

На правах рукописи

ДВОРЯШИНА

Ирина Александровна

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

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Загребин Валерий Леонидович – кандидат медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Затолокина Мария Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры гистологии эмбриологии, цитологии.

Ельчанинов Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», заведующий лабораторией роста и развития.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в __ часов на заседании диссертационного совета 21.2.005.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; и на сайте <http://www.volgmed.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной научной библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; <http://www.volgmed.ru>)

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.005.01

доктор медицинских наук, доцент

Григорьева Наталья Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема изучения регенерации печени имеет длительную историю и остается актуальной на сегодняшний день (Devarbhavi H. et al., 2023; Asrani S.K. et al., 2019; Huang D.Q. et al., 2023; Chen Y. et al., 2023; Terrault N.A. et al., 2023). 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 (Huang D. et al., 2024; Liu Q. et al., 2024). 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 (Lu X. et al., 2024). Механизмы повреждения и восстановления после гепатотоксичности четыреххлористого углерода (CCl₄) изучаются с 1950-х годов и модель гепатотоксичности с четыреххлористым углеродом активно используется в течение последних десятилетий (Li Y.N. et al., 2024).

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 (Huang R. et al., 2022). 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 (Di-Iacovo N. et al., 2023). 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 (Liang Y. et al., 2022).

Степень разработанности темы исследования

Исследования развития (Freeburg S.H. et al., 2020; Ruiz-Estevez M. et al., 2021; Thorgersen E.B. et al., 2019; Wang X. et al., 2020) и регенерации печени (Russell J.O. et al., 2019; Perugorria M.J. et al., 2019; Lee S.H. et al., 2023) 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 (Mishra A.P. et al., 2020; Xie S. et al., 2022) и клеточных

взаимодействий (Shao S. et al., 2022; Munakarmi S. et al., 2022) в процессе развития печени до понимания сложных процессов регенерации органа после токсического повреждения (Wan S. et al., 2024; Ma K. et al., 2022; Zhao Y. et al., 2022).

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 четыреххлористого 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 четыреххлористым 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 печень половозрелых самцов 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 (8.00-20.00ч. - 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, Abscam, Великобритания), затем еще 30 минут с вторичными антителами, конъюгированными с FITC (козьи-антимышинные, Abscam, 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 фосфотазой.

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 51 рисунок, 3 таблицы, 259 ссылок на литературные источники (12 отечественных и 247 зарубежных). Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, в котором рассматриваются гистологическая характеристика печени на этапах развития и регенерации, отражены закономерности гистогенеза, клеточной дифференцировки и репаративной регенерации печени. **Глава 2** посвящена описанию материалов и методов исследования и представляет собой экспериментальное моделирование фиброза печени которое проводилось в соответствии с правилами лабораторной диагностики (GLP), этическими нормами,

изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), приказами МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г. Дизайн исследования был согласован и одобрен Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области, протокол № 2013-2015 от 7.04.2015 г. Исследование клеток печени на разных стадиях развития проводилось на белых беспородных крысах - включали эмбрионов на 10 и 17 суток после оплодотворения, новорожденных и 14-дневных крысят, а также печень взрослых здоровых особей. Для изучения регенерации печени крыс после химически вызванного фиброза у подопытных животных моделировали фиброз печени, после чего формировались 4 экспериментальные на разных стадиях восстановления (нулевой день (I группа), 4 недели (II группа), 8 недель (III группа), 12 недель (VI группа)) и одна контрольная интактная группы крыс по 8 особей в каждой. В исследовании использовали образцы ткани медианной доли печени, где фиброз наиболее выражен, согласно исследованию Yorozu K. и коллег (Yorozu et al., 2004). Материалы анализировались с помощью гистологических и иммуногистохимических методов, включая окрашивание гематоксилин-эозином и флоксином.

Для аналитического вестерн-блоттинга готовили гомогенаты печени крыс. Затем, используя метод электрофореза по Лэмбли в полиакриламидном геле, анализировали белковый состав гомогенатов. После электрофореза, для Вестерн блоттинга, белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану в камере Trans-Blot, затем, окрашивали первичными антителами против виментина и цитокератина.

