

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»**

На правах рукописи

Гоникова Залина Залимгериевна

**Исследование регенераторной активности общей РНК клеток костного
мозга на экспериментальных моделях печеночной недостаточности**

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Севастьянов Виктор Иванович

доктор медицинских наук, профессор

Онищенко Нина Андреевна

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 Использование современных биотехнологий для повышения эффективности регуляции восстановительных процессов в печени при острой и хронической печеночной недостаточности. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1 Роль клеточных и молекулярных механизмов в развитии повреждения и регенерации печени	14
1.1.1 Участие клеток печени в инициации и прогрессировании необратимости повреждения печени.	16
1.1.2 Роль дисбаланса сигнальных молекул - в развитии необратимости повреждения печени	20
1.2 Современные терапевтические стратегии, используемые для коррекции острой и хронической печеночной недостаточности	28
1.2.1 Терапия, нивелирующая действие этиологических факторов	29
1.2.2 Противовоспалительная и иммуносупрессивная терапия	29
1.2.3 Терапия, индуцирующая супрессию активации и апоптоз звездчатых клеток печени	30
1.2.4 Терапия, индуцирующая регенерацию гепатоцитов. Роль стволовых/прогениторных клеток костного мозга	31
1.2.5 Терапия, индуцирующая генную регуляцию восстановительных процессов в печени. Роль микро-РНК	34
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1 Общая характеристика проведенных исследований	38
2.2 Разработка протокола выделения общей (суммарной РНК) из клеток костного мозга	41

2.3 Модели для изучения способности общей РНК, выделенной из клеток костного мозга, к адресному переносу регенерационной информации и активации восстановительных процессов в поврежденном органе	43
2.3.1 Модель острой печеночной недостаточности (модель обширной резекции печени)	43
2.3.2 Модель адоптивного переноса для выявления переноса адресных регенерационных сигналов	45
2.3.3 Модель токсического хронического повреждения печени	46
2.4 Методы исследования	47
2.4.1 Подготовка биопсийных препаратов ткани печени для гистологических исследований	47
2.4.2 Определение пролиферативной активности и митотического индекса в ткани печени	48
2.4.3 Определение массы печени как показателя восстановительной регенерации печени	48
2.4.4 Биохимические методы исследования	49
2.5 Статистическая обработка полученных результатов	49
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	50
3.1 Изучение способности общей РНК из мононуклеарных клеток костного мозга служить переносчиком адресных регенерационных сигналов при повреждении печени	50
3.2 Использование общей РНК из мононуклеарных клеток костного мозга для индукции процессов восстановительной регенерации в печени после обширной резекции	55
3.3 Использование общей РНК клеток костного мозга для коррекции структурных нарушений в ткани печени при ее хроническом токсическом повреждении	66

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
ВЫВОДЫ	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	96
СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	97
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	98

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Возрастающая во всем мире численность больных с острой и хронической печеночной недостаточности, ранняя инвалидизация и высокая смертность ставят проблему лечения таких больных в число актуальных проблем современной медицины. В России, как и во всем мире, летальность при острой и хронической печеночной недостаточности также не снижается и колеблется от 50 до 70-90% [1-3]. По данным ВОЗ прогнозируется [4], что смертность от заболеваний печени в предстоящие 10-20 лет возрастет более чем в 2 раза. К настоящему времени стало очевидным, что трансплантация печени, будучи самым эффективным методом лечения острой и хронической печеночной недостаточности из-за дефицита донорских органов не может обеспечить всех нуждающихся в ней. Рассматривая высокую летальность при острой и хронической печеночной недостаточности как следствие нарушения процессов регенерации в поврежденной печени, надежду на повышение эффективности лечения этих состояний стали связывать с регенерационной медициной, основанной на применении клеточных технологий. В эксперименте и клинике стали осуществлять трансплантацию сначала клеток донорской печени [5], а затем гемопоэтические и стромальные фракции клеток костного мозга [6-13], обладающие высоким регенерационным потенциалом.

Между тем, внедрение в практику регенеративной медицины клеточных технологий пока не получило единодушного одобрения из-за опасности малигнизации и генетических мутаций трансплантированных стволовых клеток, а также из-за быстрой гибели или быстрого снижения активности как аутологичных, так и аллогенных клеток.

Альтернативой клинического применения биомедицинских клеточных продуктов в регенерационной медицине, включая клеточно- и тканеинженерные конструкции, могут стать технологии, основанные на создании молекулярно-инженерных конструкций, содержащих выделенный из

клеток костного мозга комплекс внутриклеточных биологически активных компонентов.

Вопрос о том, какие внутриклеточные структуры и сигнальные молекулы клеток костного мозга (ККМ) способны обеспечивать «адресный перенос регенерационной информации» к поврежденным органам долго не был предметом специальных исследований.

В последние годы, однако, появилось достаточное количество обстоятельно выполненных исследований [14-17], из которых следует, что продуцентами и переносчиками регенерационной информации в межклеточной сигнальной системе выступают разнообразные по своим структурным и функциональным свойствам молекулы РНК.

Начиная с 2008 г. во всём мире проводятся интенсивные исследования молекул малых белок некодирующих РНК - микроРНК, которые начали использовать не только в качестве биомаркеров, но и в качестве терапевтических средств регуляции восстановительных процессов при различных патологиях [18]. Однако выделение какой-либо одной микроРНК с адресным эффектом для целей регенерационной терапии представляет собой сложный технологический процесс. Уже к 2015 году было идентифицировано свыше 1800 вне - и внутриклеточных микроРНК человека [19], причём функция большинства из них остаётся неизвестной. Кроме того, вызывает сомнение возможность индукции и осуществления регенерационного процесса с помощью какой-либо одной выделенной микро РНК, так как уже показано, что в процессах регенерации принимают участие разные классы РНК [20], в том числе разные классы белок некодирующих РНК, например длинные некодирующие РНК – lnc RNA [21-25], короткие интерферирующие РНК-siRNA [26-27] и короткие ядерные РНК [23].

Сравнительно недавно появилась информация, что общая РНК (оРНК), выделенная из клеток костного мозга, способна индуцировать восстановительные процессы в самом костном мозге при его повреждении [28]. Между тем, отсутствуют сведения, о способности общей РНК из клеток

костного мозга (КМ) индуцировать восстановительные процессы в органах другого гистотипа, в том числе в печени.

Цель исследования

Исследовать способность общей РНК, полученной из несортированной фракции моноклеарных клеток костного мозга, обеспечивать адресный перенос регенерационных сигналов и стимулировать восстановительные процессы в печени при ее остром и хроническом повреждении.

Задачи исследования

1. Разработать протокол выделения общей РНК (оРНК) из несортированной фракции моноклеарных клеток костного мозга.
2. Используя модель адоптивного переноса, доказать способность оРНК, полученной из клеток костного мозга, осуществлять адресный перенос регенерационных сигналов в ткань повреждённой печени.
3. На модели острой печёночной недостаточности, созданной путем обширной резекции печени, сравнить способность клеток костного мозга и оРНК, выделенной из этих клеток, стимулировать восстановительные регенерационные процессы в повреждённой печени.
4. Разработать экспериментальную модель хронического токсического повреждения печени с развитием дисфункции и фиброзирующих процессов в ней.
5. На токсической модели хронической печеночной недостаточности, сравнить эффективность регенераторного воздействия на печень клеток костного мозга и оРНК, выделенной из этих клеток.

Научная новизна

Методом адоптивного переноса впервые доказана способность средней эффективной дозы оРНК (30 ± 5 мкг/100 г. веса животного), выделенной из клеток костного мозга, обеспечивать адресный перенос регенерационных сигналов в печень при ее повреждении.

На модели обширной резекции печени установлена более высокая митотическая активность гепатоцитов и достоверно большая скорость восстановления массы печени при введении средней эффективной дозы оРНК по сравнению с введением клеток костного мозга в дозе $(30-35) \times 10^6$, используемой для выделения оРНК.

Разработана модель хронического токсического повреждения печени (ХТПП), позволяющая воссоздать и сохранить морфологические признаки цирроза печени в течение 6 месяцев путем комбинированного применения токсических доз CCl_4 в сочетании с неполным адьювантом Фрейнда.

На модели хронического токсического повреждения печени доказано, что однократное введение оРНК из клеток костного мозга в дозе 30 ± 5 мкг/100 г веса животного индуцирует восстановительные процессы в ткани печени.

