

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ДВОРЯШИНА

Ирина Александровна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС НА ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА
И ПРИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ**

1.5.22. – Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
к.м.н., доцент Загребин Валерий Леонидович

Волгоград 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Онтогенез печени крыс	14
1.2. Клеточная структура печени	18
1.2.1. Гепатоциты	19
1.2.2. Холангиоциты.....	21
1.2.3. Перисинусоидальные клетки печени	22
1.2.4. Миофибробласты	24
1.2.5. Стволовые клетки печени.....	25
1.3. Промежуточные филаменты печени.....	26
1.3.1. Цитокератин 18.....	26
1.3.2. Виментин.....	27
1.3.3. Альфа гладкомышечный актин	27
1.4. Регенерация печени	28
1.4.1. Механизмы регенерации печени	30
1.4.2. Вклад различных типов клеток в процесс регенерации.....	31
1.4.3. Регенерация печени после фиброза.....	34
1.4.4. Общая характеристика и классификация эпителиально- мезенхимального перехода	35
1.4.5. Эпителиально-мезенхимальный переход в печени	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1. Схема эксперимента	44
2.2. Моделирование экспериментального фиброза печени	44
2.3. Морфологическое исследование	45
2.4. Иммуногистохимическое исследование	46
2.5. Иммуноокрашивание с двойной флуоресценцией	48

2.6. Приготовление гомогенатов из образцов печени крыс.....	49
2.7. Вестерн блоттинг	49
2.8. Статистический анализ результатов	50
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	51
3.1. Регенерации печени после химически индуцированного фиброза	51
3.2. Динамика клеточного состава эпителиального и мезенхимального ростков в печени крыс на разных этапах онтогенеза.....	59
3.2.1. Морфофункциональный анализ клеток эпителиального ростка в образцах печени крыс на разных этапах онтогенеза	59
3.2.1.1. Локализация цитокератина 18 в нормальной печени взрослых крыс	59
3.2.1.2. Локализация цитокератина 18 в печени на этапах гепатогенеза	60
3.2.1.3. Морфометрический анализ количества цитокератина 18 в печени на этапах гепатогенеза	63
3.2.2. Морфофункциональный анализ клеток мезенхимального ростка в печени крыс на разных этапах онтогенеза	65
3.2.2.1. Локализация виментина в печени взрослых крыс	65
3.2.2.2. Локализация виментина в печени на этапах гепатогенеза	66
3.2.2.3. Морфометрический анализ виментина в печени на этапах гепатогенеза	69
3.2.3. Определение соотношения виментина и цитокератина 18 в печени на этапах гепатогенеза	71
3.3. Динамика клеточного состава печени крыс на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза	77
3.3.1. Особенности мезенхимальных клеток печени крыс на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза.....	77
3.3.1.1. Особенности распределения виментина в печени на разных этапах регенерации после химически индуцированного фиброза.....	77
3.3.1.2. Особенности распределения α -SMA в печени на разных этапах регенерации после химически индуцированного фиброза.....	84

3.3.2. Особенности клеток эпителиального ростка в печени крыс на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза	90
3.3.2.1. Динамика распределения цитокератина 18 на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза.....	90
3.3.2.2. Динамика распределения рецепторов фактора роста гепатоцитов (с-Met) на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза.....	97
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
ВЫВОДЫ.....	122
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	125
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Проблема изучения регенерации печени имеет длительную историю и остается актуальной на сегодняшний день [1, 2, 3, 4, 5]. Регенерация печени – очень важная тема не только для фундаментальных ученых, но и для клиницистов.

Печень чрезвычайно восприимчива к токсическому воздействию, после которого проявляется ее регенераторный потенциал [6, 7]. Регенерация печени как компенсаторная реакция на повреждение печени была хорошо описана для нескольких токсичных веществ, таких как тиоцетамид, четыреххлористый углерод, хлороформ, ацетаминофен и аллиловый спирт [8]. Механизмы повреждения и восстановления после гепатотоксичности четыреххлористого углерода (CCl_4) изучаются с 1950-х годов и модель гепатотоксичности с четыреххлористым углеродом активно используется в течение последних десятилетий [9].

Регенерация печени играет решающую роль в определении конечного результата воздействия токсиканта, так что своевременная и пропорциональная стимуляция регенерации повреждения, но отсроченная или ингибированная регенерация приводит к прогрессированию повреждения и смерти [10]. Хотя печень обладает поразительной способностью адаптироваться к повреждениям посредством восстановления тканей, чрезмерное накопление внеклеточного матрикса во время этого процесса часто приводит к образованию рубцовой ткани и последующему фиброзу [11]. Фиброз и цирроз печени являются результатами нарушения процессов регенерации, следовательно, определение механизмов эффективной регенерации может помочь оптимизировать восстановление функциональной паренхимы печени после ее токсического повреждения.

Печеночная мезенхима широко изучалась в контексте фиброза печени; однако гораздо меньше известно о роли мезенхимальных клеток в регенерации печени. По мере углубления знаний о клеточных и молекулярных механизмах регенерации печени, ключевая роль мезенхимального компартмента во время регенеративного ответа получает все большее признание [12].

Степень разработанности темы исследования

Исследования развития [13, 14, 15, 16] и регенерации печени [17, 18, 19] получили широкое распространение в последние десятилетия, что подчеркивает важность этой темы в современной клеточной биологии и медицине. Научные работы в этой области охватывают широкий спектр вопросов, начиная от молекулярных механизмов [20, 21] и клеточных взаимодействий [22, 23] в процессе развития печени до понимания сложных процессов регенерации органа после токсического повреждения [24, 25, 26].

Однако, несмотря на значительные достижения в этой области, многие аспекты остаются недостаточно исследованными. В частности, вопросы, связанные с детальным пониманием клеточной динамики и молекулярных сигнальных путей при развитии и регенерации печени, требуют детального исследования и проработки.

Цель исследования: дать комплексную характеристику морфофункциональных изменений клеток печени на этапах онтогенеза и при репаративной регенерации печени в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Выявить структурные изменения в печени в процессе дифференцировки клеток мезенхимального и энтодермального происхождения на этапах антенатального (на 10 и 17 сутки внутриутробного развития) и постнатального развития (от новорожденности до периода молодого возраста).

2. Дать характеристику клеток паренхимы печени в процессе роста и дифференцировки с учетом изменения экспрессии маркеров клеток мезенхимального происхождения (виментин) и гепатоцитов имеющих энтодермальное происхождение (цитокератин 18) в периоды внутриутробного (на 10 и 17 сутки) и постнатального развития (от новорожденности до периода молодого возраста) с использованием методов иммуногистохимического окрашивания, двойной иммунофлуоресценции и Вестерн-блоттинга.

3. Обосновать использование экспериментальной модели химически индуцированного повреждения печени при пероральном введении

четырёххлористого углерода на фоне умеренной алкоголизации белых беспородных крыс для изучения процессов репаративной регенерации.

4. Охарактеризовать иммунофенотип клеток печени иммуногистохимическим методом с учетом изменения экспрессии виментина, α -SMA, цитокератина 18, c-Met в различные интервалы (0, 4, 8, 12 недель восстановления) репаративной регенерации после длительного воздействия на печень четырёххлористым углеродом на фоне умеренной алкоголизации.

5. Дать сравнительную характеристику механизму роста и регенерации паренхимы печени на этапах антенатального (на 10 и 17 сутки внутриутробного развития) и постнатального развития (период молочного кормления – новорожденный и подсосный возраста и продуктивный период – молодой возраст) и при репаративной регенерации печени.

Научная новизна

Впервые показано, что в процессе гепатогенеза пик экспрессии виментина наблюдается к 10 суткам внутриутробного развития крыс, а стабилизация его экспрессии в период их новорожденности.

Впервые установлено, что в динамике регенерации печени крыс происходит снижение выраженности фиброза на фоне изменений уровня экспрессии маркеров виментина, α -SMA, ЦК-18 и c-Met, что подтверждает наличие сильной прямой корреляционной связи между удельной площадью соединительной ткани и данными маркерами. Показана прямая корреляция между уровнем экспрессии виментина и рецептором фактора роста гепатоцитов.

Впервые показано наличие сильной прямой корреляционной зависимости между удельной площадью виментинпозитивного материала на этапах развития печени и репаративной регенерации печени после химически индуцированного повреждения печени.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа носит экспериментально-теоретический характер, с выраженным прикладным аспектом. С учетом выявленных особенностей цито- и гистогенеза регенерации печени определены возможные пути воздействия на него.

Новые сведения о клетках печени на этапах онтогенеза и регенерации могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах гистологии, эмбриологии, цитологии медицинских вузов и биологических факультетах университетов, а также в экспериментальной практике научно-исследовательских институтов и лабораторий, занимающихся вопросами разработки новых препаратов для восстановления функции печени.

Диссертация выполнена в соответствии с темой научной работы кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации: «Морфофункциональная характеристика мезенхимальных клеток печени крыс на этапах онтогенеза и при репаративной регенерации» и имеет регистрационный номер НИОКТР: 121060900084-5 от 08.06.2021 г.

Методология и методы исследования

Для исследования морфофункциональной характеристики клеток печени крыс на этапах онтогенеза брали эмбрионов белых беспородных крыс на 10 и 17 день после оплодотворения, печень 1-суточных и 14 суточных крысят и печень здоровых взрослых крыс.

Для исследования морфофункциональной характеристики клеток печени крыс при репаративной регенерации после химически индуцированного фиброза печени исследовали ткань печени крыс на разных стадиях выздоровления. Для этого были сформированы 4 подопытные группы - 0 дней восстановления (I группа), 4 недели восстановления (II группа), 8 недель восстановления (III группа) и 12 недель восстановления (VI группа) и контрольная группа – взрослые интактные животные. Перед началом восстановительных периодов у подопытных животных моделировали экспериментальный фиброз печени.

Крыс содержали в клетках по 8 особей в каждой в помещениях с искусственным освещением (8:00-20:00 ч. – свет, 20:00-8:00 ч. – темнота) при 20-22°C в условиях свободного доступа к воде и пище.

Моделирование экспериментального фиброза печени. В связи с этим нами была выбрана модель фиброза с субхроническим и хроническим введением ЧХУ

на фоне постоянной алкоголизации.

Патоморфологическое исследование. Материалом исследования служила ткань печени интактных и подопытных животных. Животных контрольных и подопытных групп наркотизировали диэтиловым эфиром и декапитировали. Сразу после декапитации производили забор тканей.

В работе использовались следующие методы:

1. Метод окраски гематоксилином и эозином – для оценки общегистологической картины.

2. Метод окраски по Массону – для изучения внеклеточного матрикса печени.

3. Иммуногистохимические методы с использованием моноклональных антител к антигенам крысы для выявления:

А) Актина гладкомышечных клеток (α -SMA) (BioLegend, США);

Б) Фактора роста гепатоцитов (c-Met) (Leica Microsystems, Германия);

В) Виментина (Invitrogen, США);

Г) Цитокератина-18 (Novusbio, США).

Для выявления иммуногистохимических реакций в работе применялась система визуализации Dako EnVision (Дания). На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера. Негативным контролем служили препараты без инкубации с первичными антителами при полном соблюдении остальных этапов протокола.

Результаты оценивали с применением микроскопа. Окрашенные препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа AxioImager.Z2 (ZEISS, Германия), оборудованного камерой высокого разрешения AxioCam HRm (ZEISS, Германия). Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZENpro 2012 (ZEISS, Германия).

За положительную иммуногистохимическую реакцию принимали коричневую окраску.

4. Метод иммуноокрашивания с двойной флуоресценцией с использованием комбинации первичных антител к антигенам крысы цитокератин 18 (Мышиные, моноклональные, Novusbio, США) и виментин (Кроличьи, моноклональные,

GeneTex, Int. Corp., США). После обработки первичными антителами инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 594 (козьи-антикроличьи, Abcam, Великобритания), затем еще 30 минут с вторичными антителами, конъюгированными с FITC (козьи-антимышинные, Abcam, Великобритания). Флуоресцентные препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа AxioImager.Z2 (ZEISS, Германия), оборудованного соответствующими флуоресцентными фильтрами и камерой высокого разрешения AxioCam HRm. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZENpro 2012 (ZEISS, Германия).

5. Метод иммуноблотинга Вестерн-блот – для количественной оценки белкового состава печени. После проведения электрофореза по Лэммли (Laemmli U.K., 1970) извлекали гель из камеры и собирали «сэндвич» (снизу-вверх прозрачная крышка книжки, 2 ватмана, нитроцеллюлозная мембрана Transblot Bio-Rad, 2 ватмана, чёрная крышка книжки). Перенос белков осуществляли в камере для электроблоттинга Trans-Blot (Bio-Rad, США). Нитроцеллюлозные мембраны окрашивали первичными антителами мышинными моноклональными против виментина (клон V6, Dako, Дания) и против цитокератина (клон c-04 Novusbio, США). После чего окрашивали мембраны соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с кислой фосфатазой.

6. Статистический анализ результатов. Для оценки количественных результатов применяли методы вариационной статистики. Определяли величины средних значений, стандартного отклонения, среднеквадратичного отклонения. Нормальность данных проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка. Для параметрических данных, статистическая значимость отличий средних определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA тестом с применением апостериорного критерия Тьюки (Tukey's range test). Для непараметрических данных статистическую значимость различий средних определяли с помощью рангового дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису (Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks), так же с соответствующим апостериорным тестом Данна (post-hoc Dunn's Test). Были представлены 95% доверительные

интервалы. $P < 0,05$ считалось статистически значимым.

Положения, выносимые на защиту

1. Пренатальный и постнатальный (от новорожденности до периода молодого возраста) периоды развития экспериментальных животных характеризуются возраст-специфическими иммунофенотипами клеток печени, при которых дифференцировка клеток мезенхимального происхождения опережает созревание клеток энтодермального происхождения.

2. Моделирование репаративной регенерации печени четыреххлористым углеродом на фоне умеренной алкоголизации крыс указывает на различную активность репаративных процессов в разных зонах печени – регенерация инициируется в перипортальных зонах с последующим распространением на центрлобулярные участки, о чем свидетельствует различная зональная экспрессия ключевых маркеров (виментин, α -SMA, ЦК-18 и c-Met, α -SMA и ЦК-18). Отмечается активация HGF/c-Metсигнального пути, с последующим нарастанием экспрессии α -SMA и ЦК-18, которая сопровождается увеличением числа активированных перисинусоидальных клеток печени, фибробластов и миофибробластов.

3. В процессе онтогенеза и репаративной регенерацией выявлены сходные иммунофенотипические особенности в печени - появление клеток экспрессирующих маркеры клеток мезенхимального и энтодермального происхождения, а также выявлена сильная прямая корреляционная связь между удельной площадью виментинпозитивного материала в процессе гепатогенеза и репарации паренхимы печени.

Личный вклад

В диссертационной работе автором самостоятельно выполнены все этапы исследования, материал получен, обработан и проанализирован лично автором.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные положения и результаты исследования, используются в учебном процессе в лекциях и практических занятиях на кафедре гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский

университет» Минздрава России. Метод оценки морфофункциональных изменений в паренхиме печени при экспериментальном моделировании репаративной регенерации печени внедрен в лаборатории патоморфологии ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, ГБУ «Волгоградский научный медицинский центр» и ГБУЗ «ВОПАБ». Результаты исследования в форме статей и тезисов опубликованы в отечественных научных изданиях.

Степень достоверности, апробация результатов

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, адекватных для поставленных задач современных методах исследования, статистическим анализом значимости выявленных изменений.

Основные результаты работы были представлены на всероссийской научной конференции с международным участием «Экологические аспекты морфогенеза» (Воронеж, 2015); на 75-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2017); 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2018); 77-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы, экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2019); XXIV Региональная конференция молодых ученых и исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2019); на VIII съезде научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019); VI международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения», посвященной году науки и технологий в России (Екатеринбург, 2021); на научно-практической конференции «Гигиена, токсикология и профпатология: современные решения актуальных проблем» (Волгоград, 2021); II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Современная патология: опыт, проблемы, перспективы» (Самара, 2021); Всероссийская научная

конференция посвященная 100-летию им. В.Ю. Первушина (Ставрополь, 2023).

Соответствие паспорту научной специальности

Научные положения соответствуют группе научных специальностей 1.5. Биологические науки, паспорту специальности 1.5.22. Клеточная биология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 1, 10, 22.

Структура и объём диссертации

Оформление диссертационной работы осуществлено в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11-2011. Диссертация изложена на 157 страницах, содержит 52 рисунка, 11 таблиц, 259 ссылок на литературные источники (12 отечественных и 247 зарубежных), включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практических рекомендации, список сокращений и список литературы.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 7 в журналах и изданиях, входящих в перечень научных рецензируемых изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, а также 1 статья в журнале, индексируемом Scopus.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Печень и ее регенерация – очень популярные объекты исследований уже больше 3 веков, первые описания морфологии печеночных долек относятся к 1800 годам. Однако не смотря на накопленный за столько времени экспериментальный материал, в процессах регенерации печени остается много серых зон и не ответченных вопросов. До сих пор эффективных способов стимулировать регенерацию печени при патологических состояниях не существует, трансплантация печени остается единственным способом лечения печеночной недостаточности и ученые в поисках ключевой цели, на которую можно было бы воздействовать в терапевтических целях. Альтернативой трансплантации печени стать усиление врожденной регенеративной способности печени, вероятно, регенерация печени задействует те же сигнальные пути развития, которые функционируют во время эмбрионального гепатогенеза, что продемонстрировано потребностью Wnt/ β -catenin для регенерации на животных моделях [27, 28]

Эмбриологическое происхождение печени изучается уже многие десятилетия, таким образом, события развития, которые регулируют органогенез печени, становятся хорошо понятными [29]. Важно что, по-видимому, многие из ключевых путей развития, регулирующих развитие печени, становятся активными во время процессов регенерации.

1.1. Онтогенез печени крыс

Развитие печени у крыс начинается с формирования энтодермы (5-6 день после оплодотворения), на 7-8 сутки развития формируются передняя кишка, средняя и задняя. В это время тотипотентные клетки внутренней оболочки бластоцисты дифференцируются в мультипотентные тканеспецифичные клетки. Собственно, процесс гепатогенеза начинается на 8-9 сутки эмбриогенеза, когда начинает формироваться зачаток печени, и бипотентные гепатобласты начинают внедряться в мезенхиму поперечной перегородки [30, 31]. Эксперименты с использованием метода fate-mapping показали, что печень происходит из

латеральных доменов вентральной передней кишки и небольшой группы клеток, отслеживаемых в нижней части вентральной средней линии.

Развитие печени происходит под влиянием высококонсервативных для всех позвоночных индуктивных сигналов и генетических факторов регуляции. Исследования на лягушках, курицах, зебрафиш и мышах показали, что решающее значение в индукции развития печени имеет координированное взаимодействие фактора роста фибробластов (FGF) сердечной мезодермы и костного морфогенетического белка (BMP) мезенхимы поперечной перегородки [32].

В ответ на индуктивные сигналы в клетках печёночной энтодермы передней кишки происходит экспрессия новых генов, необходимых для дальнейшей дифференцировки клеток. Для образования и дифференцировки печёночной почки необходима активация Wnt-сигнальный пути, который изначально подавляется ингибиторами для защиты передней кишки [33]. Стволовые клетки печени на этом этапе развития называются гепатобластами, приобретают столбчатую форму и встраиваются в мезенхиму поперечной перегородки для формирования печёночной почки. Миграция гепатобластов и тканеспецифическая дифференцировка, включают скоординированную интеркинетическую миграцию ядер и пролиферацию, потерю межклеточной адгезии. Ряд исследований на мутантных линиях мышей показали, что образование печёночной почки высоко контролируется сетью транскрипционных факторов, включая гематопоетический гомеобокс-фактора (Hex) [30], GATA-6, ядерный фактор гепатоцитов (HNF-6) [34], Onecut (OC-2) [35], T-box транскрипционный фактор 3 (Tbx3) [36], фактор транскрипции PROX1 [37].

Пролиферация гепатобластов заканчивается после миграции в мезехиму при воздействии цитокинов, а также факторов роста, которые вырабатывают мезенхимальные клетками поперечной перегородки (HGF, EGF, TGF, TNF). Белок Wnt9a синтезируемый клетками синусоидов стимулирует гепатобласты, что имеет большое значение в формировании цитоархитектоники печени [37]. Следовательно, эндотелиальные клетки подают определенные каскады стимулов,

которые создают сеть сигналов и обеспечивают руководство последовательными этапами гепатогенеза.

Как бипотенциальные гепатобласты, так и гепатоциты с холангиоцитами, несут в себе признаки эпителиальных клеток, что отражает их дальнейший путь дифференцировки, которая происходит под влиянием мезенхимальных клеток поперечной связки [38]. После миграции бипотенциальных гепатобластов происходит процесс дифференциации в зрелые гепатоциты и холангиоциты [32]. Холангиоциты образуются в результате активации дифференцировки Jagged-Notch сигнальным путем. Тогда как гепатоциты образуются при комплексном участии HGF и онкостатина М [39]. Правильное соотношение количества гепатоцитов и холангиоцитов достигается объединением усилий сигнальных и транскрипционных сетей. После определения пути по гепатоцитарной или холангиоцитарной линии доля бипотентных клеток резко снижается, большинство клеток становится унипотентными. Процесс окончательной дифференцировки клеток паренхимы печени продолжается и в постнатальном развитии до нескольких недель после рождения [40].

Гепатоциты, холангиоциты и овальные клетки печени происходят из гепатобластов энтодермального происхождения протоковой пластинки, позитивных к альбумину и α -фетопротейну. Считается, что овальные клетки происходят из внутридольковых канальцев и каналов Герринга, но их изначальное происхождение из клеток протоковой пластинки [41]. На 14-15 день эмбрионального развития гепатобласты, локализованные в периваскулярных пространствах начинают синтезировать и α -фетопротейн (АФП) (свойственный гепатоцитам) и цитокератины 7 и 19 (маркеры холангиоцитов) [41].

Далее начинаются процессы органогенеза, в частности образования печеночных долек и долей, морфогенез желчных протоков, морфогенез сосудистой системы печени [42]. Примечательно что печень плода является основным органом кроветворения с 9,5 по 18,5 сутки эмбрионального развития у крыс [43], на более поздних стадиях эмбрионального развития печень становится одним из основных метаболических органов, после начала медуллярного гемапоэза [7].

Цитоархитектоника порталных долек формируется посредством неравномерной пролиферации гепатобластов и перемещения их в дифинитивные положения. Но все еще мало доказательств согласованной перестройки или миграции гепатобластов, в печени эмбрионов кур были выявлены зоны роста, отвечающие за формирование печеночных долей [44]. В этих процессах дифференциального деления важную роль играют мезенхимальные клетки спланхнотома, происходящие из боковой пластинки мезодермы и покрывающие все висцеральные органы, они выделяют факторы роста, в частности бета-катенин и Wt1 (Wilms tumor1) [45]. Морфогенез печени начинается от ворот печени продвигаясь к периферии долей, что показано с помощью современных методов трехмерной визуализации, хотя их применения на ранних эмбриональных стадиях ограничено. Морфогенез протоков был изучен с помощью иммунодетекции остеопонтина (Spp1) или ЦК 19, на ранних стадиях холангиоциты образуют вокруг мезенхимы почти непрерывную протоковую пластинку, в которой затем образуются просветы, выстланные с порталной стороны холангиоцитами и с паренхиматозной стороны клетками, похожими на гепатобласты. Когда протоки созревают, гепатобласты дифференцируются в холангиоциты и выстилают желчные протоки, при этом клетки протоковой пластинки, не участвующие в формировании протоков, теряют свои молекулярные и морфологические свойства и приобретают фенотип гепатоцитов. Трехмерные исследования показали, что рост протоков непрерывен, параллельно формируется сеть внутрипеченочных желчных канальцев. [46]. Хотя наше понимание эмбрионального развития печени заметно расширилось, меньше известно о механизмах, лежащих в основе полного приобретения печеночных функций и их поддержания в постнатальной жизни. После рождения гепатоциты подвергаются зонированию, выделяются перипортальные и перицентральные гепатоциты, которые демонстрируют разные морфофункциональные характеристики [47].

1.2. Клеточная структура печени

Зрелая печень состоит из долей (четыре у человека, шесть у крыс), содержащих несколько типов клеток, включая гепатоциты, холангиоциты, эндотелиальные клетки, звездчатые клетки и клетки Купфера.

Микроанатомия печени была впервые описана Дж. Дж. Вепфером, исследовавшим печень свиньи, в 1665 году, а вскоре после этого Мальпиги в его работе «*De Viscerum Structura Exercitatio Anatomica*». В 1833 году Кирнан описал и проиллюстрировал микроскопическую анатомию долек печени, эта модель позже будет известна как «классическая» печеночная долька, согласно которой основные гистологически определенные единицы печени изображаются в виде шестиугольник, в посередине которого располагается центральная вена и портальные тракты на периферии в вершинах углов [48], границы классической печеночной дольки легко определяются у некоторых видов животных (у свиней, верблюдов, енотов и белых медведей) благодаря наличию порто-портальных фиброзных септ. Портальная долька была описана Молом в 1906 году в данной модели печеночная долька в виде треугольника, портальные тракты представляют собой центр дольки, а центральные вены в вершинах углов [49]. Модель «печеночного ацинуса» была предложена Раппапортом в 1954 году, в ней печень подразделяется на зоны в зависимости от портального кровообращения: у портальных триад выделяется зона 1, центр классической печеночной дольки у центральных вен определяется как зона 3, а зона 2 расположена между зонами 1 и 3, эта модель строения печени не определены гистологическими ориентирами ни у одного вида, получила широкое распространение в гистологии и патологической анатомии всвязи с хорошим отображением зональных паттернов гепатоцитов, клеточного метаболизма, и зональной восприимчивости к различным патологическим процессам [50]. Ранние описания архитектуры печени были основаны на расположении основных кровеносных сосудов печени, Раппапорт сформулировал понятие ацинус печени, включил в него не только микроциркуляцию крови, но и секреторную способность гепатоцитов, в

печеночном ацинусе кровь и желчь текут в противоположных направлениях [51]. Все эти модели весьма ограничены, так как двумерные, последние годы активно идут разработки трехмерной модели печени, в том числе с использованием технологий машинного обучения и компьютерного моделирования [52,53]. В состав печеночной дольки входят печеночные балки, синусоидные капилляры, центральная вена и портальные тракты. Кровоток вдоль печеночной балки создает градиенты кислорода, питательных веществ и гормонов, которые вместе с морфогенетическими полями создают весьма изменчивое микроокружение. В непосредственной близости к синусоидным капиллярам в перисинусоидаальном пространстве Диссе располагается 4 типа клеток, которые иногда объединяют в группу синусоидных клеток печени – перисинусоидаальные клетки (клетки Ито), пит-клетки, звездчатые макрофаги (клетки Купфера) [54].

1.2.1. Гепатоциты

Гепатоциты – основные клетки печени, относятся к эпителиальным клеткам энтодермального происхождения с высокой пролиферативной активностью, и составляют 60% по количеству клеток и до 80% от общей массы печени [55]. Средние размеры гепатоцитов крыс и мышей, составляют около 15-20 мкм, грубые архитектурные и морфологические изменения гепатоцитов связаны с патологическими процессами, включая сокращение клеток при апоптозе и набухание клеток при полиплоидизации гепатоцитов [56]. Гепатоциты – основные функциональные клетки печени поэтому их функции – синтез и накопление белков, синтез холестерина, гормонов и паракринных сигнальных молекул, детоксикация, метаболизм углеводов, образование желчи, во многом определяют функции печени [57]. Гепатоциты нормальной печени содержат большое количество гранулярной эндоплазматической сети, так как синтез секретируемых белков (например липопротеинов) одна из основных функций гепатоцитов [58]. В цитоплазме гепатоцитов также содержится большое количество митохондрий, которые могут компенсировать воздействие внешней среды и подавать внутриклеточные сигналы,

ведущие к адаптации клетки [59]. Технологии, основанные на транскриптомике отдельных клеток, позволили построить глобальную пространственную карту экспрессии генов гепатоцитов у мышей, показав, что ~ 50% генов гепатоцитов экспрессируются зонально. Эта широкая пространственная гетерогенность предполагает, что гепатоциты в разных зонах долек могут иметь не только разные профили экспрессии генов, но также различные эпигенетические особенности, регенеративные способности, восприимчивость к повреждениям и другие функциональные аспекты [60]. Метаболические функции распределяются среди гепатоцитов в соответствии с их положением вдоль porto-центральной оси. Функции, такие как синтез альбумина и гликогена, глюконеогенез и цикл мочевины, требующие АТФ, выполняются в богатых кислородом перипортальных гепатоцитах. Периферические гепатоциты отвечают за синтез желчных кислот и участвуют в метаболизме аммиака, тогда как гепатоциты в остальной средней зоне участвуют в различных метаболических реакциях, опосредованных цитохромом P450. Этот функциональный паттерн известен как метаболическая зональность паренхимы печени. Для выполнения этих сложных и пространственно скоординированных функций гепатоциты должны экспрессировать большой набор генов. Сложная система сигналов, транскрипционных факторов и эпигенетических механизмов обеспечивает сохранение специфического для печени паттерна экспрессии генов (во взрослом возрасте [61]). Гепатоциты имеют иммунную функцию, могут участвовать в качестве антигенпредставляющих клеток, но они не экспрессируют костимулирующие молекулы CD80 и CD86, следовательно, они индуцируют функциональную активацию Т-клеток, но не способствуют выживанию. Кроме того, гепатоциты также могут экспрессировать PD-L1 в ответ на интерферон типа I и II с последующей индукцией апоптоза Т-клеток [62].

1.2.2. Холангиоциты

Холангиоциты (эпителиальные клетки желчных протоков) выстилают просвет внутрипеченочных и внепеченочных желчных протоков представляют собой высокоспециализированные клетки и участвуют в выработке желчи, могут участвовать в регенерации печени проявляя клеточную пластичность, когда регенерация гепатоцитов нарушена, в паренхиме печени холангиоциты локализуются в портальных трактах [63]. Несмотря на то, что доля холангиоцитов от всех клеток печени (меньше 5%), они ответственны за до 30% общего потока желчи у человека, а остальные 70% происходят из канальцевой секреции гепатоцитов [64]. Как и другие эпителиальные клетки, холангиоцитам характерна апикально-базолатеральная полярность, с которой связаны множество транспортных функций, многие из которых имеют отношение к образованию желчи. В здоровых условиях холангиоциты выполняют основные функции: желчь модифицируется в просвете протока посредством активности в их апикальном домене плазматической мембраны; за счет плотных контактов между холангиоцитами и молекул IgA на их поверхности формируется с одной стороны непроницаемый барьер для патогенов и ксенобиотиков, с другой стороны в базальном компартменте происходят процессы антигенпрезентирования патогенов и взаимодействие с иммунной и сосудистой системами. Воздействие внеклеточных сигнальных молекул, желчных кислот и физических сил (скорость и давление жидкости) продолжается в различных внутриклеточных путях, полагаясь главным образом на передачу сигналов цАМФ и Ca^{2+} в качестве вторичных мессенджеров. [65] таким образом регулируя механизмы, связанные с желчеобразованием.

По всей билиарной системе холангиоциты обнаруживают морфологическую, биохимическую и функциональную гетерогенность, незрелые холангиоциты в каналах Геринга, а также из внутрипеченочных и внепеченочных перибилиарных желез слабо дифференцированы и могут рассцениваться как низкодифференцированные клетки, способные к пролиерации и замещению гепатоцитов в том числе по ходу желчевыводящих путей, от холангиол к желчным

протокам обнаруживаются все более зрелые холангиоциты с более выраженной клеточной полярностью, большим разнообразием поверхностных рецепторов, транспортных молекул и возможного ответа на гормоны, эта дифференциация также может быть частично обусловлена различиями в васкуляризации холангиоцитов вдоль желчного дерева [66]. Холангиоциты могут активироваться при различных воздействиях, включая инфекции, холестаза, ишемию и ксенобиотики, активированные холангиоциты характеризуются повышенной пролиферацией и профибротической и провоспалительной секрецией [67]

1.2.3. Перисинусоидальные клетки печени

Перисинусоидальные клетки печени — это резидентные клетки, распределенные по всей печени, с широким набором функций в нормальной и поврежденной печени. Перисинусоидальные клетки (ПК) печени впервые были описаны в 1876г Карлом Ван Купфером как непаренхиматозные клетки звездчатой формы. В полученном материале непаренхиматозных клеток были обнаружены клетки с фагоцитарной активностью. С тех пор название звездчатые клетки Купфера стало синонимом печеночных макрофагов. В 1952 году Ито отделил от печеночных макрофагов (которые продолжили называть клетками Купфера) другие клетки печеночных синусоидов, которые обладали способностью к жирозапасаению. В 1966 г Бронфенмайор переименовал эти клетки в жирозапасающие липоциты (fat storing cells lipocite). В 1977г Вэйк выделил и описал клетки Купфера и клетки Ито, последние были описаны как витамин-А запасающие клетки синусоидального пространства печени. С тех пор один и тот же тип клеток синусоидального пространства печени имел 3 названия – клетки Ито, жирозапасающие клетки и липоциты. После того как выяснилось, что данные клетки при определенных условиях могут активироваться и трансформироваться в миофибробласты и вырабатывать α -SMA, морфологическое сообщество добилось что бы этот клеточный тип назывался согласно его морфологии – перисинусоидальные клетки печени [68].

Согласно Ито, Бронфенмаеру и Вэйку, Перисинусоидальные клетки – клетки синусоидов печени, содержащие жировые включения (включения витамина А) с отростками способными по длине охватить пару гепатоцитов. Они составляют до 5% от числа клеток нормальной печени, и порядка 1% общей массы печени. ПК локализуются в субэндотелиальном пространстве, между базалатеральной стороной гепатоцита и алиминальной стороной эндотелиоцита синусоидального пространства. ПК нормальной печени имеют веретеновидное клеточное тело, с отростками, ядро овальной или вытянутой формы. Ультраструктурно ПК имеют умеренно развитую эндоплазматическую сеть, слабо развитый аппарат Гольджи. Отростки ПК простираются между паренхиматозными клетками печени, и по длине сопоставимы с 2 гепатоцитами. Одна ПК охватывает более 2 синусоидов, отростки альвеолярной стороны клетки пересекают пространство Диссе и образуют контакт с гепатоцитами. Этот клеточный контакт между ПК и её соседями межклеточному транспорту растворимых медиаторов и цитокинов [69].

ПК имеют несколько важных функциональных ролей в печени. Это центральное место хранения витамина А в печени в частности, и в организме человека в целом. Так же ПК являются ключевыми клетками, синтезирующими ВКМ печени, так же ферменты ПК выступают и в роли антиген-презентирующий клеток печени [70].

В результате повреждения печени, например, алкогольная интоксикация, вирусная инфекция, токсическое воздействие ксенобиотиков, ЗК подвергаются активации. В процессе активации, покоящиеся ЗК становятся пролиферирующими, сократимыми миофибробластами, которые производят излишки ВКМ, в то же время они теряют способность к накоплению ретиноидов.

Активация ПК происходит в 2 этапа – инициация и перпетуация. Инициация, или предвоспалительная стадия, отвечает за ранние изменения в экспрессии генов и фенотипе клеток. Первая стадия активации ЗК - результат начальной паракринной стимуляции от поврежденных паренхиматозных клеток. В случае, если подобный паракринный сигнал продолжает поступать, активация ПК переходит на следующий этап – перпетуация. Перпетуация включает в себя 6

чётких изменений в свойствах ПК, они приобретают способность к пролиферации, хемотаксису, фиброгенезу, сократимости, деградации матрикса, а также теряют ретиноиды из своей цитоплазмы [71].

1.2.4. Миофибробласты

Печеночные миофибробласты (МФ) – гетерогенная популяция α -SMA-положительных профиброгенных клеток, которые определяются в ткани печени при хроническом повреждении (фиброз или цирроз) в клинических или экспериментальных условиях. [72] Главные особенности МФ – синтез компонентов ВКМ и способность к сокращению. Хотя ПК являются главным источником МФ в печени, данный тип клеток может происходить и из других источников – порталных фибробластов, циркулирующих фиброцитов и клеток красного костного мозга, посредством эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Например, в случаях ишемии печени или холестаза порталные фибробласты, которые в норме являются покоящимися клетками, но могут активироваться в МФ печени в ответ на повреждение [73]. Так же клетки красного костного мозга могут служить источниками МФ-подобных клеток, хотя это и весьма ограниченная роль мезенхимальных клеток красного костного мозга в прогрессировании фиброза и цирроза печени после токсического воздействия. Эпителиальные клетки могут заменить повреждённые клетки посредством ЭМП - этот процесс позволяет эпителиальной клетке с апикально-базальной полярностью приобрести способность к миграции и синтезу компонентов ВКМ, приобретая таким образом мезенхимальный фенотип [74].

Основываясь на антигенном профиле МФ и их локализации в органе выделяют несколько типов МФ:

а) порталные/септальные МФ, которые несут широкий антигенный профиль, и обычно обнаруживаются вокруг порталных трактов (портальные МФ) или с внутренней стороны септ (септальные);

б) поверхностные МФ – обнаруживаются при активном фиброгенезе и на границе между фиброзной перегородкой и здоровой тканью;

в) активированные миофибробластоподобные ПК - α -SMA-позитивные, локализованный в основном в или вокруг капилляризированных синусоид фибротической или цирротической печени [75].

1.2.5. Стволовые клетки печени

Вилсон и Ледук в время исследования регенерации печени у мышей после длительной интоксикации метионином обнаружили что паренхима печени может восстанавливаться в отсутствие деления гепатоцитов и обнаружили таким образом стволовые клетки (СК) печени в 1958 году [76].

На данный момент к стволовым клеткам печени относят две субпопуляции клеток – овалынные клетки печени, резидентные клетки печени, и мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, которые происходят из эмбриональной мезодермы и доставляются в печень от костного мозга. Обе субпопуляции могут давать начало как гепатоцитам, так и холангиоцитам. Для стволовых клеток характерно наличие маркеров клеток желчных протоков (цитокератин 19, А6 и OV6) и маркеров эмбриональных гепатоцитов (АФП и альбумин) [77].

Однако овалынные клетки не могут давать начало типичным гепатоцитам, и по всей видимости участвуют в формировании сети желчных сосудов, а также отвечают за формирование специфической гистоархетиктоники органа. [78]. Наряду с этим, выделяют отдельную субпопуляцию гепатоцитов – гибридные гепатоциты. Гибридные гепатоциты несут на своей поверхности как мезенхимные, так и эпителиальные маркеры. И по всей видимости именно они отвечают за восстановление паренхимы печени при хроническом токсическом поражении органа. Вопрос о том, являются ли эти клетки отдельным типом гепатоцитов, или клетками на стадии эпителиально-мезенхимального перехода [79].

Так же, некоторые авторы относят к стволовым клеткам перисинусоидальные клетки, порталынные миофибробласты, эндотелиоциты. Активированные

перисинусоидальные клетки, возможно обладают способностью к пролиферации, об этом говорит тот факт, что были получены иммортализованные линии ПК человека, однако ряд исследователей отрицает возможность митотического деления у ПК. В отличие от ПК, миофибробласты сохраняют свою способность к митотическому делению, поэтому могут быть классифицированы как стволовые клетки печени [80]. Эндотелиальные клетки способны к клоногенному росту и образованию сосудов, так же эндотелиальные клетки печени способствуют повышению выживаемости гепатоцитов при кокультивировании *in vitro*. Клеточные линии эндотелиоцитов обладают ограниченной способностью к делению, однако были получены иммортализованные линии эндотелиоцитов [81]. Однако несмотря на то, что стромальные клетки обладают некоторым потенциалом к пролиферации, отнести их к собственно стволовым клеткам печени нельзя.

1.3. Промежуточные филаменты печени

1.3.1. Цитокератин 18

Цитокератины – семейство фибриллярных белков, из числа промежуточных филаментов, которые ассоциированы с эпителиальными тканями. Цитокератины основываясь на классификации Молла подразделяют на 2 типа: кератины типа I – кислые, кератины типа II – основные или нейтральные белки [82].

Цитокератин 18 (ЦК-18) — это промежуточный микрофиламент, составляющий 5% от всех печеночных белков [83]. В клетках здоровой печени ЦК-18 локализуется на поверхности гепатоцитов. Кератины в печени имеют механические и немеханические функции. Механическая функция ЦК-18 сходна с механической функцией других филаментов – он обеспечивает стабильность формы гепатоцитов, защищая их от некроза. Немеханические функция включают в себя – облечение протеинового таргетирования на субклеточные структуры,

модуляцию белкового синтеза, позиционирование органелл (и защиту от апоптоза и некроза) [84].

1.3.2. Виментин

Виментин относится к числу промежуточных микрофиламентов III типа и является маркером клеток мезенхимальной природы. Виментин участвует в поддержании формы клеток, обеспечении их подвижности, а также способствует стрессовой устойчивости мезенхимальных, в процессах заживления ран, так же виментин регулирует синтез коллагена, так как способен стабилизировать мРНК коллагена I типа.

Ген виментина активно экспрессируется на протяжении фетального и постнатального развития печени, что может свидетельствовать о высокой роли виментина в процессе формирования ткани печени и созревания гистоархитектоники.

Виментин широко используется в качестве маркера эпителиально-мезенхимального перехода, так как индуцирует изменение формы, подвижности и адгезии эпителиальных [85]. Во время обратного процесса мезенхимально-эпителиального перехода экспрессия виментина снижается, поскольку снижается подвижность клеток, они принимают эпителиальные характеристики [86]

1.3.3. Альфа гладкомышечный актин

Актин гладкомышечных клеток (α -SMA) специфична для миофибробластов изоформа белка актина, чаще всего встречается в гладкомышечных клетках сосудов. В паренхиме органов миофибробласты участвуют в процессе фиброгенеза и содержат цитоплазматическую форму α -SMA [87].

Актин — это глобулярный структурный белок, который спирально полимеризуется, образуя актиновые филаменты, образующие цитоскелет.

Актиновые филаменты обеспечивают механическую поддержку клетки, определяют её форму, обеспечивают подвижность [88].

В нормальной ткани печени α -SMA локализуется в клетках перисинусоидальных пространств, эндотелиоцитах портальных триад и центральных вен. Небольшое количество α -SMA так же обнаружено в цитоплазме перисинусоидальных клеток печени. В случае фиброза печени число α -SMA – позитивных клеток растёт. При фиброзе печени α -SMA локализуется в фиброзных септах, миофибробластах, а также в перисинусоидальных клетках. [89]

1.4. Регенерация печени

Печень известна своими регенераторными возможностями, так она способна восстанавливать 70% потерю ткани за несколько недель. Репаративная регенерация печени — это процесс, посредством которого поврежденная паренхима печени восстанавливается в объеме и функционально из оставшихся неповрежденными клеток [90]. Для изучения процессов репаративной регенерации используется несколько экспериментальных моделей повреждения печени – модель частичной гепатэктомии, модели токсического повреждения печени, модели с особенностями диеты у животных.

Модель частичной гепатэктомии была впервые описана в 1931 году и до сих пор широко используется на животных для изучения регенерации печени. В стандартной модели частичной гепатэктомии происходит удаление 2/3 печени, после которой происходит восстановление массы и функции органа [91]. За частичной гепатэктомией активируется серия клеточных сигналов, в активируемых гепатоцитарным фактором роста (HGF) и эндотелиальным фактором роста, эпидермальным фактором роста (EGF), тромбоспондином-1, серотонином и трансформирующим фактором роста β (TGF- β), которые координируют пролиферацию оставшихся гепатоцитов и непаренхиматозных клеток печени. У грызунов (крыс и мышей) полная регенерация печени может проходить за 7-10 дней [92].

Сейчас существует несколько моделей химического повреждения, например, использование четыреххлористого углерода (ЧХУ), алкоголя, парацетамола. Применение этих моделей химически индуцированного повреждения печени вызывают воспалительную реакцию, повреждение и гибель клеток печени, что приближает животную модель к регенеративной реакции, возникающей при заболеваниях печени человека [93]. Использование модели хронического токсического повреждения ЧХУ приводит к подавлению нормальной регенерации печени, так как блокирует пролиферацию гепатоцитов и приводит к активации альтернативных путей репаративной регенерации [94]. Модели повреждения печени со специфической диетой. Диетические модели. Для моделирования заболеваний печени у мышей могут добавлять в питание 1,4-дигидро-2,4,6-триметил-пиридин-3,5-дикарбоксилата, что приводит к повреждению и последующей регенерации желчевыводящих путей [95]. Холин-дефицитная этиониновая диета другой пример модели специфической диеты, которая используется на мышах, вызывает стеатоз печени и последующий протоковые реакции и ответ клеток из портального тракта и овальных клеток печени [96].

После частичной гепатэктомии или частичной трансплантации печени регенерация печени приводит к следующим последствиям, таким как гемодинамические изменения в портальном венозном потоке или давлении, тканевая гипоксия и активация тромбоцитов [97]. При использовании ЧХУ модели химически индуцированного повреждения печени или лекарственного повреждения печени с использованием парацетамола при повреждении и регенерации печени проявляется зональность гепатоцитов [98]. Периферические гепатоциты, которые в норме отвечают за детоксикацию чужеродных веществ, погибают в следствие токсического повреждения. Оставшаяся паренхима печени переходит в регенеративный режим. [98].