Для иммуногистохимического исследования тканей крыс использовали подготовленные парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Для определения экспрессии различных антигенов использовали антитела против: актин гладкомышечных клеток (α -SMA) (BioLegend), фактор роста гепатоцитов (c-Met) (Leica Microsystems), виментин (Invitrogen) и цитокератин-18 (Novusbio). Блокировку эндогенной пероксидазы проводили с помощью 3% перекиси водорода, после чего применяли стандартный протокол иммуногистохимической реакции, включая методы РАР и демаскировку антител. Окончательное окрашивание осуществлялось гематоксилином Майера, с использованием негативного контроля без первичных антител. Изучение и фотодокументирование образцов производилось с помощью микроскопа AxioImager.Z2 (ZEISS, Германия) и программы ZENpro 2012. При иммуноокрашивании с двойной флуоресценцией использовались парафиновые срезы тканей. Для исследования применяли первичные антитела против цитокератина 18 и виментина. После депарафинизации и демаскировки антител, срезы инкубировали с двумя видами первичных антител, а затем с вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 594 и FITC. Финальный этап включал

применение заключающей среды с DAPI. Флуоресцентные образцы изучались и фотографировались при помощи того же микроскопа AxioImager.Z2, оснащенного соответствующими фильтрами и программой ZENpro 2012. Для оценки результатов иммуногистохимической реакции оценивали относительную площадь иммунореактивного материала в процентах. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ Statistica 6,0 (StatSoft, USA). С мерой центральной тенденции – среднее значение. Различия между группами оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

В главе 3 представлены **результаты собственных исследования**. Описана модель регенерации печени после химически индуцированного фиброза печени. Дана морфофункциональная характеристика клеткам эпителиального и мезенхимального ростков на этапах онтогенеза. Описана динамика клеточного состава печени крыс при регенерации после химически индуцированного фиброза. Приводится обобщение данных, полученных в экспериментах, и их интерпретация с учетом литературных данных.

В главе 4 представлено **обсуждение полученных результатов**, приводится обобщение данных, полученных в ходе эксперимента, их интерпретация с учетом литературных фактов.