Теоретическая и практическая значимость работы

Создана новая модель токсического хронического повреждения печени с развитием фиброзирующих процессов, пригодная для скрининговой оценки эффективности различных биотехнологических методов коррекции хронической печеночной недостаточности.

На экспериментальных моделях острого и хронического повреждения печени доказана функциональная эффективность оРНК как принципиально нового типа медицинского продукта для регенеративной медицины,

способного обеспечить эффективную регуляцию восстановительных процессов в поврежденной печени при отсутствии рисков, возникающих в случае применения клеточных продуктов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Введение оРНК из клеток костного мозга от крыс-доноров с обширной резекцией печени индуцирует в организме интактных крыс-реципиентов митотическую активность и пролиферацию гепатоцитов (метод адоптивного переноса).

2. Введение оРНК из клеток костного мозга здорового донора животным с экспериментальной моделью острой печеночной недостаточности более интенсивно, чем клеток костного мозга в эквивалентной дозе, стимулирует восстановительные процессы в печени, что выражается достоверно более высоким уровнем митотической активности гепатоцитов и достоверно более ранним восстановлением исходной массы печени.

3. Введение оРНК из клеток костного мозга и клеток костного мозга в эквивалентной дозе животным с экспериментальной моделью хронического токсического повреждения печени, сопровождающегося развитием фиброза и цирроза печени, ускоряет восстановление печени.

4. В отличие от клеток костного мозга оРНК из клеток костного мозга способствует ускорению темпа фибролиза образовавшихся междольковых соединительно-тканых септ и пролиферации гепатоцитов.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обеспечивается четкой постановкой задач исследования, применением современных и адекватных методов исследования на сертифицированном оборудовании; использованием достаточного количества экспериментальных животных в отдельных сериях опытов и в каждой экспериментальной группе; корректным применением методов статистического анализа и критической оценкой полученных результатов при сравнении с данными современной научной литературы.

Апробация работы состоялась 21 мая 2019 г. на совместной конференции научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Основные положения и результаты диссертации были доложены и обсуждены на III Национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2–4 октября 2017 г.); III Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 15-18 ноября 2017 г.); Sechenov International Biomedical Summit 2018 (Moscow, May 21-23, 2018); на IX Всероссийском съезде трансплантологов, 16–19 сентября 2018 года.

Связь работы с научными программами, планами, темами

Диссертационная работа выполнялась в рамках государственного задания Минздрава России на проведение научных исследований и разработок по теме: «Создание и исследование экспериментальных моделей молекулярно-инженерной конструкции для регенерации поврежденных органов и тканей» (2018 -2020 гг.), регистрационные номера: НИОКТР АААА-А18-118012390461-0 и ИКРБС 056-00086-18-00.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в образовательный процесс кафедры трансплантологии и искусственных органов лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в постановке цели и задач исследования, участвовала в разработке концепции и в составлении плана экспериментальных исследований. Самостоятельно создавала модель адоптивного переноса, а также модели острой и хронической печеночной недостаточности, разработала протокол выделения оРНК из клеток костного мозга. Проводила сбор материала по сравнительному исследованию эффективности индукционного воздействия клеток костного мозга и оРНК из клеток костного мозга на регенерационные процессы в печени. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Получено 3 патента РФ на изобретения.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 185 источников, в том числе 25 отечественных и 160 зарубежных. Работа изложена на 118 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 рисунками, содержит 7 таблиц.

ГЛАВА 1. Использование современных биотехнологий для повышения эффективности регуляции восстановительных процессов в печени при острой и хронической печеночной недостаточности (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Продолжающийся рост заболеваемости во всем мире, высокая смертность и недостаточная эффективность существующих методов лечения больных с тяжелыми формами острой и хронической печеночной недостаточности [4,29] побуждают к продолжению поиска новых более эффективных методов лечения печеночной недостаточности (ПН). К настоящему времени уже сложилось понимание того, что развитие ПН, проявляющейся клинически тяжелой интоксикацией, является результатом воздействия различных этиологических факторов [4, 30]. Однако в патогенезе ПН, как острой, так и хронической, в печени всегда формируются морфофункциональные нарушения одного и того же типа. Они характеризуются дегенерацией, апоптозом и некрозом гепатоцитов, нарушением или утратой функций других клеток печени различной степени выраженности, что приводит к снижению в печени количества адекватно функционирующих тканеспецифических структур до критического уровня, а также нарушением процессов их восстановительной регенерации. Длительное проявление указанных нарушений способствует переходу острой ПН в хроническую стадию с постепенно нарастающим замещением печеночной паренхимы фиброзной тканью, образованием ложных долек и прогрессирующим снижением массы нормально функционирующих гепатоцитов [30].

В настоящее время единственным эффективным методом лечения необратимого повреждения печени в результате развития острой и хронической ПН признана трансплантация печени, так как операция замены пораженной печени – здоровой донорской печенью способна обеспечить выраженный клинический эффект и полную социальную реабилитацию больного [31].

Однако, повсеместный и все углубляющийся дефицит донорских органов ограничивает доступность этой операции и поэтому число пациентов, находящихся в листе ожидания на трансплантацию печени, продолжает неуклонно расти. Других эффективных технологий лечения необратимого повреждения печени, но основанных на восстановлении её собственного регенерационного потенциала, пока не разработано и это в значительной степени обусловлено отсутствием всеобъемлющих представлений о клеточных и молекулярных механизмах развития необратимости повреждения печени. Без понимания и детального изучения механизмов патогенеза ПН невозможно разработать новые более эффективные терапевтические стратегии восстановления регенерационного потенциала печени при ПН, т.к. по наблюдениям некоторых авторов [32] фиброз и даже цирроз печени потенциально обратим.

1.1 Роль клеточных и молекулярных механизмов в развитии повреждения и регенерации печени

Известно [33], что в регенерации, как нормальной, так и в патологически измененной печени, принимают участие все ее структурные компоненты - паренхиматозные клетки (гепатоциты) и непаренхиматозные – синусоидальные клетки (купферовские клетки, эндотелиоциты, звездчатые клетки – клетки Ито, ямочные клетки - Pit-cells, и свободно мигрирующие лейкоциты), а также клетки соединительной ткани и внеклеточный матрикс. Все указанные типы синусоидальных клеток (СК) постоянно взаимодействуют между собой и с гепатоцитами при посредничестве внеклеточного матрикса, образуя единую структурно-функциональную систему, которая обеспечивает выполнение многочисленных специализированных функций гепатоцитов. В организме регуляция гомеостаза печеночной долики и ткани печени в целом, как в норме,

так и особенно при патологии печени, осуществляется с участием ряда внепеченочных функциональных систем – почек, легочной ткани [34,35], а также мигрирующих клеток системы крови и иммунной системы, то есть клеток костного мозга (ККМ). ККМ и циркулирующие в крови клетки костномозгового происхождения (лимфоциты) участвуют в экспрессии рецепторов различных клеток печени и в процессах их восстановительной регенерации как путем дистантной продукции гуморальных факторов - цитокинов, хемокинов, ростовых факторов TNF- α , IL-1, IL-6, LIF, IL-10, NGF, оксид азота, VEGF, HGF, TGF- β , MMPs, (матриксные металлопротеиназы), TIMPs, FGF-2 и 7, CSF и др., так и путем контактного взаимодействия при их трансэндотелиальной миграции в очаг повреждения и трансдифференцировки в гепатоцитоподобные клетки. Между тем, при тяжелой ПН, сопровождающейся развитием необратимого повреждения печени, нарушаются не только взаимодействия, но также восприятие и передача регуляторных сигналов клетками с развитием их дисфункции. Повреждение и дисфункция клеток печени запускается массовой гибелью гепатоцитов [3], которая нарушает химизм микроокружения клеток печени и индуцирует стрессорную повреждающую активацию СК и, прежде всего, звездчатых клеток ИТО. Стрессорная активация СК ведет к нарушению процессов ремоделирования внеклеточного матрикса, что способствует торможению митотических потенций гепатоцитов. Нарушение ремоделирования внеклеточного матрикса ведет к усилению синтеза фибриллярных матриксных коллагенов и относительной недостаточности коллагенолитических матриксных протеиназ (коллагеназ), что создает условия для формирования фиброзной ткани в синусоидальном пространстве Диссе, создает препятствие для нормального обмена веществ между кровью синусоидов, гепатоцитами и СК [22]. При снижении массы функционирующих гепатоцитов до критического уровня повышается нагрузка на оставшиеся гепатоциты, которая десинхронизирует их митотическую активность и нарушает ритмы взаимодействия с СК. В результате усиливается апоптоз сохранившихся гепатоцитов и усугубляется

формирование патологических циклов метаболизма в печени с развитием необратимости ее повреждения [36].