Вероятно, ответ о механизме регенерации печени имеет множественные ответы и зависит от того какого характера было повреждение.

1.4.1. Механизмы регенерации печени

В научной литературе выделяют несколько моделей, объясняющих механизм регенерации паренхимы печени: протоковая печень [99], стволовые клетки печени [100], концепция овальных клеток [101], концепция клеточной пластичности [102].

Протоковая печень или дуктулярная реакция – это одна из основных моделей регенерации печени, которая заключается в пролиферации холангиоцитов, характерной для острых и хронических повреждений печени, является репаративной реакцией на повреждение холангиоцитов и наиболее выражена при ограничениях пролиферации гепатоцитов [103]. Хотя дуктулярная реакция является частым признаком патологий печени, включая холангиопатии, вирусные гепатиты, алкогольные и неалкогольные жировые заболевания печени, подавление протоковой реакции усугубляет, а ее стимулирование может облегчить повреждение печени [104]. Протоковая реакция обычно имеет гистологическую картину пролиферации холангиоцитов или трансдифференцировки гепатоцитов в холангиоциты и может проявляться в виде множественных мелких протоков [105]. Помимо образования клеток для замены поврежденных холангиоцитов протоковая реакция может способствовать регенерации в условиях травмы за счет образования гепатоцитов из холангиоцитов [106].

Клеточная пластичность тоже может лежать в основе регенерации печени, при это та или иная форма пластичности характерна для гепатоцитов, холангиоцитов и макрофагов [102]. Прямые способы отслеживание клеточных линий как метод отслеживания клонов показали, что прогениторные стволовые клетки печени могут образовываться в как дедифференцировки гепатоцитов [107], зрелые гепатоциты так же способны к трансдифференцировке в холангиоциты при необходимости [108]. В свою очередь при хроническом повреждении печени гепатоциты могут образовываться из холангиоцитов посредством активации mTORC1 и the BMP сигнального пути – так же проявление клеточной пластичности в регенерации печени [109].

Так же существует теория, о том, что гематопозитические клетки красного костного мозга участвуют в регенерации печени [110]. Однако противники этой теории указывают на то, что количество гематопозитических клеток во взрослой печени крайне мало, а те клетки, которые имеют иммунофенотип клеток красного костного мозга являются плюрипотентными стволовыми клетками печени со схожим профилем иммуногистохимических маркеров. Хотя есть вероятность что небольшая доля овальных клеток печени может иметь костномозговое происхождение мозга, что продемонстрировали последние эксперименты на животных, тем не менее не больше 4% от всех гепатоцитов печени гепатоцитов могут быть полученны таким путём [111]. Регенерация паренхимы печени за счёт овальных клеток печени происходит, в частности, при массивном циррозе печени, в то время, когда репликация гепатоцитов снижена, но данный тип регенерации не считается основным. В целом, репродукция овальных клеток возможна, когда пролиферация гепатоцитов заблокирована.

1.4.2. Вклад различных типов клеток в процесс регенерации.

Гепатоциты составляют 90% клеток печени [112], являясь основой регенерации печени. Общепринятыми являются три механизма включения гепатоцитов в процессы регенерации печени: через пролиферацию [113], гипертрофию [114] и полиплоидизацию [115]. Базовым способом регенерации печени считается пролиферация гепатоцитов, который запускается при участии нескольких дублирующих сигнальных путей гепатоциты переходят из стадии G₀ клеточного цикла в стадию G₁ и в конечном счете количество гепатоцитов увеличивается и восстанавливается до нормального [116]. В ответ на повреждение печени начинается пролиферация гепатоцитов, а затем в процесс клеточного деления включаются холангиоциты, звездчатые макрофаги (клетки Купфера), эндотелиоциты [90]. Полиплоидные гепатоциты обнаруживаются в печени в норме (20-50% гепатоцитов у людей и до 90% гепатоцитов у мышей полиплоидные) и вероятно являются более стабильными в аспекте генотоксичности, эта

популяция активизируется в процессе регенерации печени генерируя большое количество дочерних клеток, которые сохраняют свою полиплоидность посредством полиплоидного конвейера [117]. В целом гипертрофия является компенсаторной реакцией на потерю части органа, увеличение массы печени при регенерации после частичной гепатэктомии происходит в основном за счет пролиферации гепатоцитов, но уже через 36 часов после гепатэктомии в паренхиме печени появляются значительно увеличенные гипертрофированные гепатоциты, таким образом за счет особенностей гепатоцитов и пролиферация и гипертрофия запускаются в ответ на повреждение печени [118].

Пролиферация гепатоцитов хоть и является основным способом регенерации при кратковременном или слабом повреждении печени, в условиях когда повреждение хроническое, тяжелое и обширное или способность гепатоцитов к пролиферации подавлена, запасные механизмы регенерации печени которые активны и на фоне гепатоцитарной регенерации, но выражены меньше, в таких альтернативных способах регенерации может происходить активация макрофагов, стромальных клеток печени, звездчатых клеток печени и овальных клеток печени, при этом альтернативные пути регенерации они [119].

Вопрос о том могут ли другие типы клеток печени участвовать в регенерации и становиться источниками гепатоцитов остается спорным до сих пор.

Холангиоциты могут способствовать регенерации печени, когда регенерация гепатоцитов нарушена. Слабо дифференцированные холангиоциты считаются клетками-предшественниками, участвующими в обновлении паренхимы печени и ее регенерации. В последнее десятилетие с появлением методов отслеживания клонов молекулярные механизмы, управляющие регенерацией желчных путей были более четко определены и показана возможность образования гепатоцитоподобных клеток из холангиоцитов [120].

Овальные клетки печени описывают как стволовых клеток печени или сохранившиеся с эмбрионального развития бипотенциальные гепатобласты, из них так же, как из гепатобластов могут образовываться гепатоциты и холангиоциты в зависимости от микроокружения и поступивших сигналов [111]. В 1950 году в

исследовании повреждения печени после введения химических канцерогенов крысам, впервые описаны овальные клетки печени, которые сначала появлялись в перипортальной области и со временем распространялись по всей печеной дольке [121]. Далее было обнаружено, что овальные клетки экспрессируют маркеры печени плода, такие как АФП, и из овальных клеток могут происходить гепатоциты, холангиоциты и перипортальные клетки [122].

Перисинусоидальные клетки печени (клетки Ито) представляют собой основной тип стромальных клеток печени и составляют примерно одну треть непаренхиматозных клеток и 8% всех клеток нормальной печени, где они находятся в покое состоянии и запасают витамина А. В физиологических условиях перисинусоидальные клетки регулируют количество ВКМ в пространстве Диссе за счет секреции белков ВКМ, металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов, также они продуцируют ряд факторов роста и других медиаторов, включая фактор роста гепатоцитов и фактор роста эндотелия сосудов. После повреждения печени перисинусоидальные клетки активируются, теряют капли ретиноидов, экспрессируют альфа-актин гладких мышц (α -SMA), приобретают фенотип миофибробластов и начинают активно синтезировать ВКМ, образуя временный рубец на месте травмы и помогая защититься от продолжающегося повреждения [123]. Было показано, что перисинусоидальные клетки печени выступают в качестве микроокружения, оказывая таким образом влияние на другие типы печеночных клеток во время развития и регенерации печени [124], опосредованное выработкой факторы роста и цитокины, а также ремоделирование ВКМ. Перисинусоидальные клетки печени синтезируют HGF в виде биологически неактивного одноцепочечного полипептида, который хранится во внеклеточном матриксе в больших количествах. Его рецептор (c-Met) экспрессируется в гепатоцитах, желчных клетках и эндотелиальных клетках. HGF играет ключевую роль в инициации регенерации печени, активируя ее рецепторы на ранних этапах после повреждения и действуя как прямой митоген для гепатоцитов.

Макрофаги воздействуют на гепатоциты во время регенерации печени выступая инициаторами пролиферации гепатоцитов и овальных клеток печени

посредством передачи сигналов по пути Tweak/Fn1, и индуцировать дифференцировку последних в гепатоциты по пути Wnt3a (Wnt Family Member 3A) [125]. Последние результаты показывают, что макрофаги и моноциты тоже могут трансформироваться в миофибробласты наряду с перисинусоидальными клетками, гепатоцитами и холангиоцитами в результате макрофагально-миофибробластного перехода на модели фиброза печени, индуцированного ЧХУ и модели неалкогольной жировой болезни печени [126].

1.4.3. Регенерация печени после фиброза

Фиброз печени у грызунов и людей — это динамичный двунаправленный процесс, который обладает способностью к ремоделированию и регенерации ткани.

Регенерация печени после фиброза характеризуется резорбцией компонентов ВКМ, а также потерей миофибробластов в районе соединительнотканых септ [127]. Ответ и количество миофибробластов может играть ключевую роль в нормальном и избыточном заживлении ткани после повреждения. Существуют множественные механизмы регуляции количества миофибробластов, в том числе апоптоз и мезенхимально-эпителиальный переход, хотя некоторые авторы отрицают роль ЭМП в разрешении фиброза [128]. Выживаемость миофибробластов при фиброзе печени может быть связана с влиянием антиапоптотических факторов, таких как TGF β и TIMP1 или реакцией на сигналы выживания, которые опосредуются NF- κ B (ядерный транскрипционный фактор активации В-клеток κ B) каскадом и киназной активностью [129]. Активированные перисинусоидальные клетки экспрессируют рецепторы смерти (например, FAS-лиганд, TNF1 рецептор, p75, TRAIL (лиганд фактора некроза опухоли) могут стимулировать апоптоз. Индукция апоптоза миофибробластов перисинусоидальными клетками ускоряет разрешение фиброза.

К тому же некоторые миофибробласты, полученные из перисинусоидальных клеток, могут просто стареть — снижается их способность синтезировать

компоненты ВКМ, цитокины и ММП, и затем они выходят из клеточного цикла. [130]. Роль перисинусоидальных клеток в регенерации печени после фиброза обширна, так как реверсия их активации способствовала прекращению фиброгенеза [131]. При разрешении фиброза примерно 50% миофибробластов принимают промежуточный фенотип, подавляют свою фиброгенную активность и восстанавливают фенотип поящихся ПК, хотя они не становятся идентичными ПК, которые никогда не были активированны [132]. Эта инактивация миофибробластов ассоциирована с белками теплового шока Hspa1a и Hspa1b, которые регулируют выживание ЗК в культуре и в естественных условиях

Натуральные киллеры и печень-специфические $\gamma\delta$ Т-клетки также участвуют в разрешении фиброза печени. После их активации интерфероном γ они могут вызвать быстрое уничтожение перисинусоидальных клеток печени.

1.4.4. Общая характеристика и классификация эпителиально-мезенхимального перехода

ЭМП — процесс, при котором клетки эпителия преобразуются в мезенхимальные за счет постепенной потери характерных эпителиальных признаков и одновременного приобретения мезенхимальных характеристик. Выделяют и обратный процесс мезенхимально-эпителиальный переход.

Эпителиальные клетки в процессе ЭМП перестают синтезировать типичные для них белки, а также теряют апикально-базальную ориентацию, и при этом приобретают ключевые мезенхимальные характеристики – способность к миграции и вторжению в окружающий матрикс. Для приобретения мезенхимальный фенотипа необходима перестройка цитоскелета, индукция синтеза мезенхимальных филаментов и ферментов деградирующих ВКМ, а также синтез новых компонентов ВКМ [133]. Запуск и дальнейшее развитие ЭМП происходит в виде цепочки последовательных изменений, которые происходят постепенно и отражаются в изменении экспрессии генов, отвечающих за мезенхимальный и эпителиальный иммунофенотип клеток. Ряд различных

молекулярных процессов необходим для инициации и завершения процесса ЭМП. В том числе, активация факторов транскрипции, экспрессия генов специфических белков клеточной поверхности, перестройка белков цитоскелета, синтез ВКМ деградирующих ферментов и изменения в экспрессии генов специфических микроРНК. [134].

Впервые эпителиально-мезенхимальная трансформация была описана в 1995г в работе Elizabeth Nau, с использованием модели первичной полоски куриного эмбриона [135]. Затем термин «трансформация» был заменён на «переход», чтобы отобразить его обратимость и показать отличие от неопластической трансформации. Помимо прямого ЭМП возможен и обратный процесс МЭП, при нем происходит преобразование мезенхимальных клеток в эпителиальные. О механизме МЭП относительно мало известно на данный момент, наиболее изучена роль МЭП в образовании почек и тубологенезе [136, 137,138]

ЭМП/МЭП происходит при образовании и перестройке ткани. То есть, процессы ЭМП/МЭП характерны для эмбрионального развития, регенерации тканей, фиброза органов и для неопластических состояний. Основываясь на этом, выделяют 3 вида ЭМП.

ЭМП 1 типа происходит во время имплантации, эмбриогенеза и развития органов. Помимо других результатов ЭМП 1 типа образуется мезодермальная и энтодермальная мезенхима, которая затем включается в процесс МЭП для генерации вторичного эпителия, который в свою очередь подвергается серии ЭМП/МЭП для формирования различных органов.

ЭМП 2 типа связан с репаративными процессами во взрослом организме. В случае острого воспаления, как правило, вновь образованные фибробласты подвергаются апоптозу. Однако, если повреждение имеет хронический характер, ЭМП генерирует клетки соединительной ткани (в том числе миофибробласты), способные синтезировать внеклеточный матрикс, в результате чего происходит его избыточное накопление с последующим фиброзированием [139].

ЭМП 3 типа связывают с раковым преобразованием эпителиальных клеток считается, что за счет этого процесса злокачественные клетки приобретают

способность инвазивного роста и формирования метастатических очагов вдали от первичной опухоли [140]. Различные типы ЭМП представляют различные биологические процессы, и, следовательно, имеют различные уникальные особенности.

Большинство существующих фундаментальных знаний о регуляции ЭМП было получено путём изучения культур клеток, поскольку его относительно легко индуцировать в культивируемых эпителиальных клетках с одной стороны, с другой стороны это способ прямого доказательства клеточной пластичности [141], дополнительные сведения о регуляции ЭМП были получены путём исследования органогенеза [142]. Важно подчеркнуть, что механизмы регуляции ЭМП, происходящие в культурах злокачественных клеток, не могут полностью совпадать с механизмами, которые контролируют ЭМП в интактных тканях.

В исследованиях на культурах клеток и эмбриональных клетках было обнаружено, что активация специфических рецепторов к TGF- β провоцировала ЭМП [143]. в то время как BMP-7 возможно является отрицательным регулятором ЭМП, так как обычно [144], но не всегда [145], выступает блокатором рецепторов TGF- β . В ходе экспериментов блокировали рецепторы к TGF- β и BMP-7, эти исследования показали, что данные механизмы регуляции ЭМП запускают множество процессов, которые приводят к тому, эпителиальные клетки теряют свой характерный фенотип и приобретают мезенхимальные характеристики поэтапно и каждый этап регулируется своим сигнальным путем [146]. Выделяют следующие этапы ЭМП: сначала происходит потеря межклеточных контактов и апикально-базальной ориентации, затем начинается перестройка цитоскелета, приобретени подвижного и инвазивного фенотипа, следующий этап начинается только после того, как завершился предыдущий. В любой момент времени отдельные клетки в культуре или ткани могут находиться на различных этапах ЭМП, в зависимости от того, какие сигналы уже были запущены, и какие сигналы нет [147]. Эта неоднородность клеточного состава, затрудняет идентификацию клеток, которые проходят ЭМП, особенно в интактных тканях [139, 141].

Так как процесс ЭМП длительный и этапный, выделяют отдельную группу клеток с частичным ЭМП [148], эти клетки называют переходными или гибридными, так как они способны к коэкспрессии маркеров эпителиальных и мезенхимальных клеток, это свойство клеток зачастую используют для идентификации процесса клеточного перехода при морфологическом исследовании [141]. Однако следует признать, что эпителиальные клетки входят в ЭМП до того, как начали синтезировать мезенхимальные клетки, как и то, что мезенхимальные клетки отличаются значительной динамичностью [149]. Ещё сложнее показать, что клетка находится в МЭП, предполагается, что обратное последовательное выключение сигналов, приведших к ЭМП, приведёт к восстановлению эпителиального фенотипа. Возможность того, что клетки могут проходить ЭМП и МЭП дают дополнительные доказательства пластичности клеток, но усложняет возможность проследить судьбу или доказать происхождение отдельных фибробластов, особенно в интактных тканях.

1.4.5. Эпителиально-мезенхимальный переход в печени

Три типа культивируемых клеток зрелой печени могут подвергаться ЭМП или МЭП, а именно: гепатоциты, холангиоциты и перисинусоидальные клетки печени.

Несколько групп исследователей показали, что обработка первичных гепатоцитов или гепатоцитов клеточных линий сублетальными дозами TGF- β приводит к снижению экспрессии генов используемых в качестве маркеров эпителиальных клеток, например альбумин и цитокератин, и одновременному повышению синтеза белков, используемых в качестве маркеров мезенхимальных клеток, в том числе коллагены разных типов, α -SMA, фибробласт-специфический белок, что приводит к миграционной способности. Первичные гепатоциты крыс с ЧХУ-индуцированным циррозом печени, имели свойственные для мезенхимальных клеток морфологические признаки [150, 151, 152, 153]. Неисключено что в условиях *in vivo* могут происходить идентичные процессы, что и при индуцировании ЭМП в культурах эукариот.

Одним из способов индуцирования ЭМП в клеточной культуре холангиоцитов является добавление в культуральную среду питательной среды от миофибробластов, что приводит к подавлению активности генов эпителиальных клеток и усилению генов мезенхимальных клеток [154]. *In vivo* при моделировании биллиарного цирроза путем лигирования желчных протоков холангиоциты могли одновременно синтезировать белки-маркеры эпителиальных и мезенхимальных клеток, что расценивается как признак ЭМП [155]. В холангиоцитах желчных протоков человека так же была обнаружена коэкспрессия эпителиальных и мезенхимальных маркеров, так же обработка культивируемых первичных холангиоцитов TGF- β индуцировала экспрессию мезенхимальных генов [156]. Наконец, одновременная локализация цитокератина 19 (маркер эпителиальных клеток) и нескольких мезенхимальных маркеров была обнаружена в исследованиях первичной биллиарной атрезии и некоторых других патологических состояний, связанных с пролиферацией желчевыводящих протоков [157]. Таким образом, существуют убедительные доказательства, что холангиоциты, как и гепатоциты, способны проходить ЭМП *in vitro* и, возможно, *in vivo*.

Перисинусоидальные клетки печени, возможно, тоже способны к МЭП. Исследования показали, что перисинусоидальные клетки происходят из субмезотелиальных клеток в процессе развития печени [158]. Считается, что субмезотелиальные клетки происходят путём ЭМП из примитивного целомического эпителия [159]. Покоящиеся перисинусоидальные клетки могут быть переходными клетками, происходящими из эпителиальных клеток, которые подверглись частичному ЭМП, эта концепция поддерживается исследованиями перисинусоидальные клетки зрелой печени Kordes и другие показали, что перисинусоидальные клетки первичной культуры зрелой печени крыс имеют маркер клеток-предшественников CD 133, и могут приобрести фенотип как миофибробластов, так и эпителиальных клеток [160]. Эти наблюдения показывают, что зрелые перисинусоидальные клетки, которые имеют мезенхимальный фенотип *in situ*, сохраняют способность к МЭП и способность вернуться к эпителиальному фенотипу. Было продемонстрировано, что клетки, происходящие из

перисинусоидальных клеток посредством МЭП, сначала проявляют иммунофенотип незрелых гепатоцитов - начинают продуцировать АФП, а затем созревают, приобретают иммунофенотип зрелых гепатоцитов синтезируя в том числе альбумин. Так же эту концепцию поддерживают *fate-mapping* исследования на накаутных мышах, как и другие исследования на культивируемых перисинусоидальных клеток печени. Sicklick и другие сообщали о коэкспрессии мезенхимальных и эпителиальных маркеров (СК 19 и АФП) у двух различных клонов МФ-ЗК происходящих из первичной культуры перисинусоидальных клеток, которые были получены от крыс с ЧХУ-индуцированным фиброзом печени [161]. Таким образом, имеются достаточно убедительные доказательства, что зрелые гепатоциты и холангиоциты могут временно приобретать маркеры МФ, а также зрелые перисинусоидальные клетки могут подвергаться по крайней мере частичному МЭП при определённых обстоятельствах. Однако учитывая динамическую природу ЭМП достаточно сложно доказать (или опровергнуть) факт ЭМП (или МЭП) при хроническом повреждении печени. Следовательно, остаётся неясным какую роль имеет ЭМП резидентных клеток печени в регенерации паренхимы органа.

Ключевой проблемой в исследованиях фиброза печени является определение происхождения фиброгенных клеток или активированных миофибробластов, которые продуцируют ВКМ. Считается, что покоящиеся перисинусоидальные клетки являются основным источником фиброгенных клеток [162]. Тем не менее, накапливаются данные, свидетельствующие о том, что перисинусоидальные клетки не единственные источники ВКМ печени. Портальные миофибробласты [163] или фиброциты, полученные из костного мозга [164], могут быть другими клеточными источниками миофибробластов при фиброзе печени. Кроме того, была предложена еще одна концепция, согласно которой гепатоциты претерпевают ЭМП с целью приобретения фибробластического фенотипа при фиброзе печени [165]. Используя метод отслеживания судьбы клеток, было продемонстрировано, что клетки, происходящие из гепатоцитов, проявляют фибробластоподобную морфологию, сопровождающуюся синтезом специфического белка фибробластов-

1 (FSP-1). Однако до сих пор неизвестно, способствуют ли эти клетки, происходящие из гепатоцитов, образованию ВКМ при фиброзе печени.

Детерминирование того, происходит ли ЭМП *in situ* и насколько важен этот процесс в исходах повреждения печени (в том числе и регенерации после фиброза), по сути своей затруднено [141]. в отличии от эмбриогенеза и канцерогенеза, когда относительно большая популяция клеток синхронно вступает в ЭМП [166], хроническое повреждение эпителиаля вызывает неравномерный ЭМП, в который включается относительно небольшое количество клеток [147].

Гепатоциты в регенерирующей печени временно перестают синтезировать эпителиальные маркеры. Широко распространено мнение, что зрелые гепатоциты во взрослой печени не подвергаются ЭМП после повреждения печени [167, 168, 169]. Тем не менее, некоторые исследования показали возможность того, что гепатоциты могут подвергаться элементам ЭМП (так называемая «частичный ЭМП»), так повышается экспрессия TGF- β и индукция Snail, фактора транскрипции pro-ЭМП в гепатоцитах. Количественный иммуоблот-анализ белковых экстрактов из гепатоцитов печени с фиброзом продемонстрировал сопоставимое снижение содержания белка E-кадгерина. Подавление экспрессии E-кадгерина гепатоцитов сопровождалось подавлением другого широко распространенного маркера зрелых гепатоцитов, альбумина. Экспрессия мРНК альбумина и содержание белка альбумина значительно снизились в гепатоцитах, которые были свежесыведены из регенерирующих остатков печени [107].

Хронически поврежденная печень, как и при циррозе, при котором имеется большое количество эпителиальных предшественников и миофибробластов, имеет клетки, подвергающиеся ЭМП, сходные с переходом, происходящим в почках при патологических состояниях. [170]. Косвенные доказательства ЭМП наблюдались в культуре перисинусоидальных клеток *in vitro*, в которых было показано, что эти клетки коэкспрессируют мезенхимальные и эпителиальные маркеры. Первичные перисинусоидальные клетки экспрессируют стабильные уровни мРНК двух эпителиальных маркеров, Mrk (маркер овальных клеток) и СК-19 (маркер незрелых и зрелых билиарных эпителиальных клеток) [161]. Убедительные данные

показали, что TGF- β может индуцировать ЭМП в гепатоцитах мыши *in vitro*. Было продемонстрировано, что этот механизм является результатом индуцированной TGF- β активации фактора транскрипции Snail, который является ключевой молекулой в EMT, и репрессии эпителиальных маркеров, таких как E-кадгерин [133, 171]. Дополнительные доказательства продемонстрировали использование AlbCre. R26RstoplacZ у двойных трансгенных мышей *in vivo*, что гепатоциты могут подвергаться ЭМП. Избегая изменений фенотипа двойных трансгенных мышей, используя эксперименты по отслеживанию клонов, гепатоциты могут трансдифференцироваться в мезенхимоподобные клетки, которые потеряли альбумин и все еще имеют активированный ген Laz. После CCl₄-индуцированного фиброза печени было обнаружено, что до 45% FSP1-позитивных фибробластов представляют собой Laz(+), который управляет ЭМП подобно процессам, происходящим в почках [172]. Несомненно, эти переходные клетки утратили свои печеночные маркеры, такие как альбумин, потеряв, таким образом, свою основную секреторную функцию. Использование коллагена I и окрашивания трансферрином показало, что половина резидентных гепатоцитов претерпела фенотип ЭМП в модели трансгенных мышей TGF- β и в образцах от пациентов с HBV, а ключевой транскрипционный фактор Snail также был обнаружен в поврежденных областях [173]. Вирусный белок гепатита C NS5A также вызывает диспластические изменения морфологии клеток печени с фенотипом ЭМП и участвует в онкогенной трансформации первичных предшественников гепатоцитов [174]. TGF- β индуцирует Snail, активирует путь Smad2/3 и, наконец, опосредует переход к фенотипу ЭМП [175]. Snail-положительные клетки также составляли из 50% оставшихся гепатоцитов в поврежденных областях [176]. Мезенхимальные маркеры виментин и α -SMA были обнаружены в гепатоцитах фиброзной печени человека и крыс вокруг фиброзных перегородок, что указывает на наличие переходных гепатоцитов и ЭМП [177]. ЭМП также встречаются в цирротических клетках печени, полученных из мышинных ЧХУ-индуцированных моделей. Интересно, что ЭМП-подобные клетки экспрессируют альбумин и мезенхимальный маркер виментин, а также приобретают секреторные функции

коллагена I. Клеточные изоляты из печени с циррозом могут проявлять антиапоптозные эффекты в отличие от нормальных гепатоцитов при обработке TGF- β . Хотя было показано, что необработанные нормальные гепатоциты, полученные из печени, не проявляют признаков ЭМП, они реагировали на TGF- β повышенной экспрессией виментина и характеристиками ЭМП [178]. Таким образом, накопленные данные показали, что ЭМП-подобные клетки, даже клетки ЭМП, существуют при хроническом повреждении печени с частичной потерей таких функций, как секреция альбумина и трансферрина, и приобретением мезенхимальных признаков.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Схема эксперимента

Для исследования морфофункциональной характеристики клеток печени крыс на этапах онтогенеза брали плодов белых беспородных крыс на 10 и 17 день после оплодотворения, печень 1-суточных и 14 суточных крысят и печень здоровых взрослых крыс. Крыс содержали в клетках по 8 особей в каждой в помещениях с искусственным освещением (8.00-20.00 ч. - свет, 20.00-8.00 ч. - темнота) при 20-22°C в условиях свободного доступа к воде и пище.

Для исследования морфофункциональных особенностей клеток печени крыс на этапах репаративной регенерации после химического повреждения в течение 8 недель и выванного им фиброза исследовали печень крыс на протяжении 12 недель восстановления. Для этого были сформированы 4 подопытные группы - 0 дней восстановления (I группа), 4 недели восстановления (II группа), 8 недель восстановления (III группа) и 12 недель восстановления (VI группа) и контрольная группа – взрослые интактные животные. Перед началом восстановительных периодов у подопытных животных моделировали экспериментальный фиброз печени. Для исследования брали образцы печени медианной доли, в которой процесс развития фиброза наиболее выражен. [182]

После чего полученные материалы исследовали гистологическими и иммуногистохимическими методами. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике. Для изучения волокон соединительной ткани в образцах печени применяли окраску срезов по Массону [183].

2.2. Моделирование экспериментального фиброза печени

Основными критериями в подборе адекватной модели считали формирование у подопытных животных фиброза. Кроме того, особенно важным при выборе модели считали стойкость фиброза печени на восстановительном этапе и

отсутствие слишком быстрой регенерации печени. Такие требования предъявлялись в связи с тем, что у лабораторных крыс существует мощная репаративная система и в восстановительный период после хронической интоксикации четыреххлористым углеродом (ЧХУ), структурная нормализация структур печени проходит за короткое время. В связи с этим нами была выбрана модель фиброза с хроническим введением ЧХУ на фоне постоянной алкоголизации.

При выполнении работ использовали ЧХУ марки «ОСЧ», растительное пищевое дезодорированное кукурузное масло, спирт этиловый 95%. Растительное масло перед употреблением автоклавировали при 120°C в течение 120 минут. Внутрижелудочное введение проводили с помощью одноразовых стерильных шприцев и желудочных зондов.

Эксперименты проводили по следующей схеме. За 7 дней до начала введения ЧХУ животным в качестве питья начинали давать 5% водный раствор этанола *ad libitum*. Раствор ЧХУ в растительном масле в соотношении 1:3 вводили внутрижелудочно через зонд дважды в неделю в дозе 0,1 мл/100г массы тела в течение 8 недель.

2.3. Морфологическое исследование

Для наркоза крыс контрольной и экспериментальных групп наркотизировали диэтиловый эфир (*Aether diaethylicus*), после чего их декапитировали. Животных I экспериментальной группы (0 дней восстановления) декапитировали под анестезией сразу по окончании моделирования химически индуцированного фиброза и забирали образцы печени. Аналогично поступали с животными II экспериментальной группы (4 недели восстановления) – забой производили через 4 недели после окончания токсического воздействия на печень; с животными III экспериментальной группы (8 недель восстановления) – через 8 недель после окончания моделирования химически индуцированного фиброза печени; с животными IV экспериментальной группы (12 недель восстановления) – через 12

недель после окончания моделирования химически индуцированного фиброза печени. Сразу после декапитации производили забор срединной доли печени, так как в этой доле фибротические изменения считаются наиболее выраженными и стойкими.

Для морфологического и иммуногистохимического исследования образцы печени толщиной не более 5 мм помещали в 4% нейтральный забуференный (на 0,01М фосфатном буфере с pH=7,4) раствор фармалина (Sigma, США). Фиксация длилась 3-5 суток, после чего образцы обезвоживали в батарее спиртов восходящей концентрации и заливали в парафин Histomix (Биовитрум, Россия).

Парафиновые блоки резали на ротационном микротоме (MICROM HM340E, Thermo Scientific, США), получали срезы толщиной 5 мкм и монтировали их на предметные стекла. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином по общепринятой методике [183]. Для изучения ВКМ в печени применяли окраску парафиновых срезов по Массону [183].

Окрашенные срезы изучали и анализировали под микроскопом Zeiss AxioScope (ZEISS, Германия), после чего фотографировали камерой AxioCam 506 color (ZEISS, Германия). На срезах, окрашенных по Массону рассчитывали относительную площадь стромы печени.

2.4. Иммуногистохимическое исследование

Парафиновые срезы образцов печени толщиной 5 мкм, подлежащих иммуногистохимическому исследованию, монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизинном (Menzel, Германия). Для определения экспрессии белков применяли следующие антитела (Таблица №1).

Характеристика антител для иммуногистохимического исследования

Наименование антител	Тип (клон)	Разведение	Производитель/ № по каталогу
Актин гладкомышечных клеток (α -SMA)	Мышиные, моноклональные (1A4)	1:100	BioLegend (904601)
Фактор роста гепатоцитов (c-Met)	Мышиные, моноклональные (8F11)	1:100	Leica Microsystems (NCL-cMet)
Виментин	Кроличьи моноклональные (V9)	1:100	Invitrogen (18-0052)
Цитокератин 18	Кроличьи моноклональные (C-04)	1:200	Novusbio (NB500-306)

Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 минут в 3% перекиси водорода. Постановку иммуногистохимических реакций проводили с помощью пероксидаза-полимерной системы визуализации по стандартному протоколу «и» – модифицированный peroxidase-antiperoxidase (PAP) – метод. Демаскировку антител осуществляли путем кипячения срезов при 100°C в миниавтоклаве Pascal (Dako, Дания) в цитратном буфере с pH=6,0 в течение 10 минут. Пероксидазу проявляли 3-3-диаминобензидином из набора протокола. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера. Негативным контролем служили препараты без инкубации с первичными антителами при полном соблюдении остальных этапов протокола.

Окрашенные препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа AxioImager.Z2 (ZEISS, Германия), оборудованного камерой высокого разрешения AxioCam HRm (ZEISS, Германия). Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZENpro 2012 (ZEISS, Германия). Для оценки результатов иммуногистохимической реакции определяли относительную площадь иммунореактивного материала (суммарная площадь измеренных объектов, отнесенная к площади тестовой системы).

2.5. Иммуноокрашивание с двойной флуоресценцией

Парафиновые срезы образцов тканей толщиной 5 мкм, предназначенные для ИФ исследования, монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизинном (Menzel, Германия).

Первичные комбинации антител представляли собой Цитокератин 18 (Мышиные, моноклональные, Novusbio, США) плюс виментин (Кроличьи, моноклональные, GeneTex, Int. Corp., США).

При исследовании срезы после депарафинизации инкубировали в растворе глицина для снижения автофлуоресценции. Демаскировку антител осуществляли путем кипячения срезов при 100 °С в миниавтоклаве Pascal (Dako, Великобритания) в цитратном буфере с рН=6,0 в течение 10 минут. Затем стекла горизонтально помещали во влажную камеру, наносили 2 вида первичных антител: мышиные и кроличьи и оставляли на ночь при 4 °С.

На следующий день стекла со срезами промывали в двух сменах 0,05 М Трис буфера по 20 минут и сначала инкубировали 1 час с вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 594 (козьи-антикроличьи, Abcam, Великобритания), затем еще 30 минут с вторичными антителами, конъюгированными с FITC (козьи-антимышиные, Abcam, Великобритания). Промывали буфером в общей сложности 30 минут, затем на срезы наносили несколько капель заключающей среды, содержащей DAPI (Sigma, США).

Флуоресцентные препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа AxioImager.Z2 (ZEISS, Германия), оборудованного соответствующими флуоресцентными фильтрами и камерой высокого разрешения AxioCam HRm (ZEISS, Германия). Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZENpro 2012 (ZEISS, Германия).

2.6. Приготовление гомогенатов из образцов печени крыс

Образцы печени крыс нарезали на маленькие кусочки, промывали в 0,05M фосфатном буфере, pH7,5. Свежезамороженные фрагмент печени лизировали в буфере RIPA с использованием гомогенизатора тканей.

2.7. Вестерн блоттинг

Для оценки белкового состава гомогенатов печени использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли [184]. Для разделения белков использовали 10% разделяющий гель и 5% концентрирующий. В качестве маркеров молекулярной массы использовали Precision Plus Protein Dual Color Standart (BioRad, США) маркеры. к образцам добавляли $\frac{1}{2}$ от конечного объема 2x буфера для образцов (50 mM Tris-HCL (pH 6,8), 100mM β -меткаптоэтанол, 2% SDS, бромфеноловый синий 0,1%, 10% глицерин). Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США) с трис-глициновым электродным буферным раствором (Tris 25 mM, глицин 250 mM, 0,1% SDS). Электрофорез проводили при силе тока 17mA на стекло до приближения бромфенолового синего к краю, после чего останавливали процесс.

После проведения электрофореза по Лэммли извлекали гель из камеры и собирали «сэндвич» (снизу-вверх прозрачная крышка книжки, 2 ватмана, нитроцеллюлозная мембрана Transblot (BioRad, США), 2 ватмана, чёрная крышка книжки). Перенос белков осуществляли в камере для электроблоттинга Trans-Blot (Bio-Rad, США) при постоянном напряжении 100V и силе тока ~300 mA 90 минут в буфере для переноса (глицин 90 mM, Tris-HCl (pH 8,7) 25mM, 0,1% SDS, 10% изопропанол), для предотвращения перегрева образцов погружали охлаждающий модуль в камеру для блоттинга с буферным раствором.

Для блокировки неспецифических участков связывания антител мембрану инкубировали в течение 30 минут 5% раствором молока в буфере TBST. Заблокированные нитроцеллюлозные мембраны окрашивали первичными антителами мышинными моноклональными против виментина (клон V6, Dako, Дания) и против цитокератина (клон c-04, Novusbio, США) на 2% BSA-TBS-t, окрашивание проводили при постоянном покачивании в течение ночи. Раствор антител сливали, мембраны промывали 3 сменами TBS-t по 10 минут при покачивании для удаления избытка антител. После чего окрашивали мембраны соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с кислотой фосфотазой на 2% BSA-TBS-t в течение 1 часа при покачивании, затем раствор антител сливали и промывали мембраны 3 сменами TBS-t по 10 минут при качании, для удаления избытка антител.

2.8. Статистический анализ результатов

Для оценки количественных результатов применяли методы вариационной статистики. Определяли величины средних значений, стандартного отклонения, среднеквадратичного отклонения. Нормальность данных проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка. Для параметрических данных, статистическая значимость отличий средних определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA тестом с применением апостериорного критерия Тьюки (Tukey's range test). Для непараметрических данных статистическую значимость различий средних определяли с помощью рангового дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллису (Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks), так же с соответствующим апостериорным тестом Данна (post-hoc Dunn's Test). Были представлены 95% доверительные интервалы. $P < 0,05$ считалось статистически значимым.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

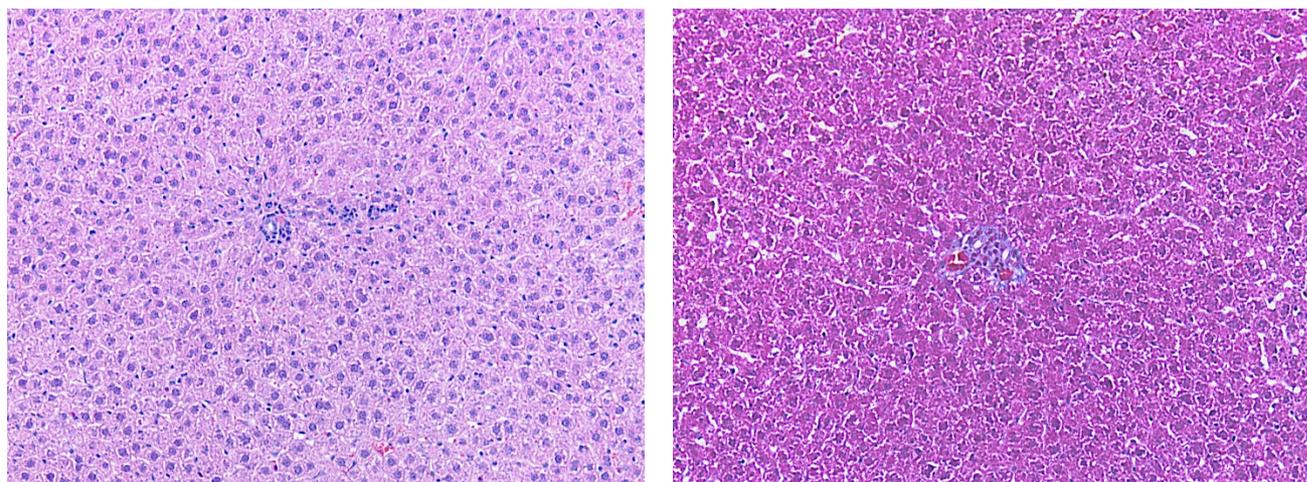
3.1. Регенерации печени после химически индуцированного фиброза

Перед моделированием регенерации печени у животных экспериментальных групп моделировали химически индуцированный фиброз печени («Материалы и методы», п. 2.2).

После чего были сформированы 4 экспериментальные группы животных согласно предложенной схеме эксперимента («Материалы и методы», п. 2.1).

Полученные образцы ткани подвергли морфологическому исследованию и окрашиванию гематоксилин-эозином по общепринятой методике и методом окрашивания по Массону для выявления ВКМ в паренхиме печени. Окрашенные срезы просматривали в световом микроскопе и фотографировали («Материалы и методы», п. 2.3.).

Контрольная группа состояла из интактных крыс, паренхима печени соответствовала норме, определяли небольшое количество фибробластов и соединительнотканых волокон в пределах портальных триад (Рисунок 1).



А

Б

Рисунок 1. Печень крысы контрольной группы.

Элементы соединительной ткани вокруг портального тракта. Исходное увеличение 100.

А – окраска гематоксилин-эозином, Б – окраска по Массону

Для оценки регенерации печени использовали следующие критерии оценки:

1. Архитектура печеночных балок:

- Нормальная архитектура, без нарушений: 0 баллов.
- Незначительные нарушения в расположении балок – разрывы в балках или небольшое смещение гепатоцитов: 1 балл.
- Явные нарушения в расположении балок – дезорганизация балок или обширные пустоты: 2 балла.

2. Синусоиды:

- Нормальные, не расширены: 0 баллов.
- Слегка расширены – увеличенные перисинусоидальные пространства, но сохранение общей структуры синусоидов: 1 балл.
- Сильно расширены – значительно увеличенные перисинусоидальные пространства, затруднение в определении границ синусоидов: 2 балла.

3. Фиброз:

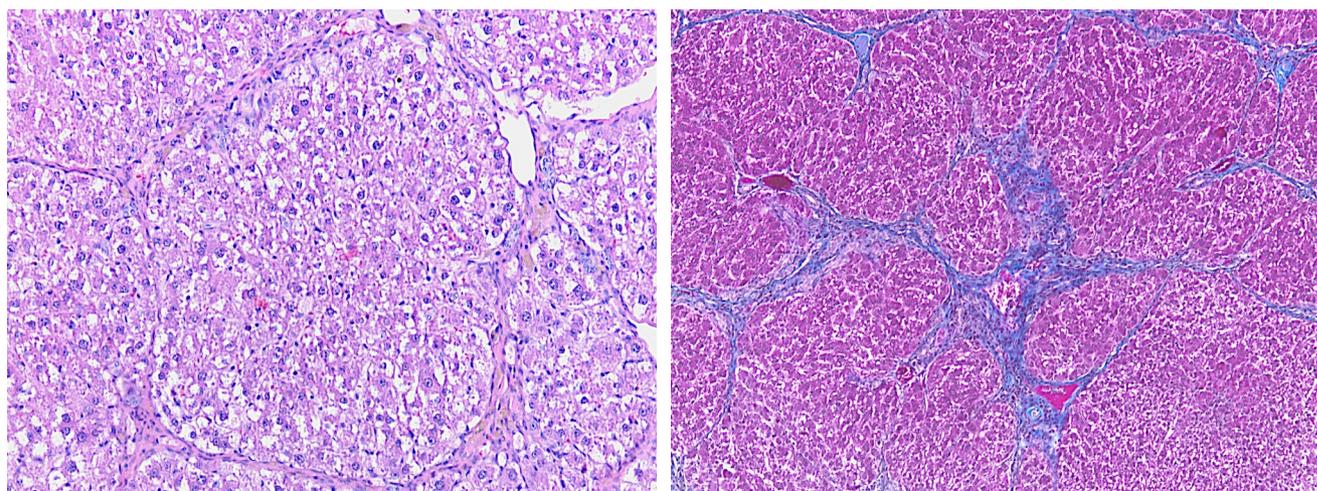
- Отсутствие фиброза: 0 баллов.
- Легкий фиброз – единичные волокна соединительной ткани или тонкие незавершенные соединительнотканые порто-портальные септы: 1 балл.
- Умеренный фиброз – формирование соединительнотканых порто-портальных септ, частично паренхимы: 2 балла.
- Тяжелый фиброз – обширные отложения волокон соединительной ткани, множественные септы, дезорганизация архитектоники печени: 3 балла.

4. Изменения гепатоцитов:

- Не измененные гепатоциты – ядро одно, однородная цитоплазма, отсутствие вакуолизации: 0 баллов.
- Легкие изменения – небольшие вакуоли в цитоплазме или незначительное увеличение ядер: 1 балл.
- Умеренные изменения – умеренная вакуолизация, некоторые гепатоциты с двумя ядрами, признаки начала баллонной дистрофии: 2 балла.

- Сильные изменения – многочисленные и значительные вакуоли, многие гепатоциты с баллонным дегенерированием, значительное увеличение и гиперхромия ядер, признаки апоптоза или некроза: 3 балла.

У животных I экспериментальной группы в паренхиме печени обнаружили накопление волокон соединительной ткани по периферии печёночных долек, формирующих порто-портальные и порто-центральные фиброзные септы, часть фиброзных септ объединялись друг с другом посредством мостовидных соединений. Выявлялись явные нарушения архитектуры печеночных балок, расширенные синусоиды, вакуолизация гепатоцитов, двухъядерные и полиплоидные гепатоциты (Рисунок 2). У животных данной группы определили повреждение печени в 7 баллов (Таблица 2).



А

Б

Рисунок 2. Печень крысы I экспериментальной группы (0 дней восстановления после моделирования фиброза).

Ложные печеночные дольки, фиброзные порто-портальные и порто-центральные септы.