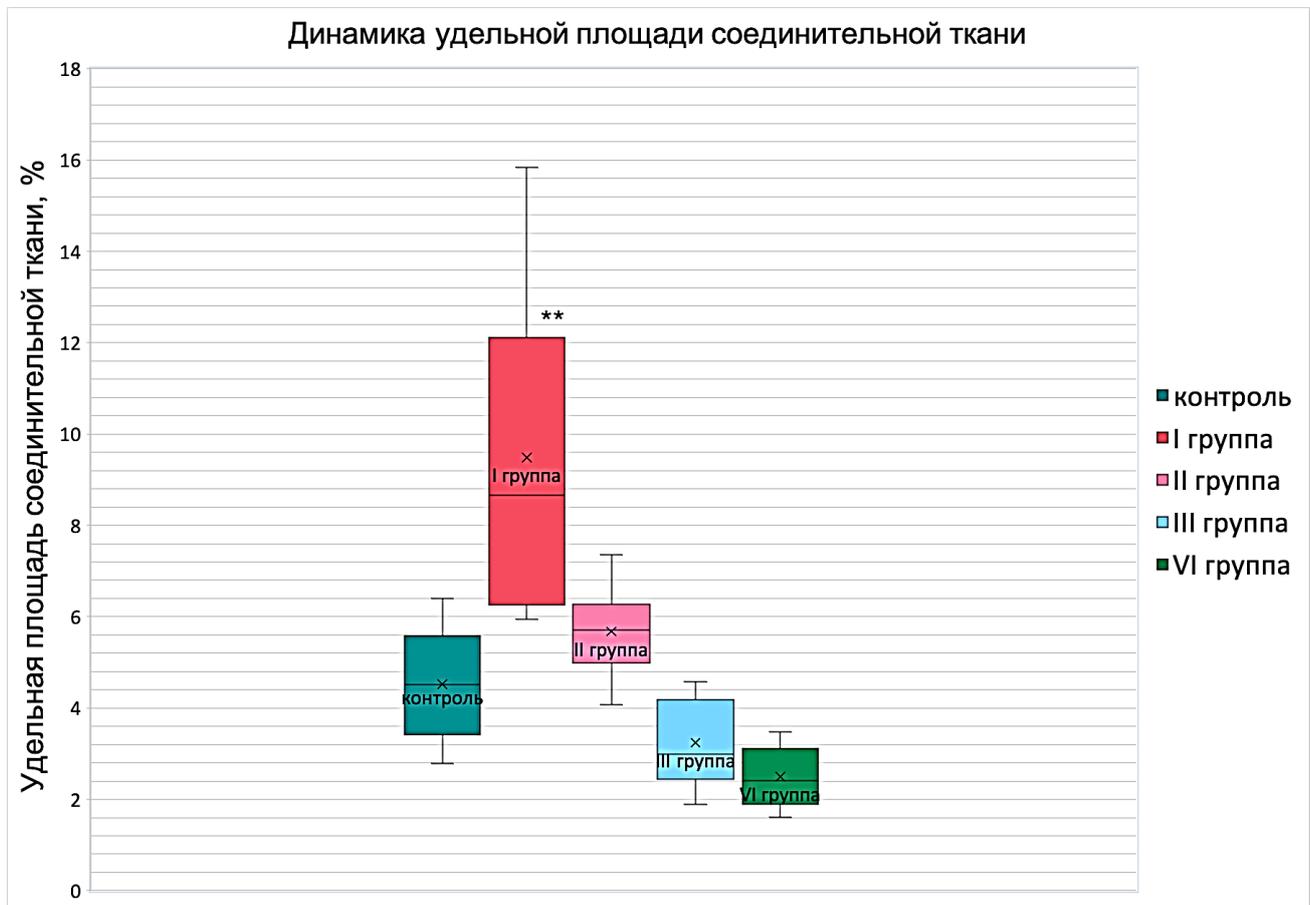


Рисунок 1. Динамика изменения относительной площади стромы печени при регенерации. ** - различия между группами статистически значимы $p < 0,01$ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки)

Мы обнаружили, что у большинства животных для полной регенерации печени после фиброза достаточно 12 недель, которая подтверждается снижением значений удельной площади фиброзной ткани (Рисунок 1), восстановлением цитоархитектоники печеночных балок, нормализацией ширины перисинусоидальных пространств и согласуется с данными литературы о регрессии фиброза после хронической интоксикации алкоголем и четыреххлористым углеродом (ЧХУ) (Kisseleva T., Brenner D., 2021). И модель длительного повреждения печени ЧХУ на фоне алкоголизации возможно использовать в качестве адекватной экспериментальной модели репаративной регенерации печени.

Наше исследование выявляет, как цитокератин 18 и виментин локализуются в клетках печени на различных этапах развития, от эмбриона до взрослой особи. Обнаружено, что у 10-дневных зародышей крыс цитокератин 18 концентрируется в клетках, которые предположительно являются гепатобластами, что указывает на активную экспрессию этого белка на ранних этапах развития печени. По мере взросления крыс мы видим, что распределение цитокератина 18 становится более типичным для зрелых гепатоцитов, подтверждая, что созревание клеток происходит поэтапно (Рисунок 2).

У зародышей крыс виментин был найден в клетках, формирующих сосуды и желчные каналы и гепатобласты, что указывает на его роль в раннем развитии печени. К моменту рождения и в первые дни после рождения удельная площадь виментина снижается на 7,6% и устанавливается на постоянном уровне 6% к 14 суткам после рождения. Когда завершается дифференцировка клеток мезенхимального происхождения (Рисунок 2).

Сравнение с современными исследованиями показывает, что наши результаты согласуются с текущими тенденциями в изучении печени, так работа (Kuburich NA et al., 2022) подтверждает роль цитокератина и виментина в процессах эпителиально-мезенхимального перехода.

Метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания позволил точно определить соотношение этих белков и выявить клетки с их колокализацией. На 10 день гестации обнаружено большое количество гибридных клеток, содержащих оба маркера, что рассматривается как признак мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП) в развитии печени рядом авторов (Zeisberg M et al., 2009). На 17 день гестации количество клеток с колокализацией цитокератина 18 и виментина снижается, что указывает на дифференцировку клеток к более зрелым эпителиальным или мезенхимальным фенотипам. После рождения наблюдается затруднение в отслеживании гибридных клеток из-за яркой автофлуоресценции, но количественный анализ с использованием метода Вестерн-блоттинга показал уменьшение соотношения виментин/цитокератин 18 в процессе дальнейшего развития, что согласуется с литературными данными (Li B. et al., 2011) и свидетельствует о повышенной экспрессии эпителиальных генов

относительно мезенхимальных.