В развитии и прогрессировании необратимости повреждения печени важную роль играет торможение миграционной и индукционной активности стволовых ККМ, которое происходит в организме на фоне ауторегуляторно возникающего и прогрессирующего вторичного иммунодефицита в ответ на усиление апоптоза и торможение митотической активности гепатоцитов [37].

Таким образом, необратимое повреждение печени, сопровождающееся инициацией и прогрессированием процессов деструкции и фиброобразования как при острой, так и при хронической ПН, является результатом глубокого рассогласования регуляторного взаимодействия клеток печени (паренхиматозных и не паренхиматозных), причем в роли ведущего механизма развития и поддержания необратимых деструктивных процессов в печени выступает ингибирование стволовых и регуляторных функции сначала звездчатых клеток печени (клетки ИТО), а затем и ККМ [33].

1.1.1 Участие клеток печени в инициации и прогрессировании необратимости повреждения печени

В развитии деструктивных процессов в печени участвуют все её клетки, но главная роль принадлежит СК, которые становятся неспособными выполнять присущую им важнейшую гомеостаз-регулирующую функцию, проявляющуюся в условиях физиологической и репаративной регенерации – поддержание в базальной мембране синусоидов вязкодисперстного состояния коллагенов (повышение коллагенолитической активности тканей печени и снижение суммарного содержания в ней коллагеновых белков, прежде всего фибриллярных) для обеспечения ускоренного взаимодействия всех клеток синусоида и растормаживания митотических потенций гепатоцитов [38].

Однако нарушение митотической активности гепатоцитов происходит не только из-за нарушения в СК синтеза и агрегатного состояния матриксных белков - синтеза и секреции матриксных металлопротеиназ (ММП) и тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМП), регулирующих баланс структурных белков во внеклеточном матриксе, но также из-за нарушения других важнейших функций этих клеток. В них нарушается синтез про и противовоспалительных цитокинов, синтез факторов роста, в том числе факторов роста гепатоцитов (HGF), фактора стволовых/прогениторных клеток (SCF), а также нарушается экспрессия информационных молекул, таких как VCAM-1 и SDF-1a, что тормозит миграцию в печень стволовых/прогениторных клеток КМ - активных участников восстановительных процессов в печени [39].

Анализ нарушения функций отдельных СК при деструктивных фиброзирующих процессах в печени убеждает в том, что среди СК именно дисфункция звездчатых клеток становится триггером развития необратимого повреждения этого органа.

Звездчатые клетки (ЗК) печени или клетки ИТО по современным представлениям обеспечивают поддержание структурного гомеостаза печени при физиологической и репаративной регенерации за счет своих стволовых функций и сохранения способности находиться в недифференцированном состоянии [33]. Обладая способностью экспрессировать маркеры гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток [40, 41] ЗК способны влиять на дифференцировку и миграцию в печень стволовых/прогениторных клеток КМ, а также служить потенциальным источником развития гепатоцитов [42]. ЗК регулируют также адекватность восстановительных процессов в печени, привлекая стволовые клетки КМ к осуществлению ранних этапов ее восстановительной регенерации [39, 42], а также проявляют свое взаимодействие с гепатоцитами и нефибриллярными белками базальной мембраны (ламинин, коллаген-4, 6 и 14 типа), которые ингибирует запуск их дифференцировки [39, 42] и сохраняют ЗК как фенотип клеток, депонирующих витамин А [43]. Под воздействием множества стрессорных (повреждающих)

факторов/или подвергаясь воздействию воспалительных цитокинов (PDGF, TGF- β , TNF- α , IL- γ и др.) ЗК переходят из спокойного в активированное состояние. Переход ЗК в активированное состояние главное событие в инициации и прогрессировании фиброза печени, так как это состояние сопровождается утратой стволовых функций ЗК. ЗК трансдифференцируются в клетки липофибробласты и экспрессируют α -гладкомышечный актин (α SMA), становятся неспособными регулировать межклеточные взаимодействия и поддерживать вязкодисперсное состояние внеклеточного матрикса (ВКМ). В результате возникает дисбаланс функций клеток печени (потеря микроворсинок на гепатоцитах, капилляризация синусоидов, нарушение активации митотических потенциалов гепатоцитов), который усиливается на фоне дисбаланса синтеза матриксных белков с развитием фиброзной ткани в пространстве Диссе в результате активации синтеза преимущественно фибриллярных коллагенов [44, 45, 46].

В начальную фазу инициации процесса активации ЗК, эти клетки снова могут вернуться в состояние покоя. Но такая инверсия в состоянии ЗК происходит только на фоне стимуляции образования в этих клетках противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-12, INF- α), которые ингибируют продукцию провоспалительных цитокинов, в частности TNF- α печеночными макрофагами, в результате чего процессы фиброзирования в печени не развиваются [47].

Эндотелиоциты или синусоидальные эндотелиальные клетки представляют собой клетки, структурной характеристикой которых является наличие на их поверхности фенестр, диаметром 150-175 nm, которые действуют как динамический фильтр, облегчающий обмен жидкостей, растворов и частиц между синусоидальной кровью и клетками печени [48, 49]. При развитии цирроза печени наступает дефенестрация и капилляризация эндотелиоцитов, причем полагают, что запускает этот процесс нарушение метаболизма витамина А и других ретинолов, вызванное активацией и трансформированием ЗК в миофибробласты [30]. Показано также, что

эндотелиоциты в свою очередь способны секретировать цитокин-IL-33, который активирует ЗК и тем самым способствует и углубляет развитие фиброза [50]. Дефенестрация и капилляризация эндотелиоцитов ведут к нарушению субстратного обмена между клетками и становятся ведущими факторами развития дисфункции гепатоцитов при циррозе печени [49]. Между тем известно, что дифференцированные (не измененные) эндотелиоциты могут обеспечивать обратный переход уже активированных ЗК в состояние покоя, ускоряя регресс и предотвращая прогрессирование фиброза с помощью VEGF (сосудистого эндотелиального ростового фактора), стимулированного продукцией в этих клетках NO [51, 52].

Купферовские клетки (КК) являются специализированными макрофагами, выстилающими стенки синусоидов, и являются главными представителями ретикулоэндотелиальной системы в печени.

Показано, что КК вовлекаются в патогенез различных заболеваний печени и активируются под воздействием многочисленных повреждающих факторов, вызывая деструкцию гепатоцитов путем продукции медиаторов воспаления и выступая в роли антигенпрезентирующих клеток [53]. Воспаление, поддерживаемое КК, рассматривается как фактор, усиливающий повреждение и фиброзирование печени [54], так как провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, TNF- α , интерфероны и др.) и медиаторы воспаления (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, селектины и др.), продуцируемые этими клетками, индуцируют активацию ЗК и их участие в процессах фиброзирования [30].

Гепатоциты (Гп), являясь паренхиматозными клетками и находясь в постоянном взаимодействии с СК выполняют сложную роль в процессах прогрессирующего повреждения печени.

Так в некротически поврежденных Гп активация процессов свободно-радикального окисления способствует появлению реактивных кислородных радикалов и выработке фиброгенных медиаторов, которые, активируя ЗК индуцируют превращение их в миофибробласты- триггеры процессов фиброзирования печени [55].

Апоптоз гепатоцитов как общий исход повреждения клеток печени при воздействии различных этиологических факторов также вносит вклад в процессы тканевого повреждения, фиброзирование и развития цирроза [30]. Установлено, что это происходит путем снижения Vcl-2 торможения отдельных фаз митотического цикла в гепатоцитах, а также нарушения функции гепатоцитов и ограничения возможности их регенерации [56, 57]. Кроме того, гепатоциты, будучи главным источником матриксных металлопротеиназ (ММР-2, ММР-3, ММР-13) и ингибиторов матриксных протеиназ (Тимр-1, Тимр-2) [58], а, также обладая высокой коллагеназной активностью, при апоптозе утрачивают способность адекватно поддерживать вязкодисперсные свойства внеклеточного матрикса и таким образом вовлекаются в патогенез фиброза и цирроза печени. На стадии фиброирования печени или развития цирроза гепатоциты пребывают в состоянии гипоксии и становятся преимущественными продуцентами цитокина $TGF\beta-1$, что способствует усилению фиброгенеза в печени [59]. Важно также отметить что, вызывая укорочение и старение ядерных теломеров в гепатоцитах удастся индуцировать формирование цирроза и этот факт позволяет связать механизмы развития цирроза с ген-зависимыми изменениями структур гепатоцитов [60].