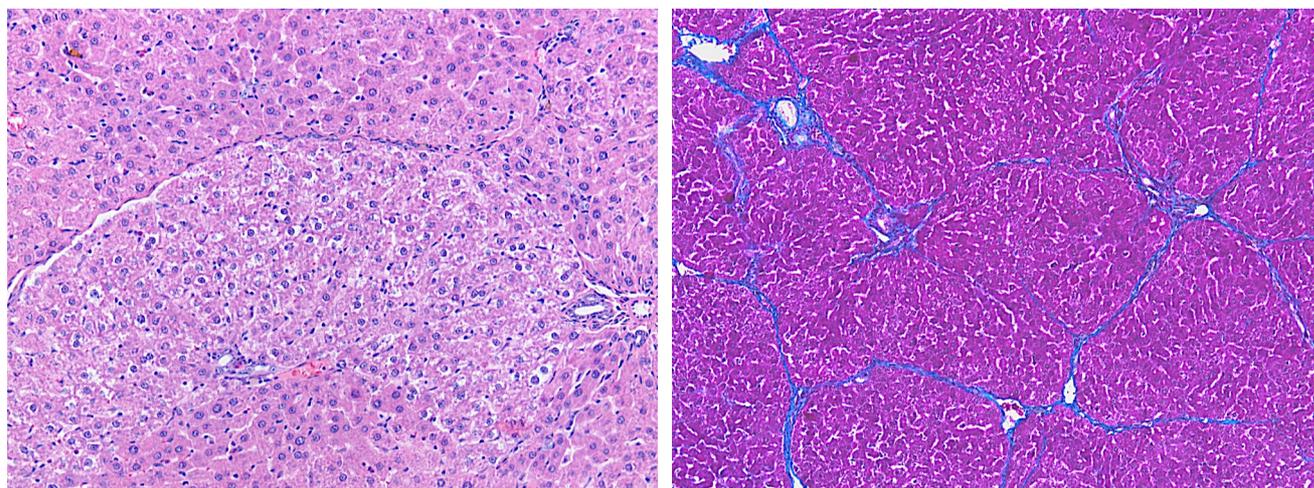
А – гематоксилин-эозином. Исходное увеличение 200,

Б – окраска по Массону. Исходное увеличение 100

Оценка репаративной регенерации, баллы

Критерий	Контроль, интактные животные	I группа (0 недель восст.)	II группа (4 недели восст.)	III группа (8 недель восст.)	IV группа (12 недель восст.)
Фиброз	0	2	1	1	0-1
Архитектура печен. балок	0	2	2	1	0
Синусоиды	0	1	1	0	0
Изменения гепатоцитов	0	2	1	0	0
Итого	0	7	4	2	0-1

В печени животных II экспериментальной группы отметили умеренно выраженное разрастание соединительной ткани вокруг печеночных триад, так же между триадами обнаружили фиброзные нити, ограничивающие печёночные дольки с формированием завершённых и незавершённых септ, явные нарушения архитектуры печеночных балок, расширенные синусоиды, небольшие вакуоли в гепатоцитах (Рисунок 3). Таким образом обнаружили истончение фиброзных септ, по сравнению с печенью I экспериментальной группы. Степень повреждения печени у животных данной группы оценили в 4 балла (Таблица 2).



А

Б

Рисунок 3. Печень крысы II экспериментальной группы.

Фиброзные завершённые и незавершённые порто-портальные септы. Ложные дольки А – окраска гематоксилин-эозином. Исходное увеличение 200, Б – окраска по Массону. Исходное увеличение 100.

В печени животных III экспериментальной группы наблюдали слабо выраженный фиброз в виде незавершённых порто-портальных септ. Отмечали сохранение тенденции к уменьшению признаков фиброза в печени, по сравнению с животными I и II экспериментальных групп – септы максимально истончились, стали незавершёнными, отсутствовали ложные дольки, незначительные нарушения в архитектонике печеночных балок, нормализацию размеров синусоидных пространств и морфологии гепатоцитов (Рисунок 4). Степень повреждения животных III экспериментальной группы оценили в 2 балла (Таблица 2).

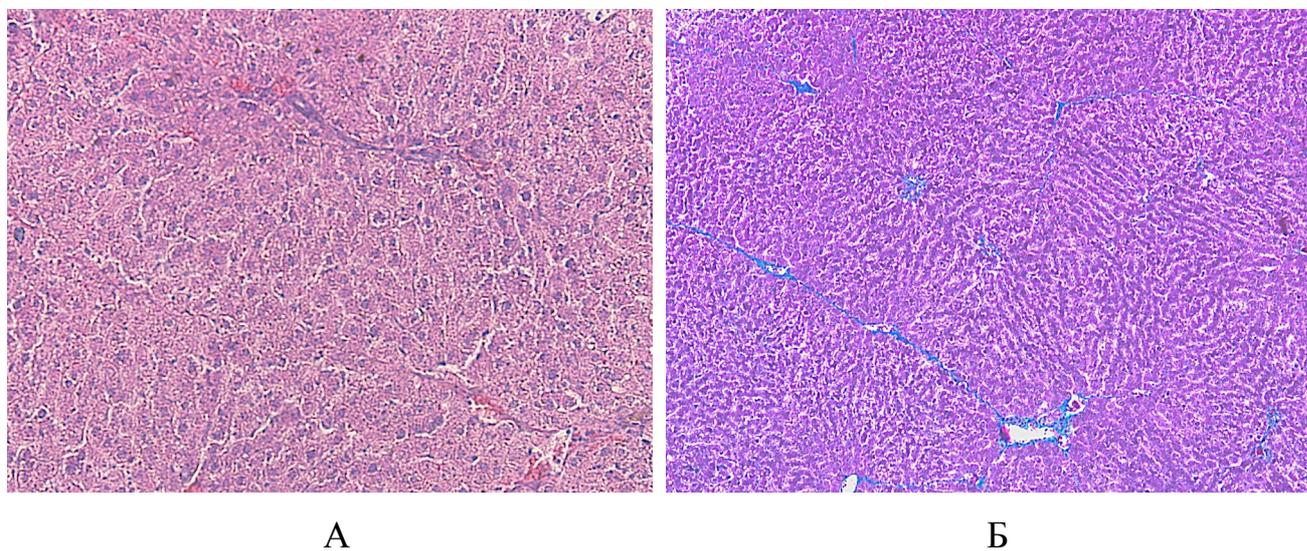


Рисунок 4. Печень крысы III экспериментальной группы.

Незавершённые фиброзные порто-портальные септы. Исходное увеличение 100.

А – окраска гематоксилин-эозином;

Б – окраска по Массону.

У 6 из 8 особей животных IV экспериментальной группы определили отсутствие признаков фиброза в паренхиме печени (Рисунок 5 А, Б), то есть у этих животных произошла спонтанная полная репаративная регенерация печени после химически индуцированного фиброза печени. У прочих животных IV группы обнаружили остаточный фиброз в виде увеличенного количества соединительной

ткани вблизи портальных трактов (Рисунок 5 В, Г), в этих случаях восстановление печени было неокончательным, но значительным, что вероятно связано с физиологическими особенностями данных животных. Степень повреждения печени животных IV экспериментальной группы оценили в 0-1балл (Таблица 2).

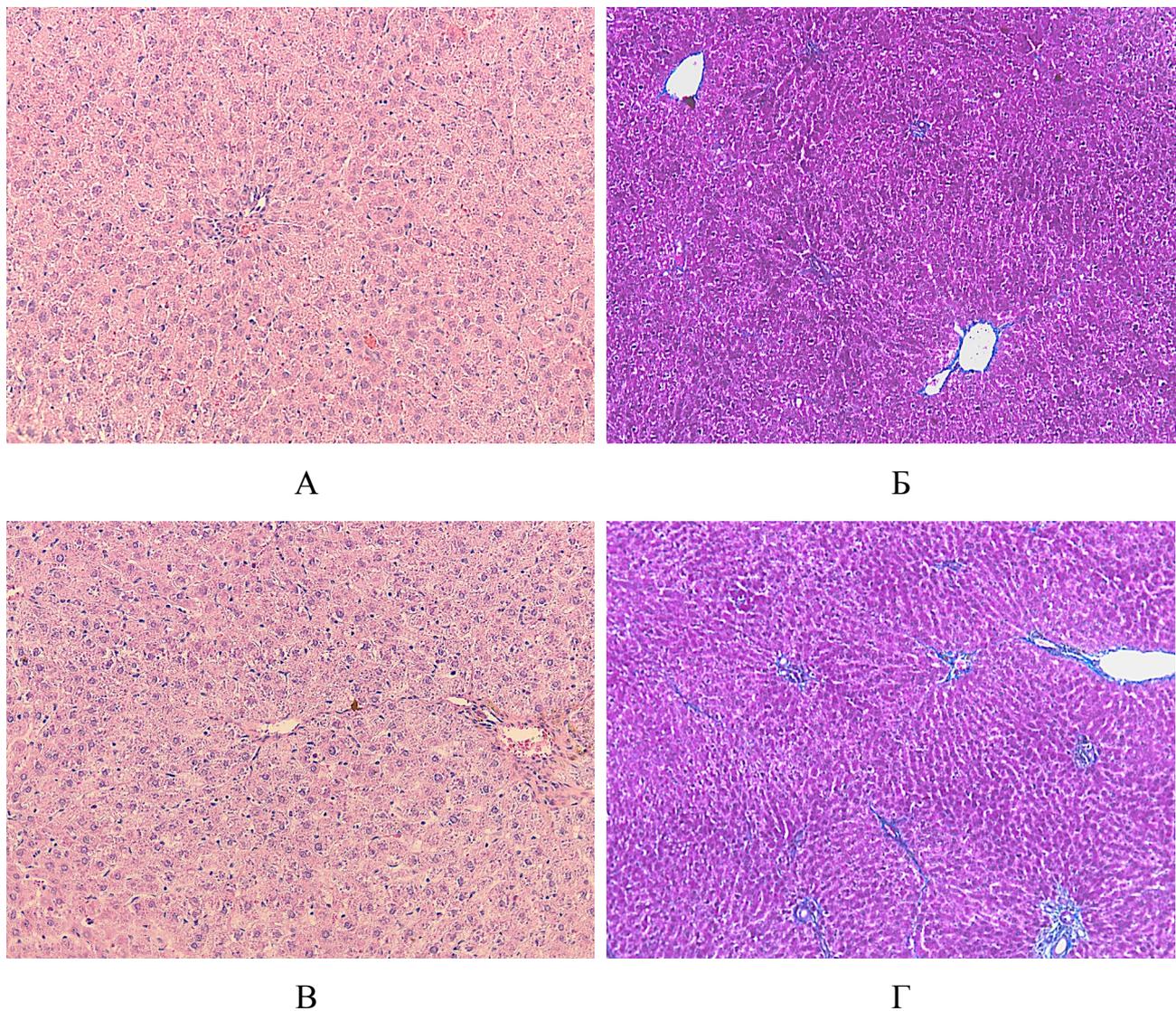


Рисунок 5. Печень крысы IV экспериментальной группы.

А – окраска гематоксилин-эозином; Исходное увеличение 200.

Б – окраска по Массону. Исходное увеличение 100.

Незначительное количество соединительной ткани вокруг портальных трактов.

В – окраска гематоксилин-эозином. Исходное увеличение 200.

Г – окраска по Массону. Исходное увеличение 100.

Слабо выраженный фиброз печени.

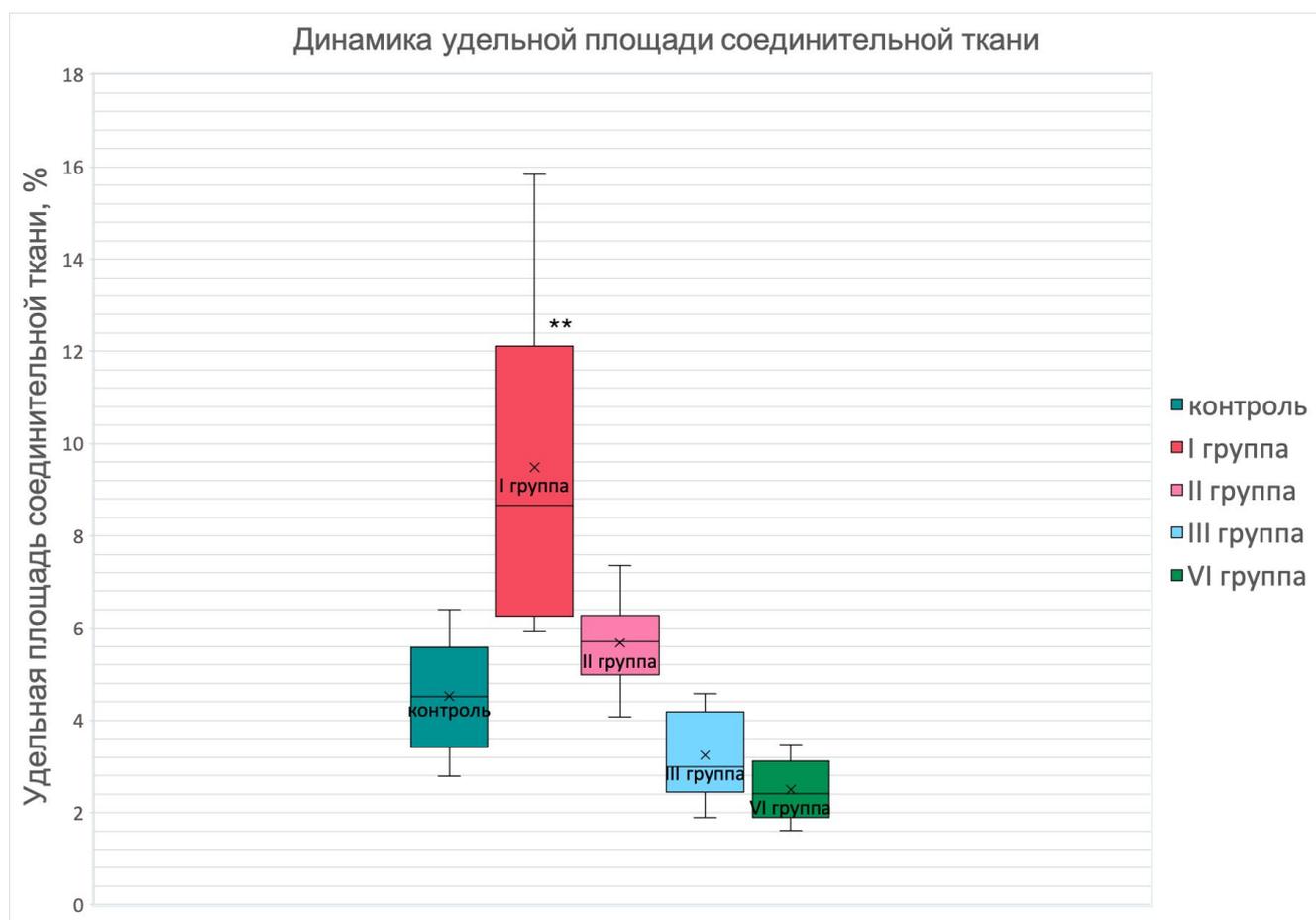


Рисунок 6. Динамика изменения относительной площади стромы печени при регенерации. ** - различия между группами статистически значимы $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки)

Для подтверждения полной регенерации печени морфометрически измерили относительную площадь соединительной ткани в паренхиме печени. В печени животных I группы (0 дней восстановления) площадь соединительной ткани статистически значимо больше чем в печени интактных животных контрольной группы (4,5% в печени животных контрольной группы против 9,48% в печени животных I группы). У животных II и III групп (4 и 8 недель восстановления) по сравнению с животными контрольной группы достоверных отличий площади соединительной ткани в печени не выявили (5,67% в печени животных II группы и 3,24% в печени животных III группы) (Рисунок 6). По

сравнению с печенью животных I экспериментальной группой у животных II группы нет достоверных отличий в площади соединительной ткани, а у животных III группы площадь соединительной в паренхиме печени достоверно меньше, чем у животных I группы. Что согласуется с данными литературы о регрессии фиброза после хронической интоксикации алкоголем и четыреххлористым углеродом (ЧХУ) [185,186]. Регенерация печени после фиброза приводит в повышенной резорбции ВКМ, что связывают с активацией металлопротеиназ печени [187], так у животных IV экспериментальной группы (12 недель восстановления) площадь соединительной ткани достоверно меньше (2,49% печени IV экспериментальной группы) чем в печени интактных животных контрольной группы, что вероятно связано (Таблица 3).

Таблица №3

Изменения относительной площади стромы печени при регенерации

Вариационно-статистические показатели	Контроль, интактные животные	I группа (0 недель восст.)	II группа (4 недели восст.)	III группа (8 недель восст.)	IV группа (12 недель восст.)
Среднее, %	4,52	9,49**	5,67	3,24	2,49
Ст. откл, %	1,23	3,58	1,02	0,97	0,67
Ст. ошибка, %	0,41	1,13	0,36	0,32	0,24
Медиана, %	4,52	8,67	5,71	2,99	2,40

Примечание: ** - ($p < 0,01$) по отношению к контрольной группе.

Так для полной спонтанной репаративной регенерации печени по морфологическим признакам после химически индуцированного фиброза большинству крыс достаточно 12 недель после отмены токсического воздействия ЧХУ. Схема эксперимента, включающая в себя хроническое внутрижелудочное введение ЧХУ на фоне алкоголизации и 12 недель после окончания воздействия, может быть использована как модель репаративной регенерации печени.

3.2. Динамика клеточного состава эпителиального и мезенхимального ростков в печени крыс на разных этапах онтогенеза

Для описания динамики клеточного состава печени крыс на разных этапах онтогенеза исследовали печень 10- и 17-суточных плодов крыс и новорождённых (1-суточных), 14-суточных и половозрелых самцов.

3.2.1. Морфофункциональный анализ клеток эпителиального ростка в образцах печени крыс на разных этапах онтогенеза

Для описания морфофункциональных характеристик эпителиальных клеток печени провели иммуногистохимическое исследование с использованием антител к цитокератину 18. В результате иммуногистохимического исследования (Материалы и методы, п. 2.4.) выявили присутствие цитокератина 18 в печени крыс всех возрастных групп. Обнаружили места сосредоточения иммунопозитивных депозитов цитокератина 18 в эндотелиальных клетках сосудов печени, гепатоцитах и гепатобластах.

3.2.1.1. Локализация цитокератина 18 в нормальной печени взрослых крыс

В результате иммуногистохимического исследования (Материалы и методы, п. 2.4.) выявили присутствие цитокератина 18 в нормальной печени взрослых животных (Рисунок 7). Цитокератин 18 определяли в цитоплазматических мембранах эпителиоцитов желчных канальцев – и кровеносных сосудов, цитоплазматических мембранах и цитоплазме гепатоцитов. Отмечали яркоокрашенные юные гепатоциты, окружающие портальные триады. Что соответствует литературным данным о нормальном распределении цитокератина 18 в паренхиме печени крыс [188].

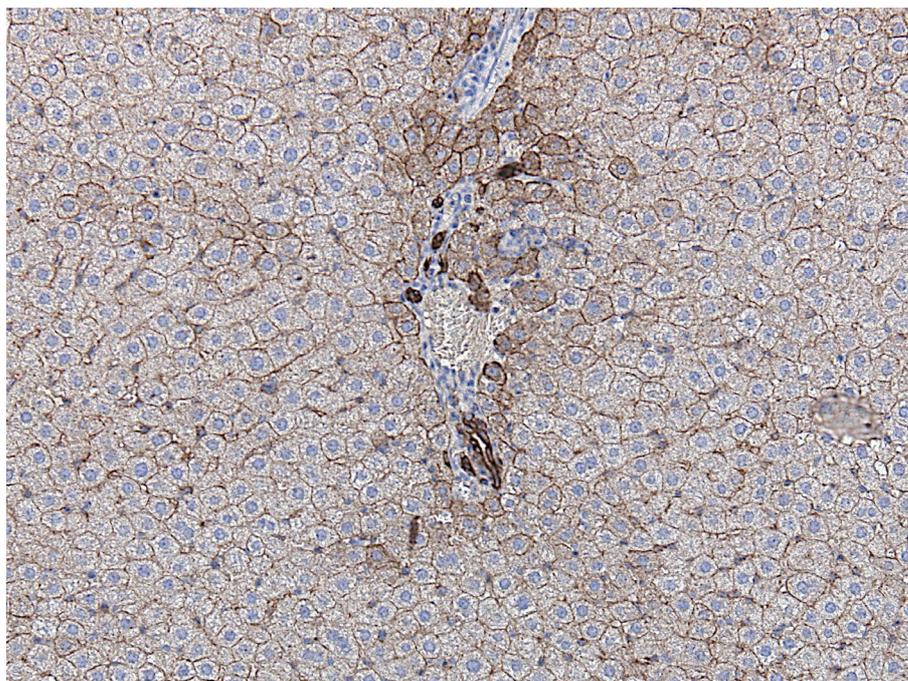


Рисунок 7. Печень взрослой крысы

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18, Иммунопозитивные депозиты преимущественно в околочелювной области и небольшие пылевидные включения в цитоплазме гепатоцитов, эндотелии сосудов. Исходное увеличение 200.

3.2.1.2. Локализация цитокератина 18 в печени на этапах гепатогенеза

В результате иммуногистохимического исследования (Материалы и методы, п. 2.4.) выявили присутствие цитокератина 18 в печени животных на всех исследуемых этапах гепатогенеза.

У 10-суточных плодов крыс обнаружили клетки неправильной формы с фенотипом гепатобластов, содержащие крупные иммунопозитивные гранулы цитокератина 18 цитоплазматической и мембранной локализации (Рисунок 8). Наличие крупных гранул продукта иммуногистохимической реакции на цитокератин 18 в цитоплазме не является типичным расположением для зрелых гепатоцитов. Можно предположить, что данные клетки являясь гепатобластами, синтезируют и накапливают цитокератин 18 в цитоплазме, который в последующем приобретет мембранную форму [29].

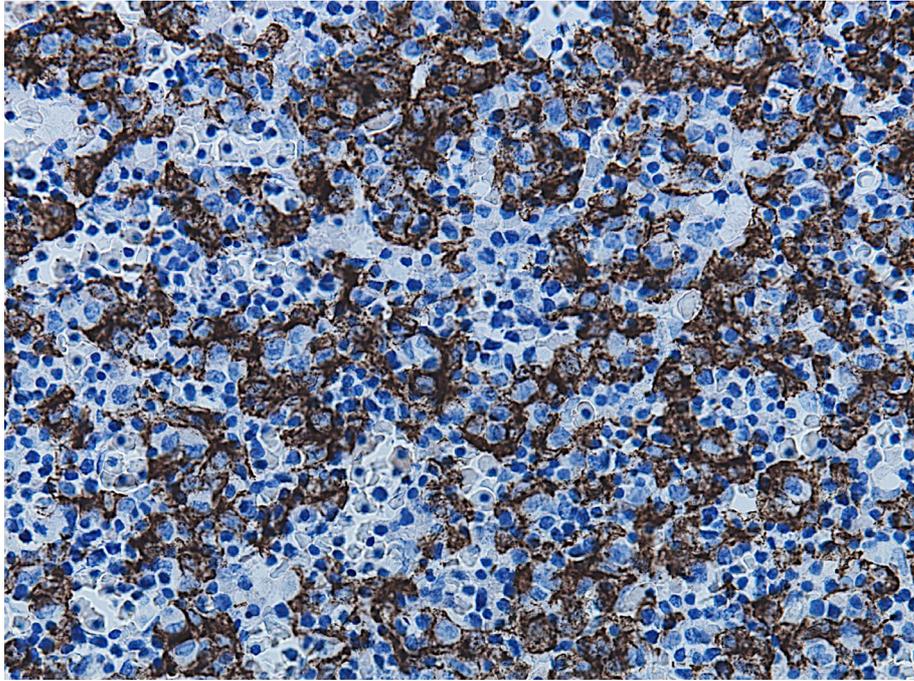


Рисунок 8. Печень 10-суточного плода крысы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18, Иммунопозитивные депозиты в цитоплазме гепатоцитов. Исходное увеличение 400.

У 17-суточных плодов крыс так же отмечали иммунопозитивные клетки неправильной формы с фенотипом гепатобластов, однако заметили, что помимо клеток с крупными иммунопозитивными гранулами появились клетки с нежной пылевидной цитоплазмой и преимущественно околосмембранной локализацией цитокератина 18 (Рисунок 9). Таким образом к 17 суткам антенатального развития расположение цитокератина 18 у части клеток становится типичным для зрелых гепатоцитов, что говорит о неравномерной скорости созревания клеток.

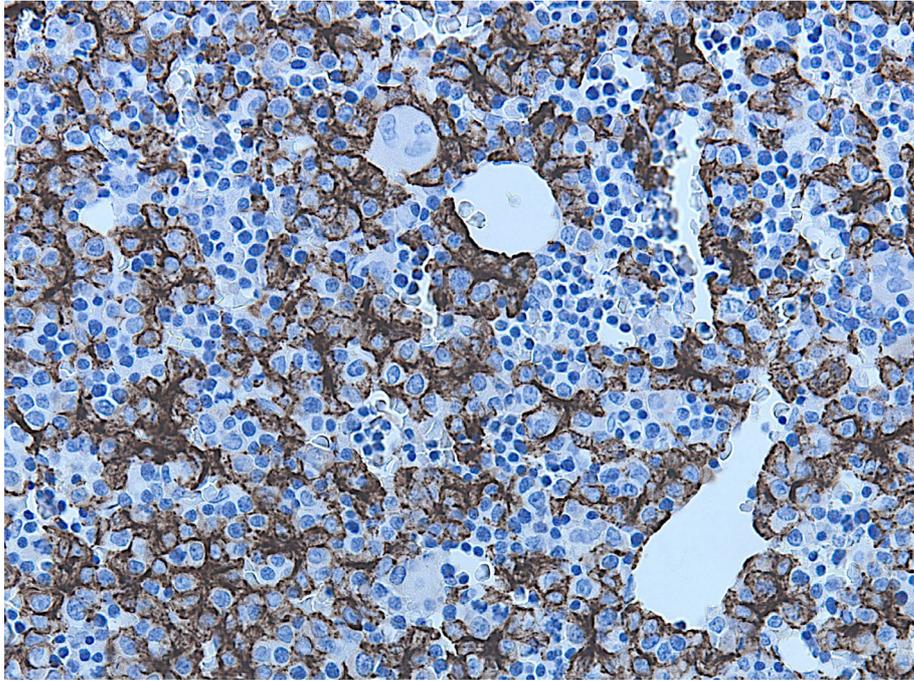


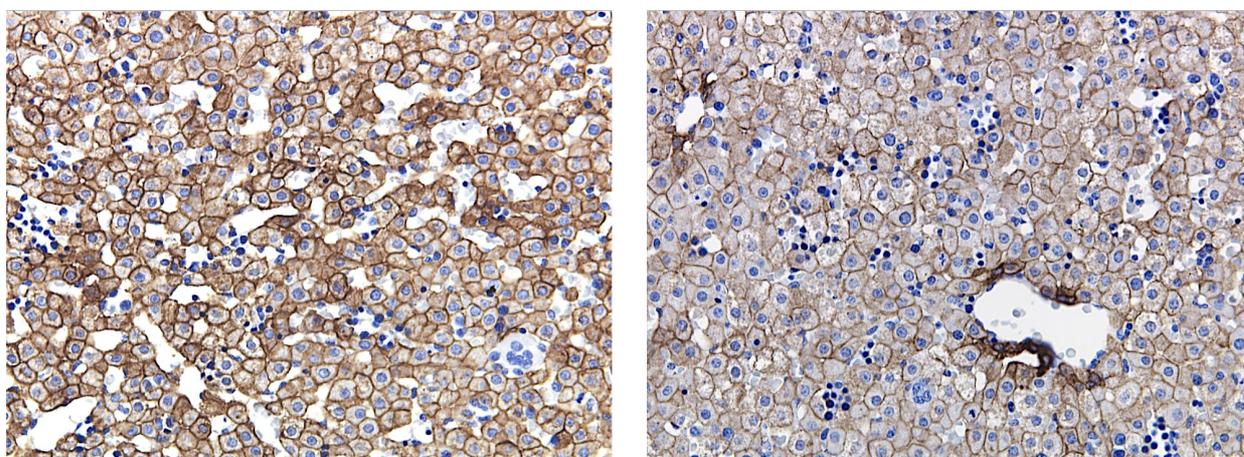
Рисунок 9. Печень 17-суточного плода крысы

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18, Резко-иммунопозитивные гепатобласты и гепатоциты с околочелювными депозитами цитокератина 18 и нежной пылевидной иммунопозитивной цитоплазмой. Исходное увеличение 400.

Обнаружили характерное для зрелых гепатоцитов распределение цитокератина 18 в клетках паренхиме печени суточных (рисунок 10) и 14-суточных крыс. При этом в печени 14 суточных крысят отмечали нормальную зрелую гистоархитектонику эпителиального роста печени, в то время как строение печени суточных крысят было незрелым.

Таким образом эпителиальные клетки печени начинают накапливать типичный для зрелых гепатоцитов промежуточный микрофиламент цитокератин 18 начиная с 10 дня эмбрионального развития. Часть гепатоцитов приобретает иммуногистохимические признаки зрелых клеток ещё на этапах эмбриогенеза, однако скорость созревания клеток неравномерна и в паренхиме печени 17-суточного плода определялись клетки с фенотипом гепатобластов, так и гепатоциты содержащие цитокератин-18. К моменту рождения гепатоциты приобретают признаки морфологически зрелых клеток, а окончательное

формирование структуры эпителиальной ткани печени завершается к 14 дню постнатального развития.



А

Б

Рисунок 10. Печень суточной крысы (А) и 14-суточной крысы (Б)

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18, Околочелюстные иммунопозитивные депозиты и нежная пылевидная иммунопозитивная цитоплазма гепатоцитов. Исходное увеличение 400.

3.2.1.3. Морфометрический анализ количества цитокератина 18 в печени на этапах гепатогенеза

Для оценки количественной динамики цитокератина 18 на исследуемых этапах онтогенеза морфометрически проанализировали препараты образцов печени, окрашенных иммуногистохимическим методом.

Удельная площадь цитокератина 18 (Рисунок 11) на 10 день антенатального развития составила $17,7\% \pm 2,09$ и значимо возросла до $23,12\% \pm 2,51$ к 17 дню фетогенеза и до $23,8\% \pm 1,18$ на момент рождения, затем незначительно понизилась до $22,4\% \pm 1,62$ на 14 день после рождения и окончательно значимо возросла до $33,7\% \pm 2,18$ у взрослых особей (Таблица 4).

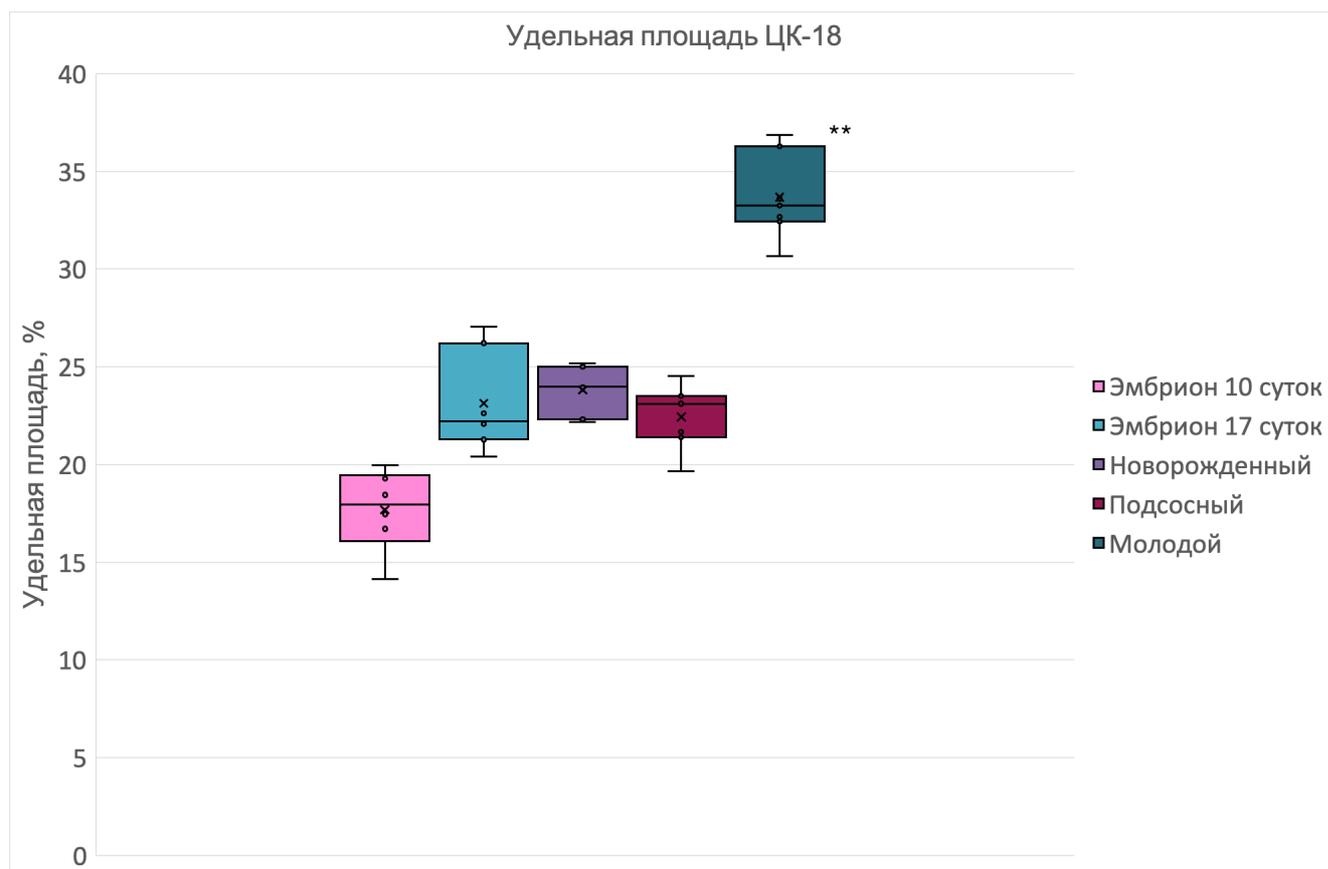


Рисунок 11. Удельная площадь цитокератина 18 на разных этапах онтогенеза
 * * - различия между группами статистически значимы $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки)

Таблица №4

Изменения удельной площади цитокератина 18 на разных этапах онтогенеза

Вариационно-статистические показатели	Эмбрион 10 суток	Эмбрион 17 суток	Новорожденный	Подсосный	Молодой
Среднее, %	17,67**	23,27	23,78	22,56	33,15**
Ст. откл, %	2,09	2,51	1,18	1,63	2,19
Ст. ошибка, %	0,85	0,95	0,45	0,61	0,83
Медиана, %	17,95	22,222	23,964	23,108	33,262

Примечание: ** - ($p < 0,01$) (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

Таким образом удельная площадь цитокератина 18 демонстрирует тенденцию к увеличению как в эмбриональном, так и в постнатальном развитии печени. Это подчеркивает ключевую роль эпителиальных клеток - гепатоцитов в печени и важность цитокератина 18 в поддержании их структурной целостности и функциональности на различных этапах развития организма. Увеличение удельной площади цитокератина 18 свидетельствует о нарастании числа и/или структурной зрелости гепатоцитов, что важно для понимания их функций и адаптаций в разные периоды жизненного цикла.

3.2.2. Морфофункциональный анализ клеток мезенхимального роста в печени крыс на разных этапах онтогенеза

Для описания характеристики мезенхимальных клеток печени на разных этапах онтогенеза провели иммуногистохимическое исследование на виментин образцов печени 10- и 17-суточных подов крыс и 14-суточных и половозрелых самцов. В результате иммуногистохимического исследования (Материалы и методы, п. 2.4.) выявили присутствие виментина в печени животных всех исследуемых возрастных групп.

3.2.2.1. Локализация виментина в печени взрослых крыс

В результате иммуногистохимического исследования (Материалы и методы, п. 2.4.) выявили присутствие виментина в образцах нормальной печени взрослых животных (Рисунок 12). Обнаружили положительную реакцию на виментин в перисинусоидальных клетках и клетках Купфера, стенках желчных канальцев, в эпителиальных клетках желчных протоков и эндотелиоцитах сосудов, что соответствует литературным данным [189].

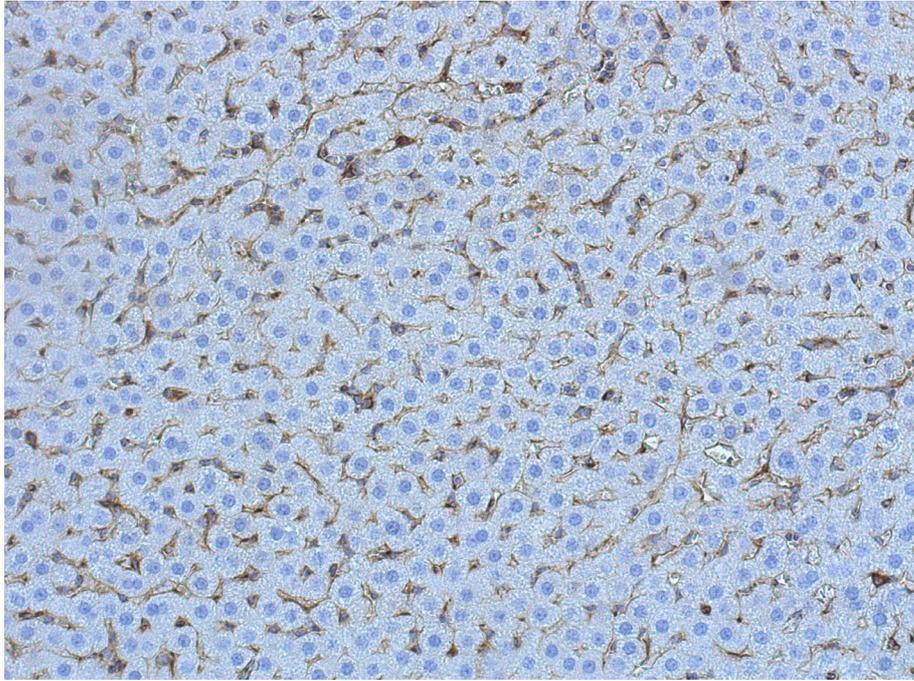


Рисунок 12. Печень взрослой крысы

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину. Иммунопозитивные депозиты преимущественно в околосинусоидальной области и небольшие пылевидные включения в цитоплазме гепатоцитов, эндотелии сосудов. Исходное увеличение 200.

3.2.2.2. Локализация виментина в печени на этапах гепатогенеза

У 10-суточных плодов крыс отмечали отложения виментина в эндотелиальной выстилке формирующихся синусоидов и желчных канальцев. Так же обнаружили резко иммунопозитивные недифференцированные мезенхимальные клетки печени и небольшое количество гепатобластов, содержащих гранулы виментина (Рисунок 13). Возможно гепатобласты, содержащие гранулы виментина находятся на поздней стадии ЭМП [190].

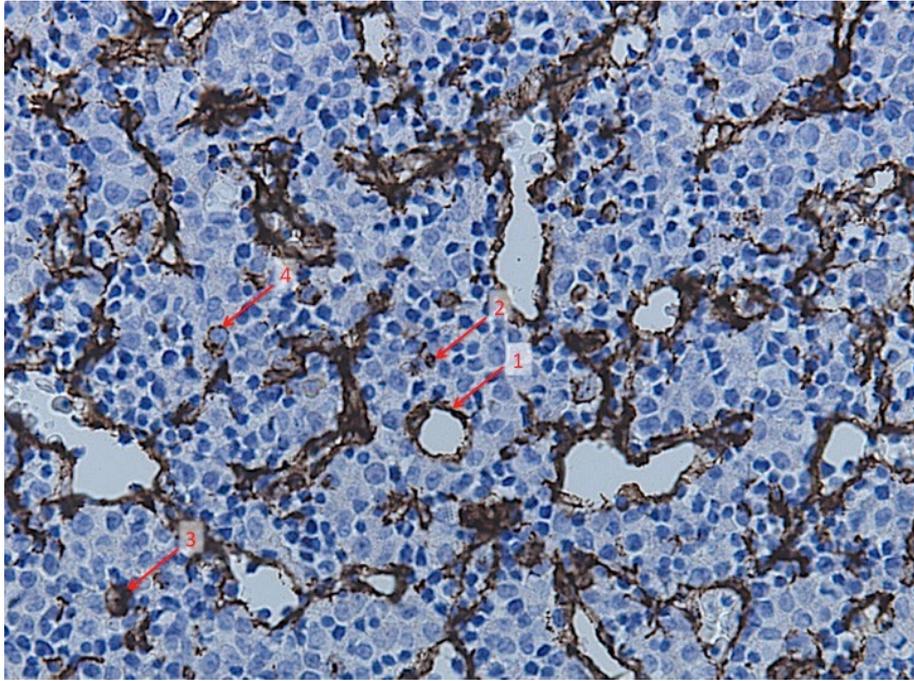


Рисунок 14. Печень 10-суточного плода крысы

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину, Иммунопозитивные депозиты в составе эндотелиальной выстилки синусоидов (1) и желчных канальцев (2). Иммунопозитивные мезенхимальная клетка печени (3) и гепатоцит (4). Исходное увеличение 400.

В образцах печени 17-суточных зародышей крыс так же определяли отложения иммунопозитивных депозитов виментина в эндотелиальном слое синусоидных капилляров, портальных артериол и венул, центральных вен и в стенке желчных канальцев (Рисунок 15). Помимо этого, обнаружили клетки с фенотипом гепатоцитов и с пылевидными иммунопозитивными включениями виментина в цитоплазме, что является признаком клеток в состоянии ЭМП. Отмечали значительно возросшее количество резко иммунопозитивных недифференцированных мезенхимальных клеток печени по сравнению с предыдущим этапом развития.

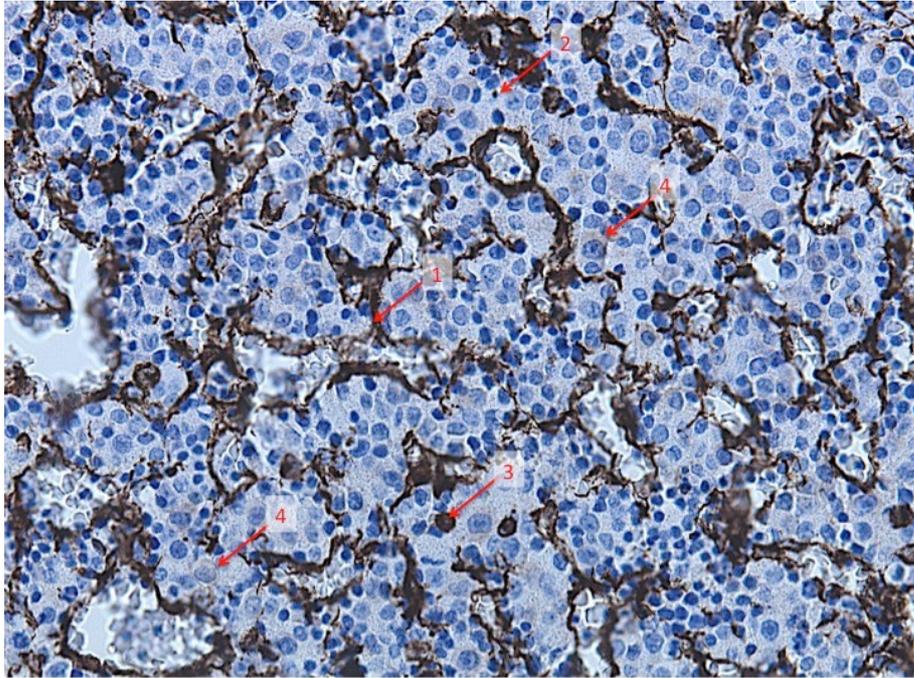


Рисунок 15. Печень 17-суточного плода крысы

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину, Иммунопозитивные депозиты в эндотелии синусоидов (1) и желчных канальцев (2). Иммунопозитивные мезенхимальная клетка печени (3) и гепатоцит с иммунопозитивными пылевидными включениями в цитоплазме (4). Исходное увеличение 400.