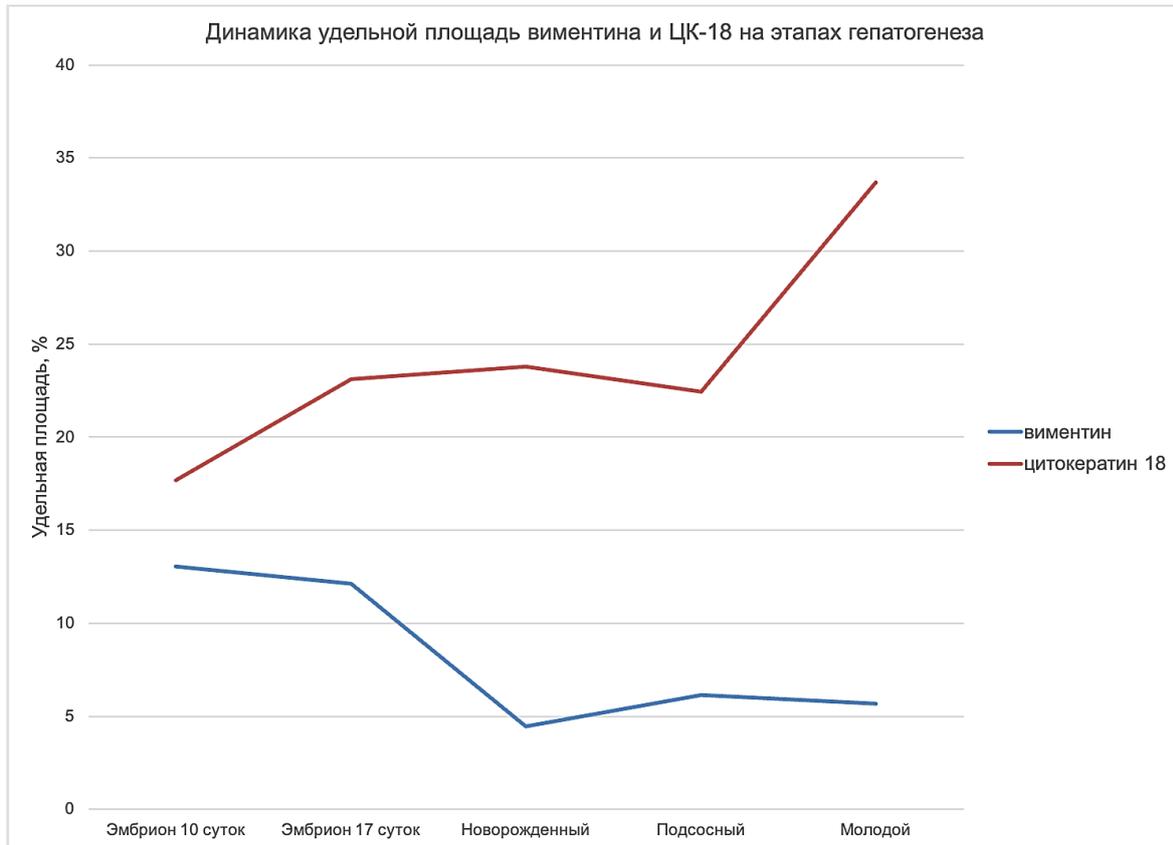


Рис 2. Удельная площадь цитокератина 18 и виментина на разных этапах онтогенеза.

Процесс регенерации печени начинается еще до того, как устранены факторы, вызывающие фиброз, нами обнаружены юные регенерирующие гепатоциты, содержание виментин, α -SMA и цитокератин 18 (Pu W. et al., 2023). В течение четырех недель регенерации было замечено истончение фиброзных септ и появление виментин-позитивных гепатоцитов, а также формирование мезенхимальных регенераторных розеток. Через восемь недель регенерация гепатоцитов распространяется на центрлобулярные участки. Через двенадцать недель восстановления наблюдалось восстановление нормального распределения виментина. Результаты показывают, что часть гепатоцитов в процессе регенерации происходит путем МЭП с 4 по 8 неделю восстановления.

Иммуногистохимическое исследование с использованием антител против α -SMA показало активированные перисинусоидальные клетки, содержащие данный белок. Через 4 недели восстановления наблюдались α -SMA-позитивные юные регенерирующие гепатоциты вдоль фиброзных септ и вокруг регенераторных розеток. К 12-й неделе восстанавливается нормальное распределение α -SMA.

Иммуногистохимическое исследование эпителиальных клеток в печени крыс на нулевой день восстановления наблюдалось типичное расположение цитокератина 18 в эндотелиоцитах и зрелых гепатоцитах, а также активизация регенераторных процессов с образованием юных гепатоцитов и