1.1.2 Роль дисбаланса сигнальных молекул - в развитии необратимости повреждения печени

Известно, что повреждение печени, независимо от вызвавшего его этиологического фактора, сопровождается поступлением в кровотоки многочисленных сигнальных молекул тканевого повреждения – цитокинов, острофазных белков, растворимых адгезивных молекул, а также многочисленных регуляторных белков некодирующих РНК, преимущественно микро РНК, спектр которых отражает тяжесть и обратимость возникающих морфофункциональных нарушений в печени.

Участие цитокинов и цитокин-опосредованных сигнальных путей в регуляции повреждения и регенерации печени

Формирование необратимого повреждения печени всегда сопровождается активацией сети цитокин-опосредованных сигнальных путей, регулирующих состояние ЗК и обратимось процессов фиброзирования. Главными цитокинами, участвующими в регуляции активности ЗК и процессов фиброгенеза, являются: тромбоцит-деривированный ростовой фактор (PDGF,) трансформирующий ростовой фактор- β (TGF- β), опухолевый некротический фактор (TNF- α), интерфероны (INFs) и интерлекины (ILs).

PDGF - является наиболее сильным митогеном для ЗК среди полипептидных ростовых факторов и представляет собой семейство, состоящее из 4-х членов- PDGF-A,-B,-C и D [61]. PDGF и их рецепторы существенно экспрессированы в фиброзированных тканях и их активность повышается при увеличении степени фиброза печени [62]. Различные патогенные факторы (вирусы, химические соединения и механическое повреждение гепатоцитов) могут побуждать КК к синтезу и выделению PDGF [63]. При связывании PDGF со специфическим рецептором на мембране ЗК, они активируют многочисленные сигнальные молекулы и транскрипционные факторы, приводя к активации заторможенных генов-мишеней (downstream target genes) и к активации ЗК [64]. Однако нейтрализация PDGF- повышает экспрессию MMP-2, MMP-9 и TIMP-1 и тормозит активность коллагеназы, и таким образом снижает деградацию внеклеточного матрикса [61, 64]. Недавно отмечено [65], что PDGF- β при частичной гепатэктомии (ЧГЭ) активируется в ЗК, а его истощение ведет к длительному повреждению печени после ЧГЭ.

TGF- β - является самым сильным из известных индукторов фиброгенеза печени, который синтезируется в печени всеми основными клетками: ЗК - миофибробластами, КК, синусоидальными эндотелиальными клетками и гепатоцитами. Семейство TGF- β включает 6 членов, но среди них TGF- β 1

играет ключевую роль в инициации и поддержании фиброза печени [66, 67]. Уровень экспрессии TGF- β 1 увеличивается при фиброзировании печени и достигает максимума при циррозе печени [59]. Профиброгенный эффект TGF- β 1- сложный, вовлекающий много аспектов: первичный эффект TGF- β 1- обусловлен стимуляцией активации ЗК и путей прогрессирования фиброза печени [68]; TGF- β 1 индуцирует также экспрессию матриксproduцирующих генов и ингибирует деградацию внеклеточного матрикса (ВКМ), снижая регуляторную экспрессию MMPs и содействуя активации TIMP, что вызывает чрезмерную депозицию коллагеновых волокон и способствует развитию фиброза печени [67, 69]. Кроме того, TGF- β 1- ингибирует DNP-синтез и индуцирует апоптоз гепатоцитов.

TGF- β 1 индуцированный апоптоз, как полагают, ответственен за убыль ткани и уменьшение размеров печени при циррозе [69]. Установленная критическая роль TGF- β 1 в патогенезе цирроза печени и возможность осуществления специфической блокады TGF- β 1/Smad3 сигнализации выявили терапевтическую ценность использования этого пути для устранения фиброза печени.

TNF- α - продуцируется главным образом моноцитами, макрофагами, ЗК и КК и оказывает провоспалительные и цитокинетические эффекты на эти клетки. В процессе фиброирования печени TNF- α играет важную роль при активации ЗК и участвует в синтезе внеклеточного матрикса [70]. TNF- α может снижать спонтанный апоптоз активированных крысиных ЗК, повышая регуляцию антиапоптотических факторов NF- κ B, Bcl-XL и p21^{waf1}, а также снижая регуляцию проапоптотического фактора p53 [71]. Однако, эффекты TNF- α на ЗК и фиброз являются более сложными и даже парадоксальными, что демонстрируется исследованиями, где TNF- α может индуцировать апоптоз ЗК [71]. Показано, что TNF- α оказывает влияние на развитие антифиброгенного эффекта ЗК крыс, снижая глутатион и ингибируя проколлаген- α 1 экспрессию [72]. В тоже время на крысиной модели неалкогольного стеатогепатита (NASH)- антитела к TNF- α снижают воспаление, некроз и фиброз печени [73].

TNF- α сигнализация через активацию КК играет существенную роль в патогенезе фиброза печени на животных с моделью NASH [74]. Однако, регенерация печени после ЧГЭ и пролиферация гепатоцитов регулируются TNF- α , выделяемым из КК [75].

Интерфероны (INFs) - это семейство растворимых внеклеточных сигнальных молекул. Лейкоциты крови синтезируют INF- α и INF- β в ответ на вирусную инфекцию, а Т-лимфоциты секретируют INF- γ в ответ на стимуляцию различными антигенами и митогенами. INFs - обладают антивирусной активностью, что и было доказано по их антивирусному эффекту [76]. У пациентов, леченных интерферонами, наступает регрессирование фиброза печени, даже если не было достигнуто избавление от вирусов; это означает, что INFs сами обладают антифибротической активностью, запуская апоптоз ЗК печени [77, 78]. INF- β может инактивировать ЗК и снижать продукцию ими α ГМА (α SMA) и коллагена через ингибицию TNF- β и PDGF метаболического пути. Сходным путем, INF- γ снижал деструкцию внеклеточного матрикса *in vivo*, ингибируя активацию ЗК через TNF- β 1/Smad3 сигнализующие пути [79]. Лечение крыс с фиброзом печени с помощью INF- γ вело к снижению продукции и деструкции коллагена, ламинина, фиброниктина и проколлагена-1 типа в печени [79]. Однако эффекты INFs на процессы фиброобразования печени, были не всегда воспроизводимы, так как имеются работы, в которых показано, что INF- α и INF- γ могут оказывать противоположные эффекты на апоптоз ЗК: INF- α оказывает антиапоптотический эффект на активированные ЗК, тогда как INF- γ проявляет проапоптотический эффект за счет снижения регуляции HSP-70 (белок теплового шока 70) зависимого пути [80].

Интерлейкины (ILs) - ILs- это группа цитокинов, которые продуцируются широким спектром клеток таких, как CD4 Т-лимфоциты, моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки и выделяют про и антифиброгенные интерлейкины.

Профиброгенные ILs: КК и синусоидальные эндотелиальные клетки (СЭК) могут активно продуцировать ILs в ответ на повреждение ткани печени.

IL-1 может напрямую активировать ЗК и стимулировать их к продукции MMP-13 и TIMP-1, вызывая фиброгенез печени. В противоположность этому, мыши с дефицитом IL-1 рецептора с меньшей вероятностью поддерживают повреждение печени и проявляют сниженную восприимчивость к развитию фиброза [81].