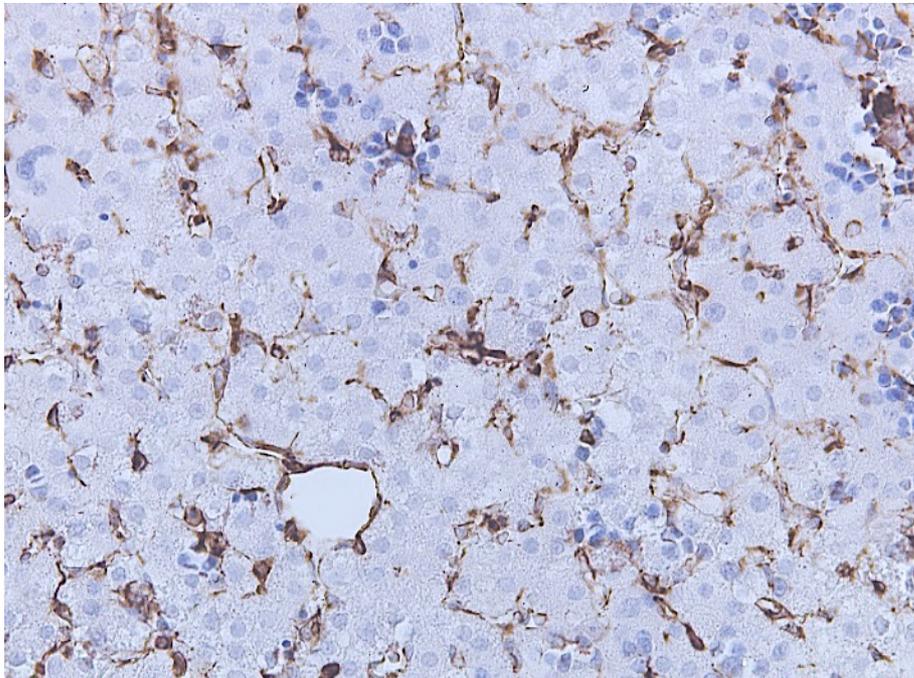


Рисунок 16. Печень суточной крысы

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину, Иммунопозитивные депозиты с мембраной локализацией и нежная пылевидная иммунопозитивная цитоплазма клеток. Исходное увеличение 400.

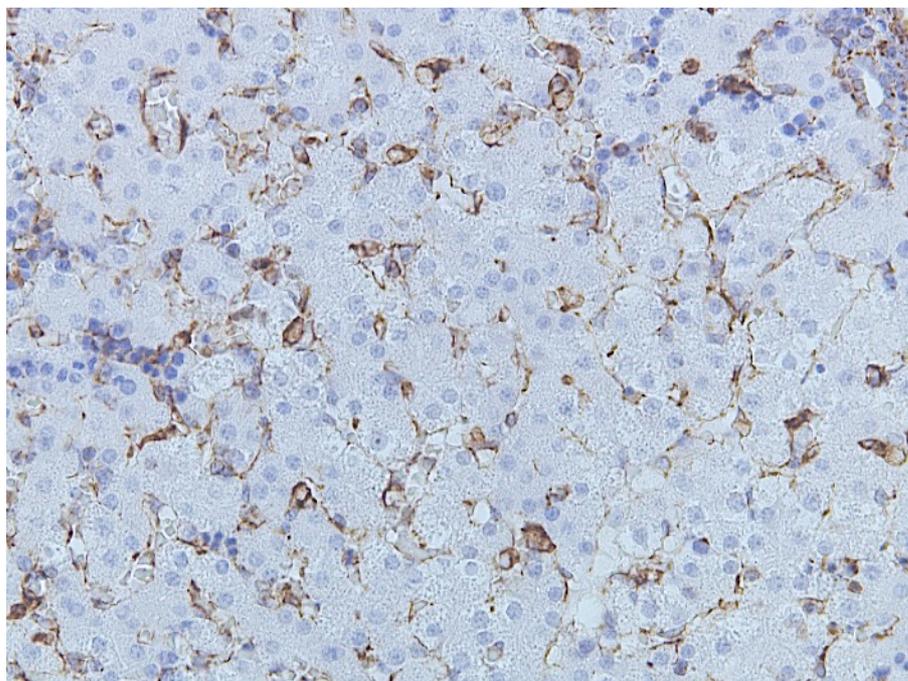


Рисунок 17. Печень 14-суточной крысы

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину, Иммунопозитивные депозиты с мембраной локализацией и нежная пылевидная иммунопозитивная цитоплазма клеток. Исходное увеличение 400.

В образцах печени суточных крысят виментин обнаруживали в эндотелиальных выстилках сосудов, перисинусоидальных клетках, так же определяли виментин-позитивные гепатобласты и гепатоциты с гранулами виментина (Рисунок 16). В печени 14-суточных крысят распределение виментина схоже с таковым в ткани взрослых животных: снижается количество недеференцированных мезенхимальных клеток и виментин-позитивных гепатоцитов (Рисунок. 17).

3.2.2.3. Морфометрический анализ виментина в печени на этапах гепатогенеза

Для оценки динамики количества виментина на этапах онтогенеза провели морфометрический анализ препаратов печени окрашенных иммуногистохимическим методом.

Удельная площадь виментина (Рисунок 18) на 10 день эмбрионального развития составила $13,06\% \pm 1,31$, на 17 день эмбрионального развития незначительно уменьшилась до $12,11\% \pm 1,29$. К моменту рождения удельная площадь значительно снизилась до $4,47\% \pm 1,3$, на 17 день после рождения возросла до $6,12\% \pm 1,3$. У взрослых особей средняя удельная площадь виментина составляла $5,66\% \pm 1,28$ (Таблица 5).

Установили, что удельная площадь виментина на разных этапах развития печени претерпевает значительные изменения, ее максимальный уровень обнаружили на антенатальных этапах, с последующим достоверным снижением после рождения. Динамика уровней виментина в печени крыс на этапах развития подчеркивает роль мезенхимальных клеток печени в антенатальном развитии печени и последующие структурные и функциональные перестройки в печени к моменту рождения.

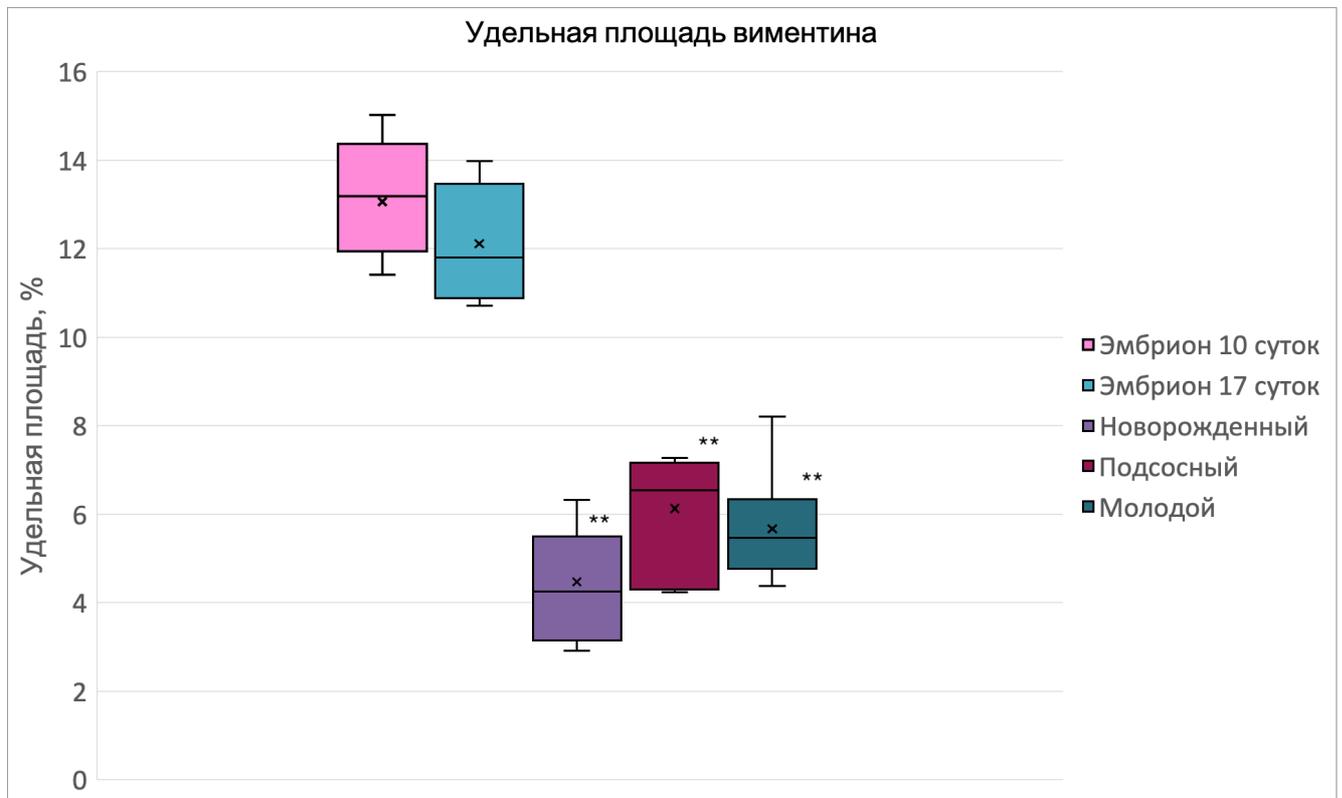


Рисунок 18. Удельная площадь виментина на разных этапах онтогенеза

* * - различия между группами статистически значимы $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки)

Изменения удельной площади виментина на разных этапах онтогенеза

Вариационно-статистические показатели	Эмбрион 10 суток	Эмбрион 17 суток	Новорожденный	Подсосный	Молодой
Среднее, %	13,04	11,80	4,31**	5,96**	5,78**
Ст. откл, %	1,32	1,29	1,31	1,32	1,28
Ст. ошибка, %	0,50	0,49	0,49	0,50	0,48
Медиана, %	13,19	11,80	4,25	6,54	5,472

Примечание: ** - ($p < 0,01$) (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

3.2.3. Определение соотношения виментина и цитокератина 18 в печени на этапах гепатогенеза

Определили динамику соотношения виментин/цитокератин 18 в печени плодов крыс 10 и 17 суток гестации и на 1, 14 день постнатального развития. Оценку количества виментина и цитокератина 18 проводили с использованием методов двойного иммунофлуоресцентного окрашивания. Данный метод флуоресцентной иммуногистохимии позволял точно определить соотношение виментин/цитокератин 18, а также обнаружить клетки с колокализацией обоих маркеров.

С помощью метода двойного иммунофлуоресцентного окрашивания одни и те же образцы печени крыс 10-суточных плодов крыс моноклональными антителами к цитокератину 18 и виментину визуализировали специфическую локализацию мембранного и цитоплазматического пула данного цитокератина 18 в клетках развивающейся печени (Рисунок 19 А), так же были получены изображения клеток, содержащих виментин (Рисунок 19 Б). Однако на совмещённых изображениях (Рисунок 19 Г) большинство виментин-позитивных клеток обнаруживали и цитокератин 18 и только единичные клетки содержали

исключительно мембранный пул виментина. Клетки, имеющие оба маркера (цитокератин и виментин), являлись гибридными и их наличие подтверждает гипотезу о происхождении мезенхимальных клеток печени путём ЭМП [141]. Выявили переходные клетки с колокализацией виментина и цитокератина-18 вероятно находящиеся на этапе ЭМП в областях формирования сосудов печени, таких как синусоидные капилляры, портальные триады и центральные вены, что характерно для дифинитивного расположения клеток мезенхимального происхождения в зрелой печени.

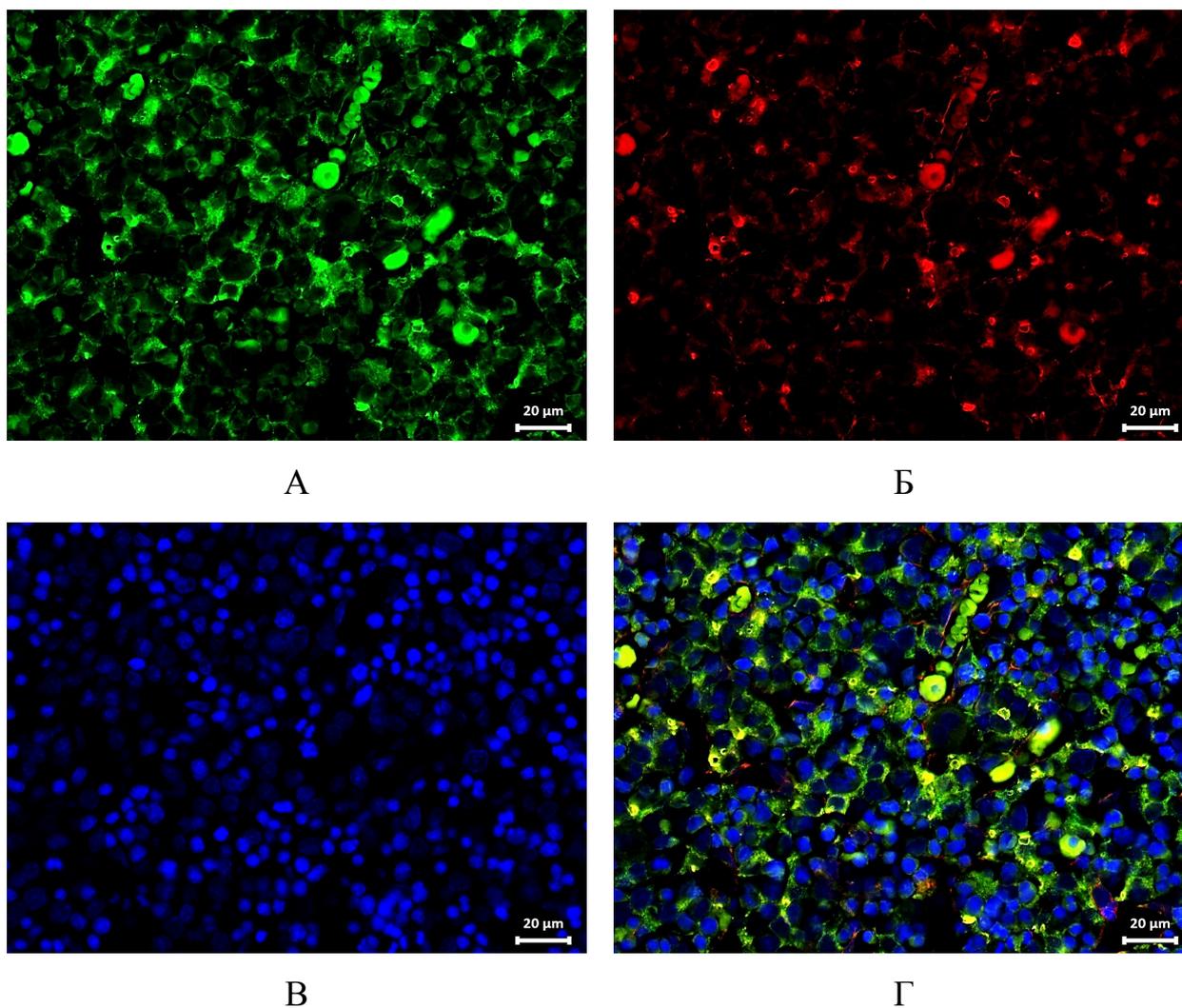


Рисунок 19. Иммунофлуоресцентный анализ печени 10-суточного плода крысы

А) зелёный канал - визуализация антителами к цитокератину 18. Б) красный канал – визуализация антителами к виментину. В) ядра клеток, окрашенные DAPI. Г) совмещённое иммунофлуоресцентное изображение. Исходное увеличение 400.

Получили изображения иммунофлюоресцентного окрашивания печени крыс 17-суточных плодов крыс моноклональными антителами к цитокератину 18 и виментину и показали специфическую визуализацию данных белков в клетках развивающейся печени (Рисунок 20).

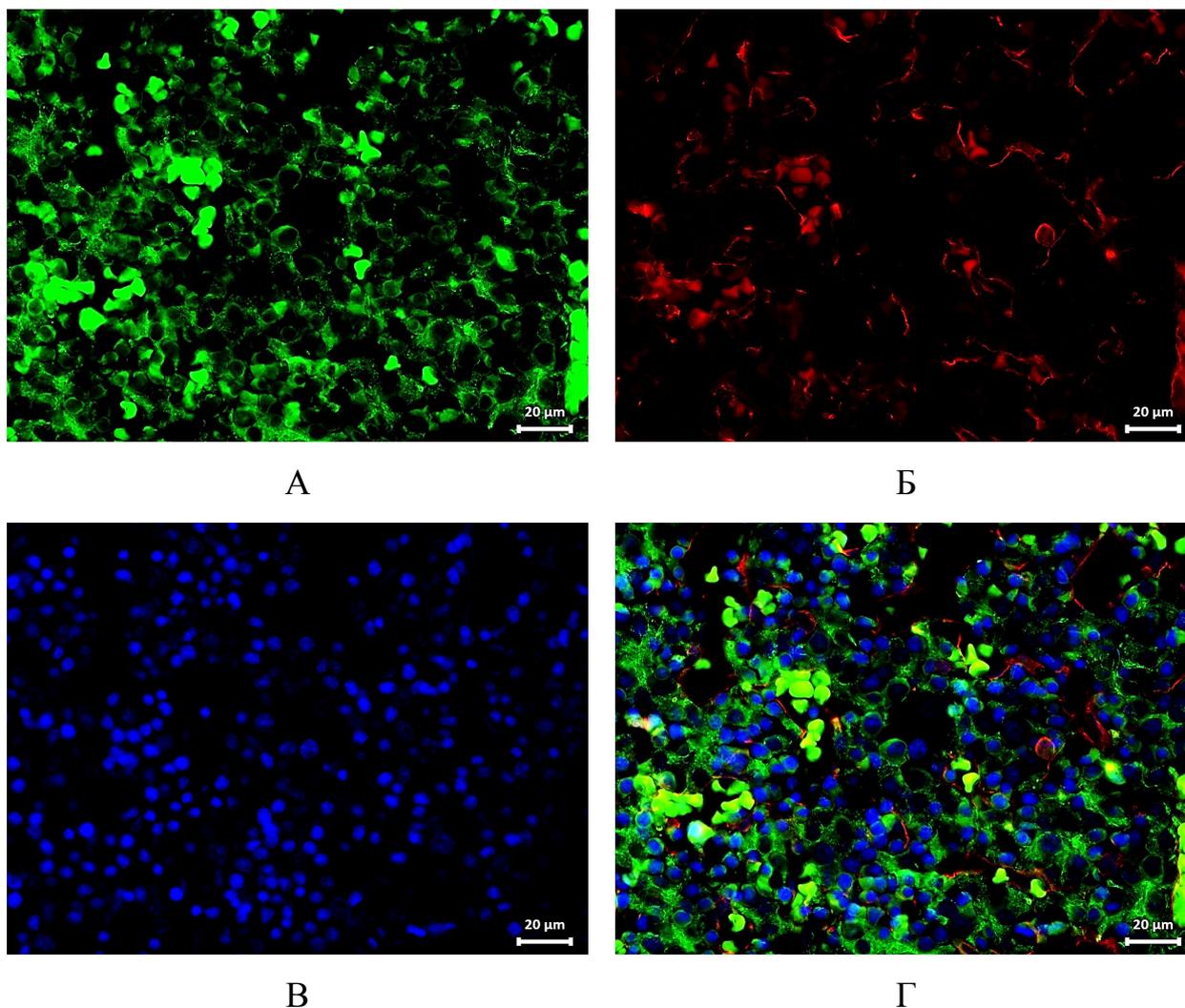


Рисунок 20. Иммунофлюоресцентный анализ печени 17-суточного плода крысы

А) зелёный канал - визуализация антителами к цитокератину 18. Б) красный канал – визуализация антителами к виментину. В) ядра клеток, окрашенные DAPI. Г) совмещённое иммунофлюоресцентное изображение. Исходное увеличение 400.

На 17 сутки эмбрионального развития снизилось число клеток, имеющих колокализацию цитокератина 18 и виментина, на фоне увеличения количества клеток, содержащих либо эпителиальный (цитокератин 18), либо мезенхимальный (виментин) маркеры. Виментин-позитивные клетки обнаруживали вблизи от формирующихся центральных вен, порталных триад и синусоидных капилляров. Дальнейшее увеличение количества мезенхимальных клеток и их типичное расположение для зрелой печени подтверждает весомую роль ЭМП в морфогенезе мезенхимального ростка паренхимы печени.

Был проведен компьютерный анализ иммунофлюоресцентных изображений с использованием количественного подхода, включал отдельное рассмотрение зеленого и красного каналов на изображениях, полученных с помощью специфических антител, маркированных разными флуорофорами. Для определения степени перекрестного свечения был использован метод бинаризации изображений с последующим вычислением перекрытия сигналов при 50% пороге интенсивности. Результаты показывают, что перекрытие между каналами не превышает 28,29% при 50% пороге, что указывает на минимальное перекрестное свечение. Большая часть сигнала приходится на специфические каналы, что подтверждает специфичность связывания антител с их целевыми белками (Таблица 6).

Таблица №6

Анализ перекрестного свечения при иммунофлуоресценции

День эмб. развития	Порог интенсивности	Перекрытие, %	Только зеленый, %	Только красный, %
10	50	28,29	68,94	2,77
17	50	8,93	86,71	4,36

После рождения в печени крыс появляется яркая автофлуоресценция, что затрудняло дальнейшее отслеживание гибридных клеток, содержащих оба маркера, поэтому для получения количественных данных о содержании виментина

и цитокератина 18 в паренхиме печени провели вестерн-блоттинг анализ гомогенатов печени (Материалы и методы, п.2.7) (Рисунок 21).

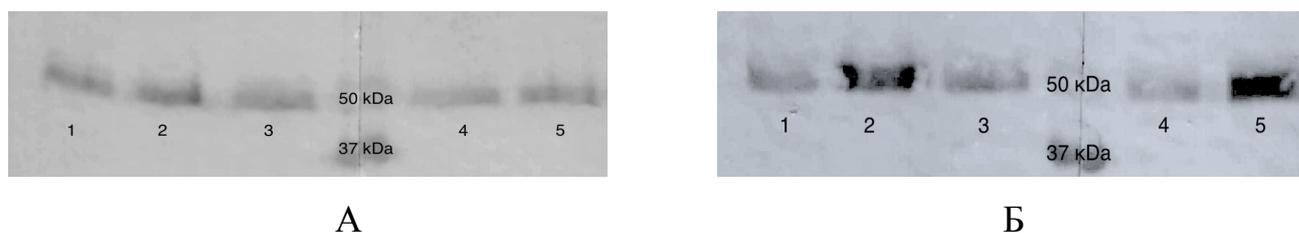
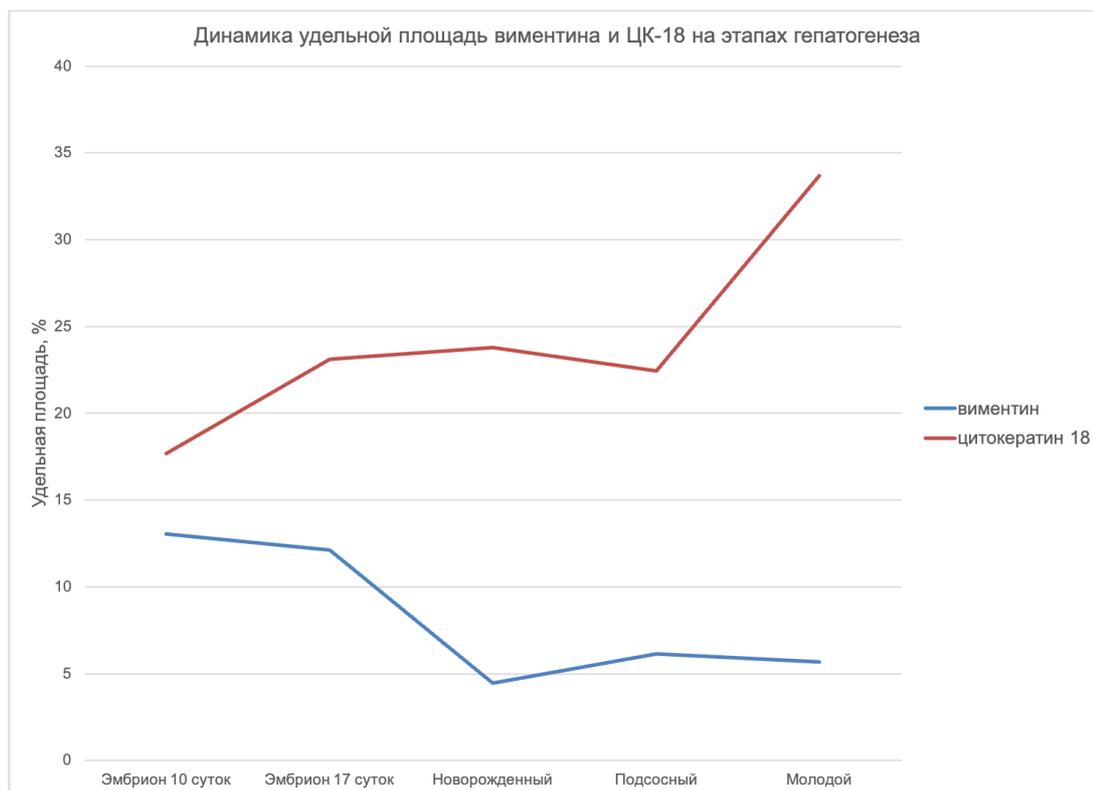


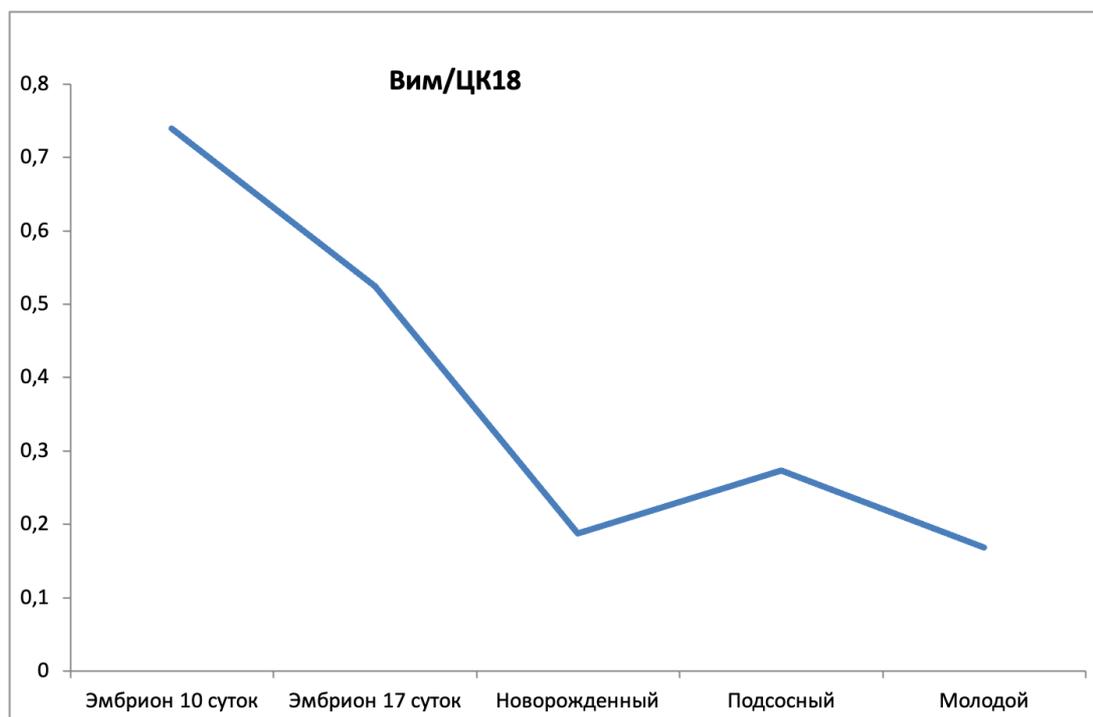
Рисунок 21. Вестерн-блоттинг анализ гомогенатов печени на содержание виментина (А) и цитокератина 18 (Б)

1 – 10 суточный эмбрион, 2 – 17 суточный эмбрион, 3 – новорожденный, 4 – подсосный, 5 – молодой возраст

Чтобы дополнительно охарактеризовать МЭП при дифференцировке клеток печени, мы провели количественный анализ динамических изменений экспрессии виментина и цитокератина 18. Для этого мы рассчитали отношение удельной площади виментин-позитивных клеток к цитокератин-позитивным. На графике отношения площади виментин/цитокератин 18 (Рисунок 22) кривая снижается от 10 дня антенатального развития до рождения и показывает увеличение синтеза белков, характерных для эпителиальных клеток, относительно белков мезенхимальных клеток, таким образом дополнительно подтверждая МЭП в процессе пренатального и раннего постнатального гепатогенеза [191].



А



Б

Рис 22. Динамика соотношения относительной площади виментина и цитокератина на этапах онтогенеза

А – относительное содержание виментина и цитокератина, Б – соотношение относительного содержания виментина и цитокератина.

3.3. Динамика клеточного состава печени крыс на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза

Отследили динамику эпителиального и мезенхимального ростков клеток печени крыс на разных этапах репаративной регенерации печени после химически индуцированного фиброза для выяснения ведущих клеточных механизмов спонтанной регенерации печени после её токсического поражения.

3.3.1. Особенности мезенхимальных клеток печени крыс на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза

Для описания характеристик мезенхимальных клеток при регенерации после химически индуцированного фиброза печени провели иммуногистохимическое исследование 32 образцов печени крыс четырёх экспериментальных групп, согласно предложенной схеме, эксперимент (Материалы и методы, п. 2.1) с использованием антител к виментину и гладкомышечному актину (α -SMA).

3.3.1.1. Особенности распределения виментина в печени на разных этапах регенерации после химически индуцированного фиброза

Для описания морфофункциональных особенностей пула мезенхимальных клеток в печени при регенерации после химически индуцированного фиброза провели иммуногистохимическое исследование с использованием антител к виментину.

Особенности расположения виментина в печени интактных животных контрольной группы описали в предыдущей главе (Результаты и обсуждение, п. 3.2.2.1.). Определили ряд виментин-положительных клеток, характерных для нормального строения печени – эндотелиоциты, холангиоциты, перисинусоидальные клетки и клетки Купфера.

В результате иммуногистохимического исследования определили распределение виментина в образцах печени животных I экспериментальной группы (0 дней восстановления) (Рисунок 23). Выявили отложения виментина внутри соединительной ткани фиброзных септ, в стенках синусоидных капилляров, перисинусоидальные клетки печени и макрофаги так же были виментин-позитивными, что согласуется с литературными данными [192]. Отметим aberrantные включения виментина в юных гепатоцитах, которые свидетельствуют о происхождении данных клеток путём МЭП. Внутри фиброзных септ обнаружили формирование ложных печёночных долек из низкодифференцированных клеток.

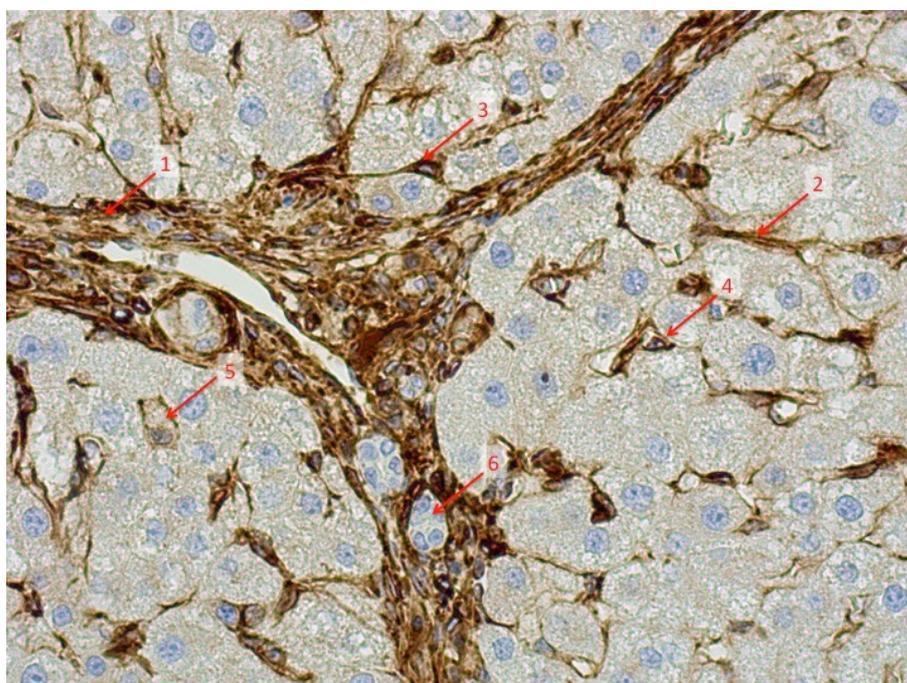


Рисунок 23. Печень крысы I экспериментальной группы.

Имуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину.

Имунопозитивные депозиты в составе фиброзных септ (1), эндотелия синусоидов (2), перисинусоидальных клеток (3) и клеток Купфера (4). Юный иммунопозитивный гепатоцит (5). Ложная долька внутри фиброзной дольки из низкодифференцированных клеток (6). Исходное увеличение 400.

По результатам иммуногистохимического исследования печени II экспериментальной группы («Материалы и методы», п. 2.1) с использованием антител к виментину обнаружили ключевые изменения в распределении данного

белка в ткани органа. Через 4 недели восстановления паренхимы печени после химически индуцированного фиброза (II экспериментальная группа) отмечали истончение фиброзных септ, вдоль которых были расположены юные виментин-позитивные гепатоциты. Наличие виментина в цитоплазме гепатоцитов считали за признак промежуточного этапа МЭП. В паренхиме печени детектировали группы мезенхимальных клеток, окружённые виментин-позитивными гепатоцитами (Рисунок 24). Мы полагаем что такие морфофункциональные группы мезенхимальных клеток в окружении юных гепатоцитов являются очагами регенерации печени путём МЭП, и называем данные структуры регенераторными розетками. Таким образом, места образования юных гепатоцитов путём МЭП через 4 недели восстановления были вдоль фиброзных септ и вокруг мезенхимальных регенераторных розеток.

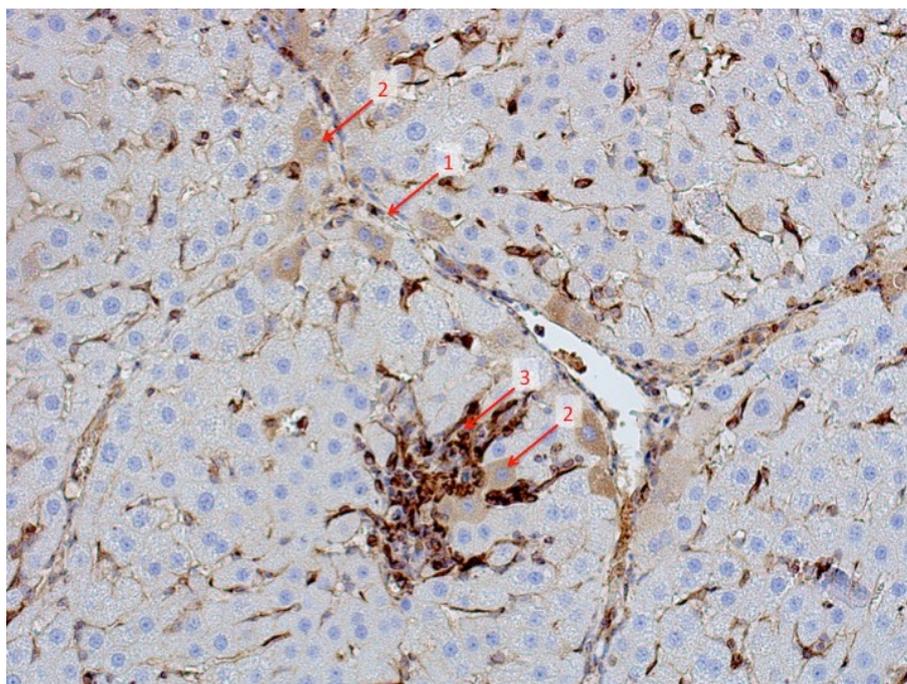


Рисунок 24. Печень крысы II экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину. Виментинпозитивные юные гепатоциты (2) вдоль фиброзных септ (1) и вокруг мезенхимальной регенераторной розетки (3). Исходное увеличение 200.

Провели иммуногистохимическое исследование печени животных III экспериментальной группы (8 недель восстановления) с использованием антител к

виментину. Отмечали следующие изменения виментин-содержащих клеток: виментин-позитивные гепатоциты располагались вдоль фиброзных септ, при этом их окрашивание стало более насыщенным по сравнению с виментин-позитивными гепатоцитами животных II экспериментальной группы. Обнаружили новое место локализации юных виментин-позитивных гепатоцитов вблизи кровеносных сосудов. Мезенхимальные островки клеток сохранялись, однако они окружены зрелыми виментин-отрицательными гепатоцитами (Рисунок 25). Таким образом заметили преимущественную локализацию процессов МЭП возле кровеносных сосудов и фиброзных септ.

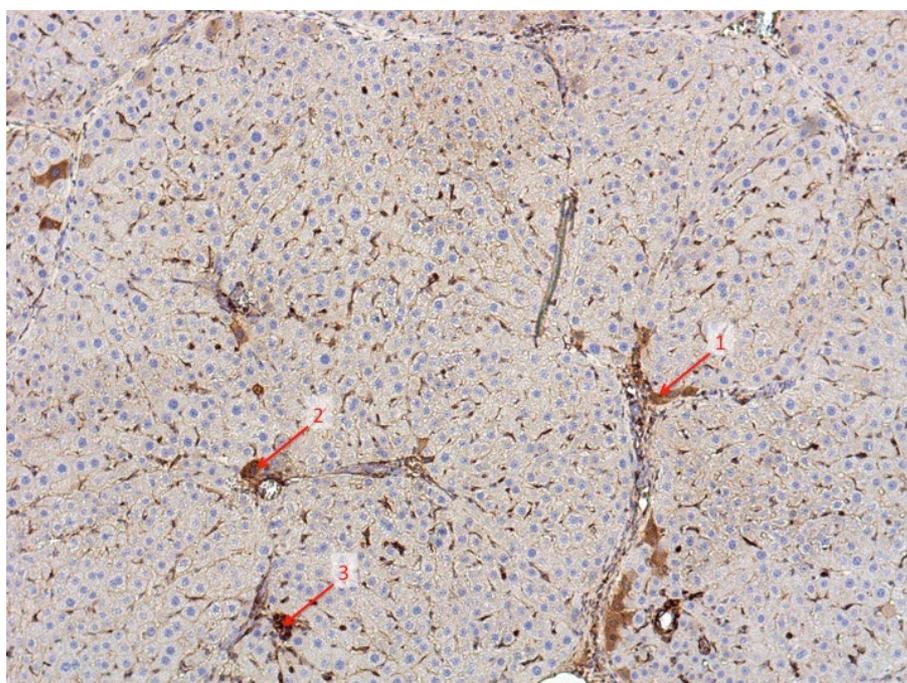


Рисунок 25. Печень крысы III экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину. Виментинпозитивные юные гепатоциты вдоль фиброзных септ (1) и вблизи кровеносных сосудов (2), мезенхимальная регенераторная розетка (3) в окружении зрелых гепатоцитов. Исходное увеличение 100.

В результате иммуногистохимического исследования печени животных IV экспериментальной группы (12 недель восстановления после химически индуцированного фиброза печени) обнаружили восстановление нормального паттерна распределения виментина. Отмечали отсутствие видимых фиброзных

септ и наличие небольшого количества виментин-позитивных гепатоцитов вблизи портальных триад. Наличие юных переходных гепатоцитов вблизи портальных триад соответствует классическому представлению о их месте образования (Рисунок 26).

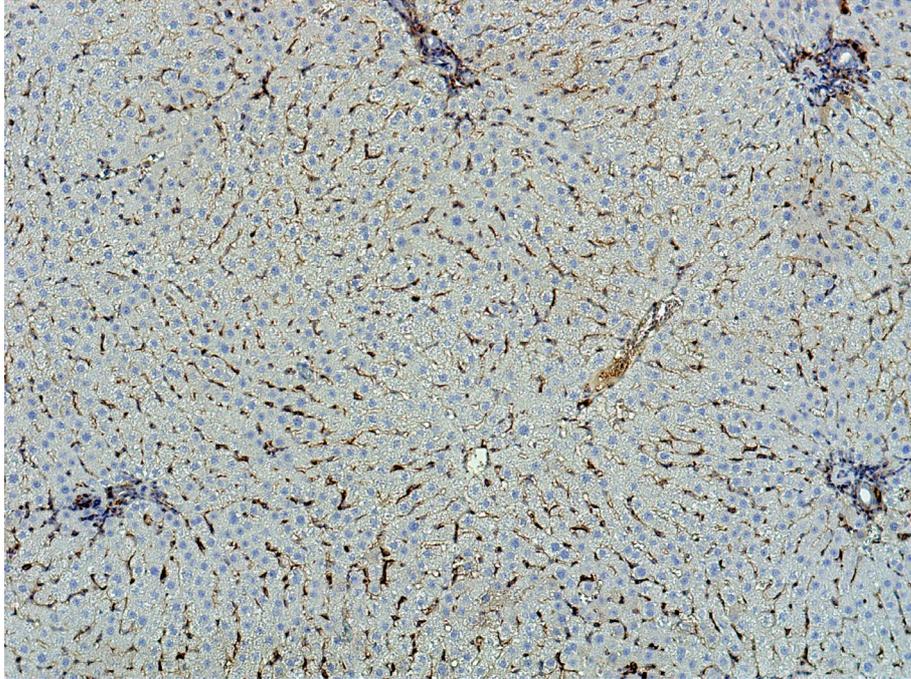


Рисунок 26. Печень крысы IV экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину.

Виментинпозитивные юные гепатоциты вблизи портальных триад. Исходное увеличение 100.

Не смотря на восстановление общей гистоархитектоники печени спустя 12 недель после прекращения токсического воздействия на орган, отмечали наличие мезенхимальных розеток в паренхиме печени вблизи кровеносных сосудов. Через 12 недель восстановления данные морфологические структуры состояли из виментин-позитивных мезенхимальных клеток, располагались вблизи кровеносных сосудов и были окружены юными виментин-отрицательными гепатоцитами (Рисунок 27).

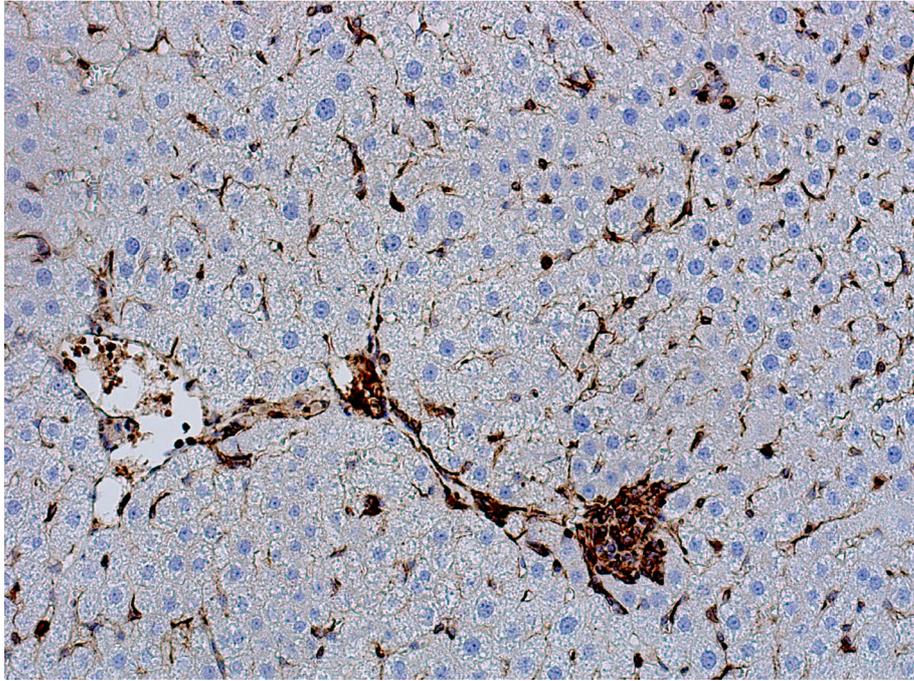


Рисунок 27. Печень крысы IV экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к виментину. Виментинпозитивные мезенхимальные розетки вблизи кровеносных сосудов. Исходное увеличение 200.