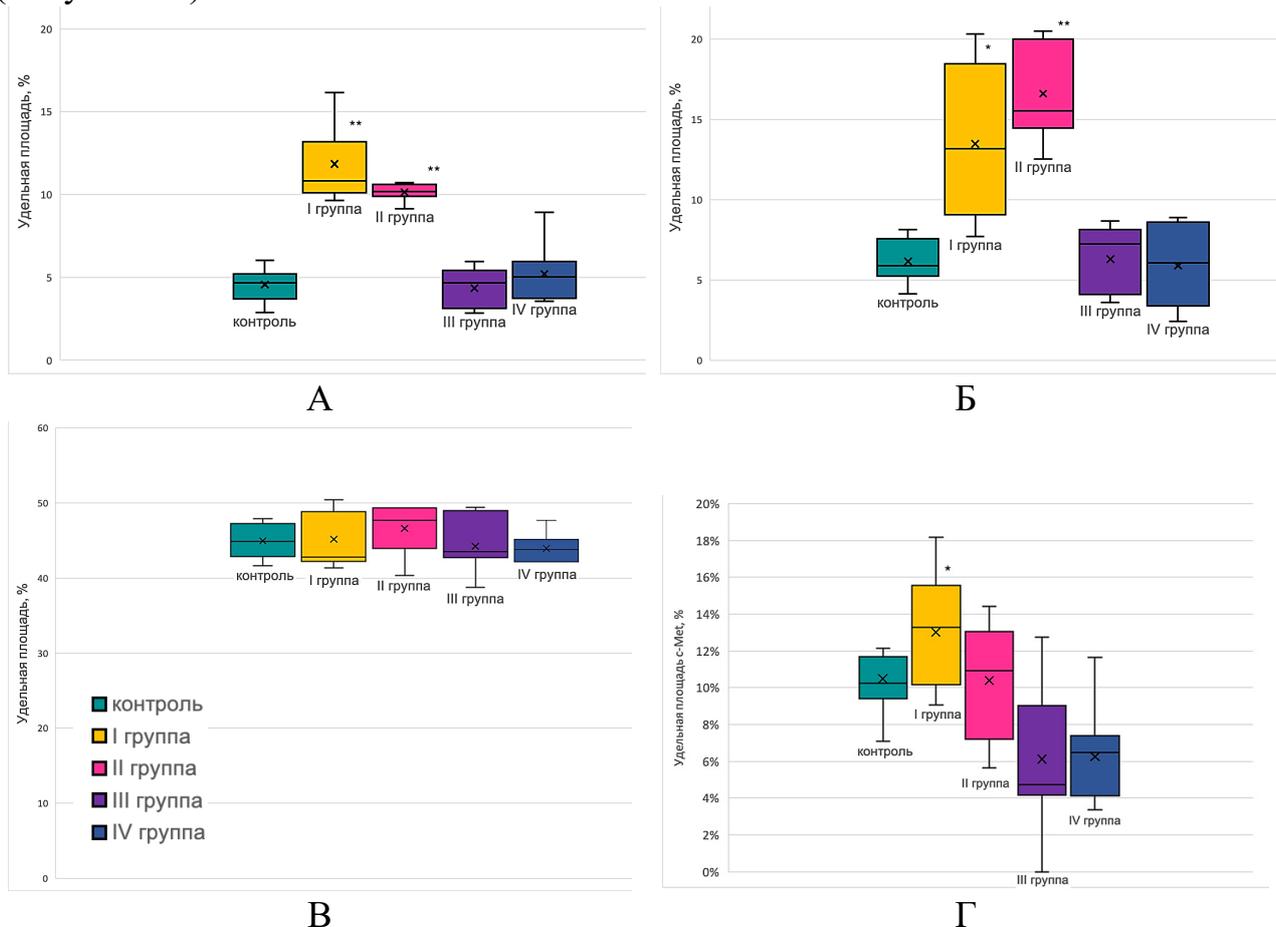
гипертрофированных овальных клеток вдоль фиброзных септ. Через четыре недели восстановления процессы регенерации генерализуются по всей паренхиме печени, с равномерным распределением юных гепатоцитов и овальных клеток, подтверждая, участие этих клеток в репаративной регенерации печени (Michalopoulos G.K. et al., 2021) и пластичность эпителиальных клеток печени (Tsuchiya A. et al., 2019; So J. et al., 2020). По истечении восьми недель восстановления наблюдается смещение локализации регенераторных процессов и юных гепатоцитов от перипортальных к центрoлобулярным участкам печени. Важным моментом является обнаружение регенераторных розеток, содержащих цитокератин-отрицательные клетки мезенхимального происхождения, окружённые юными гепатоцитами, предположительно прошедшими процесс мезенхимально-эпителиального перехода. Через двенадцать недель после химически индуцированного фиброза восстанавливается нормальное распределение зрелых гепатоцитов, а юные гепатоциты локализуются вокруг портальных триад. Однако, несмотря на возвращение нормального распределения цитокератина 18, сохраняются регенераторные розетки вблизи портальных триад и по периферии печёночных долек, что свидетельствует о продолжающихся регенеративных процессах.