Дефицит IL-1 α при наличии IL-1 β также делает мышей с моделью стеатогепатита менее чувствительными к развитию фиброза [65]. Подобно этому антагонисты IL-1 рецептора защищают крыс от развития фиброза в ответ на воздействие диметилнитрозамина, а блокирование IL-1 сигнализации заметно ослабляет алкогольиндуцированное воспаление печени и стеатоз. IL-1 β способен увеличивать воспаление и содержание про-стеатотического хемокин-моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 в гепатоцитах, а также усиливать толл-подобный рецептор (T α R-4) - зависимую регуляцию воспалительной сигнализации в макрофагах [82]. Другим профибротическим цитокином является IL-17, так как уровень его экспрессии повышается с увеличением степени фиброза печени [83, 84]. Показано, что IL-17 индуцирует фиброз через множество механизмов, включая повышенную регуляцию TNF- α , TNF- β и экспрессию коллаген-1 α , которая регулируется активностью активатора транскрипции - (STAT-3) - сигнального пути; кроме того, IL-17 поддерживает миофибробластоподобные изменения ЗК [85]. В тоже время при регенерации печени после ЧГЭ, возросшая пролиферация гепатоцитов регулировалась IL-17A, выделенным из CD4 лимфоцитов селезенки [75].

Антифиброгенные ILs: IL-10-это цитокин, который снижает провоспалительный ответ и оказывает модуляторный эффект на фиброз печени [86]. Полагают, что IL-10 может иметь терапевтический эффект у больных с HCV-зависимым фиброзом печени, которые не отвечают на терапию, основанную на применении INFs. IL-10 оказывает антифибротические эффекты через ингибицию активности ЗК [87], что было продемонстрировано на крысиной модели, в которой экзогенный IL-10 вызывал реверсию CCL₄ индуцированного фиброза печени, путем ингибиции экспрессии TGF- β 1, MMP-2 и TIMP-1 [86-88]. IL-22 играет ключевую роль в активации антимикробного

иммунитета, воспаления и тканевой регенерации на барьерных поверхностях. IL-22 индуцирует старение ЗК, ограничивает фиброз печени и ускоряет освобождение печени от фиброза в мышинной модели [89]. IL-6 это плеiotропный цитокин, вовлекаемый в процессы воспаления, гематопоз и иммунную регуляцию. IL-6 может ослаблять апоптоз и способствовать регенерации гепатоцитов через NF- κ B-сигнализацию и Ras-МАРК путь [90]. IL-6 снижает CCL₄ индуцированное острое и хроническое повреждение печени и фиброз. Предварительное применение IL-6 для лечения фибротически измененной печени, улучшает внутрипеченочное микроокружение клеток и создает условия для трансплантации мезенхимальных стволовых клеток, вызывая улучшение (уменьшение повреждения) печени после фиброза [91]. Между тем повышенный уровень IL-6 в крови был обнаружен у больных с NAFLD (неалкогольный жировой гепатоз). IL-6 может также индуцировать резистентность к инсулину и воспаление в печени [92, 93], позволяя предположить, что IL-6 может также участвовать в развитии NAFLD.

Молекулы микро-РНК как посттранскрипционные участники процессов повреждения и регенерации печени

Микро-РНК (miRNAs) относятся к семейству малых белок-некодирующих РНК, которые контролируют трансляцию и транскрипцию множества генов, являясь, таким образом, посттранскрипционными регуляторами жизнедеятельности различных клеток организма, в том числе печени [94-97]. В настоящее время показано, что многочисленные miRNAs играют ключевую роль в различных патологиях печени, таких как гепатит, цирроз, неалкогольный жировой гепатоз, гепатоцеллюлярная карцинома, а также острая печеночная недостаточность [98-100], и именно поэтому было предложено использовать определенные miRNAs в диагностических целях [20, 101, 102].

В зависимости от динамики патологического процесса в печени экспрессируются miRNAs с про или антифиброгенными свойствами, а также miRNAs, являющиеся маркерами восстановительных процессов.

Профиброгенные miRNAs. Установлено взаимовлияние активации профиброгенных miRNAs и профиброгенных цитокинов в организме. Показано, что TGF- β 1 индуцирует экспрессию miRNA-181 α и miRNA-181 β и что последняя способна индуцировать пролиферацию ЗК путем регуляции p27 и клеточного цикла. В связи с этим повышение в сыворотке крови уровня miRNA-181 β предлагается рассматривать в качестве диагностического биомаркера у пациентов с циррозом [103]. Установлено, что miRNA-214-5p также может повышать экспрессию генов, связанных с фиброзом (таких как MMP2, MMP9, α SMA и TGF- β 1) в клетках печени линии LX-2 и поэтому полагают, что miRNA-214-5p- может играть определяющую роль в активации ЗК и прогрессировании фиброза печени [104]. miRNA-222 также повышенно экспрессируются в печени человека и у мышей при прогрессировании в ней фиброзирующих процессов, причем экспрессию miRNA-222 индуцирует TGF- α в присутствии TNF- α , и это позволяет ей связаться с нетранслируемыми (p27)³ регионами гена [105]. Среди других фиброз-ассоциированных miRNAs выделяют miRNA-200 β , которая существенно коррелировала с прогрессированием фиброза печени у человека и мыши: повышенная экспрессия этой miRNA значительно повышала экспрессию фиброзозависимых генов в ЗК в присутствии TGF- β [106].

Антифиброгенные miRNAs. К антифиброгенным miRNAs относят miRNAs, содержание и экспрессия которых в ЗК оказывалась сниженной при фиброзе печени, а при повышении содержания и экспрессии их в ЗК признаки фиброзирования печени ослаблялись. Было установлено, что такими свойствами обладают miRNA-150 и miRNA-194; полагают, что они ингибируют активацию ЗК и продукцию внеклеточного матрикса, по крайней мере, отчасти, путем ингибции экспрессии гена C-myb и ras-1 [107]. К антифиброгенным miRNAs, относятся также miRNA-29, miRNA-19b, miRNA-146a, miRNA 133b, экспрессия которых была отчетливо сниженной в изолированных ЗК животных с фиброзом

печени, а при ослаблении фиброгенеза печени их экспрессия восстанавливалась [44, 108, 109]. Полученные результаты позволили считать эти miRNAs не только биомаркерами для контроля прогрессирования фиброза печени, но также целями терапевтического регулирования при развивающемся фиброзе и циррозе печени. Между тем, рассматривая развитие фиброзирующих процессов в печени, как труднорегулируемую стадию повреждения печени, исследователи в последние годы стали идентифицировать в печени другие miRNAs, экспрессия которых выявлялась уже на ранних стадиях повреждения и активирующейся регенерации для поиска путей раннего управления метаболическими и восстановительными процессами в поврежденной печени.

Был идентифицирован ряд наиболее часто выявляемых маркеров печени: miRNA-122 как ключевой фактор повреждения печени (особенно информативен при гепатите С [98, 101, 110]; miRNA-21 и 155 как маркеры баланса про и антипролиферативных процессов для характеристики состояния регенерационных процессов [100-102, 111, 112]; miRNA-16 как маркер степени выраженности апоптоза гепатоцитов [113]. При исследовании в клинике сыворотки крови 63 больных с острой печеночной недостаточностью было установлено, что у больных со спонтанным восстановлением функций печени в сыворотке крови отмечался существенно более высокий уровень miRNA-122, miRNA-21 и miRNA-221 по сравнению с невосстановившимися пациентами. Этот факт, по мнению авторов [100] свидетельствует об участии вышеуказанных miRNAs в процессе спонтанного восстановления (регенерации) печени при острой печеночной недостаточности, а применение их может оказаться полезным для разработки новых терапевтических стратегий. Анализ механизмов развития печеночной недостаточности убеждает в том, что, несмотря на различия в этиологических факторах повреждения печени, патогенез печеночной недостаточности имеет общие закономерности развития, которые обусловлены нарушением регуляции процессов репаративной регенерации. Развитие печеночной недостаточности сопровождается повреждением, дисфункцией и дисрегуляцией всех клеток печени. По мере прогрессирования структурных повреждений печени и степени

тяжести печеночной недостаточности ослабляются и утрачиваются стволовые и регуляторные функции ЗК печени, а также стволовые, миграционные и иммунорегуляторные функции ККМ, которые в здоровом организме принимают непосредственное участие в регуляции восстановительных процессов в печени. В условиях развития глубокой патологии в печени стрессорная и все нарастающая дисрегуляция экспрессии сигнальных (информационных) молекул не способствует согласованному взаимодействию клеток печени между собой и с внеклеточным матриксом, что ведет к развитию состояния необратимости. Комплексно воздействовать на все патогенетические механизмы печеночной недостаточности в наиболее полной мере могут обеспечить современные биотехнологические методы.