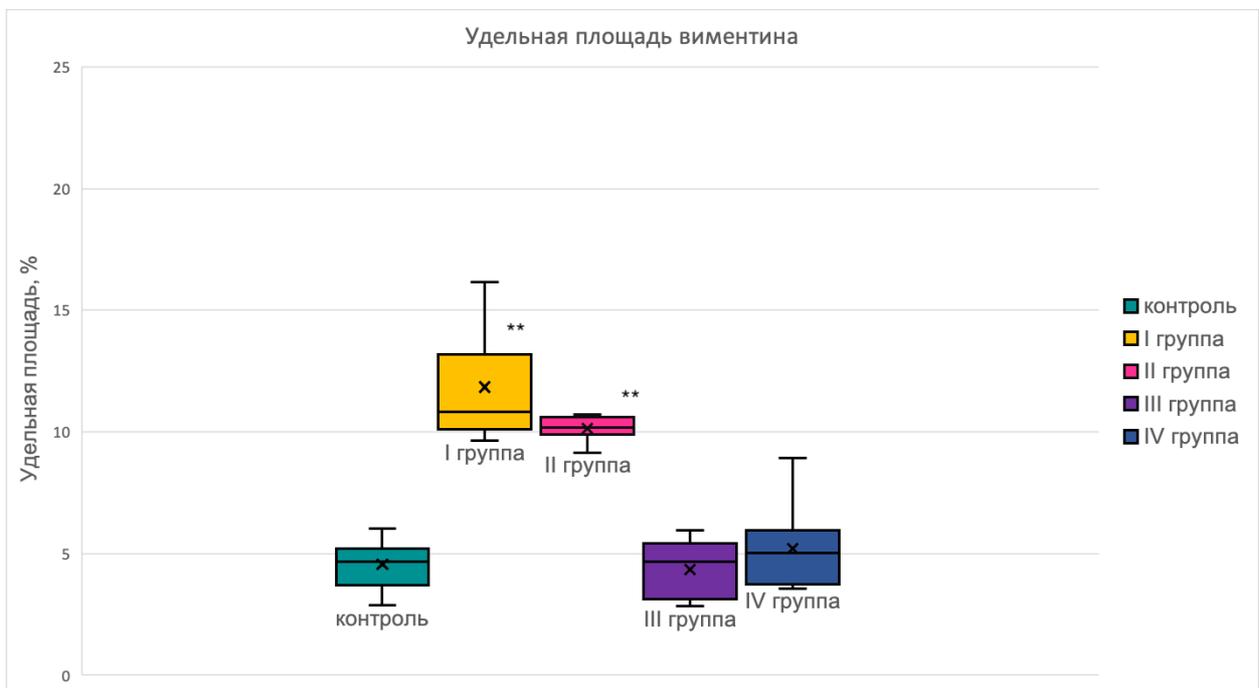


Рисунок 28. Динамика относительной площади виментина при регенерации печени.

** - у животных I и II групп различия средних значений статистически значимы $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки) относительно других групп

Изменения удельной площади виментина при регенерации печени

Вариационно-статистические показатели	Контроль, интактные животные	I группа (0 недель восст.)	II группа (4 недели восст.)	III группа (8 недель восст.)	IV группа (12 недель восст.)
Среднее, %	4,57	11,85**	10,14**	4,35	5,21
Ст. откл, %	1,03	2,30	0,52	1,22	1,88
Ст. ошибка, %	0,39	0,87	0,20	0,46	0,71
Медиана, %	4,68	10,83	10,18	4,67	5,03

Примечание: ** - ($p < 0,01$) (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

Оценили динамику относительной площади виментина при регенерации печени (Рисунок 28). В печени крыс I экспериментальной группы (0 дней восстановления) относительная площадь виментина статистически значимо больше, чем в образцах печени интактных крыс (11,85% против 4,57% соответственно). Через 4 недели восстановления печени крыс II экспериментальной группы, относительная площадь виментина в паренхиме печени становилась достоверно меньше, чем у крыс I экспериментальной группы (10,14% против 11,85%), но была все еще достоверно больше, чем у крыс контрольной группы (10,14% против 4,57%). В печени крыс III и IV групп (через 8 и 12 недель после отмены химического воздействия) относительная площадь виментина в паренхиме печени не имела значимых отличий по сравнению с контрольной группой и была достоверно ниже чем в печени крыс I экспериментальной группы (4,35% и 5,21% против 11,85%) (Таблица 7).

Таким образом, распределение виментин-позитивных гепатоцитов динамически изменяется на этапах репаративной регенерации печени после химически индуцированного фиброза. Мы обнаружили признаки начала МЭП начиная с момента образования фиброза печени (I экспериментальная группа животных 0 недель восстановления), то есть орган восстанавливает пул гепатоцитов из мезенхимальных клеток и еще до того, как устранены факторы,

вызывающие фиброз. К 4 недели восстановления (II экспериментальная группа) в паренхиме органа появляются новые морфофункциональные единицы – виментин-позитивные регенераторные розетки и изменяется рисунок распределения переходных гепатоцитов. Виментин-позитивные клетки во II группе определяли вдоль фиброзных септ и вокруг регенераторных розеток. Через 8 недель восстановления (III экспериментальная группа) мы отмечали снижение активности МЭП вблизи регенераторных розеток и обнаружили смещение МЭП в сторону кровеносных сосудов, то есть в этом случае вероятно гепатоциты происходят не из паренхиматозных мезенхимальных клеток, а из мезенхимальных клеток крови. Спустя 12 недель восстановления отмечали сохранение регенераторных розеток с отсутствием признаков МЭП вблизи них, в целом гистоархитектоника органа восстанавливалась и нормализовались места образования юных гепатоцитов – вблизи портальных триад.

3.3.1.2. Особенности распределения α -SMA в печени на разных этапах регенерации после химически индуцированного фиброза

Для того что бы определить какие из мезенхимальных клеток имеют характеристики миофибробластов и продуцируют основную массу ВКМ провели иммуногистохимическое исследование печени на разных этапах регенерации после химически индуцированного повреждения с использованием антител к α -SMA [74].

В печени интактных животных контрольной группы (Материалы и методы, п. 2.1) обнаружили основные преобладающие места локализации α -SMA с помощью иммуногистохимического метода с использованием антител к данному белку. Большею частью α -SMA определяли в мышечном слое кровеносных сосудов и в миофибробластах перипортальной зоны (Рисунок 29).

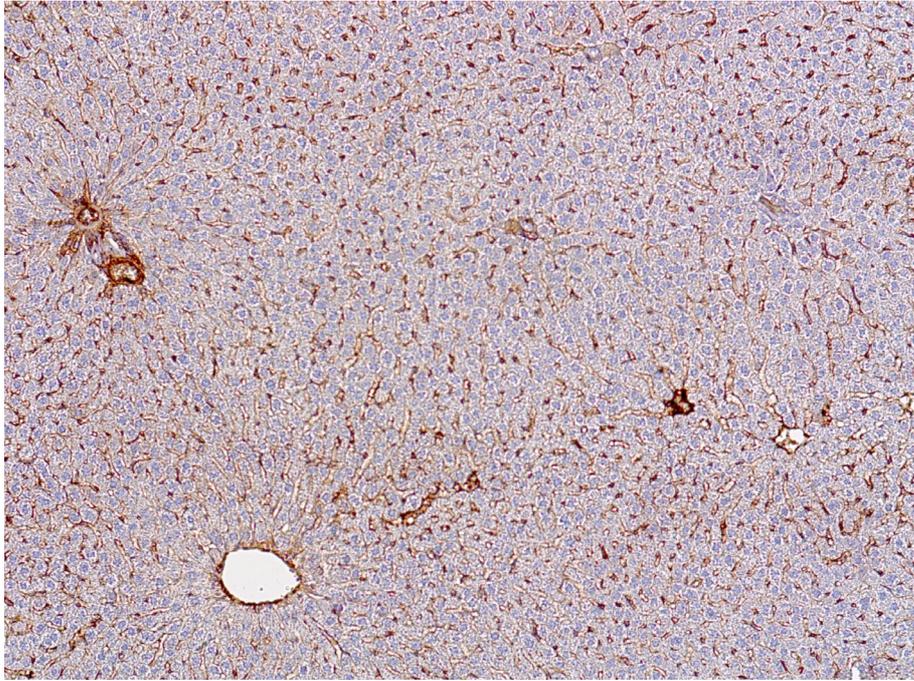
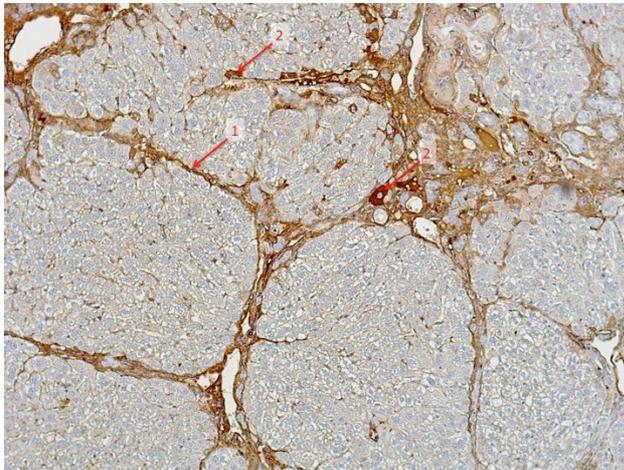
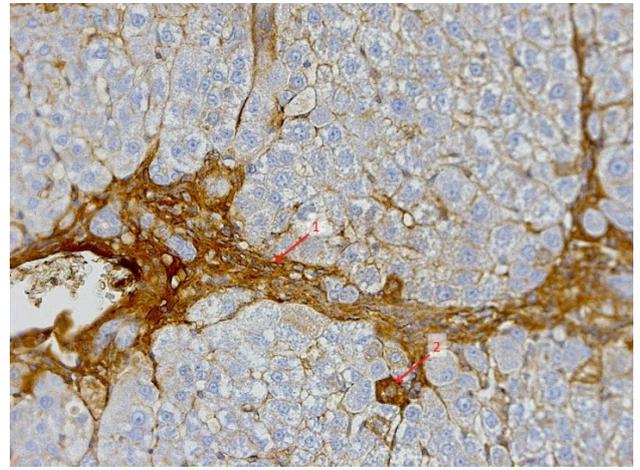


Рисунок 29. Печень крысы контрольной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к α -SMA. Исходное увеличение 100.



А



Б

Рисунок 30. Печень крысы I группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к α -SMA. Миофибробласты в составе фиброзных септ (1) и активированные перисинусоидальные клетки (2). А. Исходное увеличение 100. Б. Исходное увеличение 200.

При иммуногистохимическом окрашивании печени крыс I экспериментальной группы (0 недель восстановления) с использованием антител к α -SMA обнаружили массивные фиброзные порто-портальные и порто-центральные септы, состоящие из миофибробластов и волокон. Отмечали расположенные вблизи фиброзных септ резко иммунопозитивные активированные перисинусоидальные клетки печени (клетки Ито) (Рисунок 30). Перисинусоидальные клетки в результате активации приобретают свойства сократимости за счёт накопления α -SMA и синтезируют компоненты ВКМ.

С помощью иммуногистохимического метода определили места локализации α -SMA в образцах печени животных II экспериментальной группы (4 недели восстановления). Обнаружили α -SMA позитивные перисинусоидальные клетки вблизи фиброзных септ (Рисунок 31). Так же обнаружили мезенхимальные регенераторные розетки в окружении α -SMA-позитивных клеток печени, регенерирующих α -SMA позитивных гепатоцитов (Рисунок 32) [193].

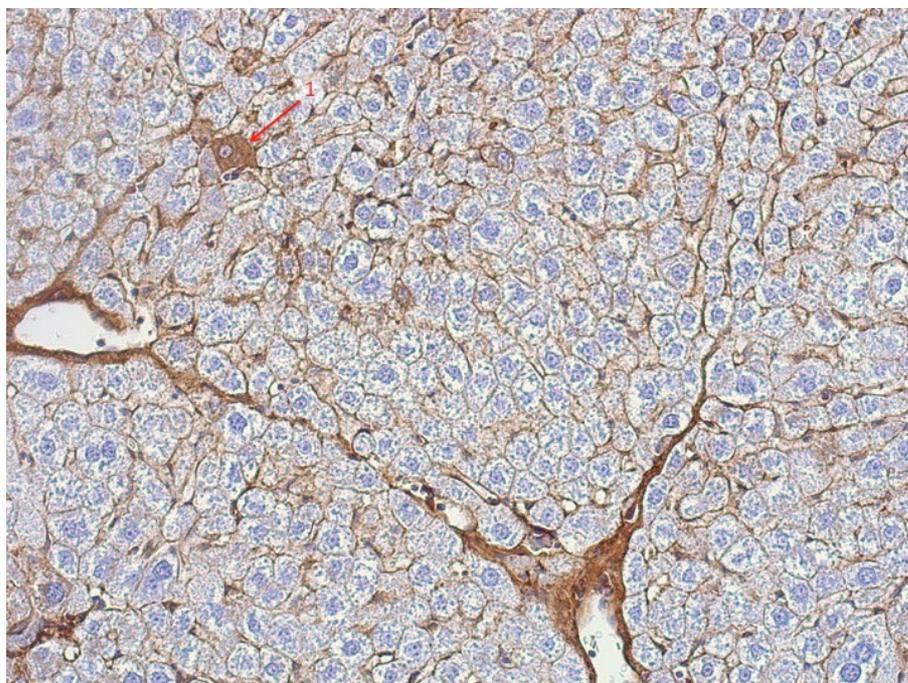


Рисунок 31. Печень крысы II группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к α -SMA. Активированная перисинусоидальная клетка (1) вблизи фиброзной септы. Исходное увеличение 200.

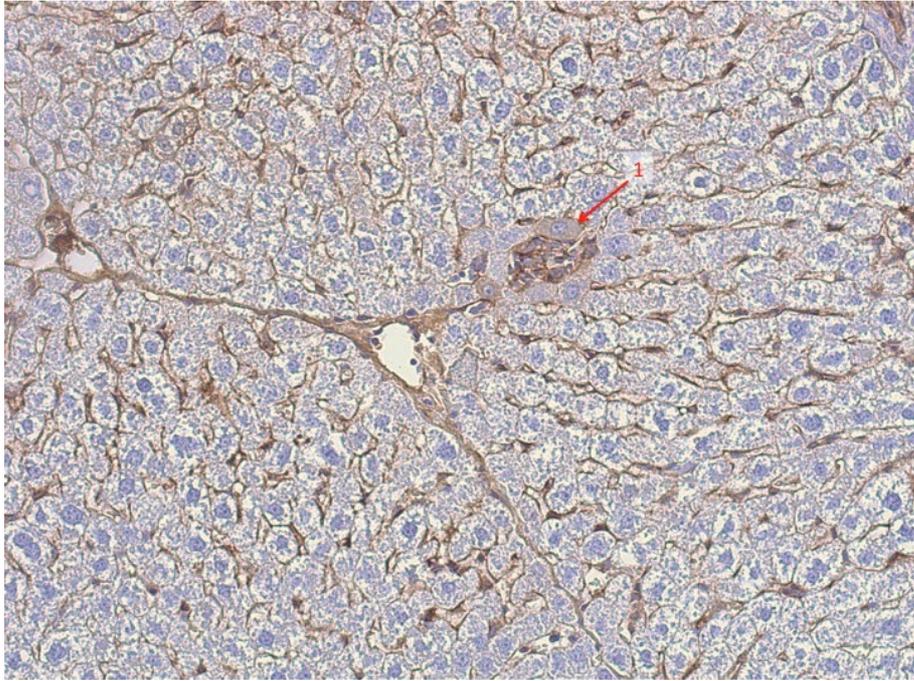


Рисунок 32. Печень крысы II группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к α -SMA. Мезенхимальная регенераторная розетка в окружении α -SMA позитивных регенеративных гепатоцитов (1). Исходное увеличение 200.

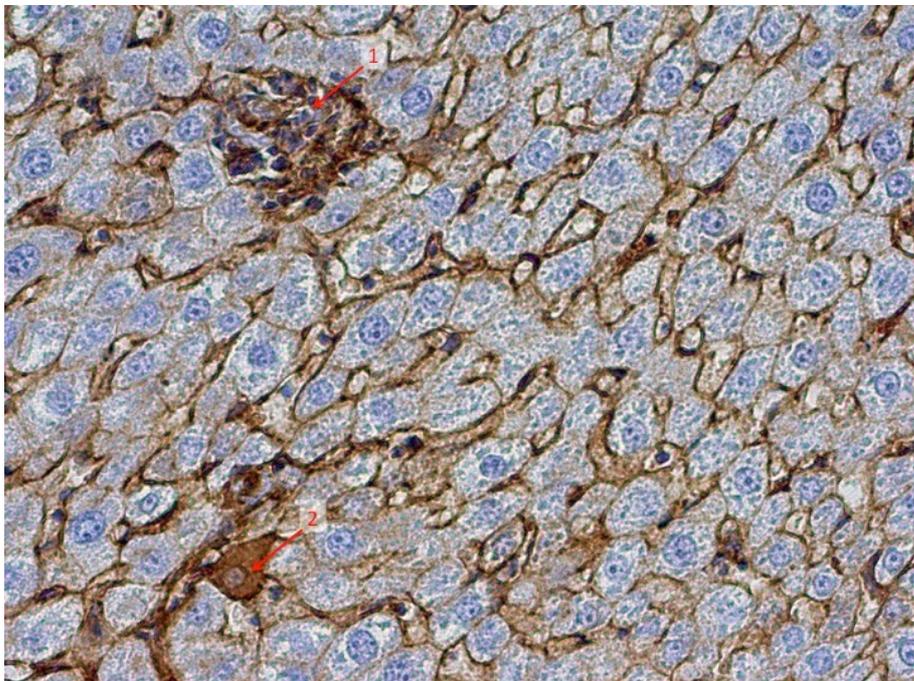


Рисунок 33. Печень крысы III экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к α -SMA. Мезенхимальная розетка из α -SMA позитивных клеток (1) в окружении гепатоцитов и активированные перисинусоидальные клетки (2) в паренхиме печёночной дольки. Исходное увеличение 400.

В результате иммуногистохимического исследования печени животных III экспериментальной группы (8 недель восстановления) обнаружили α -SMA позитивные активированные перисинусоидальные клетки (клетки Ито), связанные со звездчатыми макрофагами (клетками Купфера) в паренхиме печёночных долек, вдали фиброзных септ. Выявили в паренхиме мезенхимальные розетки, состоящие из мезенхимальных α -SMA позитивных клеток, которыми могут быть миофибробласты, фибробласты, активированные звездчатые клетки, в окружении зрелых и юных гепатоцитов без включений α -SMA (Рисунок 33).

В печени животных IV экспериментальной группы (12 недель восстановления после химически индуцированного фиброза печени) отмечали восстановление нормального распределения α -SMA (Рисунок 34). Однако обнаруживались небольшие соединительнотканые розетки из миофибробластов в окружении зрелых гепатоцитов.

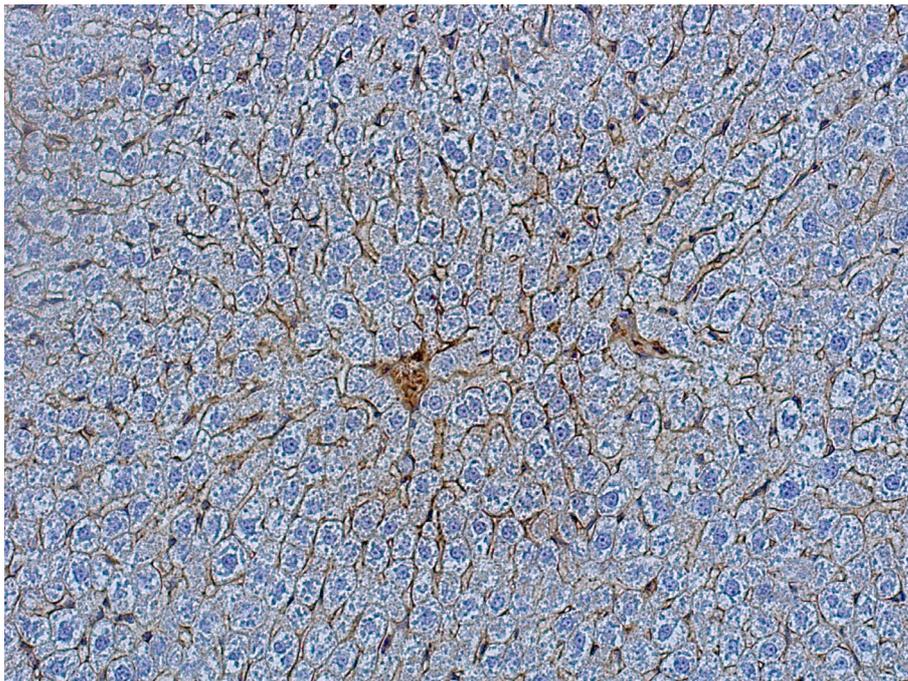


Рисунок 34. Печень крысы IV экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к α -SMA. Мезенхимальная розетка из миофибробластов в окружении зрелых гепатоцитов и в паренхиме печёночной дольки. Исходное увеличение 100

Обнаруженные нами регенерирующие гепатоциты с α -SMA в цитоплазме, мы расцениваем как признак происхождения гепатоцитов из мезенхимальных α -SMA позитивных клеток [194], вероятно это остаточные количества белка, сохранившиеся на ранних этапах МЭП (4 недели восстановления).

При количественной оценке обнаружили достоверное ($p < 0,05$) увеличение удельной площади иммунореактивного материала с использованием антител против α -SMA (Рисунок 35) в образцах печени животных I (0 дней восстановления) и II (4 недели восстановления) экспериментальных групп, с последующим уменьшением удельной площади до значений контрольной группы животных (Таблица 8).

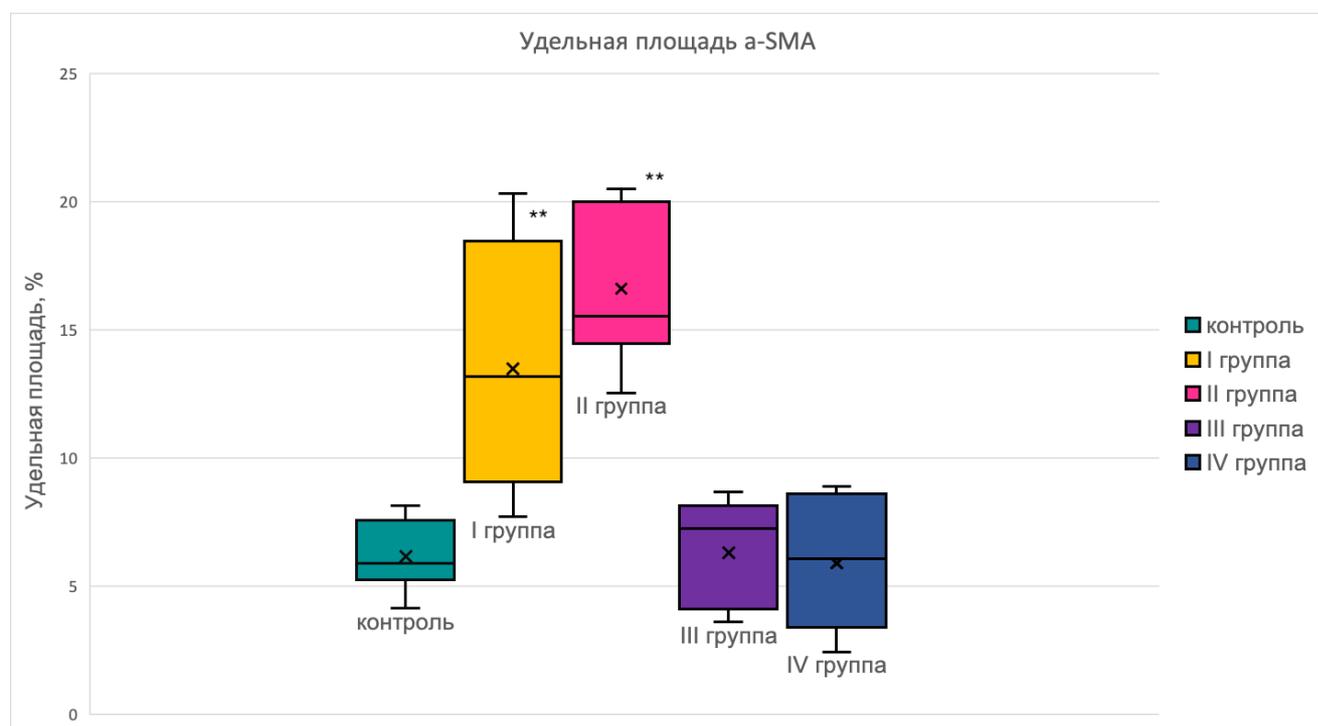


Рисунок 35. Динамика относительной площади α -SMA при регенерации печени.

** - у животных I и II групп различия средних значений статистически значимы $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки) относительно других групп.

Изменения удельной площади α -SMA при регенерации печени

Вариационно-статистические показатели	Контроль, интактные животные	I группа (0 недель восст.)	II группа (4 недели восст.)	III группа (8 недель восст.)	IV группа (12 недель восст.)
Среднее, %	6,15	13,49**	16,61**	6,30	5,90
Ст. откл, %	1,26	4,75	2,84	2,01	2,48
Ст. ошибка, %	0,36	1,37	0,82	0,58	0,72
Медиана	5,88	13,18	15,52	7,24	6,06

Примечание: ** - ($p < 0,01$) (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

3.3.2. Особенности клеток эпителиального ростка в печени крыс на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза

Для описания морфофункциональных характеристик клеток энтодермального происхождения – гепатоцитов и холангиоцитов на этапах репаративной регенерации провели иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к цитокератину 18 образцов печени крыс всех четырех экспериментальных групп согласно нашей схеме эксперимента (Материалы и методы, п. 2.1).

3.3.2.1. Динамика распределения цитокератина 18 на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза

В результате иммуногистохимического исследования (Материалы и методы, п. 2.4.) образцов печени животных I экспериментальной группы (0 дней восстановления) обнаружили типичное расположение иммунопозитивных депозитов цитокератина 18 в мембранах эндотелиоцитов и в зрелых гепатоцитах с преобладанием мембранной формы белка и слабоиммунопозитивной цитоплазмой. Отмечали активизацию регенераторных процессов – большое количество юных

гепатоцитов с усиленным окрашиванием цитоплазмы на цитокератин 18 и резкоиммунопозитивные гипертрофированные овальные клетки. Юные гепатоциты и овальные клетки печени преимущественно локализовались вдоль и внутри фиброзных септ (Рисунок 36). Юные гепатоциты и овальные клетки являются регенераторным пулом паренхимы печени и их характерное расположение говорит об активных процессах регенерации в местах образования фиброзных септ.

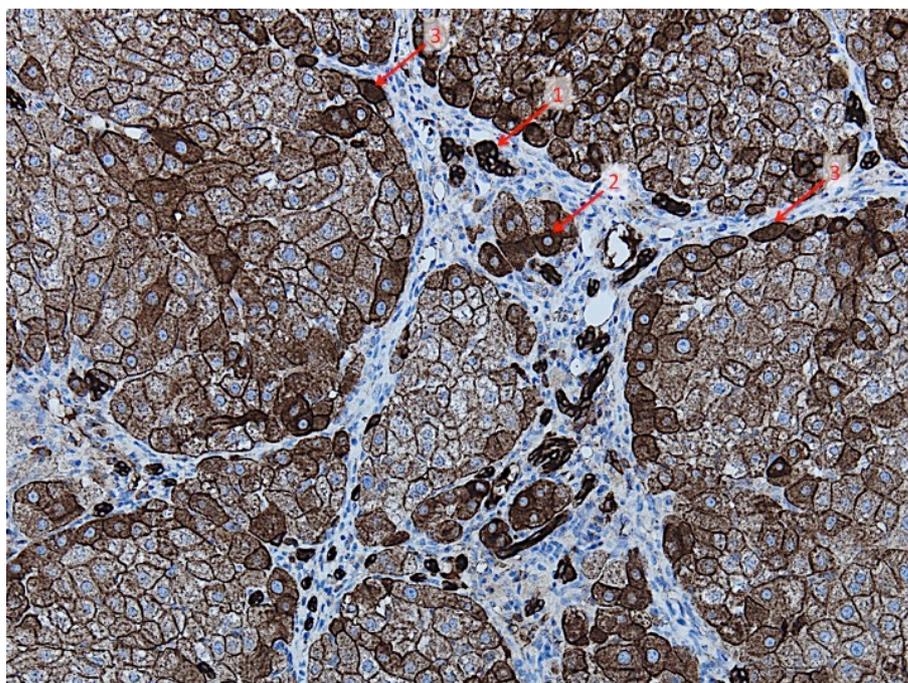


Рисунок 36. Печень крысы I экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18. Иммунопозитивные депозиты в составе эндотелиальной выстилки (1), резкоиммунопозитивный юный гепатоцит (2) и овальные клетки (3) вблизи фиброзных соединительнотканых септ. Исходное увеличение 200.

Для описания особенностей клеток печени эпителиального ростка через 4 недели восстановления после химически индуцированного фиброза провели иммуногистохимическое исследование (Материалы и методы, п. 2.4.) печени животных II экспериментальной группы (Материалы и методы, п. 2.1.). Определили, что основные кератин-содержащие клетки сохранялись – это эндотелиоциты с мембранной формой цитокератина 18, зрелые гепатоциты с преимущественно мембранной формой белка, юные гепатоциты с насыщенным окрашиванием цитоплазмы и гипертрофированные овальные клетки печени с резкоиммунопозитивными скоплениями цитокератина 18 (Рисунок 37). Отмечали,

что группы юных гепатоцитов и овальных клеток печени были равномерно распределены по паренхиме органа в отличие от образцов печени животных I экспериментальной группы. Таким образом обнаружили генерализацию очагов регенерации в органе.

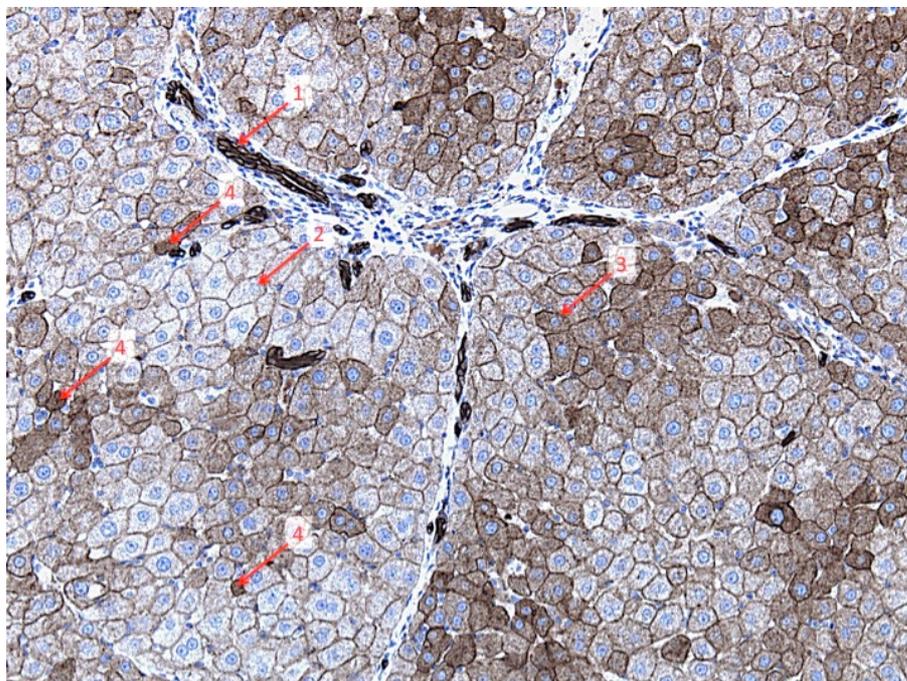


Рисунок 37. Печень крысы II экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18. Иммунопозитивные депозиты в составе эндотелиальной выстилки (1), зрелый гепатоцит (2). Резкоиммунопозитивный юный гепатоцит (3) и овальные клетки (4) равномерно распределены по паренхиме органа. Исходное увеличение 200.

Провели иммуногистохимическое исследование (Материалы и методы, п. 2.4.) печени животных III экспериментальной группы с применением антител к белку цитокератину 18 для описания особенностей клеток печени эпителиального ростка через 8 недель после химически индуцированного фиброза. Цитокератин 18 так же был обнаружен в клетках эндотелия сосудов, зрелые гепатоциты имели типичное распределение мембранной и цитоплазмной форм данного белка. Определили расположение основных клеток регенерации. Юные гепатоциты преимущественно располагались вдоль фиброзных септ, овальные клетки печени близи сосудов и фиброзных септ. Отмечали, что овальные клетки приобретали нормальные не гипертрофированные размеры, что предположительно означает снижение их активной регенераторной функции (Рисунок 38).

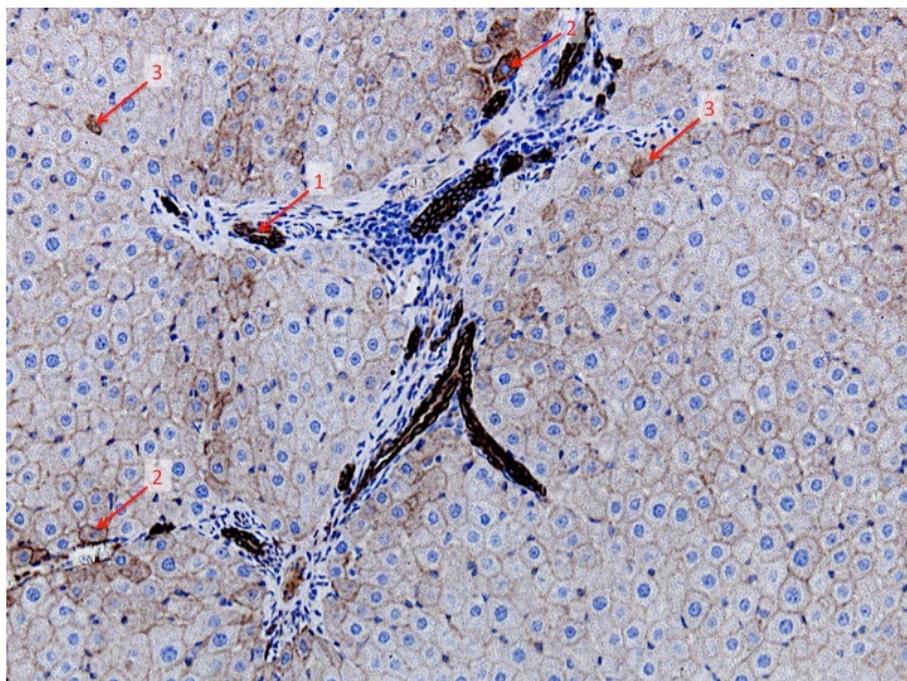


Рисунок 38. Печень крысы III экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18. Иммунопозитивные депозиты в составе эндотелиальной выстилки (1). Юные гепатоциты (2) и овальные клетки (3) вблизи фиброзных септ кровеносных сосудов. Исходное увеличение 200.

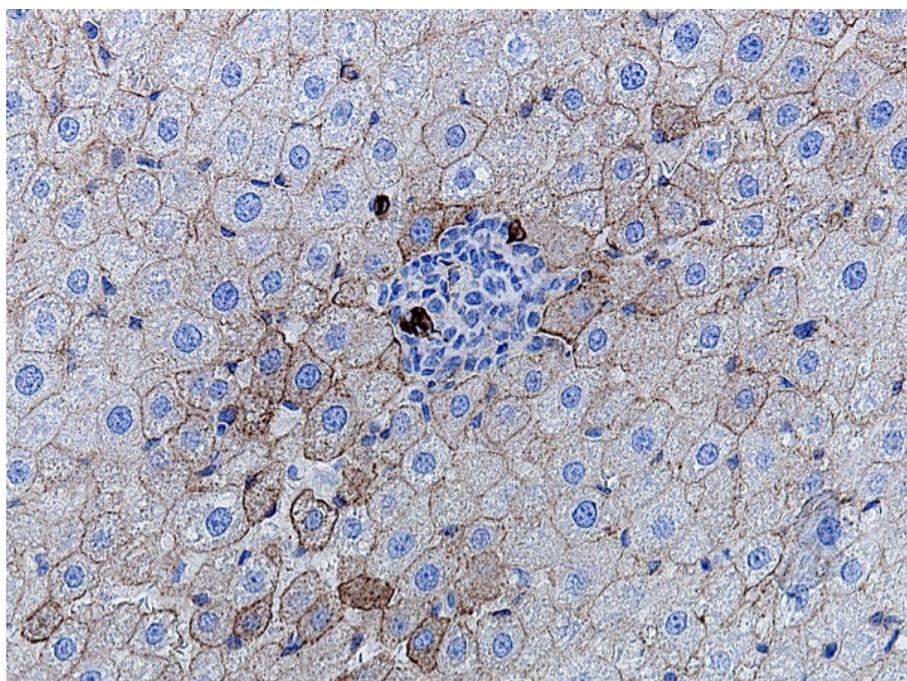


Рисунок 39. Регенераторная розетка в печени крысы III экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18. Мезенхимальные клетки в центре, окружённые юными гепатоцитами, несколько капилляров в составе регенераторной розетки. Исходное увеличение 400.

У животных III экспериментальной группы обнаружили специфические морфологические структуры – регенераторные розетки (Рисунок 39). Регенераторная розетка содержит мезенхимальные клетки в центре, окруженные юными гепатоцитами, возможно прошедшими МЭП. В центре регенераторной розетки или вблизи ее располагаются капилляры.

Иммуногистохимически (материалы и методы 2.4.) выявили локализацию цитокератина 18 и продемонстрировали особенности клеток печени эпителиального ростка животных IV экспериментальной группы через 12 недель восстановления после химически индуцированного фиброза. Обнаружили нормальное распределение зрелых гепатоцитов с преимущественно мембранной формой цитокератина 18 и юных гепатоцитов, которые локализовались вокруг портальных триад (Рисунок 40) [195].

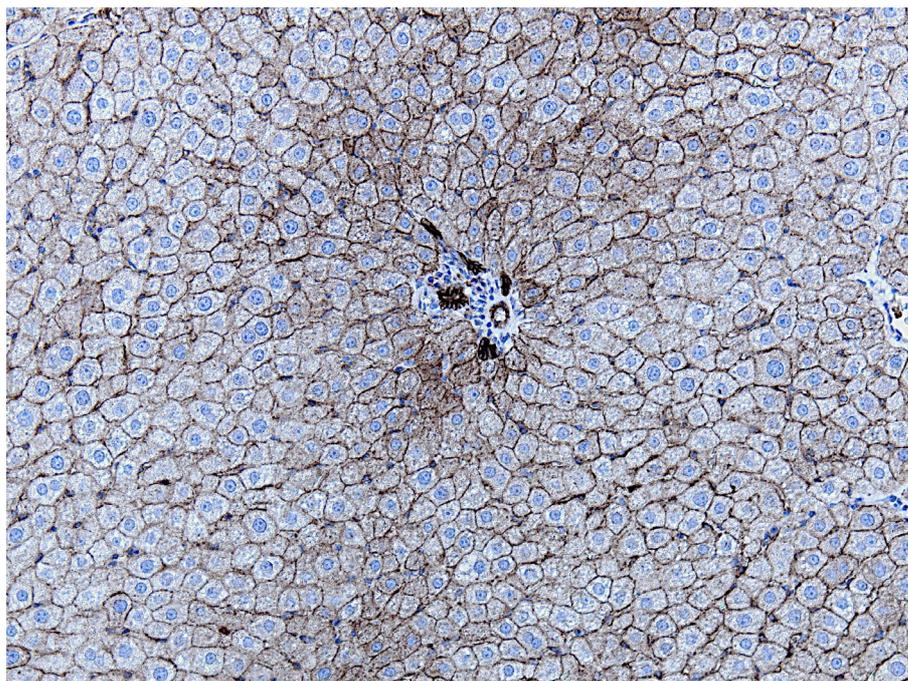


Рисунок 40. Печень крысы IV экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18. Юные гепатоциты вокруг портальных триад. Исходное увеличение 200.

Однако не смотря на возвращение нормального распределения цитокератина 18 в печени через 12 недель восстановления обнаружили сохранение регенераторных розеток небольшого размера вблизи портальных триад и по периферии классической печёночной дольки (Рисунок 41).

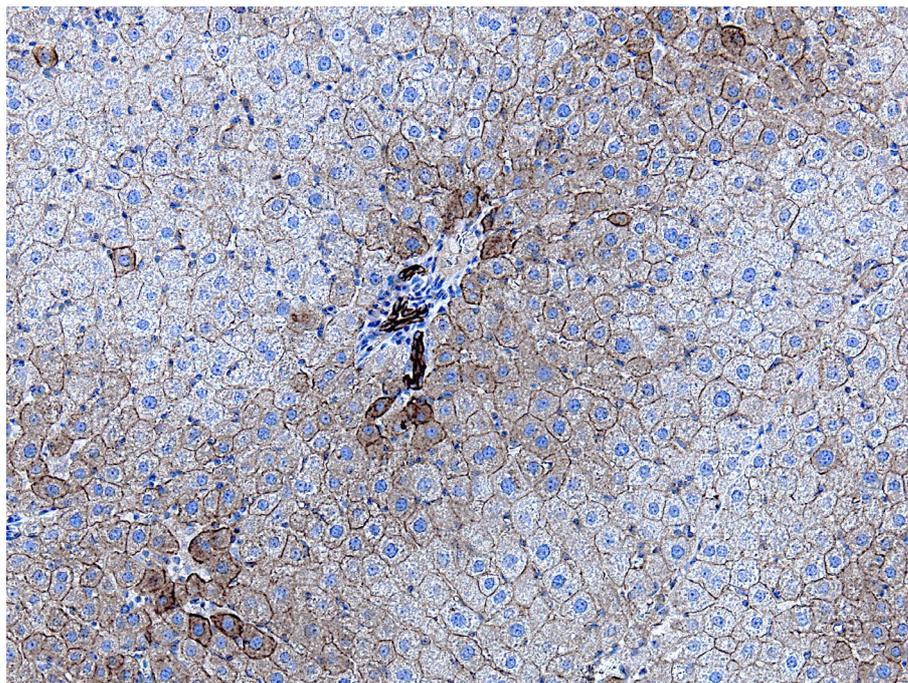


Рисунок 41. Регенераторная розетка в печени крысы IV экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к цитокератину 18. Регенераторные розетки у портальной триады и по периферии печёночной дольки. Исходное увеличение 200.

Оценили динамику относительной площади цитокератина 18 (Рисунок 42), и не смотря на значительное перераспределение иммунопозитивных депозитов в печени, достоверных отличий в относительно площади цитокератина 18 между группами не обнаружено (Таблица 9).

Таким образом с помощью окраски на цитокератин 18 иммуногистохимическим методом определили динамику мест образования юных гепатоцитов и активированных ЗК в процессе регенерации печени после химически индуцированного фиброза. Так во время токсического воздействия и развития фиброза печени (I экспериментальная группа) юные гепатоциты и ЗК обнаруживали внутри и вдоль фиброзных септ. При этом в печени животных этой же экспериментальной группы при окраске на виментин отмечали виментин-отрицательные группы клеток внутри фиброзных септ, что говорит об эпителиальном происхождении данных клеток, вдоль фиброзных септ

обнаруживали виментин-позитивные клетки, что подтверждает происхождение этих клеток путём МЭП. То есть одновременно в печени в момент токсического воздействия новые гепатоциты образуются различными путями. У животных II экспериментальной группы (4 недели восстановления) отмечали генерализацию процессов регенерации печени и равномерное распределение юных клеток. В печени животных III экспериментальной группы (8 недель восстановления) отмечали регенераторные розетки сходные по строению с обнаруженными ранее при окраске на виментин. Регенераторные розетки в печени животных III экспериментальной группы при окраске на цитокератин 18 были окружены иммунопозитивными клетками (при окраске на виментин эти клетки были виментин-отрицательными), что может расцениваться как завершение процессов МЭП. Юные гепатоциты в печени животных IV экспериментальной группы вблизи портальных триад, содержащие цитоплазматическую форму цитокератина 18, так же содержали и виментин, что подтверждает их мезенхимальное происхождение.

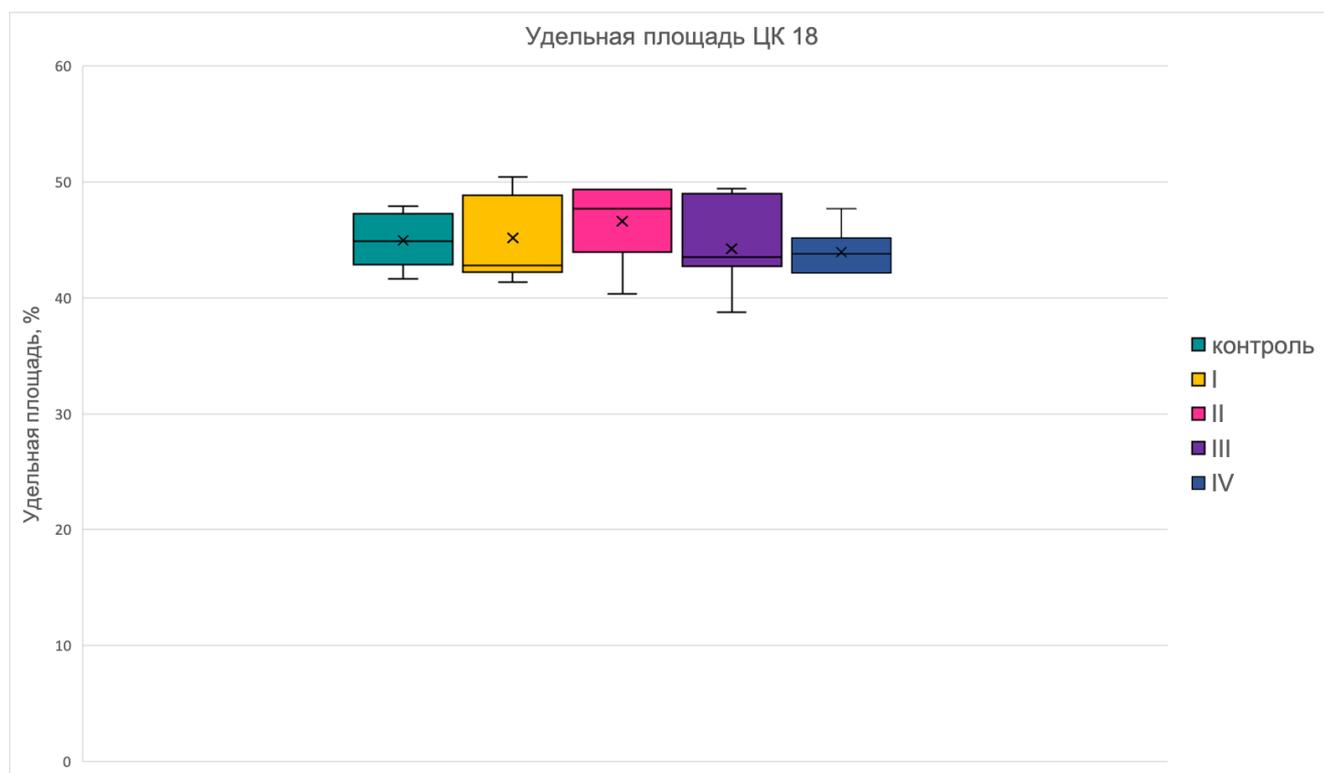


Рисунок 42. Динамика относительной площади цитокератина 18 при регенерации печени.