Сигнальные пути EGFR и cMET участвуют в инициации регенерации печени и обеспечивают пролиферацию гепатоцитов (Gadd V.L. et al., 2020). Наши результаты показали, что c-met присутствует на поверхности мембран гепатоцитов и эндотелиоцитов в нормальной паренхиме печени. Через 4 недели после фиброза отмечали появление гепатоцитов с цитоплазматической формой c-met вблизи септ и вокруг регенераторных розеток. После 12 недель восстановления распределение c-met возвращается к нормальному, с гепатоцитами, содержащими цитоплазматическую форму вокруг портальных триад и центральных вен.

По результатам морфометрического анализа, отмечали статистически значимые изменений в уровнях удельной площади виментина, α -SMA и c-Met (Рисунок 3). Максимальные значения виментина и c-met отмечали в 1 экспериментальной группе, до начала восстановительного периода, а максимальную удельную площадь α -SMA фиксировали через 4 недели после восстановления. Вероятно, это связано с тем, что во время токсического воздействия запускаются молекулярные сигнальные пути, в том числе FGH-c-Met, которые приводят к накоплению α -SMA вследствие активации перисинусоидальных клеток печени и миофибробластов.

После проведения корреляционного анализа (Таблица 1) нами были выявлены сильные прямые связи между удельной площадью соединительной ткани и удельной площадью виментина и c-Met; между удельной площадью виментина и α -SMA; между удельной площадью α -SMA и цитокератина (Рисунок 3А). А также сильная прямая связь между динамикой удельной площади виментина на этапах гепатогенеза и при репаративной регенерации

(Рисунок 3Б).

**Рисунок 3. Удельная площадь ИГХ маркеров на этапах регенерации печени**А – виментин; Б – α -SMA; В – ЦК-18; Г – с-Met.

Примечания: * - различия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с группой контроля (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки)

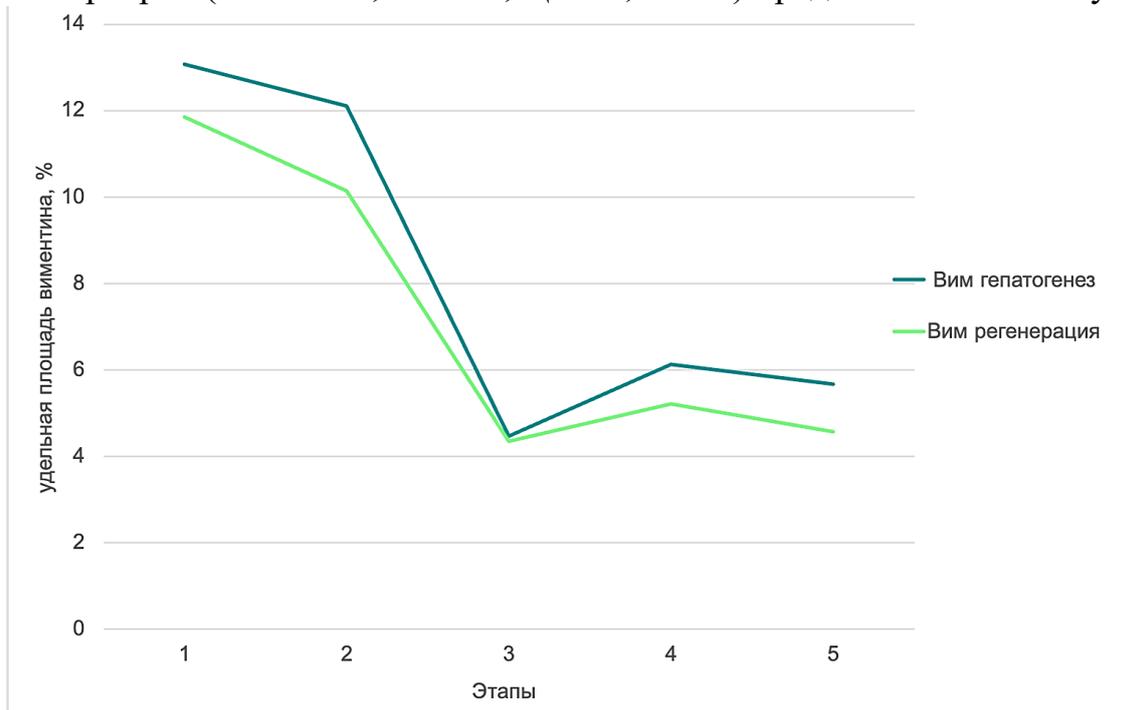
** - различия статистически значимы при $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки)

Таблица 1.