1.2 Современные терапевтические стратегии, используемые для коррекции острой и хронической печеночной недостаточности

Анализ последних достижений в изучении фиброгенеза печени убеждает в том, что этот процесс динамический и потенциально обратимый. Наблюдения за животными и в клинике подтверждают, что любая степень фиброза и даже цирроза, как исхода острой и хронической печеночной недостаточности, потенциально обратима под воздействием обоснованных терапевтических стратегий [32]. Среди современных терапевтических стратегий коррекции острой и хронической печеночной недостаточности предпочтение отдается этиологическим и патогенетическим методам, способствующим восстановлению нарушенной регуляции регенерационных процессов в печени.

1.2.1 Терапия, нивелирующая действие этиологических факторов

Устранение действия этиологических факторов - это наиболее эффективный подход к профилактике и лечению фиброза печени. Этот подход включает применение медикаментозных средств, направленных против HBV и HCV инфекций [114, 115], воздержание от злоупотребления алкоголем, соблюдение диеты с одновременным контролем веса и уровня липидов в крови, использование хелатов для защиты клеток печени от накопления в них железа и меди и др. [116]. Среди противовирусных препаратов антифибротический эффект был установлен для таких препаратов, как рибавирин, ламивудин, адефовир, энтекавир и особенно для препарата INF- α [76, 115, 117].

1.2.2 Противовоспалительная и иммуносупрессивная терапия

Поскольку внутрипеченочное воспаление и иммунный ответ являются непосредственной причиной повреждения гепатоцитов и активации ЗК, то противовоспалительная и иммуносупрессивная терапия являются важной стратегией предотвращения процессов фиброгенеза в печени, так как фиброз и цирроз печени чаще всего являются результатом вирусного гепатита, аутоиммунного гепатита и первичного склерозирующего гепатита. Для противовоспалительной терапии используют препарат целекоксиб [118] и антиоксиданты - таурин и витамин Е [119]. В качестве иммуносупрессивных препаратов используются азатиоприн [120], колхицины [121] и рапамицин [122, 123]. Эти препараты проявляют выраженный противовоспалительный, антифибротический и иммуномодулирующий эффекты, а такролимус активирует регенерационные процессы в печени и, следовательно, все они потенциально полезны для профилактики и лечения фиброза печени, т.е. для восстановления регуляции регенерационных процессов.

1.2.3 Терапия, индуцирующая супрессию активации и апоптоз звездчатых клеток печени

Так как ЗК печени играют определяющую роль в фиброзировании и хронизации деструктивных процессов в печени то потенциально они являются триггерными клетками и в антифиброгенной терапии. В связи с этим ингибция активации ЗК является наиболее обоснованным терапевтическим подходом в предотвращении и лечении фиброза печени. Показано, что инактивация ЗК может быть достигнута путем ингибции TGF- β 1 сигнального пути и PDGF- β [124, 125], а активированные ЗК могут быть исключены из патогенеза деструкции печени путем индукции в этих клетках состояния апоптоза [126, 127]. Выявлено, что некоторые цитокины и факторы роста, такие как инсулиноподобный фактор-1, INF- α и INF- γ индуцируют апоптоз ЗК печени [74, 80]. Ингибция ингибитора карра- β -киназы [45] ускоряет апоптоз ЗК и усиливает антифибротический эффект [45]. Показано также, что медикаментозные препараты с гепатопротективными свойствами: силимарин [128, 129], урсодезхолиевая кислота и тауро-урсодезхолиевая кислота [130, 131], блокаторы Са каналов [132] и др., используемые в лечении хронических заболеваний печени, также проявляют антифибротическую активность. Эти наблюдения позволяют признать, что в индукции и хронизации деструктивных процессов в печени наряду со ЗК участвуют и другие клетки печени.

1.2.4 Терапия, индуцирующая регенерацию гепатоцитов. Роль стволовых/прогениторных клеток костного мозга

При хронических заболеваниях печени, которые сопровождаются апоптозом и гибелью гепатоцитов, а также избыточным разрастанием соединительной ткани в печени создаются условия для нарушения межклеточного взаимодействия, а также прогрессирования процессов воспаления и фиброзирования [133, 134].

Для восстановления межклеточного взаимодействия и регуляторной роли гепатоцитов, а также для защиты их от апоптоза и сохранения функций при развитии ХПН в качестве терапевтического средства в эксперименте стали использовать HGF и антифибротический ростовой фактор [135, 136], а в клинике стали применять трансплантацию гепатоцитов или их экстракорпоральное подключение, используя для этого аллогенные и даже ксеногенные (свиные) гепатоциты. Между тем эффективность применения гепатоцитов для коррекции острой и хронической ПН оказалась недостаточной, а индукция восстановительных процессов в печени кратковременной [137]. Такой результат был обусловлен тем, что гепатоциты будучи дифференцированными клетками были не способны после трансплантации продуцировать полный спектр ростовых гепатотропных факторов и индуцировать митотическую активность в повреждённой печени.

Недостаточная эффективность применения зрелых гепатоцитов способствовала интенсификации исследований по применению незрелых клеток - участников регенерационных процессов в печени - овальных клеток, представляющих собой внутрипечёночные стволовые/прогениторные клетки (СПК) и клеток костного мозга (ККМ), содержащих стволовые/прогениторные клетки гемопоэтического и мезенхимального стромального ряда (ГСК и МСК соответственно) [33]. В настоящее время и овальные клетки и ККМ рассматриваются в качестве регионарных СПК печени, так как эти клетки

оказались способными в культуре экспрессировать гены гепатоцитарных белков, приобретать некоторые функции гепатоцитов, а при трансплантации восстанавливать функциональные резервы клеток поврежденной печени [6,39]. Из-за технологических проблем получения овальных клеток из донорской печени основное внимание исследователей переключилось на использование СПК костного мозга (ГСК и МСК) для коррекции ПН. В последнее десятилетие в связи с изучением перспектив применения клеточных технологий для репаративной регенерации печени в клинике, широко обсуждается вопрос о возможности восстановления структуры и функции печени не только за счет усиления пролиферации гепатоцитов и увеличения массы паренхимы, но и за счет регресса уже сформировавшегося фиброза [6, 137, 138]. По мнению экспериментаторов [139] и клиницистов [11, 140-143] для активации дефибрирующих процессов в печени при использовании как ГСК, так и МСК КМ следует учитывать тип используемых клеток, степень выраженности их биорегуляторной активности (аллогенные ККМ от здорового донора или аутологичные ККМ от пациента с ХПН), исходная тяжесть состояния пациента, а также должна применяться адекватная доза клеток. Так при сравнительном исследовании эффективности применения ГСК и МСК КМ в клинике при циррозе печени [144] было установлено, что МСК в дозе в 6 раз превышающей дозу ГСК ($31,73 \cdot 10^6$ МСК и $5,25 \cdot 10^6$ ГСК) были клинически более эффективны и индуцировали фибролиз соединительно-тканых септ в печени. Авторы связали такой результат не только с дозой МСК, но и с более широким потенциалом регуляторного воздействия МСК не только на гепатоциты, но и на непаренхиматозные синусоидальные клетки печени, т.к. МСК подобно этим клеткам имеют мезенхимальное происхождение.

Анализ результатов накапливающихся клинических исследований применения СПК (стволовые/прогениторные клетки) КМ для коррекции цирроза печени позволил констатировать, что в этих работах наряду с позитивной оценкой антифиброгенных свойств этих клеток, сообщается о наблюдениях, в которых процессы фиброзирования печени усиливались после

введении аутологичных МСК при тяжелой ПН [145]. Такая диаметрально противоположная оценка результатов использования клеточной терапии при ПН позволила связать их с воздействием ряда недоучтенных факторов и сформулировать соответствующие общие рекомендации [146, 147] по применению клеточной терапии для снижения ее неблагоприятного воздействия, особенно аутологичных МСК, обладающих более выраженными регуляторными свойствами, чем ГСК при использовании у больных с циррозом печени [138].