Достоверных различий между группами не обнаружено (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

Изменения удельной площади цитокератина 18 при регенерации печени

Вариационно-статистические показатели	Контроль, интактные животные	I группа (0 недель восст.)	II группа (4 недели восст.)	III группа (8 недель восст.)	IV группа (12 недель восст.)
Среднее, %	44,97	45,18	46,60	44,25	43,94
Ст. откл, %	2,24	3,71	3,41	3,75	1,98
Ст. ошибка, %	0,85	1,40	1,29	1,42	0,75
Медиана, %	44,90	42,82	47,66	43,51	43,84

3.3.2.2. Динамика распределения рецепторов фактора роста гепатоцитов (с-Met) на разных этапах регенерации печени после химически индуцированного фиброза

Провели иммуногистохимическое окрашивание образцов крыс животных контрольной и четырех экспериментальных групп с использованием антител к с-Met.

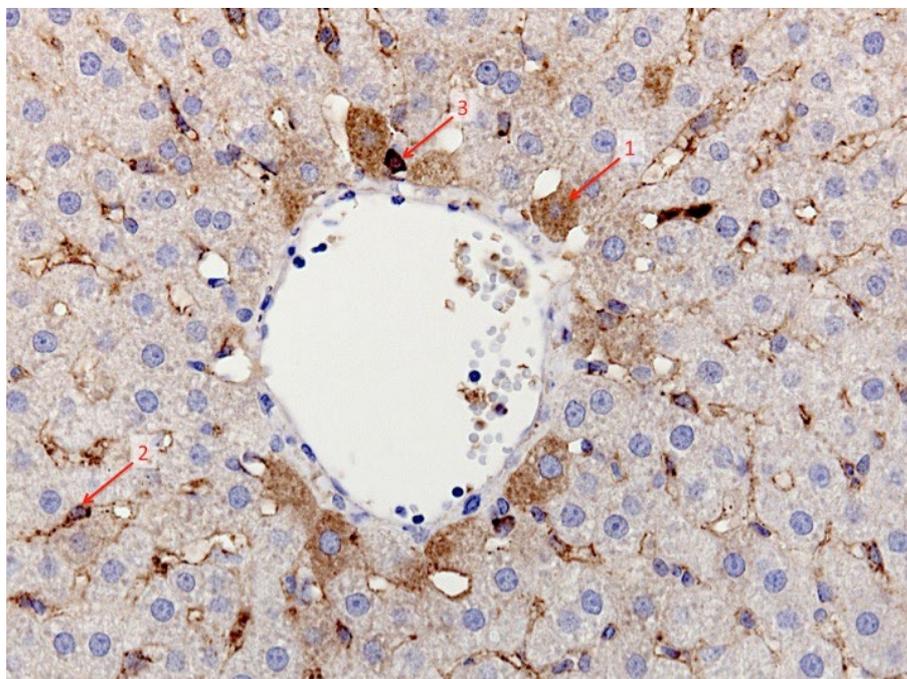


Рисунок 43. Печень крысы контрольной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к с-Met. Гепатоциты с цитоплазмной формой с-Met (1) вокруг центральной вены, иммунопозитивные перисинусоидальная клетка (2) и клетка Купфера (3). Исходное увеличение 400.

В печени интактных животных экспериментальной группы, что с-Met находился на поверхности мембран гепатоцитов и эндотелиоцитов, так же обнаружили гепатоциты с цитоплазматической формой с-Met вокруг центральных вен, что соответствует литературным данным о нормальном распределении данного рецептора. Обнаружили интенсивную реакцию на с-Met у перисинусоидальных клеток и клеток Купфера (Рисунок 43).

В образцах печени экспериментальных животных с индуцированным фиброзом печени (I группа) регистрировали с-Met иммунопозитивные клетки в местах образования фиброзных септ, при этом отмечали снижение мембранной формы рецептора в паренхиме органа (Рисунок 44).

По результатам иммуногистохимического исследования печени крыс II экспериментальной группы (4 недели восстановления) отмечали усиление рисунка мембранной формы с-Met гепатоцитов и большое количество гепатоцитов с цитоплазматической формой белка вдоль фиброзных септ, в паренхиме печёночных долек и вблизи сосудов, активированные перисинусоидальные клетки с цитоплазматической формой с-met. Обнаружили с-Met позитивные регенераторные розетки в окружении с-Met отрицательных гепатоцитов (Рисунок 45).

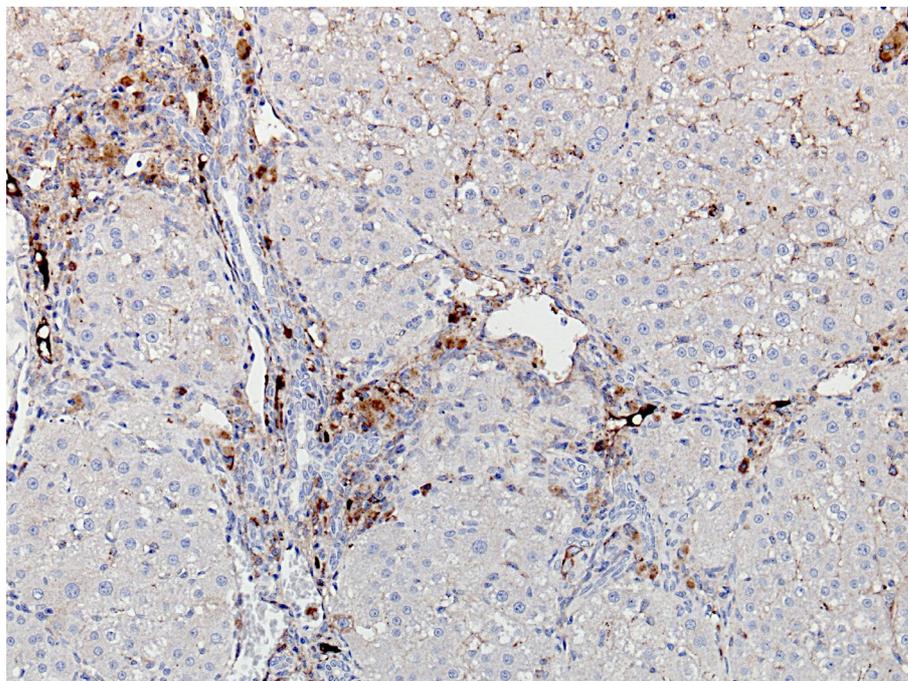


Рисунок 44. Печень крысы I экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к с-met. Иммунопозитивные клетки внутри фиброзных септ. Исходное увеличение 200.

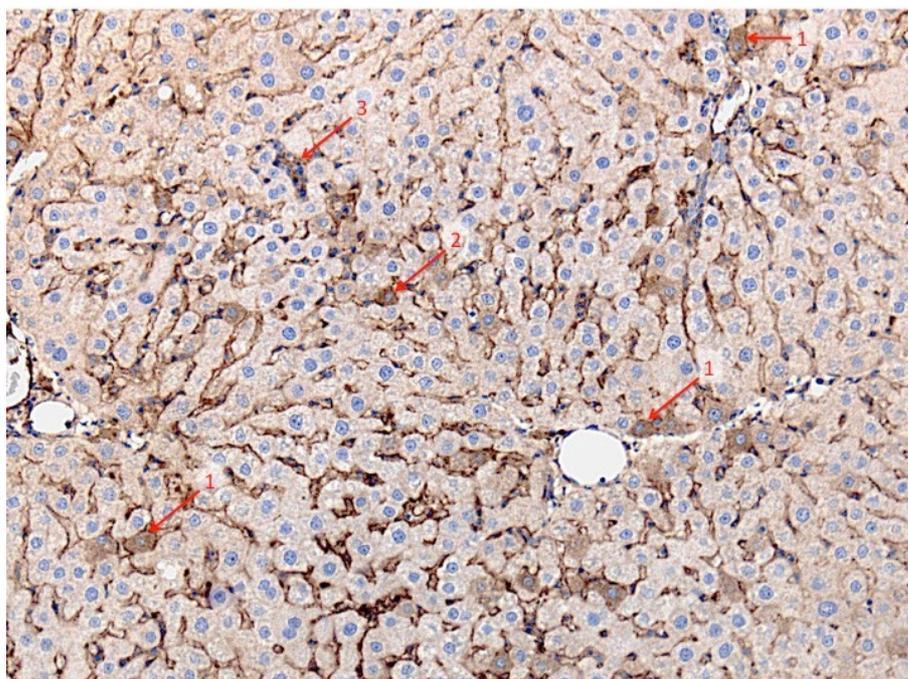


Рисунок 45. Печень крысы II экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к c-met. Гепатоциты с цитоплазматической формой c-Met (1), активированная перисинусоидальная клетка (2), c-Met позитивная регенераторная розетка (3). Исходное увеличение 200.

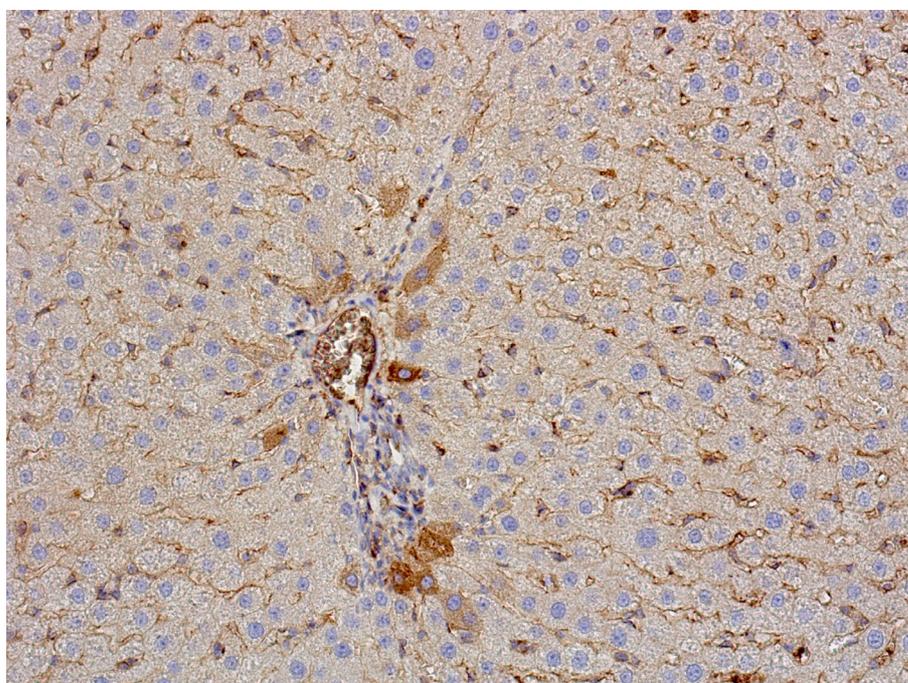


Рисунок 46. Печень крысы III экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к c-met. Гепатоциты с цитоплазматической формой c-Met вблизи портальной триады. Исходное увеличение 200.

Провели иммуногистохимическое исследование на с-Met образцов печени животных III экспериментальной группы. Через 8 недель регенерации печени после окончания индуцирования фиброза отмечали гепатоциты с цитоплазмной формой с-Met вблизи портальных триад (Рисунок 46) и вокруг регенераторных розеток (Рисунок 47). При этом сами розетки, в отличие от регенераторных розеток в печени животных II экспериментальной группы, были с-Met негативными.

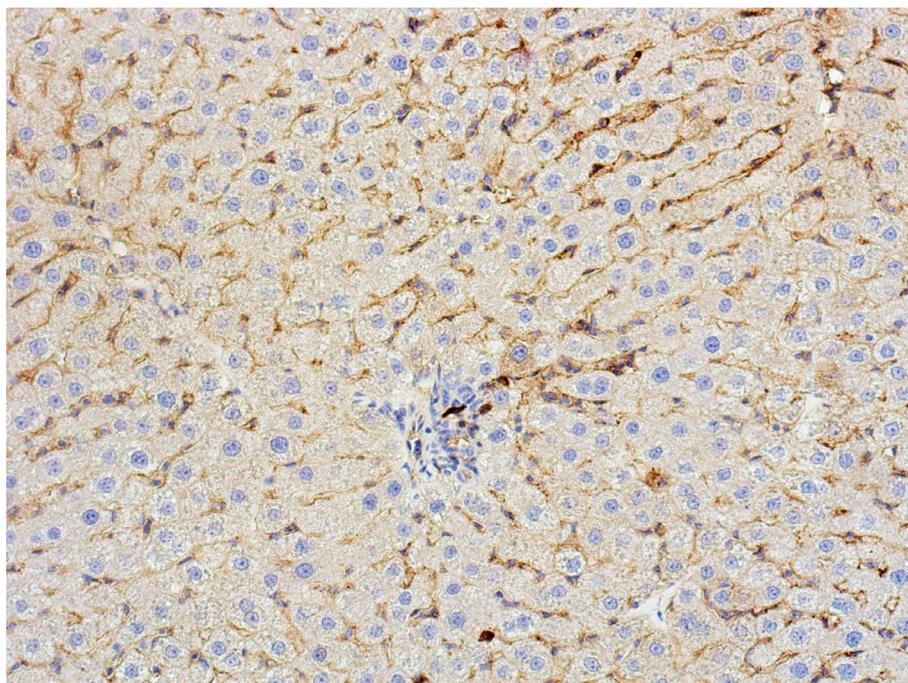


Рисунок 47. Печень крысы III экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к с-met. с-Met-негативная регенераторная розетка и расположенные вблизи гепатоциты с цитоплазматической формой белка. Исходное увеличение 200.

В результате иммуногистохимического исследования образцов печени животных IV экспериментальной группы отмечали характерное для нормальной печени распределение с-Met позитивных гепатоцитов с цитоплазмной формой белка – вблизи портальных триад и вокруг центральных вен (Рисунок 48). Регенераторные розетки в паренхиме печёночных долек были с-Met отрицательными в окружении гепатоцитов с мембранной формой с-Met (Рисунок 49).

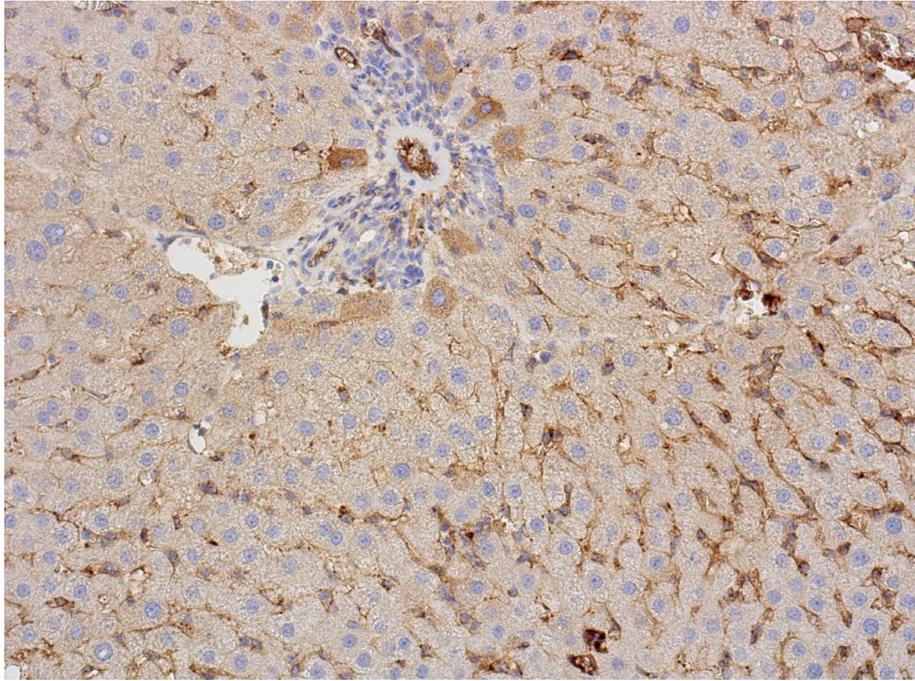


Рисунок 48. Печень крысы IV экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к с- Met. Гепатоциты с цитоплазматической формой с-Met вблизи портальной триады. Исходное увеличение 200.

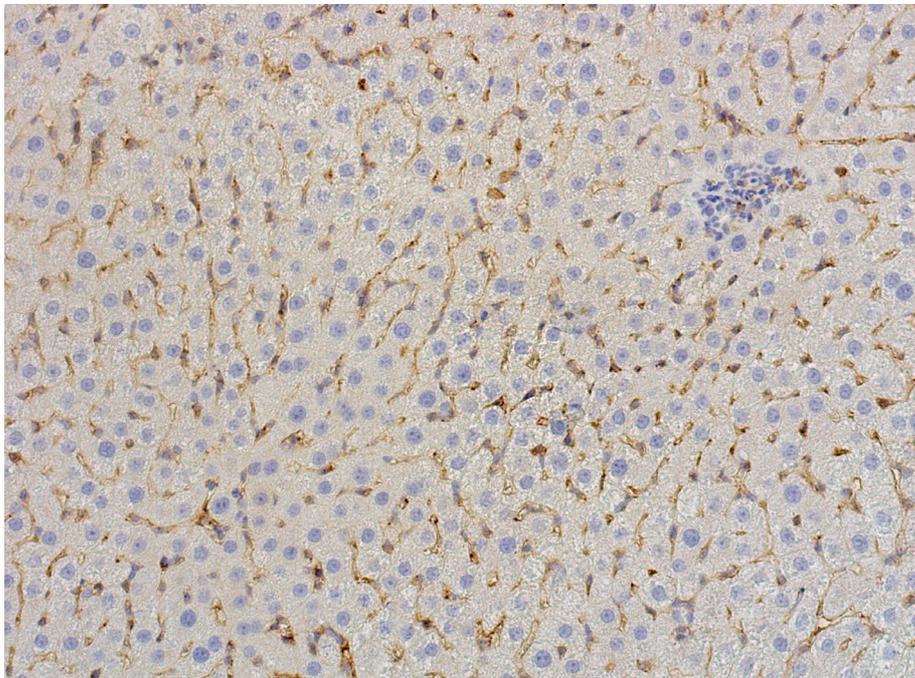


Рисунок 49. Печень крысы IV экспериментальной группы.

Иммуногистохимическое окрашивание, ПАП-метод, антитела к с-Met. с-Met негативная регенераторная розетка в окружении гепатоцитов с мембранной формой белка. Исходное увеличение 200.

Система HGF/c-Met является важным индуктором роста и пролиферации гепатоцитов, так же c-Met запускает сигналы важные для восстановления гепатоцитов [196].

Таким образом во всех экспериментальных группах отмечали похожее распределение юных гепатоцитов с иммунопозитивной реакцией на цитокератин 18 и c-Met, что в том числе могло стать причиной взаимодействия с HGF, которое впоследствии приводило к пролиферации, косвенно подтвержденной обнаруженными нами двухъядерными гепатоцитами и фигурами митоза вблизи регенераторных розеток. Клетки, содержащие цитоплазматическую форму c-Met в печени интактных животных и животных IV экспериментальной группы (12 недель восстановления) располагались в типичных для нормальной паренхимы печени местах – вблизи портальных триад и вокруг центральных вен. В печени животных I экспериментальной группы (фиброз печени, 0 дней восстановления) пролиферирующие гепатоциты обнаруживали вдоль фиброзных септ. Так как c-Met (cell mesenchymal epithelial transition) так же является мезенхимально-эпителиальным переходным фактором, то можно предположить, что во время хронического токсического повреждения печени и прогрессирования фиброза в том числе может происходить МЭП в местах образования фиброзных септ. В печени животных II экспериментальной группы (4 недели восстановления) отмечали разнообразные места локализации c-Met позитивных гепатоцитов с цитоплазматической формой белка – вдоль фиброзных септ, в паренхиме органа, вблизи сосудов, а также c-Met позитивные регенераторные розетки в окружении c-Met отрицательных гепатоцитов, что говорит о генерализации процессов МЭП в процессе спонтанной регенерации печени. В печени животных III экспериментальной группы (8 недели восстановления) отмечали c-Met позитивных гепатоцитов с цитоплазматической формой белка вблизи портальных триад, центральных вен и вокруг c-Met отрицательных регенераторных розетках, что говорит о постепенном завершении МЭП в процессе спонтанной регенерации печени после химически индуцированного фиброза. В процессе спонтанной

регенерации печени ключевым моментом является смещение баланса профибротической активности клеток в сторону МЭП.

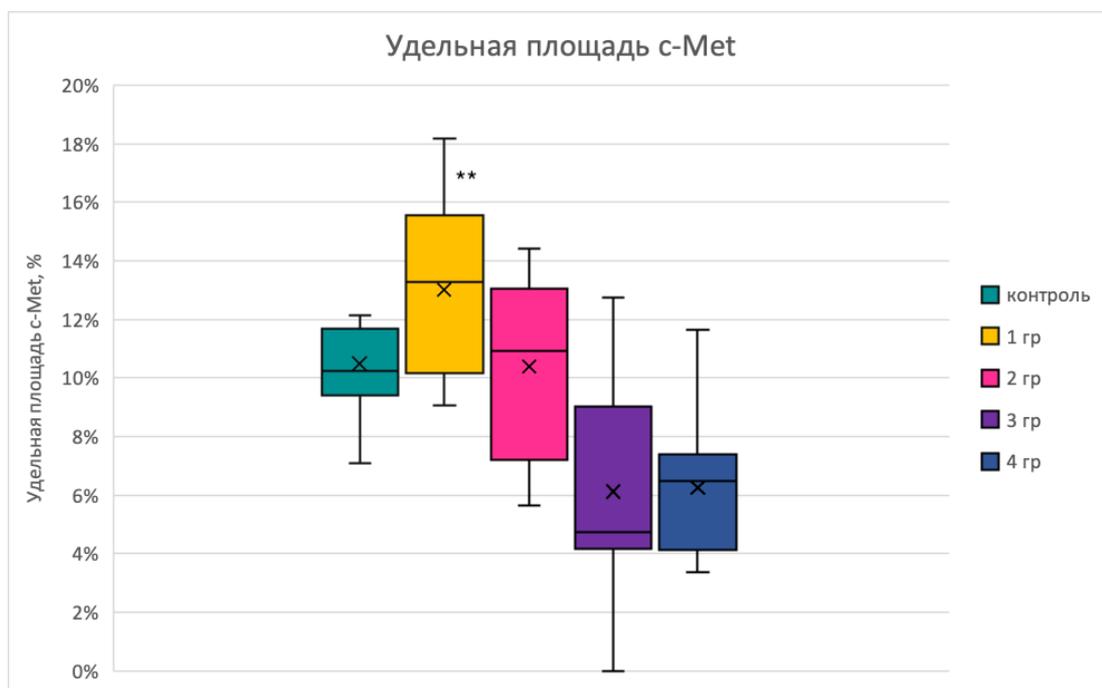


Рисунок 50. Динамика относительной площади с-Met при регенерации печени.

** - различия между группами статистически значимы $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки).

Таблица №10

Изменения удельной площади с-Met при регенерации печени

Вариационно-статистические показатели	Контроль, интактные животные	I группа (0 недель восст.)	II группа (4 недели восст.)	III группа (8 недель восст.)	IV группа (12 недель восст.)
Среднее, %	10,49	13,01**	10,39	6,62	6,25
Ст. откл, %	1,95	3,02	2,97	3,20	2,37
Ст. ошибка, %	0,49	1,01	0,86	0,92	0,59
Медиана, %	10,24	13,29	10,94	4,96	6,47

Оценили динамику удельной площади с-Met при регенерации печени (Рисунок 50). В образцах печени крыс I экспериментальной группы (0 дней восстановления) относительная площадь с-Met статистически значимо больше, чем в образцах печени интактных крыс. В образцах печени крыс II, III и IV групп (4, 8

и 12 недель восстановления) относительная площадь с-Met в паренхиме печени не имела значимых отличий по сравнению с контрольной группой (Таблица 10).

После завершения морфометрического анализа отметили схожесть графиков динамики относительной площади соединительной ткани и ИГХ маркеров (с-Met, виментин, α -SMA) при регенерации печени (Рисунок 51), что стало поводом для проведения корреляционного анализа. Нами были обнаружены несколько значимых сильных корреляционных связей между количеством соединительной ткани и виментином (коэффициент Пирсона $r = 0,88$), соединительной ткани и α -SMA ($r=0,71$), соединительной ткани и с-Met ($r=0,94$), а так же между ИГХ маркерами попарно виментином и α -SMA ($r=0,92$), α -SMA и с-Met ($r=0,76$), ЦК-18 и α -SMA ($r=0,89$).

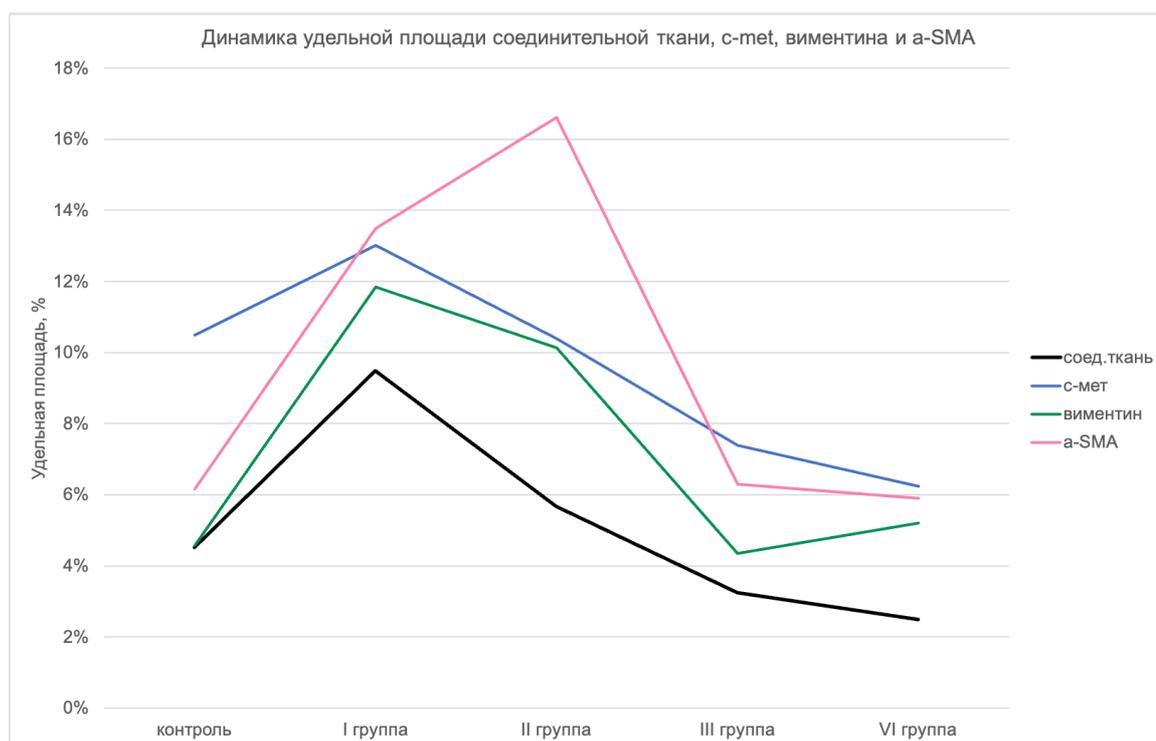


Рисунок 51. Динамика относительной площади соединительной ткани и ИГХ маркеров (с-Met, виментин, α -SMA) при регенерации печени.

Для подтверждения гипотезы о том, что паттерны развития печени повторяются в репаративной регенерации печени после химически индуцированного фиброза мы провели корреляционный анализ между динамикой удельной площади виментина на этапах гепатогенеза и динамикой удельной

площади виментина при регенерации печени и обнаружили значимую сильную прямую корреляционную связь ($r=0,99$) (Рисунок 52).

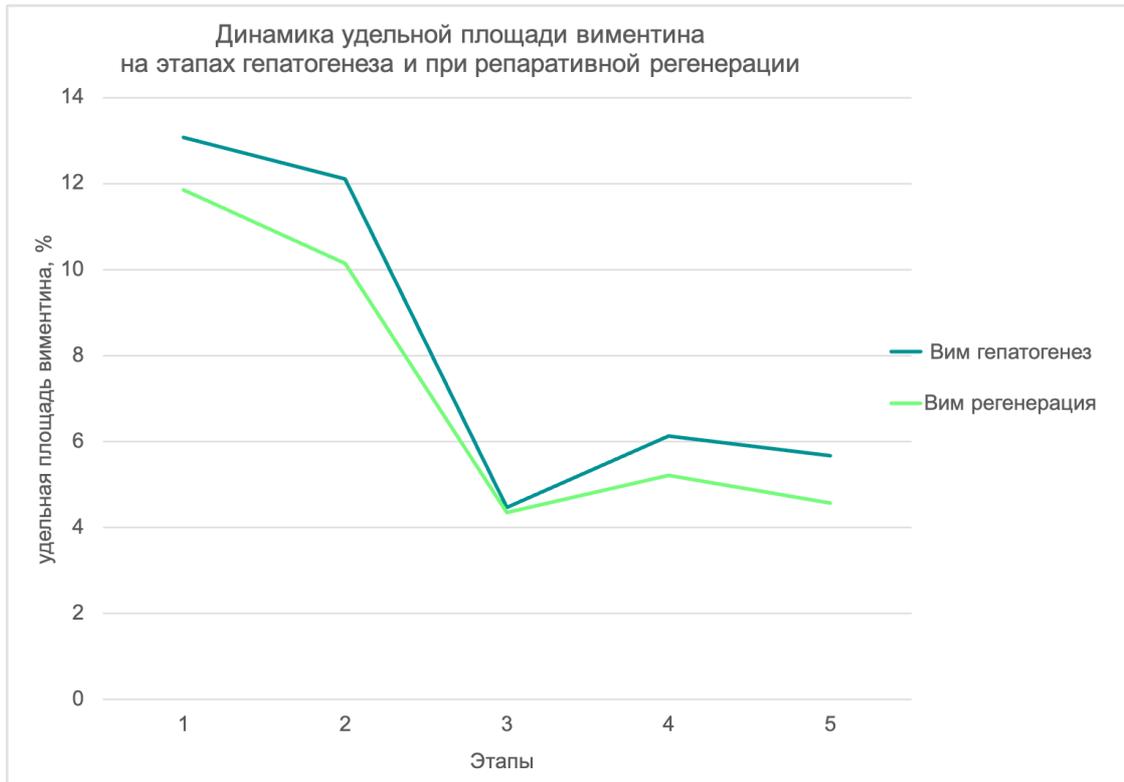


Рисунок 52. Динамика удельной площади виментина при гепатогенезе и при регенерации печени.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ежегодно в мире от заболеваний печени погибает более 2 миллионов человек, конкретнее от осложнений цирроза печени ежегодно в мире погибает более 300 тысяч [197], изучение клеточных механизмов развития и регенерации печени может иметь фундаментальное значение для разработки новых целей и подходов лечения заболеваний печени.

Процесс гепатогенеза активно изучался в последние десятилетия, были выявлены ключевые этапы развития печени, стволовые прогениторные клетки, дающие начало основным клеточным популяциям зрелой печени, эти достижения в изучении развития печени легли в основу для исследований механизмов репаративной регенерации печени [198] и других органов [199, 200]. В ответ на повреждение во взрослом организме перезапускаются эмбриональные генетические программы клеточной пластичности для репаративной регенерации ткани, примерами такой реактивации эмбриональных программ являются индукция прогениторных клеток и эпителиально-мезенхимальный переход [201].

Нами была выдвинута гипотеза о повторении паттернов развития печени в процессе спонтанной репаративной регенерации печени после химически индуцированного фиброза печени, учитывая особенности клеточного состава зрелой печени и ключевую роль клеток мезенхимального происхождения в развитии фиброза мы сосредоточились на дифференцировке мезенхимальных и эпителиальных клеток печени. Обнаруженное нами преобладание удельной площади иммунореактивного материала с использованием антител против цитокератина 18 над удельной площадью виментинпозитивного материала в течение эмбрионального и постнатального развития, подтверждает известный факт, что печень во многом развивается из эпителиальных клеток передней энтодермы [202] и состоит более чем на 70% из эпителиальных клеток [203]. Гепатоциты созревают постепенно как в пренатальном, так и постнатальном развитии печени, накапливают белки и физиологический профиль зрелых паренхиматозных клеток, что подтверждается постепенным нарастанием удельной

площади иммунореактивного материала с использованием антител против цитокератина 18 на этапах эмбрионального и постнатального гепатогенеза.

Удельная площадь иммунореактивного материала с использованием антител против виментина испытывает значительные изменения на этапах эмбрионального и постнатального гепатогенеза. Максимальное значение удельной площади виментинпозитивного материала отмечено нами на 10-й день эмбрионального развития, что указывает на значимую роль виментина на начальных этапах развития печени и подтверждается литературными данными о роли мезенхимальных сигналов GATA4 и BMP4, WNT необходимых для раннего развития печени [204]. Ранее было установлено, что мезенхимальные клетки оказывают наибольшее воздействие на предшественников клеток печени до образования функциональных кровеносных сосудов [205]. Прежде чем стать частью желудочно-кишечного тракта на ранних этапах эмбрионального развития печень является гемопоэтическим органом и клетки стромы являются микроокружением для гемопоэза [206,207]. К моменту рождения удельная площадь виментинпозитивного материала значительно уменьшалась до 4,47% по сравнению с предыдущими этапами, что свидетельствует о структурных и функциональных изменениях в печени в период перехода от пренатального к постнатальному развитию и подчеркивает динамичный характер сигнальных событий, которые контролируют созревание клеток печени [208]. Затем в подсосном (период молочного кормления) и молодом (продуктивный период) возрасте отмечали стабилизацию уровня удельной площади виментинпозитивного материала, которая отражает роль клеток печени мезенхимального происхождения в поддержании структурной и функциональной целостности в зрелой печени и соответствует доле стромальных клеток в нормальной печени взрослых [209]. Дифференцировка мезенхимальных клеток опережает созревание эпителиальных клеток и завершается к 14 суткам после рождения. Удельная площадь клеток, содержащих виментин, в паренхиме печени достоверно снижается на до 4,47% (на 7,64%) к 1 суткам после рождения и устанавливается на постоянном уровне 6% к 14 суткам после рождения, когда завершается формирование мезенхимального

ростка. В эпителиальных клетках печени на протяжении эмбрионального и постнатального гепатогенеза определяется цитокератин 18, его накопление носит нелинейный характер и достигает максимума во взрослом периоде, уже на 10 сутки эмбрионального развития определяются цитокератин 18 положительные гепатобласты, к моменту рождения в паренхиме печени есть зрелые гепатоциты, а к 14 суткам после рождения выстраивается нормальная зрелая гистоархитектоника печени.

Эпителиально-мезенхимальный переход – это обратимая программа клеточной пластичности, при которой эпителиальные клетки приобретают свойства мезенхимальных, так же существует обратный процесс мезенхимально-эпителиального перехода, когда клетки мезенхимального происхождения приобретают свойства эпителиальных, оба этих механизма играют важную роль на этапах эмбрионального развития и при заживлении ран [210], поэтому одним из потенциальных паттернов эмбрионального развития в репаративной регенерации мы предположили такой вариант клеточной пластичности. Самым простым методом, который используется для изучения процессов ЭМП и МЭП *in vivo* является иммуногистохимическое исследование, который помогает показать колокализацию эпителиальных и мезенхимальных маркеров в клетках [211]. У этого метода изучения клеточной пластичности, не смотря на его распространённость использования, есть несколько ограничений, он не может идентифицировать клетки, которые значительно снизили или потеряли определенные маркеры, кроме того, при световой микроскопии наложение эпителиальной и мезенхимальной клетки может быть ошибочно интерпретировано как одна клетка, проходящая переход, так же световая микроскопия не может указать на направление перехода. С первым ограничением может справиться метод высокопроизводительного секвестрирования одноклеточных препаратов [212], обладающий высочайшей разрешающей способностью и позволяющий получить карты экспрессии генов. Со вторым ограничением позволяет справиться конфокальная микроскопия, позволяющая точно локализовать расположение маркеров [213]. Метод отслеживания клеточных линий (lineage tracing) позволяет

однозначно определить направления развития клеток и отследить клеточные переходы [214]. Однако для выявления паттернов развития печени достаточными являются классические методы иммуногистохимии и подтверждающий их метод Вестерн-блоттинга [215]. На этапах эмбрионального гепатогенеза с помощью методов двойной иммунофлюоресценции выявлены гибридные клетки, по-видимому, содержащие оба маркера виментин и ЦК-18, может рассматриваться как признак незавершенного клеточного перехода, и используется некоторыми авторами как признак мезенхимально-эпителиального перехода в процессе развития печени [191]. На 17 день эмбрионального развития количество гибридных клеток уменьшалась по сравнению с 10 днем эмбрионального развития, а количество клеток, содержащих один из двух маркеров – виментин или цитокератин, увеличивалось, что свидетельствует о завершении данного этапа дифференцировки и МЭП и формировании клеточных линий, преимущественно содержащих цитокератин-18 (гепатоцитов). После рождения в образцах появлялась яркая автофлюоресценция, характерная для зрелой печени [216], из-за чего использование метода двойной иммунофлюоресценции стало затруднительным, но количественный анализ с использованием метода Вестерн-блоттинга показал снижение соотношения виментин/ЦК-18, что также подтверждает МЭП на этапах эмбрионального гепатогенеза [191].

Таким образом, основными паттернами характерными для клеток мезенхимального происхождения и эпителиальных клеток в развитии печени можно выделить признаки МЭП и достоверное снижение уровня виментина на фоне недостоверных изменений уровня цитокератина 18. Учитывая важную роль стромальных клеток печени в качестве микроокружения в печеночном гемопоэзе, и в формировании фиброза печени можно предположить повторение этих паттернов в процессе спонтанной репаративной регенерации печени после химически индуцированного фиброза печени.

Репаративная регенерация печени в постнатальном периоде изучается на различных моделях - частичная гепатэктомия [207], лигирование желчных протоков [217], химически индуцированное повреждение (ЧХУ [218], парацетамол

[219]), специфические диеты (холин-дефицитные диеты [96], DDC-богатая диета [95]) и на различных животных – крысы [220], мыши [221], рыбы Zebrafish [222]. Каждая из этих моделей служит своим целям в исследованиях механизмов регенерации печени, так модель частичной гепатэктомии показывает клеточные реакции на физическую потерю массы органа, лигирование желчных каналов имитирует холестаз при фиброзе желчных протоков или желчнокаменной болезни, в то время как химические модели (ЧХУ, парацетамол) используются для изучения регенерации в контексте токсического повреждения и фиброза печени. ЧХУ индуцирует фиброза печени через окислительный стресс и повреждение митохондрий за счет его метаболизма цитохромом P450 в трихлорметиловый радикал, что приводит к окислительной деградации липидов цитоплазматической мембраны и ее последующему повреждению [218]. Модели регенерации печени при частичной гепатэктомии или частичной трансплантации печени имеют свои ограничения, например, они влияют на кровоснабжение органа и систему гемостаза, по сравнению с регенерацией печени после химического или лекарственного повреждения печени [97]. Модели химически индуцированного повреждения печени и последующей регенерации проявляют зональность гепатоцитов в пределах печеночной доли. В норме из-за особенностей кровоснабжения печени периферические гепатоциты участвуют в детоксикации чужеродных веществ и имеют отличный от перипортальных гепатоцитов профиль экспрессии генов. После токсического воздействия на печени ЧХУ или парацетамола происходит некроз периферических гепатоцитов и периферические гепатоциты должны проявить клеточную пластичность – изменить свой белковый состав, функцию для замещения некротических участков [123]. При индуцированном ЧХУ фиброзе печени, наблюдаются такие морфологические изменения, как интенсивная нейтрофильная инфильтрация и обширный фиброз и отражают патологические состояния, наблюдаемые при заболеваниях печени человека [223], в то же время поскольку воспроизводимость модели химического повреждения выше, чем у частичной гепатэктомии, она больше подходит для изучения регенерации печени при хроническом повреждении печени [93]. К тому

же несмотря на то, что ЧХУ эффективно индуцирует фиброз и имитирует определенные аспекты заболевания печени человека, данная модель не полностью воспроизводит специфические патофизиологические особенности при НАЖБП или алкогольно-индуцированной болезни печени [218]. При использовании модели хронического токсического повреждения печени ЧХУ происходит подавление пролиферации гепатоцитов, и как следствие активизируются альтернативные пути регенерации [94]. Модели токсического повреждения печени парацетамолом и ЧХУ чаще используются на мышах, так как у белых крыс есть мощная репаративная система в печени из-за чего использование модели ЧХУ индуцированного фиброза не дает достаточно стойкого результата [224]. Поэтому мы выбрали наиболее адекватную для изучения репаративной регенерации модель, которая основывается на длительном введении ЧХУ на фоне умеренной алкоголизации для более стойких изменений и точного отражения условий при патологиях печени человека, и дает более полное понимание динамики регенерации печени.

Хроническое токсическое повреждение печени приводит к фиброзу, который характеризуется избыточным образованием и недостаточной деградацией внеклеточного матрикса и нарушает нормальную цитоархитектонику печени. Избыточная соединительная ткань в паренхиме печени может затруднять нормальный кровоток и препятствовать функционированию гепатоцитов и приводить к печеночной недостаточности, которая является распространенным осложнением цирроза [225]. Биомеханические факторы, включая изменения в микроокружении гепатоцитов значительно влияют на регенерацию печени, так повышенное давление в синусоидах печени и растяжение эндотелиоцитов портальной вены, приводят к высвобождению регенеративных факторов [226.]. Исследование клеточных взаимодействий во время регенерации печени открывает прямые возможности для регуляции этого процесса и может дать ответ на ключевые вопросы – как привести к уменьшению соединительной ткани в паренхиме печени и восстановить нормальное строение печеночных долек. Понимание того, как клетки могут дифференцироваться в гепатоциты, и условия,

при которых эта дифференцировка усиливается или ингибируется, имеет решающее значение для разработки терапевтических стратегий, направленных на снижение фиброза и восстановление нормальной функции печени [227].

По данным литературы выделяют следующие признаки регенерации: увеличивается количество митозов гепатоцитов [228], появляются двухъядерные и полиплоидные гепатоциты [229, 227], восстанавливается цитоархитектоника паренхимы печени и печеночных балок [230], нормализуются размеры и форма клеток [231]. В нашем исследовании после токсического повреждения печени отмечали появление двухъядерных и полиплоидных гепатоцитов, признаки баллонной дистрофии печени, расширение синусоидных пространств и серьезные нарушения в архитектонике печеночных балок. Постепенно за 12 недель после отмены токсического воздействия все эти признаки повреждения печени исчезали, и мы наблюдали полную спонтанную репаративную регенерацию печени после химически индуцированного фиброза.

Таким образом, на первом этапе нашего исследования были выявлены морфологические паттерны развития печени – признаки клеточной пластичности, в том числе МЭП, снижение количества виментина – маркера клеток мезенхимального происхождения на фоне увеличения количества ЦК-18 – маркера гепатоцитов. Следующим этапом было исследование иммунофенотипа клеток печени на этапах регенерации печени с использованием расширенной панели антител против виментина, цитокератина 18, α -SMA, c-Met.

В течение многих лет считалось, что виментин обеспечивает структурную устойчивость клеток к механическим нагрузкам [232], более свежие данные показали, что виментин локализуется в цитоплазматических и мембранных компартментах мезенхимальных клеток [233], фибробластов [234], эпителиальных клеток [235], перинуклеарный виментин защищает ДНК от механического повреждения [236]. При фиброзе печени виментин регулирует форму, пролиферацию и миграцию клеток, и дополнительно регулирует межклеточные взаимодействия [237], в активированных перисинусоидальных клетках печени виментин участвует в миграции клеток в качестве координатора взаимодействия

между ВКМ и актином, регулирует клеточную адгезию [238], также виментин контролирует отложение коллагена и структуру ВКМ посредством посттранскрипционной регуляции генов ВКМ [239], играя таким образом важную роль в развитии фиброза печени. Эпителиальные клетки, в том числе гепатоциты, могут экспрессировать виментин в процессе эпителиально-мезенхимального перехода, что делает виментин довольно распространенным маркером ЭМП [240].