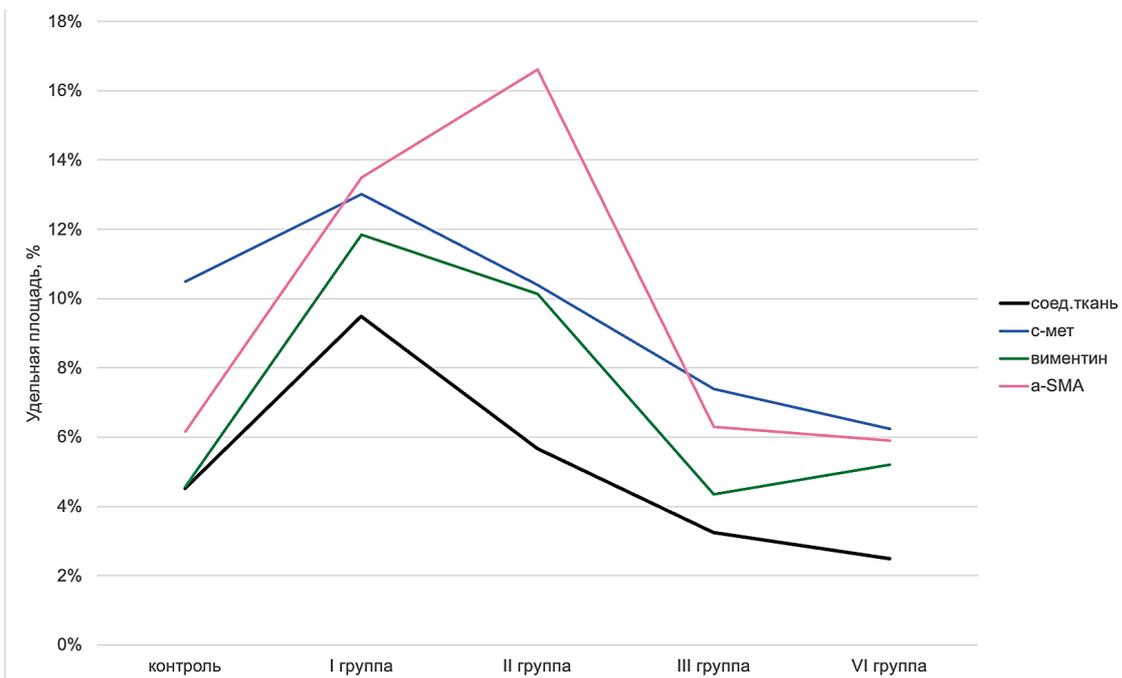
**Матрица корреляции (коэффициент Пирсона)
удельной площади соединительной ткани и ИГХ маркеров**

	соед.ткань	виментин	ЦК-18	α -SMA	с-Met
соед.ткань	1,00				
виментин	0,88	1,00			
ЦК-18	0,52	0,68	1,00		
α -SMA	0,71	0,92	0,89	1,00	
с-Met	0,94	0,76	0,63	0,65	1,00

Динамика удельной площади виментина на этапах развития печени и при репаративной регенерации и динамика удельной площади соединительной ткани и ИГХ маркеров (виментин, α -SMA, ЦК-18, с-Met) представлены на Рисунке 4.



А



Б

Рисунок 4. Динамика удельной площади маркеров на этапах развития печени и при репаративной регенерации

А - динамика удельной площади виментина на этапах развития печени и при репаративной регенерации. Этапы гепатогенеза: 1 – 10 суток эмбрионального развития; 2 – 17 суток эмбрионального развития; 3 – новорождённый возраст; 4 – подсосный возраст; 5 - молодой возраст. Этапы регенерации: 1 – 0 дней восстановления; 2 – 4 недели восстановления; 3 – 8 недель восстановления; 4 – 12 недель восстановления; 5 – интактные животные. Б – динамика удельной площади соединительной ткани и ИГХ маркеров (виментин, α -SMA, ЦК-18, с-Met)

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, что подтверждается как морфометрическими измерениями, так и динамикой изменения клеточного состава печени.

Полученные данные демонстрируют активную роль клеточных переходов в процессе восстановления печени. Наблюдаемые изменения в распределении и активности эпителиальных клеток, включая юные регенераторные гепатоциты и овальные клетки, подчеркивают значимость клеточной пластичности в процессе регенерации печени. Обнаружение регенераторных розеток, содержащих фокус фиброза, окруженный юными гепатоцитами и овальными клетками печени, также подтверждает важность пластичности клеток печени в регенеративных процессах. Наши наблюдения могут способствовать более глубокому пониманию механизмов регенерации и демонстрируют необходимость дальнейшего изучения и разработки новых методов воздействия на этот процесс для улучшения результатов в лечении заболеваний печени и различных повреждений, включая химически индуцированный фиброз.