В частности рекомендуется: для снижения риска прогрессирования фиброза печени использовать не всю фракцию МСК, содержащую фиброгенные клетки, а использовать только CD133+ клетки; начинать возможно, более раннее применение МСК, еще на этапе развития активного гепатита В, когда признаки фиброзирования еще отсутствуют, поскольку МСК пациента по своим биологическим характеристикам еще не отличаются от аналогичных клеток здоровых людей и в организме еще не наступила необратимая перестройка в системе соединительной ткани печени; кроме того, предлагается использовать достаточно большой объем клеток (от миллиарда до, миллиона клеток на 1 кг массы тела больного), чтобы введенная масса клеток могла оказать мощное репаративное воздействие на паренхиму печени, сохранившиеся непаренхиматозные клетки и еще неизменный внеклеточный матрикс [148]; предлагается также при наращивании массы МСК использовать не более 3–5 культуральных пассажей, при которых сохраняется генетическая стабильность культивируемых клеток. Указывается, что требуемое количество МСК для терапии пациента с ХПН может быть получено из аспирата КМ объемом не более 10–15 мл [148, 149]; из трех способов трансплантации клеток пациенту – внутриартериальный, внутрипортальный и внутривенный предпочтительным считать, внутривенный способ во избежании тромбоэмболических осложнений, обусловленных имеющимися нарушениями свертываемости крови у больных ПН. До внедрения метода клеточной терапии в широкую клиническую практику лечения ХПН рекомендуется проводить

широкомасштабные двойные слепые клинические исследования, что позволит объективизировать полученный результат [150].

В последние годы для повышения эффективности клеточной терапии фибротических процессов в печени предлагается использовать не МСК взрослого человека, а МСК, выделенные из пупочного канатика человека, поскольку эти клетки обладают свойством сверхэкспрессии HGF [151].

Исследуется так же возможность повышения активности МСК при циррозе печени путем трансфекции этих клеток анти-апоптотическим Bcl-2 геном [152].

Таким образом, инфузию ККМ гемопоэтического и стромального ряда в настоящее время можно признать лишь как потенциально эффективный метод лечения хронической печеночной недостаточности и цирроза печени [153-155].

1.2.5 Терапия, индуцирующая генную регуляцию восстановительных процессов в печени. Роль микро-РНК

В последние годы стала интенсивно изучаться возможность направленного воздействия на ключевые гены, участвующие в патогенезе цирроза печени (TGF- β , PDGF- β , CTGF, TIMP), как на терапевтические мишени при циррозе печени. Было показано, что в роли ингибиторов экспрессии этих генов могут быть использованы антисенсорные олигонуклеотиды [156, 157] и малые интерферирующие РНК (siRNA) [26, 158, 159]. Многочисленные микроРНК (miRNAs) [96], участвуя в патогенезе фиброза и цирроза печени через регуляцию профибротических и антифибротических генов, также оказывают влияние на пролиферацию и активацию ЗК, и, следовательно, могут быть потенциально полезны при лечении фиброза [160]. Более того, для эффективного воздействия miRNAs на фиброгенные ЗК более коротким путем исследователи пытаются сделать

мишенями рецепторы профиброгенных белков, экспрессированных на ЗК печени [159-161] и ингибировать активность этих генов. Однако, установлено, что защитить печень от цирроза с помощью микро-РНК можно воздействуя не только на ЗК печени.

Показано, что супрессия miRNA-219-5p способствует активации фактора роста кератиноцитов (KGF), которая обеспечивает защиту от цирроза и усиливает восстановительную регенерацию печени [163]. Аналогичным образом супрессия miRNA-199 снижает тяжесть развития цирроза печени при использовании мезенхимальных стволовых клеток из пупочного кнатики человека за счет предварительной активации в этих клетках фактора роста кератиноцитов [164]. В настоящее время известно также, что различные miRNAs являются активными участниками не только повреждения и заместительной (фиброзирующей) регенерации, но и вносят существенный вклад в реализацию процессов восстановительной регенерации печени.

Обнаружено, что после частичной гепатэктомии введение рекомбинантной miRNA-203 в составе аденовирусной конструкции способствует активации пролиферативных процессов в печени путем экспрессии Ki-67 и усиления IL-5/SOCS-3/STAT-3 зависимых про-пролиферативных сигналов [165, 166]. Аналогичными свойствами обладает miRNA-27b [167] miRNA-26a [168], miRNA-34a [169] и многие другие микро-РНК, которые создают условия для реализации баланса про-пролиферативных и антипролиферативных фиброгенных эффектов при регуляции регенеративных ответов нормальной и патологически измененной печени [102]. При исследовании механизмов инициации процессов регенерации печени у крыс после частичной гепатэктомии печени [170] было показано, что в ранней фазе регенерации печени (через 2 ч. и 6 ч.) участвовало 23 miRNAs и что при этом была существенно изменена структура 278 белков. Протеомный анализ и анализ участвующих miRNAs позволил установить, что начальную фазу регенерации печени регулируют

8miRNAs: miRNAs-125a, -143, -150, -181c, -182, -183, -199a, -429 путем модуляции экспрессии генов белков, вовлеченных в различные регуляторные сети, которые являются критическими (ключевыми) для процессов жизнедеятельности клеток: для апоптоза, выживания клеток, функционирования клеточного цикла, воспалительного ответа, метаболизма и др. [170]. Проведенное исследование показало, что в раннюю фазу регенерации печени в регуляторной (молекулярной) сети клеток сначала возникают снижено регулируемые мишени-гены разных белков, которые индуцируют активацию соответствующих им miRNAs (target miRNAs), запускающих регенерационный процесс.

Таким образом, в основе терапевтической стратегии применения miRNA при регенерации печени лежит блокирование и/или стимуляция функциональных сетей соответствующими многочисленными кодирующими их miRNAs [171].

Между тем уже стало очевидным, что в регуляции регенерационных процессов в поврежденных органах одновременно принимают участие не только многочисленные miRNAs, но также РНК других классов [20, 97, 172], в том числе из разных классов белок некодирующих РНК: длинные некодирующие РНК-(lnc RNA) [21, 22, 24, 25] короткие интерферирующие РНК (siRNA) [27], короткие ядерные РНК [23] и т. д.

Изучение литературы последних лет позволяет убедиться в том, что общая РНК (oРНК), выделенная из ККМ, обладающих высоким регенерационным потенциалом, способна индуцировать восстановительные процессы в поврежденном костном мозге и восстанавливать в нем процессы кроветворения [16]. Однако в литературе до настоящего времени нет информации о способности oРНК клеток КМ, включающей в себя различные типы и классы РНК, регулировать регенерационные процессы в органах другого гистотипа, в частности в печени. Целесообразность изучения возможности регуляции восстановительных процессов в печени с помощью oРНК из ККМ связана не только с необходимостью повышения

эффективности регенерационного потенциала этих клеток, но также с необходимостью повышения надежности и безопасности клеточной терапии. Известно, что при использовании клеточного продукта - общей РНК из стволовых/прогениторных ККМ, а не самих ККМ, исключается опасность развития в организме реципиента жизнеугрожающих осложнений, связанных с мутациями и малигнизацией этих клеток. Кроме того, выявление в крови больших количеств РНК различных типов свидетельствуют также о достаточной устойчивости этих молекул и способности их сохранять свои регуляторные свойства, в том числе в патологически измененной среде организма больных [17].

Отсутствие в литературе сведений об эффективности и целесообразности применения оРНК из клеток костного мозга для коррекции острой и хронической ПН позволило нам сформулировать цель и задачи исследования, которые приведены в разделе «Введение».

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика проведенных исследований

Работа выполнена на 453 крысах-самцах породы Вистар весом 250-300 г. Из них на 10 крысах отработана методика выделения несортированной мононуклеарной фракции клеток костного мозга (далее - ККМ). На 25 крысах отработана технология получения общей РНК (оРНК) из ККМ и на 16 крысах установлена средняя эффективная доза оРНК. Отработана модель острой печеночной недостаточности (ОПН) путем обширной резекции печени (70-75%), n=20 и разработана модель хронического повреждения печени (n=30).

Методом адоптивного переноса изучена способность оРНК из ККМ к адресному переносу регенерационных сигналов в организм интактного реципиента при моделировании у донора субтотальной резекции печени (n=37).

На 175 крысах было проведено сравнительное изучение способности ККМ и оРНК из несортированной мононуклеарной фракции ККМ от здорового донора индуцировать восстановительные процессы в поврежденной печени после ее обширной резекции, На 130 крысах после моделирования хронического токсического повреждения печени (ХТПП) путем хронической заправки животных CCl_4 на фоне применения неполного адьюванта Фрейнда (токсическая модель) была изучена способность оРНК индуцировать фибролиз соединительнотканых септ и восстановительные процессы в поврежденной печени. Распределение животных по группам экспериментов представлено в Таблице 1.