На этапах регенерации нами обнаружены изменения в распределении виментина по паренхиме печени, так на начальном этапе регенерации до отмены токсического воздействия виментин обнаруживали преимущественно в соединительнотканых септах и юных гепатоцитах, последние могут свидетельствовать о процессе клеточного перехода от эпителиального фенотипа гепатоцитов к мезенхимальному в ответ на токсическое воздействие [194]. Через 4 недели восстановления отмечали появление новых морфофункциональных единиц, названных регенераторными розетками, которые сформированы из низкодифференцированных клеток в окружении юных гепатоцитов и овальных клеток печени и располагались вдоль фиброзных септ и вблизи от кровеносных сосудов. При этом через 4 недели виментин-позитивные гепатоциты обнаруживали вокруг регенераторных розеток, а через 8 и 12 недель восстановления – вблизи порталных триад, что демонстрирует смену локализации обратного перехода от клеток мезенхимального фенотипа к эпителиальному в процессе регенерации печени. Возможность образования гепатоцитов из мезенхимальных клеток красного костного мозга уже была описана в литературе ранее [241].

Наличие значимой сильной прямой корреляционной связи между динамикой количества виментина в печени на этапах гепатогенеза и динамикой количества виментина в печени на этапах репаративной регенерации подтверждает, что роль клеток печени мезенхимального происхождения в развитии и регенерации печени является повторяющейся программой в этих процессах.

В норме в паренхиме печени миофибробласты не обнаруживаются, но при повреждении печени миофибробласты активизируются и начинают экспрессировать α -SMA. Инициация образования миофибробластов тщательно

изучалась, они могут образовываться в результате активации перипортальных клеток печени, портальных фибробластов, резидентных клеток печени, клеток костномозгового происхождения [242], также сообщалось о других источниках миофибробластов печени, таких как эпителиальные клетки посредством эпителиально-мезенхимального перехода [169], эндотелиальные клетки посредством эндотелиально-мезенхимального перехода [243]. Традиционно миофибробласты идентифицируются по экспрессии α -SMA [244], чаще всего визуализируемой с помощью иммуноокрашивания.

На этапах репаративной регенерации печени наблюдались изменения в распределении α -SMA, указывающие на преобразование клеток печени и их участие в синтезе ВКМ. В контрольной группе интактных животных α -SMA в основном локализовался в мышечном слое кровеносных сосудов и миофибробластах перипортальной зоны, что соответствует литературным данным [245]. Уже на начальном этапе регенерации до отмены токсического воздействия было обнаружено значительное количество α -SMA в фиброзных септах и активированных перисинусоидальных клетках печени (клетки Ито), указывающее на их преобразование в миофибробласты и участие в синтезе ВКМ [246]. На 4-й неделе восстановления α -SMA был обнаружен в активированных перисинусоидальных клетках вблизи фиброзных септ, а также в мезенхимальных регенераторных розетках, окруженных регенерирующими α -SMA-позитивными гепатоцитами [247], что свидетельствует о продолжающемся процессе регенерации и МЭП [24]. На более поздних этапах регенерации через 8 недель восстановления наблюдались α -SMA позитивные активированные перисинусоидальные клетки и мезенхимальные розетки в центрлобулярных участках паренхимы печени. На 12-й неделе отмечено восстановление нормального распределения α -SMA, хотя и сохранялись небольшие соединительнотканые розетки из миофибробластов. Таким образом, исследование показывает, что часть гепатоцитов в процессе регенерации после химически индуцированного фиброза происходит путём МЭП в период с 4 по 8 неделю восстановления. Наличие α -SMA в цитоплазме

регенерирующих гепатоцитов свидетельствует о происхождении этих клеток из мезенхимальных α -SMA позитивных клеток.

Мезенхимальные клетки печени (перисинусоидальные клетки печени (клетки Ито), эндотелиальные клетки сосудов и звездчатые макрофаги (клетки Купфера)) выполняют роль микроокружения в паренхиме печени секретируют HGF (фактор роста гепатоцитов) который является специфическим лигандом рецептора c-Met [26]. Сигнальный путь HGF/c-Met необходим для защиты и регенерации паренхимы печени, так как способствует выживанию гепатоцитов, одновременно индуцируя апоптоз в активированных ЗКП и способствуя разрешению внеклеточного матрикса [248]

Обнаруженное нами повышение экспрессии биомаркера c-Met в паренхиме печени еще до отмены токсического воздействия на печень свидетельствует об активации процессов мезенхимально-эпителиального перехода в регенерации [249], при этом усиление иммунопозитивной реакции наблюдали вдоль фиброзных септ, с уменьшением окраски в паренхиме органа. Через 4 недели восстановления после отмены токсического воздействия нами были обнаружены гепатоциты с цитоплазменной формой c-Met вдоль фиброзных септ, вблизи кровеносных сосудов и на периферии регенераторных розеток, низкодифференцированные клетки внутри регенераторных розеток так же были c-Met-позитивными, обычно c-Met обнаруживается на поверхности клеток [250], цитоплазменная форма c-Met в гепатоцитах может указывать на активацию или специфическую функцию белка в процессе регенерации печени. Исследования показывают, что белок c-Met ассоциируется с процессами регенерации [251], так как повышает жизнеспособность клеток за счет снижения апоптоза и увеличения пролиферации [252], а также стимулирует мезенхимально-эпителиальный переход [253]. Через 8 недель восстановления гепатоциты с цитоплазменной формой c-Met обнаруживали вблизи портальных триад и на периферии регенераторных розеток, при этом клетки в центре розеток были c-Met-отрицательными в отличии от предыдущего этапа регенерации.

ЦК-18 белок промежуточных филаментов типа I с высокой концентрацией в гепатоцитах и холангиоцитах составляет 5% от общего белка печени [254] и рассматривается как потенциальный биомаркер повреждения печени [255]. Гетеродимеры ЦК-8/ЦК-18 представляют собой каркас для гепатоцитов, способный выдерживать механические и немеханические стрессы, например, те, которые возникают при токсическом повреждении печени. Важность ЦК-18 в печени была подчеркнута у мышей с нокаутом ЦК-18, при этом отсутствие ЦК-18 в гепатоцитах приводит к спонтанному развитию поражений печени (точно отражающих морфологический спектр канцерогенеза печени, связанного со стеатогепатитом), а также опухолей печени [256].

Тот факт, что процессы регенерации активизируются до окончания токсического воздействия на печень, подтверждался большим количеством юных гепатоцитов с насыщенным окрашиванием цитоплазмы и гипертрофированных овальных клеток с резко иммунопозитивными скоплениями цитокератина 18, расположенных вдоль и внутри фиброзных септ, на данном этапе активные процессы регенерации локализуются преимущественно в местах образования фиброзных септ. Через 4 недели восстановления основные кератин-18 позитивные клетки (эндотелиоциты, зрелые и юные гепатоциты, овальные клетки) сохранялись, но их распределение было равномерным в паренхиме органа, что свидетельствует о генерализации процессов регенерации в паренхиме печени. Спустя 8 недель восстановления обнаружены регенераторные розетки, состоящие из фокуса фиброза в центре, окружённых юными гепатоцитами, что может указывать на завершение процессов МЭП. Юные гепатоциты располагались вблизи фиброзных септ и сосудов, а овальные клетки приобрели нормальные размеры, что может свидетельствовать о снижении их активной регенераторной функции. Через 12 недель восстановления наблюдалось возвращение нормального распределения цитокератина 18 в паренхиме печени, однако сохранялись регенераторные розетки небольшого размера вблизи порталных триад и по периферии печёночных долек. Примечательно, что, не смотря на повышение уровня с-Met, увеличения количества цитокератина 18 не происходит, возможно, потому что ЧХУ блокирует

пролиферацию гепатоцитов или отсутствие роста цитокератина 18 в процессе регенерации связано с перераспределением данного маркера на этапах восстановления паренхимы печени.

Таблица №11

Матрица корреляции между удельными площадями соединительной ткани и ИГХ маркеров

	Соед.ткань, по Массону	Виментин	ЦК18	α-SMA	c-Met
Соед.ткань, по Массону	1,00				
Виментин	0,88	1,00			
ЦК18	0,52	0,68	1,00		
α-SMA	0,71	0,92	0,89	1,00	
c-Met	0,94	0,76	0,63	0,65	1,00

При моделировании репаративной регенерации печени после химически индуцированного повреждения нами обнаружены значимые сильные прямые корреляционные связи (Таблица 11) между удельной площадью соединительной ткани и удельными площадями иммунореактивного материала с использованием антител против виментина, α -SMA. Отмечено, что пик удельной площади соединительной ткани, виментина и c-Met наступает еще до отмены воздействия токсического фактора, что свидетельствует о запуске регенераторных путей, связанных с виментином и c-Met в ответ на повреждающий фактор, а максимум удельной площади α -SMA приходится на 4 недели восстановления после отмены воздействия и является следствием активированных ранее путей регенерации. При активации перисинусоидальных клеток печени α -SMA является одновременно ключевым игроком и маркером их перехода в миофибробласты [257], согласно литературным данным покоящиеся перисинусоидальные клетки (липоциты) не сразу приобретают способность к выработке и накоплению белков ВКМ, предлагается модель двойного перехода в фибротической печени [123], которую

подтверждают наши данные о первичном увеличении количества виментина, а затем α -SMA в ответ на токсическое повреждение печени. Выявленные в нашем эксперименте виментин-позитивные гепатоциты, α -SMA-позитивные гепатоциты и активированные перисинусоидальные клетки, не смотря на синтез одного и того же белка могут быть участвовать в различных путях репаративной регенерации печени, так активированные перисинусоидальные клетки в ответ на токсическое воздействие на печень начинают пролиферировать и воздействовать на окружающие клетки посредством, цитокинов и факторов роста, которые в свою очередь способствуют регенерации и пролиферации гепатоцитов, при этом вероятно часть гепатоцитов происходит путем МЭП.

В ходе эксперимента выявлена значимая прямая сильная корреляционная связь между удельной площадью иммунореактивного материала с использованием антител против виментина и c-Met. Вероятно, это не следствие прямого действия одного фактора на другой, а признак двух параллельных процессов, которые запускаются в ответ на токсическое повреждение печени, с одной стороны образуются излишки ВКМ, а с другой стороны должно начаться восполнение количества гепатоцитов за счет пролиферации под контролем HGF/c-Met оси. Ранее методами машинного обучения было показано, что уровень виментина не только коррелирует с тяжестью фиброза печени, но и играет ключевую роль в его развитии за счет активации перисинусоидальных клеток печени и сигнальных путей, связанных с фиброзом, в том числе TGF β , PDGF, CTGF, и BMP7 [258].

Между удельной площадью иммунореактивного материала с использованием антител против α -SMA и цитокератина 18 обнаружили сильную прямую корреляционную связь, которая может указывать на ремоделирование тканей печени в процессе репаративной регенерации [259], одновременно с α -SMA повышается доля цитокератин 18 положительных клеток, вероятно так же как активация миофибробластов происходит вследствие запуска каскадов биохимических сигналов, так же и гепатоциты реагируют на сигнал по оси HGF/c-Met и начинают участвовать в регенерации после отмены токсического воздействия на печень. Между удельной площадью иммунореактивного материала

с использованием антител против виментина и α -SMA обнаружили сильную прямую корреляционную связь, которая отражает долю активированных перисинусоидальных клеток печени, которые, согласно литературным данным, содержат виментина и α -SMA [227], графики динамики количества обоих маркеров очень похожи, с той разницей что график α -SMA достигает пика после отмены токсического воздействия на печень, а максимум количества виментина обнаруживается еще до отмены воздействия химических агентов.

Нами обнаружены и описаны морфологические структуры регенераторные розетки, которые появляются после отмены токсического воздействия на печень и сохраняются до 8 недели спонтанной регенерации. Регенераторные розетки состояли из виментин и α -SMA позитивных низкодифференцированных клеток, вероятно это прогениторные клетки печени, далее от центра мезенхимальных розеток располагались овальные клетки печени в окружении юных регенерирующих гепатоцитов. Гепатоциты на периферии регенераторных розеток демонстрировали разный иммунофенотип, зависящий от этапа репаративной регенерации, так на 4 неделе восстановления гепатоциты содержали виментин, α -SMA, цитоплазменную форму c-Met, а на 8 неделе были резкоиммунопозитивными по ЦК-18 и так же содержали цитоплазменную форму c-Met. Эта динамика иммунофенотипов юных регенерирующих гепатоцитов позволяет предположить их происхождение в результате МЭП и дифференцировки стромальных мезенхимальных клеток печени, и может быть еще одним примером перезапуска программы развития печени при репаративной регенерации печени.

Таким образом у крыс на этапах эмбрионального и постнатального развития определены снижение количества виментина по мере созревания органа и дифференцирующиеся клетки несущие мезенхимальный и эпителиальный маркеры, вероятно мезенхимальные клетки которые созревают раньше эпителиальных не только создают микроокружение для дифференцирующихся гепатоцитов и холангиоцитов, но и являются источником развития части из них, так проявляются паттерны роста и регенерации паренхимы печени на этапах гепатогенеза, которые затем могут проявляться в процессе репаративной

регенерации печени. В условиях хронического повреждения печени ЧХУ на фоне умеренной алкоголизации основной путь регенерации печени за счет пролиферации гепатоцитов оказывается затруднен, мы обнаружили признаки повторения программ развития печени – повторение динамики количества виментина и признаки клеточной пластичности в особых морфологических структурах – регенераторных розетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были получены значимые данные о морфофункциональных характеристиках клеток печени крыс на различных этапах их онтогенеза и в процессе регенерации после химически индуцированного фиброза. Исследование подтверждает сложность и многообразие механизмов, участвующих в процессах регенерации печени. Наши результаты показывают, что для большинства животных 12 недель является достаточным временем для полноценного восстановления печени после фиброза. Это подтверждается как морфометрическими измерениями, так и динамикой изменения клеточного состава печени. Особенно важным является обнаружение корреляции в процессах гепатогенеза и в регенерации печени, что раскрывает новые перспективы для понимания механизмов восстановления печени и разработки новых терапевтических подходов.

Полученные данные также демонстрируют активную роль клеточной пластичности в процессе восстановления печени. Обнаружение регенераторных розеток, содержащих низкодифференцированные клетки в окружении юных гепатоцитов и овальных клеток, подтверждает важность пластичности клеток печени в регенеративных процессах. Эти наблюдения подчеркивают необходимость дальнейшего изучения и разработки новых методов воздействия на эти процессы для улучшения результатов в лечении заболеваний печени.

В целом, результаты нашего исследования предоставляют ценный вклад в научное понимание процессов регенерации печени и могут послужить основой для дальнейших исследований в этой области. Это исследование подчеркивает важность интеграции различных методологий для получения более полной картины сложных биологических процессов, происходящих в организме.

ВЫВОДЫ

1. Комплексное гистологическое исследование с программной компьютерной морфометрией и определением иммунофенотипа выявило возраст-специфические различия морфофункциональных характеристик клеток печени на этапах эмбрионального и постнатального развития. Установлено, что при развитии печени дифференцировка клеток мезенхимального происхождения завершается в период молочного кормления (до 14 суток постнатального развития) и опережает созревание клеток энтодермального происхождения.
2. На 10 и 17 сутках эмбрионального развития методом двойной иммунофлуоресценции определены дифференцирующиеся клетки, содержащие маркер клеток мезенхимального происхождения (виментин) и маркер эпителиальных клеток (цитокератин 18). Удельная площадь виментинпозитивного материала в период новорожденности в паренхиме печени достоверно снижается на 50,61% по сравнению с предыдущим этапом (17 сутки эмбрионального развития) и устанавливается на постоянном уровне в подсосном периоде, что также подтверждается стабилизацией уровня данного маркера при Вестерн-блоттинге. В эпителиальных клетках печени на протяжении эмбрионального и постнатального развития наблюдается прогрессивное увеличение (на 52,46% суммарно за наблюдаемый период) уровня цитоплазматической экспрессии цитокератина 18, которые носит нелинейный характер и достигает максимума в молодом возрасте.
3. Экспериментальная модель длительного повреждения печени четыреххлористым углеродом на фоне умеренной алкоголизации у белых беспородных крыс характеризуется спонтанным восстановлением печени в течение 12 недель после окончания воздействия, что проявляется снижением площади соединительной ткани (на 26,3%), восстановлением цитоархитектоники печеночных балок, нормализацией диаметров синусоидных пространств и снижением выраженности дистрофических и воспалительных изменений, это свидетельствует о реализации репаративных процессов, как со стороны клеток энтодермального, так и клеток мезенхимального происхождения.

4. Морфологические признаки активации репаративной регенерации сразу после длительного повреждения печени характеризуется появлением юных регенерирующих гепатоцитов, содержащих виментин, α -SMA и цитокератин 18. На 4 неделе репаративной регенерации образуются розетковидные скопления низкодифференцированных виментин-позитивных клеток, в том числе овальных клеток печени, окруженные виментин- и α -SMA-позитивными регенерирующими гепатоцитами, что свидетельствует об активации процессов клеточной пластичности. Во всех группах восстановления после длительного повреждения печени отмечали наличие юных гепатоцитов с иммунопозитивной реакцией на ЦК-18 и c-Met в перипортальных зонах печени и вдоль фиброзных септ, что свидетельствует о наиболее выраженных регенераторных процессах в данных зонах и об активации HGF/c-Met сигнального пути, который играет важную роль в регенерации печени, стимулируя миграцию, выживаемость и пролиферацию гепатоцитов.

5. Выявлена значимая сильная прямая корреляционная связь между удельной площадью соединительной ткани и удельной площадью продукта иммунореактивного материала с использованием антител на виментин ($r=0,88$), α -SMA ($r=0,71$) и c-Met ($r=0,94$) на этапах репаративной регенерации печени, что свидетельствует о снижении доли соединительной ткани в печени в процессе репаративной регенерации и сопровождается снижением содержания белка промежуточного микрофиламента виментина (на 43,96%) и α -SMA (на 43,71%) в фибробластах, активированных перисинусоидальных клетках и миофибробластах, с ремоделированием тканей печени, активацией миофибробластов и HGF/c-Met пути. Наблюдаемая значимая сильная прямая корреляционная связь между значениями удельной площади иммунореактивного материала на виментин и c-Met ($r=0,76$) в печени у крыс на этапах репаративной регенерации, с максимумом на этапе химического повреждения печени, указывает на активацию виментин-позитивных клеток и HGF/c-Met пути до отмены воздействия ЧХУ на печень. Установлена значимая сильная прямая корреляционная связь между значениями удельной площади иммунореактивного материала между α -SMA и виментин

($r=0,92$), а также α -SMA и ЦК-18 ($r=0,89$) у крыс на этапах репаративной регенерации, с максимальным повышением уровня маркеров через 4 недели после прекращения повреждения печени ЧХУ, отражает активацию регенераторных механизмов, посредством активации перисинусоидальных клеток печени и пролиферации гепатоцитов.

6. Морфологическое сходство в процессах дифференцировки гепатоцитов при репаративной регенерации печени, а также в антенатальном (10, 17 сутки) и постнатальном (от новорожденности до периода молодого возраста) периодах становления печени отражается выявлением значимой сильной прямой корреляционной зависимостью между динамикой количества виментина на этапах гепатогенеза и его показателями на этапах репаративной регенерации. В период 10 и 17 сутки суток эмбриогенеза и на 4 и 8 неделе репаративной регенерации после длительного повреждения печени выявлены клетки, содержащие маркеры дифференцирующихся клеток мезенхимального (виментин, α -SMA) и энтодермального происхождения (цитокератин 18, c-Met).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для использования экспериментальной модели репаративной регенерации печени после химически индуцированного фиброза у белых беспородных крыс рекомендуется внутрижелудочное введение масляного раствора ЧХУ в соотношении 1:3 через зонд дважды в неделю в дозе 0,1 мл/100г массы тела в течение 8 недель.

2. Для оптимизации протоколов диагностики заболеваний и токсического повреждения печени, а также для повышения точности существующих методик оценки восстановления паренхимы печени после токсического повреждения, рекомендуется использовать иммуногистохимические методы с применением антител против виментина, цитокератина-18, α -SMA, c-Met, двойное иммунофлуоресцентное окрашивание и методы вестерн-блоттинга.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования связаны с углубленным изучением клеточных механизмов регенерации печени и могут быть нацелены в дальнейшем на разработку новых методов диагностики и лечения заболеваний печени. Результаты исследования открывают новые направления для изучения процессов, происходящих в печени при репаративной регенерации и после токсического повреждения, и определяют направления научного поиска для будущих работ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- BMP – bone morphogenetic protein, костный морфогенетический белок
- c-Met – cellular-Mesenchymal-Epithelial Transition factor, рецептор фактора роста гепатоцитов
- EGF – epidermal growth factor, эпидермальный фактор роста
- HNF-6 – ядерный фактор гепатоцитов
- FGF – fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов
- HGF – hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов
- Spp1 – остеопонтин
- Tbx3 – T-box транскрипционный фактор 3
- TGF – Transforming growth factor, трансформирующий фактор роста
- TIMPs – Tissue inhibitor of metalloproteinase
- TNF – tumor necrosis factor, фактор некроза опухолей
- α -SMA – α -smooth muscle actin
- АТФ – Аденозинтрифосфорная кислота
- АФП – α -фетопротеин
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ММП – матриксные металлопротеиназы
- МФ – миофибробласты
- МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход
- НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени
- ПК – перисинусоидальные клетки
- СК – стволовые клетки
- ФП – фиброз печени
- ЦК 18 – цитокератин 18
- ЧХУ – четыреххлористый углерод
- ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Devarbhavi H. Global burden of liver disease: 2023 update. / Devarbhavi H., Asrani S.K., Arab J.P., Nartey Y.A., Pose E., Kamath P.S. // *J Hepatol.* – 2023 – Vol. 79(2) – P. 516-537.
2. Asrani S.K. Burden of liver diseases in the world. / Asrani S.K., Devarbhavi H., Eaton J., Kamath P.S. // *J Hepatol.* – 2019 – Vol. 70(1) – P. 151-171.
3. Huang D.Q. Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors. / Huang D.Q., Mathurin P., Cortez-Pinto H., Loomba R. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2023 – Vol. 20(1) – P. 37-49.
4. Chen Y. Obesity, non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. / Chen Y., Wang W., Morgan M.P., Robson T., Annett S. // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2023 – Vol. 14 – P. 1148934.
5. Terrault N.A. Liver Transplantation 2023: Status Report, Current and Future Challenges. / Terrault N.A., Francoz C., Berenguer M., Charlton M., Heimbach// *J. Clin Gastroenterol Hepatol.* – 2023 – Vol. 21(8) – P. 2150-2166.
6. Huang D. Biomimetic Liver Lobules from Multi-Compartmental Microfluidics. /, Huang D., Wu Z., Wang J., Wang J., Zhao Y. Biomimetic Liver Lobules from Multi-Compartmental Microfluidics. // *Adv Sci (Weinh).* – 2024 – e2406573.
7. Liu Q. Liver regeneration after injury: Mechanisms, cellular interactions and therapeutic innovations. / Liu Q., Wang S., Fu J., Chen Y., Xu J., Wei W., Song H., Zhao X., Wang H. // *Clin Transl Med.* – 2024 – Vol. 14(8) – e1812.
8. Lu X. miR-106b-5p protects against drug-induced liver injury by targeting vimentin to stimulate liver regeneration. / Lu X., Yu L., Zheng J., Li A., Li J., Lou H., Zhang W., Guo H., Wang Y., Li X., Gao Y., Fan X., Borlak J. // *MedComm (2020).* – 2024 – Vol. 5(9) – e692.
9. Li Y.N. Alterations in liver triglyceride profiles in CCl₄-induced liver regeneration. / Li Y.N., Sun F.F., Ouyang F., Luo D., Zhang Z.X., Lu M.X., Hu C.Y., Shi Y.H., Gui Q., Zhang J.Y., Yang T.S. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2024 – Vol. 734 – P. 150662.

10. Huang R. Liver regeneration: Cellular origin and molecular mechanisms. /Huang R., Zhang X., Gracia-Sancho J., Xie W.F. // *Liver Int.* 2022 Jul;42(7):1486-1495.
11. Di-Iacovo N. Liver Regeneration and Immunity: A Tale to Tell. /Di-Iacovo N., Pieroni S., Piobbico D., Castelli M., Scopetti D., Ferracchiato S., Della-Fazia M.A., Servillo G.// *Int J Mol Sci.* – 2023 – Vol. 24(2) – P. 1176.
12. Liang Y. Temporal analyses of postnatal liver development and maturation by single-cell transcriptomics. /Liang Y., Kaneko K., Xin B., Lee J., Sun X., Zhang K., Feng G.S. // *Dev Cell.* – 2022 – Vol. 57(3) – P. 398-414.e5.
13. Freeburg S.H. Hepatobiliary Differentiation: Principles from Embryonic Liver Development. /Freeburg S.H., Goessling W.// *Semin Liver Dis.* – 2020 – Vol. 40(4) – P. 365-372
14. Ruiz-Estevez M. Liver development is restored by blastocyst complementation of HHEX knockout in mice and pigs. /Ruiz-Estevez M., Crane A.T., Rodriguez-Villamil P., Ongaratto F.L., You Y., Steevens A.R., Hill C., Goldsmith T., Webster D.A., Sherry L., Lim S., Denman N., Low W.C., Carlson D.F., Dutton J.R., Steer C.J., Gafni O.// *Stem Cell Res Ther.* – 2021 – Vol. 12(1) – P. 292.
15. Thorgersen E.B. The Role of Complement in Liver Injury, Regeneration, and Transplantation. /Thorgersen E.B., Barratt-Due A., Haugaa H., Harboe M., Pischke S.E., Nilsson P.H., Mollnes T.E. // *Hepatology.* – 2019 – Vol. 70(2) – P. 725-736.
16. Wang X. Comparative analysis of cell lineage differentiation during hepatogenesis in humans and mice at the single-cell transcriptome level. / Wang X., Yang L., Wang Y.C., Xu Z.R., Feng Y., Zhang J., Wang Y., Xu C.R. // *Cell Res.* – 2020 – Vol. 30(12) – P. 1109-1126.
17. Russell J.O. Hepatocyte-Specific β -Catenin Deletion During Severe Liver Injury Provokes Cholangiocytes to Differentiate /Russell J.O., Lu W.Y., Okabe H., Abrams M., Oertel M., Poddar M., Singh S., Forbes S.J., Monga S.P.// *Into Hepatocytes. Hepatology.* – 2019 – Vol. 69(2) – P. 742-759.,
18. Perugorria M.J. Hepatocyte Differentiation: A Context-Dependent Process and an Opportunity for Regenerative Medicine. /Perugorria M.J., Olaizola P., Banales J.M.// *Cholangiocyte-to- Hepatology.* – 2019 – Vol. 69(2) – P. 480-483.

19. Lee S.H. Hepatocyte-to-cholangiocyte conversion occurs through transdifferentiation independently of proliferation in zebrafish. /Lee S.H., So J., Shin D.// *Hepatology*. – 2023 – Vol. 77(4) – P. 1198-1210.
20. Mishra A.P., Impaired liver regeneration and lipid homeostasis in CCl₄ treated WDR13 deficient mice. /Mishra A.P., Siva A.B., Gurunathan C., Komala Y., Lakshmi B.J. // *Lab Anim Res*. – 2020 – Vol. 36(1) – P. 41.
21. Xie S. Assessment of Fibrotic Liver Regeneration After Partial Hepatectomy With Intravoxel Incoherent Motion Diffusion-Weighted Imaging: An Experimental Study in a Rat Model With Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury. /Xie S., Qiu C., Sun Y., Yu Y., Hu Z., Zhang K., Chen L., Cheng Y., Bao M., Zhang Q., Zhu J., Grimm R., Shen W.// *Front Physiol*. – 2022 – Vol. 13 – P. 822763.
22. Shao S. The dynamics of cell death patterns and regeneration during acute liver injury in mice. /Shao S., Zhang Y., Li G., Yu Z., Cao Y., Zheng L., Zhang K., Han X., Shi Z., Cui H., Song X., Hong W., Han T.// *FEBS Open Bio*. – 2022 – Vol. 12(5) – P. 1061-1074.
23. Munakarmi S. Hepatoprotective Effects of a Natural Flavanol 3,3'-Diindolylmethane against CCl₄-Induced Chronic Liver Injury in Mice and TGFβ1-Induced EMT in Mouse Hepatocytes via Activation of Nrf2 Cascade. /Munakarmi S., Gurau Y., Shrestha J., Risal P., Park H.S., Shin H.B., Jeong Y.J. // *Int J Mol Sci*. – 2022 – Vol. 23(19) – P. 11407.
24. Wan S. Activated hepatic stellate cell-derived Bmp-1 induces liver fibrosis via mediating hepatocyte epithelial-mesenchymal transition. /Wan S., Liu X., Sun R., Liu H., Jiang J., Wu B.// *Cell Death Dis*. – 2024 – Vol. 15(1) – P. 41.
25. Ma K. A Mesenchymal-Epithelial Transition Factor-Agonistic Antibody Accelerates Cirrhotic Liver Regeneration and Improves Mouse Survival Following Partial Hepatectomy. /Ma K., Que W., Hu X., Guo W.Z., Gu E.L., Zhong L., Morello V., Cazzanti M., Michieli P., Takahara T., Li X.K.// *Liver Transpl*. – 2022 – Vol. 28(5) – P. 782-793.
26. Zhao Y. HGF/c-Met: A Key Promoter in Liver Regeneration. /Zhao Y., Ye W., Wang Y.D., Chen W.D.// *Front Pharmacol*. – 2022 – Vol. 13 – P. 808855

27. Aimaiti Y. Hepatic stellate cells regulate hepatic progenitor cells differentiation via the TGF- β 1 /Jagged1 signaling axis. /Aimaiti Y., Jin X., Shao Y., Wang W., Li D. // *J. Cell Physiol.* – 2019 – Vol. 234(6) – P. 9283-9296.
28. Fenlon M. Prominin-1-expressing hepatic progenitor cells induce fibrogenesis in murine cholestatic liver injury. /Fenlon M., Short C., Xu J., Malkoff N., Mahdi E., Hough M., Glazier A., Lee C., Asahina K., Wang K.S. // *Physiol Rep.* – 2020 – Vol. 8(14) – e14508.
29. Elke A. Ober. Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis /Elke A. Ober, Frédéric P. Lemaigre // *Journal of Hepatology*, – 2018 – Vol. 68 (5) – P. 1049-1062
30. Bort R. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. /Bort R., Signore M., Tremblay K., Martinez Barbera J.P., Zaret K.S. // *Dev Biol.* – 2006 – Vol. 290(1) – P. 44-56.
31. Willnow D. Quantitative lineage analysis identifies a hepato-pancreato-biliary progenitor niche. /Willnow D., Benary U., Margineanu A., Vignola M.L., Konrath F., Pongrac I.M., Karimaddini Z., Vigilante A., Wolf J., Spagnoli F.M.// *Nature.* – 2021 – Vol. 597(7874) – P. 87-91.
32. Si-Tayeb K. Organogenesis and development of the liver. / Si-Tayeb K., Lemaigre F.P., Duncan S.A. // *Dev Cell.* – 2010 – Vol. 18(2) – P. 175-89.
33. Gordillo M. Orchestrating liver development. / Gordillo M., Evans T., Gouon-Evans V. // *Development.* – 2015 – Vol. 142(12) – P. 2094-108.
34. Clotman F. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. /Clotman F., Lannoy V.J., Reber M., Cereghini S., Cassiman D., Jacquemin P., Roskams T., Rousseau G.G., Lemaigre F.P.// *Development.* – 2002 – Vol. 129(8) – P. 1819-28.
35. Margagliotti S. The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration. /Margagliotti S., Clotman F., Pierreux C.E., Beaudry J.B., Jacquemin P., Rousseau G.G., Lemaigre F.P.// *Dev Biol.* – 2007 – Vol. 311(2) – P. 579-89.

36. Lüdtke T.H. Tbx3 promotes liver bud expansion during mouse development by suppression of cholangiocyte differentiation. /Lüdtke T.H., Christoffels V.M., Petry M., Kispert A. // *Hepatology*. – 2009 – Vol. 49(3) – P. 969-78.
37. Gérard C. Gene regulatory networks in differentiation and direct reprogramming of hepatic cells. /Gérard C., Tys J., Lemaigre F.P.// *Semin Cell Dev Biol*. – 2017 – Vol. 66 – P. 43-50.
38. Hou X. Integrating Spatial Transcriptomics and Single-Cell RNA-seq Reveals the Gene Expression Profiling of the Human Embryonic Liver. / Hou X., Yang Y., Li P., Zeng Z., Hu W., Zhe R., Liu X., Tang D., Ou M., Dai Y. // *Front Cell Dev Biol*. – 2021 – Vol. 9 – P. 652408.
39. Zong Y. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. / Zong Y., Panikkar A., Xu J., Antoniou A., Raynaud P., Lemaigre F., Stanger BZ. // *Development*. – 2009 – Vol. 136(10) – P. 1727-39.
40. Ober E.A. Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis. /Ober E.A., Lemaigre F.P. // *J Hepatol*. – 2018 – Vol. 68(5) – P. 1049-1062.
41. Carpentier R. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. / Carpentier R., Suñer R.E., van Hul N., Kopp J.L., Beaudry J.B., Cordi S., Antoniou A., Raynaud P., Lepreux S., Jacquemin P., Leclercq I.A., Sander M., Lemaigre F.P. // *Gastroenterology*. – 2011 – Vol. 141(4) – P. 1432-8, 1438.e1-4.
42. Modi K. Morphometry of Fetal Liver From Human Fetuses Between 12-36 Weeks Gestational Age. / Modi K., Chaturvedi A., Ahmad A., Bhadoria P. // *Cureus*. – 2022 – Vol. 14(4) – e24060.
43. Crawford L.W. Histology atlas of the developing mouse hepatobiliary system with emphasis on embryonic days 9.5-18.5. / Crawford L.W., Foley J.F., Elmore S.A. // *Toxicol Pathol*. – 2010 – Vol. 38(6) – P. 872-906.
44. Ober E.A. Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis. / Ober E.A., Lemaigre F.P. // *J Hepatol*. – 2018 – Vol. 68(5) – P. 1049-1062.
45. Taniguchi T. Regulation of Mesothelial Cell Fate during Development and Human Diseases. / Taniguchi T., Tomita H., Kanayama T., Mogi K., Koya Y., Yamakita

- Y., Yoshihara M., Kajiyama H., Hara A. // *Int J Mol Sci.* – 2022 – Vol. 23(19) – P. 11960.
46. Lemaigre F.P. Development of the Intrahepatic and Extrahepatic Biliary Tract: A Framework for Understanding Congenital Diseases. / Lemaigre F.P. // *Annu Rev Pathol.* – 2020 – Vol. 15 – P. 1-22.
47. Lemaigre F.P. Heart-of-Glass: A Regulator at the Heart of Liver Morphogenesis and Metabolic Zonation. / Lemaigre F.P. // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2022 – Vol. 13(6) – P. 1847-1848.
48. Kiernan F. The anatomy and physiology of the liver. / Kiernan F. // *Philos. Trans. R Soc. Lond.* – 1833 – Vol. 123 – P. 711–770.
49. Mall F. A. study of the structural unit of the liver. / Mall F. // *Am. J. Anat.* – 1906 – Vol. 5 – P. 227–308.
50. Rappaport A. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit: Role in hepatic physiology and pathology. / Rappaport A., Borowy Z.J., Lougheed W.M., Lotto W.N. // *Anat. Rec.* – 1954 – 119 – 11–34.
51. Paris J. Liver zonation, revisited. / Paris J., Henderson N.C. // *Hepatology.* – 2022 – Vol. 76(4) – P. 1219-1230.
52. Liu Z. Mesoscale visualization of three-dimensional microvascular architecture and immunocyte distribution in intact mouse liver lobes. / Liu Z., Xu M., Huang S., Pan Q., Liu C., Zeng F., Fan Z., Lu Y., Wang J., Liu J., Li X., Luo Q., Zhang Z. // *Mesoscale visualization of three-dimensional microvascular architecture and immunocyte distribution in intact mouse liver lobes. Theranostics.* – 2022 – Vol. 12(12) – P. 5418-5433.
53. Lau C. Voronoi theory of the normal liver lobular architecture and its applicability in hepatic zonation. / Lau C., Kalantari B., Batts K.P., Ferrell L.D., Nyberg S.L., Graham R.P., Moreira R.K. // *The Sci Rep.* – 2021 – Vol. 11(1) – P. 9343.
54. Затолокина, М. А. Морфологическое обоснование использования неноменклатурного термина "sinusoidal liver cells" в современной морфологии / М. А. Затолокина // *Региональный вестник.* – 2019. – № 19(34). – С. 15-17.

55. Overi D., Hepatocyte Injury and Hepatic Stem Cell Niche in the Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis. / Overi D., Carpino G., Franchitto A., Onori P., Gaudio E. // *Cells*. – 2020 – Vol. 9(3) – P. 590.
56. Jiang X. Mapping hepatocyte size in vivo using temporal diffusion spectroscopy MRI. / Jiang X., Xu J., Gore J.C. // *Magn Reson Med*. 2020 - Vol. 84(5) – P. 2671-2683.
57. Цыркунов, В. М. Клиническая морфология печени: гепатоциты, эндомембранная система / В. М. Цыркунов, В. П. Андреев, Р. И. Кравчук // *Гепатология и гастроэнтерология*. – 2019. – Т. 3, № 1. – С. 28-42.
58. Zhang D. Chronic Microcystin-LR Exposure Induces Abnormal Lipid Metabolism via Endoplasmic Reticulum Stress in Male Zebrafish. / Zhang D., Lin W., Liu Y., Guo H., Wang L., Yang L., Li L., Li D., Tang R. // *Toxins (Basel)*. – 2020 – Vol. 12(2) – P. 107
59. Sheldon R.D. eNOS deletion impairs mitochondrial quality control and exacerbates Western diet-induced NASH. / Sheldon R.D., Meers G.M., Morris E.M., Linden M.A., Cunningham R.P., Ibdah J.A., Thyfault J.P., Laughlin M.H., Rector R.S. // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2019 – Vol. 317(4) – E605-E616.
60. Ben-Moshe S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. / Ben-Moshe S., Itzkovitz S. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2019 – Vol. 16(7) – P. 395-410.
61. Berasain C. Loss of liver function in chronic liver disease: An identity crisis. / Berasain C., Arechederra M., Argemí J., Fernández-Barrena M.G., Avila M.A. // *J Hepatol*. – 2023 – Vol. 78(2) – P. 401-414.
62. Giambartolomei G.H. Immunopathogenesis of Hepatic Brucellosis. / Giambartolomei G.H, Delpino M.V. // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2019 – Vol. 9 – P. 423.
63. Banales J.M. Cholangiocyte pathobiology. / Banales J.M., Huebert R.C., Karlsen T., Strazzabosco M., LaRusso N.F., Gores G.J. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2019 – Vol. 16(5) – P. 269-281.
64. Hundt M. Physiology, Bile Secretion. / Hundt M., Basit H., John S. // *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan.

65. Javitt N.B. Hepatic bile formation: bile acid transport and water flow into the canalicular conduit. / Javitt N.B. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2020 – Vol. 319(5) – G609-G618.
66. Little A. Recent Advances in Intrahepatic Biliary Epithelial Heterogeneity. / Little A., Medford A., O'Brien A., Childs J., Pan S., Machado J., Chakraborty S., Glaser S. // *Semin Liver Dis.* – 2023 – Vol. 43(1) – P. 1-12.
67. Guicciardi M.E. The Spectrum of Reactive Cholangiocytes in Primary Sclerosing Cholangitis. / Guicciardi M.E., Trussoni C.E., LaRusso N.F., Gores G.J. // *Hepatology.* – 2020 – Vol. 71(2) – P.741-748.
68. Zhang M. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives. / Zhang M., Serna-Salas S., Damba T., Borghesan M., Demaria M., Moshage H. // *Mech Ageing Dev.* – 2021 – Vol. 199 – P. 111572.
69. Luo N. Hepatic Stellate Cell: A Double-Edged Sword in the Liver. / Luo N., Li J., Wei Y., Lu J., Dong R. // *Physiol Res.* – 2021 – Vol. 70(6) – P. 821-829.
70. Kordes C. Hepatic stellate cells: current state and open questions. / Kordes C., Bock H.H., Reichert D., May P., Häussinger D. // *Biol Chem.* – 2021 – Vol. 402(9) – P. 1021-1032.
71. Barcena-Varela M. Epigenetic Mechanisms in Hepatic Stellate Cell Activation During Liver Fibrosis and Carcinogenesis. / Barcena-Varela M., Colyn L., Fernandez-Barrena M.G. // *Int J Mol Sci.* – 2019 – Vol. 20(10) – P. 2507.
72. Lei L. Portal fibroblasts with mesenchymal stem cell features form a reservoir of proliferative myofibroblasts in liver fibrosis. / Lei L., Bruneau A., El Mourabit H., Guégan J., Folseraas T., Lemoine S., Karlsen T.H., Hoareau B., Morichon R., Gonzalez-Sanchez E., Goumard C., Ratziu V., Charbord P., Gautheron J., Tacke F., Jaffredo T., Cadoret A., Housset C. // *Hepatology.* – 2022 – Vol. 76(5) – P. 1360-1375.
73. Yang W. Single-Cell Transcriptomic Analysis Reveals a Hepatic Stellate Cell-Activation Roadmap and Myofibroblast Origin During Liver Fibrosis in Mice. / Yang W., He H., Wang T., Su N., Zhang F., Jiang K., Zhu J., Zhang C., Niu K.,

- Wang L., Yuan X., Liu N., Li L., Wei W., Hu J. // *Hepatology*. – 2021 – Vol. 74(5) – P. 2774-2790.
74. O'Hara S.P. Portal fibroblasts: A renewable source of liver myofibroblasts. / O'Hara S.P., LaRusso N.F. // *Hepatology*. – 2022 – Vol. 76(5) – P. 1240-1242.
75. Cassiman D. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. / Cassiman D., Roskams T. // *J Hepatol*. – 2002 – Vol. 37(4) – P. 527-35.
76. Wilson J.W. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. / Wilson J.W., Leduc E.H. J. // *Pathol. Bacteriol*. 1958; 76:441 -9
77. Hixson D.C. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. / Hixson D.C., Faris R.A., Thompson N.L. // *Pathobiology* – 1990 – Vol. 58(2) – P. 65-77
78. Киясов А. П. Овальные клетки - предполагаемые стволовые клетки печени или гепатобласты? / А. П. Киясов, А. А. Гумерова, М. А. Титова. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2006. – Т. 1. – № 2. – С. 55-58.
79. Bocci F. NRF2 activates a partial epithelial-mesenchymal transition and is maximally present in a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. / Bocci F., Tripathi S.C., Vilchez Mercedes S.A., George J.T., Casabar J.P., Wong P.K., Hanash S.M., Levine H., Onuchic J.N., Jolly M.K. // *Integr Biol (Camb)*. – 2019 – Vol. 11(6) – P. 251-263.
80. Evarts R.P. Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. / Evarts R.P., Hu Z., Fujio K., Marsden E.R., Thorgeirsson S.S. // *Cell Growth Differ*. – 1993 – Vol. 4(7) – P. 555-61.
81. Hwa A.J. Rat liver sinusoidal endothelial cells survive without exogenous VEGF in 3D perfused co-cultures with hepatocytes. / Hwa A.J., Fry R.C., Sivaraman A., So P.T., Samson L.D., Stolz D.B., Griffith L.G. // *FASEB J*. – 2007 – Vol. 21(10) – P. 2564-79.
82. Дворяшина И. А. Особенности локализации и соотношения промежуточных филаментов эпителиального и мезенхимального фенотипов в ткани печени крыс в эмбриональном и постнатальном периодах морфогенеза / И. А.

Дворяшина, Ю. И. Великородная, А. В. Терентьев, В. Л. Загребин // Гены и Клетки. – 2021. – Т. 16, № 3. – С. 63-68.