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 ткани 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-Metпути до отмены воздействия ЧХУ на печень. Установленная 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 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ,
а также входящие в базу Scopus*:

1. **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.
2. **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.
3. **Дворяшина, И. А.** Динамика соотношения мезенхимальных маркеров при экспериментальном фиброзе печени / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная, В. Л. Загребин // Морфология. – 2019. – Т. 155, № 2. – С. 95-96.
4. **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.*
5. **Дворяшина, И. А.** Эпителиально-мезенхимальный переход I типа как важный биологический процесс в эмбриогенезе / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная, А. В. Терентьев, В. Л. Загребин // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2021. – № 2(78). – С. 37-45.
6. **Дворяшина, И. А.** Иммуногистохимические признаки мезенхимально-эпителиального и эпителиально-мезенхимального переходов в эмбриональном и постнатальном морфогенезе печени / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная, А. В. Терентьев, В. Л. Загребин // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. – Т. 19, № 1 – С. 123-128.
7. **Дворяшина, И.А.** Динамика распределения виментина и альфа-гладкомышечного актина в печени на этапах регенерации после химически индуцированного фиброза / И.А. Дворяшина, Ю.И. Великородная, В.Л. Загребин, Д.Ю. Быхалов, А.В. Смирнов // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2024. – Т. 13, №2 – С. 16-24.

Список печатных работ, опубликованных в других изданиях:

1. **Дворяшина, И. А.** Активность ингибиторов металлопротеиназ при фиброзе печени в эксперименте / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием, посвященной 80-летию ВолгГМУ,

Волгоград, 22–25 апреля 2015 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2015. – С. 385.

2. **Дворяшина, И. А.** Исследование репаративной регенерации печени в эксперименте / И. А. Дворяшина, В. Л. Загребин // Сборник трудов научно-практической конференции профессорско-преподавательского коллектива, посвященной 80-летию Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград, 10–14 сентября 2015 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2015. – С. 128-130.

3. **Дворяшина, И. А.** Овальные клетки печени / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолГМУ с международным участием, Волгоград, 19–22 апреля 2017 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2017. – С. 506-507.

4. **Дворяшина, И. А.** Компоненты внеклеточного матрикса при развитии печени / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 25–28 апреля 2018 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2018. – С. 421.

5. **Дворяшина, И. А.** Динамика изменения соотношения виментина и цитокератина 18 в ткани печени на этапах онтогенеза крыс / И. А. Дворяшина // XXIV Региональная конференция молодых ученых и исследователей Волгоградской области: Материалы докладов, Волгоград, 09 декабря 2019 года / Под общей редакцией В.И.Петрова. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2019. – С. 7-8.

6. **Дворяшина, И. А.** Иммуногистохимическое исследование распределения индуцибельной синтазы оксида азота при спонтанной регенерации ткани печени после индуцирования фиброза химического генеза / И. А. Дворяшина // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Материалы 77-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 24–27 апреля 2019 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2019. – С. 403.

7. Terentiev, A. V. Transitional hepatoblasts in liver development / A. V. Terentiev, **I. A. Dvoryashina** // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины : сборник 79-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 21–23 апреля 2021 года / Волгоградский государственный медицинский университет, Федерация представителей молодежных научных обществ медвузов, Научно-образовательный медицинский кластер ЮФО «Южный», Автономная некоммерческая организация развития образования и науки «Региональная ассоциация университетов», Научное общество молодых ученых и студентов

ВолгГМУ. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2021. – Р. 445-446.

8. **Дворяшина, И. А.** Распределение нестин-положительных клеток в ткани печени в норме и при индуцированном фиброзе / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная, А. В. Терентьев // Современная патология: опыт, проблемы, перспективы: II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, Самара, 09 декабря 2021 года. – Самара: Самарский государственный медицинский университет, 2021. – С. 24-27.

9. **Дворяшина, И. А.** Анализ распределения клеток, положительных по α-SMA, в ткани печени в норме и при индуцированном фиброзе / И. А. Дворяшина, Ю. И. Великородная, Л.С. Быхалов // Вестник молодого ученого: Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы морфологии», посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.Ю. Первушина – Ставрополь: Ставропольский государственный медицинский университет, 2023. – С. 14.

Автор выражает глубокую благодарность сотрудникам лаборатории патоморфологии ФГУП «НИИ гигиены, токсикологии, патоморфологии» ФМБА России в лице заведующей лабораторией Великородной Ю.А, Почецова А.Я. за неоценимую помощь в проведении исследования.