83. Altaf B. Association of liver biomarkers and cytokeratin-18 in Nonalcoholic fatty liver disease patients. / Altaf B., Rehman A., Jawed S., Raouf A. // Pak J Med Sci. – 2020 – Vol. 36(3) – P. 387-390.
84. de Alteriis G. Visceral Obesity and Cytokeratin-18 Antigens as Early Biomarkers of Liver Damage. / de Alteriis G., Pugliese G., Di Sarno A., Muscogiuri G., Barrea L., Cossiga V., Perruolo G., Di Tolla M.F., Zumbolo F., Formisano P., Morisco F., Savastano S. // Int J Mol Sci. – 2023 – Vol. 24(13) – P. 10885.
85. Богуш Т. А. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии виментина в эпителиальных клетках / Т. А. Богуш, С. А. Калюжный, А. А. Башарина [и др.] // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2019. – Т. 60, № 6. – С. 384-391
86. Nushtaeva A. "Pulsed Hypoxia" Gradually Reprograms Breast Cancer Fibroblasts into Pro-Tumorigenic Cells via Mesenchymal-Epithelial Transition. / Nushtaeva A., Ermakov M., Abdurakhmanova M., Troitskaya O., Belovezhets T., Varlamov M., Gayner T., Richter V., Koval O. // Int J Mol Sci. – 2023 – Vol. 24(3) – P. 2494.
87. Younesi F.S. Myofibroblast Markers and Microscopy Detection Methods in Cell Culture and Histology / Younesi F.S., Son D.O., Firmino J., Hinz B. // Methods Mol Biol. – 2021 – Vol. 2299 – P. 17-47
88. Schröder S.K. Staining for F-Actin in Hepatic Stellate Cells. / Schröder S.K., Tag C.G., Weiskirchen S., Weiskirchen R. // Phalloidin Methods Mol Biol. – 2023 – Vol. 2669 – P. 55-66.
89. Rockey D.C. Deficiency Leads to Decreased Liver Fibrosis via Impaired Cytoskeletal Signaling in Hepatic Stellate Cells Smooth Muscle α -Actin / Rockey D.C., Du Q., Weymouth N.D., Shi Z. // Am J Pathol. – 2019 – Vol. 189(11) – P. 2209-2220.
90. Michalopoulos G.K. Liver regeneration / Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. // Science. – 1997 – Vol. 276(5309) – P. 60-6.

91. Zhao J. Identifying the Key Genes in Mouse Liver Regeneration After Partial Hepatectomy by Bioinformatics Analysis and in vitro/vivo Experiments / Zhao J., Yu S.Z., Cai Q., Ma D., Jiang L., Yang L.P., Yu Z.Y. // *Front Genet.* – 2021 – Vol. 12 – P. 670706.
92. Starlinger P. Hemostasis and Liver Regeneration / Starlinger P., Luyendyk J.P., Groeneveld D.J. // *Semin Thromb Hemost.* – 2020 – Vol. 46(6) – P. 735-742.
93. Huang W. A narrative review of liver regeneration-from models to molecular basis / Huang W., Han N., Du L., Wang M., Chen L., Tang H. // *Ann Transl Med.* – 2021 – Vol. 9(22) – P. 1705.
94. Forbes S.J. Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application / Forbes S.J., Newsome P.N. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2016 – Vol. 13(8) – P. 473-85.
95. Fragoulis A. Nrf2 Ameliorates DDC-Induced Sclerosing Cholangitis and Biliary Fibrosis and Improves the Regenerative Capacity of the Liver / Fragoulis A., Schenkel J., Herzog M., Schellenberg T., Jahr H., Pufe T., Trautwein C., Kensler T.W., Streetz K.L., Wruck C.J. // *Toxicol Sci.* – 2019 – Vol. 169(2) – P. 485-498.
96. Jeng K.S. Liver Fibrosis and Inflammation under the Control of ERK2 / Jeng KS, Lu S.J., Wang C.H., Chang C.F. // *Int J Mol Sci.* – 2020 – Vol. 21(11) – P. 3796.
97. Yagi S. Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation / Yagi S., Hirata M., Miyachi Y., Uemoto S. // *Int J Mol Sci.* – 2020 – Vol. 21(21) – P. 8414.
98. Bhushan B. Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. / Bhushan B., Apte U. // *Am J Pathol.* – 2019 – Vol. 189(4) – P. 719-729.
99. Furuyama K. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. / Furuyama K., Kawaguchi Y., Akiyama H., Horiguchi M., Kodama S., Kuhara T., Hosokawa S., Elbahrawy A., Soeda T., Koizumi M., Masui T., Kawaguchi M., Takaori K., Doi R., Nishi E., Kakinoki R., Deng J.M., Behringer R.R., Nakamura T., Uemoto S. // *Nat Genet.* – 2011 – Vol. 43(1) – P. 34-41.

100. de Miguel M.P. Mesenchymal Stem Cells for Liver Regeneration in Liver Failure: From Experimental Models to Clinical Trials / de Miguel M.P., Prieto I., Moratilla A., Arias J., Aller M.A. // *Stem Cells Int.* – 2019 – Vol. 2019 – P. 3945672.
101. Zweerink S. Repolarization Precedes Oval Cell-mediated Hepatocytic Regeneration in the CDE Diet Mouse Model / Zweerink S., Mueck V., Kraemer L.P., Tischler E., Schulte S., Goeser T., Nierhoff D. // *J Histochem Cytochem.* – 2022 – Vol. 70(5) – P. 377-389.
102. Li W. Cell Plasticity in Liver Regeneration / Li W., Li L., Hui L. // *Trends Cell Biol.* – 2020 – Vol. 30(4) – P. 329-338.
103. Monga S.P. Regeneration: Fulfilling the Prophecy of Prometheus! Ductular Reaction and Liver Cell / Monga S.P., Nejak-Bowen K. // *Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2023 – Vol. 15(3) – P. 806-808.
104. Sato K. Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. / Sato K., Marzioni M., Meng F., Francis H., Glaser S., Alpini G. // *Hepatology.* – 2019 – Vol. 69(1) – P. 420-430.
105. Wilson D.B. Invasive Ductular Reaction: Form and Function / Wilson D.B., Rudnick D.A. // *Am J Pathol.* – 2019 – Vol. 189(8) – P. 1501-1504.
106. Raven A. Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration / Raven A., Lu W.Y., Man T.Y., Ferreira-Gonzalez S., O'Duibhir E., Dwyer B.J., Thomson J.P., Meehan R.R., Bogorad R., Koteliansky V., Kotelevtsev Y., Ffrench-Constant C., Boulter L., Forbes S.J. // *Nature.* – 2017 – Vol. 547(7663) – P. 350-354.
107. Li W. A Homeostatic Arid1a-Dependent Permissive Chromatin State Licenses Hepatocyte Responsiveness to Liver-Injury-Associated YAP Signaling / Li W., Yang L., He Q., Hu C., Zhu L., Ma X., Ma X., Bao S., Li L., Chen Y., Deng X., Zhang X., Cen J., Zhang L., Wang Z., Xie WF., Li H., Li Y., Hui L. // *Cell Stem Cell.* – 2019 – Vol. 25(1) – P. 54-68.e5.
108. Gadd V.L. Epithelial Plasticity during Liver Injury and Regeneration. *Cell Stem Cell* / Gadd V.L., Aleksieva N. // *Forbes SJ.* – 2020 – Vol. 27(4) – P. 557-573.

109. He J. Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling Is Required for the Dedifferentiation From Biliary Cell to Bipotential Progenitor Cell in Zebrafish Liver Regeneration / He J., Chen J., Wei X., Leng H., Mu H., Cai P., Luo L. // *Hepatology*. – 2019 – Vol. 70(6) – P. 2092-2106.
110. Siapati E.K. Liver Regeneration by Hematopoietic Stem Cells: Have We Reached the End of the Road? / Siapati E.K., Roubelakis M.G., Vassilopoulos G. // *Cells*. – 2022 – Vol. 11(15) – P. 2312.
111. Szücs A. Postnatal, ontogenic liver growth accomplished by biliary/oval cell proliferation and differentiation / Szücs A., Paku S., Sebestyén E., Nagy P., Dezső K. // *PLoS One*. – 2020 – Vol. 15(5) – e0233736.
112. Gong J. Hepatocytes: A key role in liver inflammation / Gong J., Tu W., Liu J., Tian D. // *Front Immunol*. – 2023 – Vol. 13 – P. 1083780.
113. Liang C.Q. FoxO3 restricts liver regeneration by suppressing the proliferation of hepatocytes / Liang C.Q., Zhou D.C., Peng W.T., Chen W.Y., Wu H.Y., Zhou Y.M., Gu W.L., Park K.S., Zhao H., Pi L.Q., Zheng L., Feng S.S., Cai D.Q., Qi X.F. // *NPJ Regen Med*. – 2022 – Vol. 7(1) – P. 33.
114. Matsumoto T. In Vivo Lineage Tracing of Polyploid Hepatocytes Reveals Extensive Proliferation during Liver Regeneration / Matsumoto T., Wakefield L., Tarlow B.D., Grompe M. // *Cell Stem Cell*. – 2020 – Vol. 26(1) – P. 34-47.e3.
115. Miyaoka Y. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration / Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. // *Curr Biol*. – 2012 – Vol. 22(13) – P. 1166-75.
116. Ельчанинов А. В. Регуляция пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс / А. В. Ельчанинов, А. В. Макаров, И. Г. Воробьева [и др.] // *Гены и Клетки*. – 2018. – Т. 13, № 4. – С. 37-42.
117. Wilson S.R. The Ploidy State as a Determinant of Hepatocyte Proliferation. / Wilson S.R., Duncan A.W. // *Semin Liver Dis*. – 2023 Nov – 43(4) – 460-471.
118. Yano K. Spatiotemporal expression of HMGB2 regulates cell proliferation and hepatocyte size during liver regeneration / Yano K., Chojookhuu N., Ikenoue M.,

- Fidya, Fukaya T., Sato K., Lee D., Taniguchi N., Chosa E., Nanashima A., Hishikawa Y. // *Sci Rep.* – 2022 – Vol. 12(1) – P. 11962.
119. Barkin J.M. Significance of CCNs in liver regeneration / Barkin J.M., Jin-Smith B., Torok K., Pi L. // *J Cell Commun Signal.* – 2023 Jun – 17(2) – 321-332.
120. Banales J.M.. Cholangiocyte pathobiology / Banales J.M., Huebert R.C., Karlsen T., Strazzabosco M., LaRusso N.F., Gores G.J. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2019 – Vol. 16(5) – P. 269-281
121. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. / Farber E. // *Cancer Res.* – 1956 – Vol. 16(2) – P. 142-8.
122. Ko S. Liver Progenitors and Adult Cell Plasticity in Hepatic Injury and Repair: Knowns and Unknowns / Ko S., Russell J.O., Molina L.M., Monga S.P. // *Annu Rev Pathol.* – 2020 – Vol. 15 – P. 23-50.
123. Yan M. The Dual-Mode Transition of Myofibroblasts Derived from Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis / Yan M., Xie Y., Yao J., Li X. // *Int J Mol Sci.* – 2023 – Vol. 24(20) – P. 15460.
124. Beringer A. IL-17 and TNF- α co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells / Beringer A., Miossec P. // *Clin Exp Immunol.* – 2019 – Vol. 198(1) – P. 111-120.
125. Qian Y. Liver Regeneration in Chronic Liver Injuries: Basic and Clinical Applications Focusing on Macrophages and Natural Killer Cells / Qian Y., Shang Z., Gao Y., Wu H., Kong X. // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2022 – Vol. 14(5) – P. 971-981.
126. Vierhout M. Monocyte and macrophage derived myofibroblasts: Is it fate? A review of the current evidence / Vierhout M., Ayoub A., Naiel S., Yazdanshenas P., Revill S.D., Reihani A., Dvorkin-Gheva A., Shi W., Ask K. // *Wound Repair Regen.* – 2021 – Vol. 29(4) – P. 548-562.

127. Iredale J. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. / Iredale J. P. // *J. Clin. Invest.* – 1998 – Vol. 102– P. 538–549.
128. Xue F. Coordinated signaling of activating transcription factor 6 α and inositol-requiring enzyme 1 α regulates hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis in mice / Xue F., Lu J., Buchl S.C., Sun L., Shah V.H., Malhi H., Maiers J.L. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2021 – Vol. 320(5) – G864-G879.
129. Caligiuri A. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Liver Fibrosis Regression / Caligiuri A., Gentilini A., Pastore M., Gitto S., Marra F. // *Cells.* – 2021 – Vol. 10(10) – P. 2759.
130. Gao J. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis / Gao J., Wei B., de Assuncao T.M., Liu Z., Hu X., Ibrahim S., Cooper S.A., Cao S., Shah V.H., Kostallari E. // *J Hepatol.* – 2020 – Vol. 73(5) – P. 1144-1154.
131. Nakano Y. Deactivation Factor of Fibrogenic Hepatic Stellate Cells Induces Regression of Liver Fibrosis in Mice / Nakano Y., Kamiya A., Sumiyoshi H., Tsuruya K., Kagawa T., Inagaki Y. A. // *Hepatology.* – 2020 – Vol. 71(4) – P. 1437-1452.
132. Kisseleva T. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis / Kisseleva T., Cong M., Paik Y., Scholten D., Jiang C., Benner C., Iwaisako K., Moore-Morris T., Scott B., Tsukamoto H., Evans S.M., Dillmann W., Glass C.K., Brenner D.A. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012 – Vol. 109(24) – P. 9448-53.
133. Jayachandran J. Molecular mechanism involved in epithelial to mesenchymal transition / Jayachandran J., Srinivasan H., Mani K.P. // *Arch Biochem Biophys.* – 2021 – Vol. 710 – P. 108984.
134. He J. Micro-vesicles from mesenchymal stem cells over-expressing miR-34a inhibit transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells in vitro / He J., Jiang Y.L., Wang Y., Tian X.J., Sun S.R. // *Chin Med J (Engl).* – 2020 – Vol. 133(7) – P. 800-807.

135. Hay E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. / Hay, E.D. //Acta Anat. (Basel) – 1995 – Vol. 154:8–P. 20.
136. Lipschutz, J.H. Molecular development of the kidney: a review of the results of gene disruption studies. / Lipschutz, J.H. // Am. J. Kidney Dis. – 1998 – Vol. 31 – P. 383–397.
137. Rothenpieler U.W. Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development / Rothenpieler U.W., Dressler G.R.// Development. – 1993 – Vol. 119– P. 711–720.
138. Hogan B.L. Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis / Hogan B.L., Kolodziej P.A. // Nat. Rev. Genet. – 2002 - Vol. 3 – P. 513–523
139. Marconi GD. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis / Marconi G.D., Fonticoli L., Rajan T.S., Pierdomenico S.D., Trubiani O., Pizzicannella J., Diomede F.// Cells. – 2021 – Vol. 10(7) – P. 1587.
140. Choi S.S. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. / Choi S.S., Diehl A.M.// Hepatology. - 2009 – Vol. 50(6) – P. 2007–2013.
141. Zeisberg M. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. / Zeisberg M., Neilson E.G.// J Clin Invest. – 2009 – Vol. 119(6) – P. 1429-1437.
142. Francou A. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Development and Cancer / Francou A., Anderson K.V.// Annu Rev Cancer Biol. – 2020 – Vol. 4 – P. 197-220.
143. Hao Y. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis / Hao Y., Baker D., Ten Dijke P. // Int J Mol Sci. – 2019 – Vol. 20(11) – P. 2767.
144. Valcourt U. TGF- β and the smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal transition / Valcourt U., Kowanetz M., Niimi H., Heldin C.-H., Moustakas A.// Mol Biol Cell. – 2005 – Vol. 16 – P. 1987–2002.

145. Murray L.A. BMP-7 does not protect against bleomycin-induced lung or skin fibrosis / Murray L.A., Hackett T.L., Warner S.M., Shaheen R., Argentieri R.L., Dudas P., Farrell F.X., et al. // PLoS ONE. – 2008 – Vol. 3 – e403
146. Antony J. Epithelial-to-mesenchymal transition: lessons from development, insights into cancer and the potential of EMT-subtype based therapeutic intervention / Antony J., Thiery J.P., Huang R.Y. // Phys Biol. – 2019 – Vol. 16(4) – P. 041004.
147. Zavadil J. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. / Zavadil J., Bottinger E.P.// Oncogene. – 2005 – 24 – 5764–5774.
148. Brabletz S. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression / Brabletz S, Schuhwerk H., Brabletz T., Stemmler M.P. // EMBO J. – 2021 – Vol. 40(18) – e108647.
149. Hamidi S. Partial EMT/MET: An Army of One / Hamidi S., Nagai H., Sheng G.// Methods Mol Biol. – 2021 – Vol. 2179 – P. 29-33.
150. Zeisberg M. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition / Zeisberg M., Yang C., Martino M., Duncan M.B., Fieder F., Tanjore H., Kalluri R. // J Biol Chem. – 2007 – Vol. 282(32) – P. 23337-23347.
151. Kaimori A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro / Kaimori A., Potter J., Kaimori J.Y., Wang C., Mezey E., Koteish A. // J Biol Chem. – 2007 – Vol. 282 – P. 22089–22101
152. Meindl-Beinker N.M. Transforming growth factor-beta and hepatocyte transdifferentiation in liver fibrogenesis / Meindl-Beinker N.M., Dooley S.// J Gastroenterol Hepatol. – 2008 – Vol. 23(Suppl1) – S122–S127.
153. Nittta T. Muring cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and laterations in survival signaling pathways / Nittta T., Kim J.S., Mohuczy D., Behrns K.E. // Hepatology. – 2008 – Vol. 48 – P. 909– 919.
154. Omenetti A. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans / Omenetti A., Porrello A., Jung Y.,

- Yang L., Popov Y., Choi S.S., Witek R.P., et al. // *J Clin Invest.* – 2008 – Vol. 118 – P. 3331–3342.
155. Omenetti A. Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation / Omenetti A., Yang L., Li Y.X., McCall S.J., Jung Y., Sicklick J.K., Huang J., et al. // *Lab Invest.* – 2007 – Vol. 87 – P. 499–514.
156. Zhou T. Knockdown of vimentin reduces mesenchymal phenotype of cholangiocytes in the *Mdr2*^{-/-} mouse model of primary sclerosing cholangitis (PSC) / Zhou T., Kyritsi K., Wu N., Francis H., Yang Z., Chen L, O'Brien A., Kennedy L., Ceci L., Meadows V., Kusumanchi P., Wu C., Baiocchi L., Skill N.J., Saxena R., Sybenga A., Xie L., Liangpunsakul S., Meng F., Alpini G., Glaser S.E.// *BioMedicine.* – 2019 – Vol. 48 – P. 130-142.
157. Paulsen J.D. Keratin 19 and mesenchymal markers for evaluation of epithelial-mesenchymal transition and stem cell niche components in primary biliary cholangitis by sequential elution-stripping multiplex immunohistochemistry / Paulsen J.D., Zeck B., Sun K., Simoes C., Theise N.D., Chiriboga L. // *J Histotechnol.* – 2020 – Vol. 43(4) – P. 163-173.
158. Loo C.K. Origin of stellate cells from submesothelial cells in a developing human liver / Loo C.K., Wu X.J. // *Liver Int.* – 2008 – Vol. 28 – P. 1437–1445.
159. Ijpenberg A. Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis / Ijpenberg A., Perez-Pomares J.M., Guadix J.A., Carmona R., Portillo-Sanchez V., Macias D., Hohenstein P., et al // *Dev Biol.* – 2007 – Vol. 312 – P. 157–170.
160. Kordes C. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. / Kordes C., Sawitza I., Muller-Marbach A., Ale-Agha N., Keitel V., Klonowski-Stumpe H., Haussinger D. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007 – Vol. 352 – P. 410–417.
161. Sicklick J. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells / Sicklick J., Choi S.S., Bustamante M., McCall S.J., Perez E.H., Huang J., Li Y.X., et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2006 – Vol. 291 – G575–G583

162. Friedman S.L. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver / Friedman S.L., Roll F.J., Boyles J., Bissell D.M. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1985 – Vol. 82(24) – P. 8681-5
163. Rahman N. Characterization of Immature Myofibroblasts of Stellate Cell or Mesenchymal Cell Origin in D-Galactosamine-Induced Liver Injury in Rats / Rahman N., Kuramochi M., Izawa T., Kuwamura M., Yamate J. // *Vet Pathol.* – 2021 – Vol. 58(1) – P. 80-90.
164. Hempel F. Depletion of Bone Marrow-Derived Fibrocytes Attenuates TAA-Induced Liver Fibrosis in Mice / Hempel F., Roderfeld M., Savai R., Sydykov A., Irungbam K., Schermuly R., Voswinckel R., Köhler K., Churin Y., Kiss L., Bier J., Pons-Kühnemann J., Roeb E. // *Cells.* – 2019 – Vol. 8(10) – P. 1210.
165. Chowdhury O. Sustained systemic inflammation increases autophagy and induces EMT/fibrotic changes in mouse liver cells: Protection by melatonin / Chowdhury O., Ghosh S., Das A., Liu H., Shang P., Stepicheva N.A., Hose S., Sinha D., Chattopadhyay S. // *Cell Signal.* – 2023 – Vol. 101 – P. 110521.
166. Montell D.J. EMT, One of Many Morphological Transitions in Cellular Phase Space / Montell D.J. // *Methods Mol Biol.* – 2021 – Vol. 2179 – P. 13-18.
167. Taura K. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice / Taura K., Miura K., Iwaisako K., Osterreicher C.H., Kodama Y., Penz-Osterreicher M., Brenner D.A. // *Hepatology.* – 2010 – Vol. 51(3) – P. 1027-36.
168. Chu A.S. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis / Chu A.S., Diaz R., Hui J.J., Yanger K., Zong Y., Alpini G., Stanger B.Z., et al. // *Hepatology.* – 2011 – Vol. 53 – P. 1685–1695.
169. Pinzani M. Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: fibrogenesis or escape from death? / Pinzani M. // *J Hepatol.* – 2011 – Vol. 55 – P. 459–465.

170. Lin L. A Co-culture Model to Study the Effect of Kidney Fibroblast-p90RSK on Epithelial Cell Survival / Lin L., White S., Hu K. // *Methods Mol Biol.* – 2021 – Vol. 2346 – P. 63-71.
171. Zhang F. Genetic programming of macrophages to perform anti-tumor functions using targeted mRNA nanocarriers / Zhang F., Parayath N.N., Ene C.I., Stephan S.B., Koehne A.L., Coon M.E., Holland E.C., Stephan M.T. // *Nat Commun.* – 2019 – Vol. 10(1) – P. 3974.
172. Zou Y. MiR-146a attenuates liver fibrosis by inhibiting transforming growth factor- β 1 mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes / Zou Y., Li S., Li Z., Song D., Zhang S., Yao Q. // *Cell Signal.* – 2019 – Vol. 58 – P. 1-8.
173. Shu G. Limonin relieves TGF- β -induced hepatocyte EMT and hepatic stellate cell activation in vitro and CCl₄-induced liver fibrosis in mice via upregulating Smad7 and subsequent suppression of TGF- β /Smad cascade. / Shu G., Dai C., Yusuf A., Sun H., Deng X. // *J Nutr Biochem.* – 2022 – Vol. 107 – P. 109039.
174. Ishimoto T. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth / Ishimoto T., Nagano O., Yae T., Tamada M., Motohara T., Oshima H., Oshima M., Ikeda T., Asaba R., Yagi H., et al. // *Cancer Cell.* – 2011 – Vol. 19 – P. 387–400.
175. Zhang Q. TGF- β 1 mediated Smad signaling pathway and EMT in hepatic fibrosis induced by Nano NiO in vivo and in vitro / Zhang Q., Chang X., Wang H., Liu Y., Wang X., Wu M., Zhan H., Li S., Sun Y. // *Environ Toxicol.* – 2020 – Vol. 35(4) – P. 419-429.
176. Unrau L. Smad7 Deficiency in Myeloid Cells Does Not Affect Liver Injury, Inflammation or Fibrosis after Chronic CCl₄ Exposure in Mice / Unrau L., Endig J., Goltz D., Sprezyna P., Ulrich H., Hagenstein J., Geers B., Kaftan K., Heukamp L.C., Tiegs G., Diehl L. // *Int J Mol Sci.* – 2021 – Vol. 22(21) – P. 11575.
177. Zhou J. Hepatocyte nuclear factor 4 α negatively regulates connective tissue growth factor during liver regeneration / Zhou J., Sun X., Yang L., Wang L., Ran G., Wang J., Cao Q., Wu L., Bryant A., Ling C., Pi L. // *FASEB J.* – 2020 – Vol. 34(4) – P. 4970-4983.

178. Kwapisz O. Fatty Acids and a High-Fat Diet Induce Epithelial-Mesenchymal Transition by Activating TGF β and β -Catenin in Liver Cells / Kwapisz O., Górká J., Korlatowicz A., Kotlinowski J., Waligórska A., Marona P., Pydyn N., Dobrucki J.W., Jura J., Miekus K // *Int J Mol Sci.* – 2021– Vol. 22(3) – P. 1272.
179. Beaussier M. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries / Beaussier M., Wendum D., Schiffer E., Dumont S., Rey C., Lienhart A., Housset C.// *Lab Invest.* – 2007– Vol. 87(3) – P. 292-303.
180. Kisseleva T. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis / Kisseleva T., Uchinami H., Feirt N., Quintana-Bustamante O., Segovia J.C., Schwabe R.F., Brenner D.A.// *J Hepatol.* – 2006 – Vol. 45(3) – P. 429-38.
181. Acloque H. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. / Acloque H., Adams M.S., Fishwick K., Bronner-Fraser M., Nieto M.A. // *J Clin Invest.* – 2009 – Vol. 119 – P. 1438–1448.
182. Yorozu. K. Lobular difference in fibrotic changes in rat cirrhosis model induced by carbon tetrachloride. / K.Yorozu, E. Fujii, S. Teruya et al. // *J. Toxicol. Pathol.* – 2004. – Vol.17. – P.267-274.
183. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С.Саркисова и Ю.Л.Перова. - М.: Медицина, 1996. - 544 с.
184. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4 / Laemmli U.K. // *Nature.* – 1970 – Vol. 227 – P. 680–685
185. Kisseleva T. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression / Kisseleva T., Brenner D. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2021 – Vol. 18(3) – P. 151-166.
186. Ефремова Н.А. Современные представления о патогенетических механизмах фиброза печени / Ефремова Н.А., Грешнякова В.А., Горячева Л.Г. // *Журнал инфектологии.* 2023 – Vol. 15(1) – P. 16-24.
187. Дворяшина И. А., Иммуногистохимический анализ ткани печени при спонтанной регенерации в восстановительный период после экспериментального фиброза / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная, А. Я.

- Почепцов, В. Л. Загребин // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2015. – Т. 23. – № 3. – С. 18-26.
188. van Eyken, P. Cytokeratin pattern of hepatocytes, bile ducts and acinar gradient Keratin immunohistochemistry in normal human liver / van Eyken, P., Sciot, R., van Damme, B. et al. // Virchows Archiv A Pathol Anat. – 1987 – Vol. 412 – P. 63–72.
189. Vassy J. Confocal microscopy immunofluorescence localization of desmin and other intermediate filament proteins in fetal rat livers / Vassy J., Rigaut J.P., Briane D., Kraemer M. // Hepatology. – 1993 – Vol. 17(2) – P. 293-300.
190. Thiery J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions / Thiery J.P., Sleeman J.P. // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2006 – Vol. 7(2) – P. 131-42.
191. Li B. Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation / Li B., Zheng Y.W., Sano Y., Taniguchi H. // PLoS One. – 2011 – Vol. 6(2) – e17092.
192. Friedman S. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury / Friedman S // J Biol Chem. – 2000 – Vol. 275 – P. 2247-2250
193. Jabbar A.A.J. Sinapic Acid Attenuate Liver Injury by Modulating Antioxidant Activity and Inflammatory Cytokines in Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis in Rats / Jabbar A.A.J., Alamri Z.Z, Abdulla M.A., AlRashdi A.S., Najmaldin S.K., Zainel M.A. // Biomedicines. – 2023 – Vol. 11(5) – P. 1447.
194. Zhao Y.L. Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis / Zhao Y.L., Zhu R.T., Sun Y.L. // Biomed Rep. – 2016 – Vol. 4(3) – P. 269-274.
195. Peleman C. Zonated quantification of immunohistochemistry in normal and steatotic livers /Peleman C., De Vos W.H., Pintelon I., Driessen A., Van Eyck A., Van Steenkiste C., Vonghia L., De Man J., De Winter B.Y., Vanden Berghe T., Francque S.M., Kwanten W.J. // Virchows Arch. – 2023 – Vol. 482(6) – P. 1035-1045.

196. Giebeler A. c-Metconfers protection against chronic liver tissue damage and fibrosis progression after bile duct ligation in mice. *Gastroenterology* / Giebeler A., Boekschoten M.V., Klein C., Borowiak M., Birchmeier C., Gassler N., Wasmuth H.E., Müller M., Trautwein C., Streetz K.L // 2009 – Vol. 137(1) – P. 297-308 – 308.e1-4.
197. Черноусов А.Ф. Регенерация цирротической печени в эксперименте / Хоробрых Т.В., Карпова Р.В., Некрасова Т.П. // *Медицинский вестник Юга России.* – 2015 – №2 – с. 48-53.
198. Diehl A.M. Developmental Morphogens & Recovery from Alcoholic Liver Disease. / Diehl A.M. // *Adv Exp Med Biol.* – 2018 – Vol. 1032 – P. 145-151.
199. Stabler C.T. Developmental pathways in lung regeneration / Stabler C.T., Morrissey E.E. // *Cell Tissue Res.* – 2017 – Vol. 367(3) – P. 677-685.
200. Xin M. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair / Xin M., Olson E.N., Bassel-Duby R. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2013 – Vol. 14(8) – P. 529-41.
201. Fazilaty H. Reactivation of embryonic genetic programs in tissue regeneration and disease / Fazilaty H., Basler K. // *Nat Genet.* – 2023 – Vol. 55(11) – P. 1792-1806.
202. Tremblay K.D. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues / Tremblay K.D, Zaret K.S. // *Dev Biol.* – 2005 – Vol. 280(1) – P. 87-99.
203. Polidoro M.A. Experimental liver models: From cell culture techniques to microfluidic organs-on-chip / Polidoro M.A., Ferrari E., Marzorati S., Lleo A., Rasponi M. // *Liver Int.* – 2021 – Vol. 41(8) – P. 1744-1761.
204. Macchi F. Unraveling the Epigenetic Basis of Liver Development, Regeneration and Disease / Macchi F., Sadler K.C. // *Trends Genet.* – 2020 – Vol. 36(8) – P. 587-597.
205. Soares-da-Silva F. Crosstalk Between the Hepatic and Hematopoietic Systems During Embryonic Development / Soares-da-Silva F., Peixoto M., Cumano A., Pinto-do-Ó P. // *Front Cell Dev Biol.* – 2020 – Vol. 8 – P. 612.

206. Popescu D.-M. Decoding human fetal liver haematopoiesis. / Popescu D.-M., Botting R.A., Stephenson E., Green K., Webb S., Jardine L., Calderbank E.F., Polański K., Goh I., Efremova M., et al. // *Nature*. – 2019 – Vol. 574 – P. 365–371.
207. Cenariu D. Extramedullary Hematopoiesis of the Liver and Spleen / Cenariu D., Iluta S., Zimta A.A., Petrushev B., Qian L., Dirzu N., Tomuleasa C., Bumbea H., Zaharie F. // *J Clin Med*. – 2021 – Vol. 10(24) – P. 5831.
208. Tachmatzidi E.C. Transcription Control of Liver Development / Tachmatzidi E.C., Galanopoulou O., Talianidis // *Cells*. – 2021 – Vol. 10(8) – P. 2026.
209. Kholodenko I.V. The Crosstalk between Mesenchymal Stromal/Stem Cells and Hepatocytes in Homeostasis and under Stress / Kholodenko I.V., Kholodenko R.V., Yarygin K.N.// *Int J Mol Sci*. – 2023 – Vol. 24(20) – P. 15212.
210. Dongre A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer / Dongre A., Weinberg R.A. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2019 – Vol. 20(2) – P. 69-84.
211. Kovacic J.C. Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review / Kovacic J.C., Dimmeler S., Harvey R.P., Finkel T., Aikawa E., Krenning G., Baker A.H. // *J Am Coll Cardiol*. – 2019 – Vol. 73(2) – P. 190-209.
212. Huang X. Identification of differentially expressed circular RNAs during TGF- β 1-induced endothelial-to-mesenchymal transition in rat coronary artery endothelial cells / Huang X., Chen Y., Xiao J., Huang Z, He L., Xu D., Peng J. // *Anatol J Cardiol*. – 2018 – Vol. 19(3) – P. 192-197.
213. Chen D. Adenomyosis-derived extracellular vesicles endow endometrial epithelial cells with an invasive phenotype through epithelial-mesenchymal transition / Chen D., Qiao H., Wang Y., Ling Zhou, Yin N., Fang L, Wang Z. // *Genes Dis*. – 2020 – Vol. 7(4) – P. 636-648.
214. Kirkwood P.M. Single-cell RNA sequencing and lineage tracing confirm mesenchyme to epithelial transformation (MET) contributes to repair of the endometrium at menstruation / Kirkwood P.M., Gibson D.A., Shaw I., Dobie R., Kelepouri O., Henderson N.C., Saunders P.T.K. // *Elife*. – 2022 – Vol. 11 – e77663.

215. Zhou LX. SNCA inhibits epithelial-mesenchymal transition and correlates to favorable prognosis of breast cancer / Zhou L.X., Zheng H., Tian Y., Luo K.F., Ma S.J., Wu Z.W., Tang P., Jiang J., Wang M.H. // *Carcinogenesis*. – 2022 – Vol. 43(11) – P. 1071-1082.
216. Larsen A.K. Autofluorescence in freshly isolated adult human liver sinusoidal cells / Larsen A.K., Simón-Santamaría J., Elvevold K., Ericzon B.G., Mortensen K.E., McCourt P., Smedsrød B., Sørensen K.K. // *Eur J Histochem* – 2021– Vol. 65(4) – P. 3337.
217. Almishri W. ADAM Metalloproteinase Domain 17 Regulates Cholestasis-Associated Liver Injury and Sickness Behavior Development in Mice / Almishri W., Swain L.A., D'Mello C., Le T.S., Urbanski S.J., Nguyen H.H. // *Front Immunol*. – 2022 – Vol. 12 – P. 779119.
218. Wu S. An update on animal models of liver fibrosis / Wu S., Wang X., Xing W., Li F., Liang M., Li K., He Y., Wang J. // *Front Med (Lausanne)*. – 2023 – Vol. 10 – P. 1160053.
219. Tujios S. Management of Acute Liver Failure: Update 2022 Tujios / S, Stravitz R.T., Lee W.M. // *Semin Liver Dis*. – 2022 – Vol. 42(3) – P. 362-378.
220. Liang C. Platelets Stimulate Liver Regeneration in a Rat Model of Partial Liver Transplantation / Liang C., Takahashi K., Furuya K., Oda T., Ohkohchi N. // *Liver Transpl*. – 2021 – Vol. 27(5) – P. 719-734.
221. Ravichandra A. Mouse Models of Liver Fibrosis / Ravichandra A., Schwabe R.F. // *Methods Mol Biol*. – 2021 – Vol. 2299 – P. 339-356.
222. Shimizu N. Zebrafish as a Useful Model System for Human Liver Disease / Shimizu N., Shiraishi H, Hanada T // *Cells*. – 2023 – Vol. 12(18) – P. 2246.
223. Jing H. Remodeling of the liver fibrosis microenvironment based on nilotinib-loaded multicatalytic nanozymes with boosted antifibrogenic activity / Jing H., Ren Y., Zhou Y., Xu M., Krizkova S., Heger Z., Lu Q., Wang S., Liang X., Adam V., Li N. // *Acta Pharm Sin B*. – 2023 – Vol. 13(12) – P. 5030-5047.
224. Дворяшина И. А. Иммуногистохимический анализ ткани печени при экспериментальном химически индуцированном фиброзе / И. А. Дворяшина,

- Ю. И. Великородная, А. Я. Почепцов, В. Л. Загребин // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2015. – № 1(53). – С. 96-99.
225. Singanayagam A. Macrophages in Chronic Liver Failure: Diversity, Plasticity and Therapeutic Targeting / Singanayagam A., Triantafyllou E. // *Front Immunol.* – 2021 – Vol. 12 – P. 661182.
226. Wu Y. Biomechanics in liver regeneration after partial hepatectomy / Wu Y., Li N., Shu X., Li W., Zhang X., Lü D., Long M. // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2023– Vol. 11 – P. 1165651.
227. Pu W. Hepatocyte generation in liver homeostasis, repair, and regeneration / Pu W, Zhou B. // *Cell Regen.* – 2022 – Vol. 11(1) – P. 2.
228. Chen F. Distinct hepatocyte identities in liver homeostasis and regeneration / Chen F., Schönberger K., Tchorz J.S. // *JHEP Rep.* – 2023 Apr 24 – 5(8) – 100779.
229. Donne R. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease / Donne R., Saroul-Aïnama M., Cordier P., Celton-Morizur S., Desdouets C. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2020 – Vol. 17(7) – P. 391-405.
230. Campana L. Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications / Campana L., Esser H., Huch M., Forbes S. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2021 – Vol. 22(9) – P. 608-624.
231. Russell J.O. Hippo signalling in the liver: role in development, regeneration and disease / Russell J.O., Camargo F.D. // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2022 – Vol. 19(5) – P. 297-312.
232. Kim S. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm / Kim S., Coulombe P.A. // *Genes Dev.* – 2007 – Vol. 21(13) – P. 1581-97.
233. Mendez M.G. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition / Mendez M.G., Kojima S., Goldman R.D. // *FASEB J.* – 2010 – Vol. 24(6) – P. 1838-51.
234. Ding I. Cooperative roles of PAK1 and filamin A in regulation of vimentin assembly and cell extension formation / Ding I., Ostrowska-Podhorodecka Z., Lee

- W., Liu R.S.C., Carneiro K., Janmey P.A., McCulloch C.A. // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2020 – Vol. 1867(9) – P. 118739.
235. Vuoriluoto K. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer / Vuoriluoto K., Haugen H., Kiviluoto S., Mpindi J.P., Nevo J., Gjerdrum C., Tiron C., Lorens J.B., Ivaska J. // *Oncogene.* – 2011 – Vol. 30(12) – P. 1436-48.
236. Patteson A.E. Loss of Vimentin Enhances Cell Motility through Small Confining Spaces / Patteson A.E., Pogoda K., Byfield F.J., Mandal K., Ostrowska-Podhorodecka Z., Charrier E.E., Galie P.A., Deptuła P., Bucki R., McCulloch C.A., Janmey P.A. // *Small.* – 2019 – Vol. 15(50) – e1903180.
237. Lowery J. Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function / Lowery J., Kuczmarski E.R., Herrmann H., Goldman R.D. // *J. Biol. Chem.* – 2015 – Vol. 290(28) – P. 17145-17153.
238. Wang P.W. Characterization of the Roles of Vimentin in Regulating the Proliferation and Migration of HSCs during Hepatic Fibrogenesis / Wang P.W., Wu T.H., Lin T.Y., Chen M.H., Yeh C.T., Pan T.L. // *Cells.* – 2019 – Vol. 8(10) – P. 1184.
239. Ostrowska-Podhorodecka Z. Impact of Vimentin on Regulation of Cell Signaling and Matrix Remodeling / Ostrowska-Podhorodecka Z., Ding I., Norouzi M., McCulloch C.A. // *Front Cell Dev Biol.* – 2022 – Vol. 10 – P. 869069.
240. Costa M.L. Distinct interactions between epithelial and mesenchymal cells control cell morphology and collective migration during sponge epithelial to mesenchymal transition / Costa M.L., de Andrade Rosa I., Andrade L., Mermelstein C., Coutinho C. // *J Morphol.* – 2020 – Vol. 281(2) – P. 183-195.
241. Шагидулин М.Ю. Влияние соотношения клеток печени и ММСК костного мозга в имплантируемых клеточно-инженерных конструкциях печени на эффективность восстановления функциональных и морфологических показателей при хронической печеночной недостаточности / Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Никольская А.О., Волкова Е.А., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Севастьянов В.И., Готье С.В. //

Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019 – Т. 21(1) – С. 122-134.

242. Xia S. Role of macrophage-to-myofibroblast transition in chronic liver injury and liver fibrosis / Xia S., Huang Y., Zhang Y., Zhang M., Zhao K., Han P., Tian D., Liao J., Liu J. // *Eur J Med Res.* – 2023 – Vol. 28(1) – P. 502.
243. Piera-Velazquez S. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases / Piera-Velazquez S., Mendoza F.A., Jimenez S.A. // *J Clin Med.* – 2016 – Vol. 5(4) – P. 45.
244. Hillsley A. A strategy to quantify myofibroblast activation on a continuous spectrum / Hillsley A., Santoso M.S., Engels S.M., Halwachs K.N., Contreras L.M., Rosales A.M. // *Sci Rep.* – 2022 – Vol. 12(1) – P. 12239.
245. Voutilainen S.H. Expression of 6 Biomarkers in Liver Grafts After Pediatric Liver Transplantation: Correlations with Histology, Biochemistry, and Outcome / Voutilainen S.H., Kosola S.K., Lohi J., Mutka A., Jahnukainen T., Pakarinen M., Jalanko H. // *Ann Transplant.* – 2020 – Vol. 25 – e925980.
246. Rosenthal S.B. Heterogeneity of HSCs in a Mouse Model of NASH / Rosenthal S.B., Liu X., Ganguly S., Dhar D., Pasillas M.P., Ricciardelli E., Li R.Z., Troutman T.D., Kisseleva T., Glass C.K., Brenner D.A. // *Hepatology.* – 2021 – Vol. 74(2) – P. 667-685.
247. Zhang J.B. The combination of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* herb-pair alleviated inflammation in liver fibrosis / Zhang J.B., Jin H.L., Feng X.Y., Feng S.L., Zhu W.T., Nan H.M., Yuan Z.W. // *Front Pharmacol.* – 2022 – Vol. 13 – P. 984611.
248. Almalé L. c-Met Signaling Is Essential for Mouse Adult Liver Progenitor Cells Expansion After Transforming Growth Factor- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Regulates Cell Phenotypic Switch / Almalé L., García-Álvaro M., Martínez-Palacián A., García-Bravo M., Lazcanoiturburu N., Addante A., Roncero C., Sanz J., de la O López M., Bragado P., Mikulits W., Factor V.M., Thorgeirsson S.S., Casal J.I., Segovia J.C., Rial E., Fabregat I., Herrera B., Sánchez A. // *Stem Cells.* – 2019 – Vol. 37(8) – P. 1108-1118.

249. Uchikawa E. Structural basis of the activation of c-Metreceptor / Uchikawa E., Chen Z., Xiao G.Y., Zhang X., Bai X.C. // *Nat Commun.* 2021 Vol. 12(1) – P. 4074.
250. Zhang Y. Function of the c-Metreceptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities / Zhang Y., Xia M., Jin K., Wang S., Wei H., Fan C., Wu Y., Li X., Li X., Li G., Zeng Z., Xiong W. // *Mol Cancer.* – 2018 – Vol. 17(1) – P. 45.
251. Andermarcher E.E. Co-expression of the HGF/SF and c-Metgenes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis / Andermarcher E., Surani M.A., Gherardi. // *Dev Genet.* – 1996 – Vol. 18(3) – P. 254–266.
252. Wood G.E. The role of MET in chemotherapy resistance / Wood G.E., Hockings H., Hilton D.M., Kermorgant S. // *Oncogene* – 2021 Mar – 40(11) – 1927-1941.
253. Raj S. Molecular mechanism(s) of regulation(s) of c-MET/HGF signaling in head and neck cancer / Raj S., Kesari K.K., Kumar A., Rathi B., Sharma A., Gupta P.K., Jha S.K., Jha N.K., Slama P., Roychoudhury S., Kumar D. // *Mol Cancer.* – 2022 – Vol. 21(1) – P. 31.
254. Tajima S. Clinical prospects of biomarkers for the early detection and/or prediction of organ injury associated with pharmacotherapy / Tajima S., Yamamoto N., Masuda S. // *Biochem Pharmacol.* – 2019 – Vol. 170 – P. 113664.
255. Korver S. The application of cytokeratin-18 as a biomarker for drug-induced liver injury / Korver S., Bowen J., Pearson K., Gonzalez R.J., French N., Park K., Jenkins R., Goldring C. // *Arch Toxicol.* – 2021 – Vol. 95(11) – P. 3435-3448.
256. Bettermann K. Keratin 18-deficiency results in steatohepatitis and liver tumors in old mice: A model of steatohepatitis-associated liver carcinogenesis / Bettermann K., Mehta A.K., Hofer E.M., Wohlrab C., Golob-Schwarzl N., Svendova V., Schimek M.G., Stumptner C., Thüringer A., Speicher M.R., Lackner C., Zatloukal K., Denk H., Haybaeck J. // *Oncotarget.* – 2016 – Vol. 7(45) – P. 73309-73322.

257. Chen Y. Ten-eleven translocation-2-mediated macrophage activation promotes liver regeneration / Chen Y., Meng L., Xu N., Chen H., Wei X., Lu D., Wang S., Xu X. // *Cell Commun Signal.* – 2024 – Vol. 22(1) – P. 95.
258. Wang W.M. Vimentin (VIM) predicts advanced liver fibrosis in chronic hepatitis B patients: A random forest-derived analysis / Wang W.M., Zhang W.S., Yang Z.G. // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2022 – Vol. 26(14) – P. 5164-5177.
259. Elchaninov A. Multipotent stromal cells stimulate liver regeneration by influencing the macrophage polarization in rat / Elchaninov A., Fatkhudinov T., Usman N., Arutyunyan I., Makarov A., Lokhonina A., Eremina I., Surovtsev V., Goldshtein D., Bolshakova G., Glinkina V., Sukhikh G. // *World J Hepatol.* – 2018 – Vol. 10(2) – P. 287-296.