Таблица 1 – Общий расход животных (крыс) при выполнении настоящего исследования. Распределение крыс по группам экспериментов

№	Группы экспериментов	Количество животных
1	отработка методики выделения из костного мозга несортированной моонуклеарной фракции клеток костного мозга (ККМ)	10
2	отработка технологии получения оРНК из ККМ, отработка средней эффективной дозы оРНК	41
3	отработка техники моделирования острой печеночной недостаточности и техники моделирования хронического токсического повреждения печени (ХТПП)	50
4	изучение способности оРНК из ККМ и ККМ к адресному переносу регенерационных сигналов методом адоптивного переноса	37
5	изучение способности оРНК из ККМ и ККМ индуцировать восстановительные процессы в печени при моделировании острой печеночной недостаточности (ОПН)	175
6	изучение способности оРНК из ККМ и ККМ индуцировать восстановительные процессы в ткани печени при моделировании ХТПП (цирроз печени)	140
Всего		453

Для выявления способности оРНК из ККМ к осуществлению регенераторных функций, подобных ККМ, было выполнено 3 серии экспериментов на 352 крысах (Таблица 2). В 1 серии на модели адоптивного переноса при оценке возможности оРНК адресно переносить регенерационные сигналы в поврежденный орган животные были разделены на 4 группы. Во 2 серии на 175 крысах, разделенных на 3 группы, исследовали способность оРНК из ККМ и ККМ в соответствующих дозах ускорять процесс регенерации печени после обширной резекции.

Таблица 2 - Распределение животных по сериям и группам опытов при изучении регуляторной активности оРНК из ККМ

№	Серии опытов	Группы опытов	Количество животных (крысы)
1	Изучение способности оРНК к переносу регенерационных сигналов в печень на модели адоптивного переноса	Донорская группа с моделированием частичной гепатэктомии	10
		Интактные реципиенты: оРНК из ККМ донора	12
		ККМ донора	10
		Физиологический раствор (ФР) - контроль.	5
2	Сравнительное изучение способности ККМ и оРНК ККМ индуцировать процессы восстановительной регенерации печени после обширной резекции (модель ОПН)	ОПН+ ФР (контроль)	25
		ОПН+ оРНК	25
		ОПН+ККМ	25
		Здоровые доноры - источник для получения ККМ и оРНК	100
3	Изучение способности общей РНК индуцировать восстановление структуры ткани печени в опытах с моделированием ХТПП	Создание модели ХТПП	100 (25 крыс погибли)
		ХТПП+ ФР	25
		ХТПП+ оРНК	25
		ХТПП+ККМ	25
		Здоровые доноры для получения ККМ и выделения из них оРНК	40
	Всего		352

В 3 серии на 140 крысах, разделенных на 3 группы, изучали способность оРНК индуцировать процессы восстановительной регенерации печени на модели хронического токсического повреждения печени, характеризующейся развитием фиброза и цирроза печени.

Все манипуляции с животными проводили в утренние часы (в период с 10 до 12 ч.), когда суточный ритм митотической активности клеток печени минимален, с соблюдением биоэтических принципов обращения с животными (грызуны), утверждённых Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005 г) и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утверждёнными приказом Минздрава России №708 от 23.08.2010 г.

2.2 Разработка протокола выделения общей РНК из клеток костного мозга

Выполнение протокола начинали с заблаговременного получения несортированной моноклеарной фракции клеток из аспирата КМ животного. Для этого под эфирным наркозом из костномозгового канала большеберцовых и бедренных костей крысы-донора получали клетки КМ путем аспирации их шприцом с иглой 18G, содержащим среду для забора (0.5 мл фосфатно-буферного раствора с 50 ЕД/мл гепарина и 0.25 мг/л гентамицина).

Суспензию клеток КМ центрифугировали при 1500 об/мин (350g) 5 минут, осадок клеток ресуспендировали в растворе для лизиса эритроцитов и тромбоцитов (114 мМ NH_4Cl , 7,5 мМ KHCO_3 , 100 мкМ EDTA) в течение 3 минут и повторно центрифугировали. Гемолизированный супернатант удаляли отсасыванием, а клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10 % телячью эмбриональную сыворотку

(«HyClonegold», USA), инсулин 0,4 мкМ, 0.25 мг/л гентамицина. Выделенные клетки представляли собой моноклеарную фракцию, преимущественно гемопоэтических клеток КМ, суммарный выход которых составлял $0,8-1,5 \times 10^7$ клеток.

Далее приступали к выделению оРНК из полученной несортированной моноклеарной фракции клеток КМ (далее ККМ) по методике Extract RNA, разработанной фирмой «ЕВРОГЕН» (Россия). К полученной фракции ККМ добавляли реагент Extract RNA из расчета 1 мл реагента на 1×10^6 клеток, предварительно подсчитанных в камере Горяева, инкубировали смесь 15 мин., периодически пипетируя) и центрифугировали при 13400 об/мин 10 мин. для удаления нерастворенных фрагментов.

Супернатант переносили в новую пробирку и приступали к разделению фаз. Для этого добавляли 0.2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента Extract RNA, инкубировали смесь в течение 5 мин. при комнатной температуре, периодически встряхивая образец; затем образец центрифугировали при 13400 об/мин в течение 15 мин. при комнатной температуре.

В ходе центрифугирования происходило разделение смесей на три фазы: нижнюю органическую: фенол - хлороформную фазу желтоватого оттенка, интерфазу белого цвета и верхнюю бесцветную водную фазу. оРНК находится в верхней водной фазе, которую аккуратно собирали и переносили в чистую пробирку.

Затем приступали к непосредственному выделению оРНК. Для этого в водную фазу добавляли 0.5 мл 100% изопропанола на каждый 1 мл использованного реагента (Extract RNA). Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. и центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 мин. при комнатной температуре. Затем аккуратно, по стенке пробирки, добавляли 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола, использованного ранее. Полученный образец центрифугировали на максимальной скорости (13400 об/мин) в течение 5 минут. Удаляли этанол пипеткой и осадок, выделенной РНК, растворяли в 1

мл воды и определяли концентрацию оРНК в 100 мкл образца на спектрофотометре Shimadzu UV-2600 (Япония) при длине волны 260 нм.

Из каждых $35,0 \times 10^6$ выделенных моноклеарных клеток КМ получали от 115,5 – до 160 мкг оРНК, что в среднем составило $148,5 \pm 22,3$ мкг.

Далее из этого концентрированного раствора оРНК готовили рабочие растворы оРНК, требуемой концентрации для введения в организм животного. Эффективная доза оРНК колебалась от 15 мкг/100 г веса до 60 мкг/100 г веса и в исследуемых сериях экспериментов она составляла в среднем 30 ± 5 мкг/100 г. веса животного (при определении эффективной дозы оРНК использовали метод адоптивного переноса разных доз оРНК – 15, 30, 45 и 60 мкг/100 г веса животного и в срезах печени крыс-реципиентов через 48 часов определяли митотический индекс – МИ, см. раздел 2.3.1).

2.3 Модели, для изучения способности общей РНК, выделенной из клеток костного мозга, к адресному переносу регенерационной информации и активации восстановительных процессов в поврежденном органе

2.3.1 Модель острой печеночной недостаточности (модель обширной резекции печени)

У крыс, наркотизированных ингаляционно диэтиловым эфиром, с соблюдением правил асептики и антисептики моделировали острую печеночную недостаточность (ОПН) путем обширной резекции печени. Для этого вскрывали брюшную полость, выводили печень в рану и последовательно накладывали лигатуры на основания срединной, левой боковой и правой верхней долей печени, после чего их удаляли (всего 70-75% общей массы печени).

Модель была использована для изучения способности оРНК, выделенной из ККМ интактного животного стимулировать восстановительную регенерации резецированной печени.

Работу выполняли на крысах-самцах породы Вистар (n=175), у 75 из которых воспроизводили модель обширной резекции печени (ОРП). Все животные после ОРП были разделены на три группы; 1 группа - контрольная (n=25) без применения терапии (только введение физиологического раствора); 2 группа – опытная (n=25), в которой через 3-5 часов после ОРП внутрибрюшинно однократно вводили общую суммарную РНК (оРНК), приготовленную из несортированной моноклеарной фракции клеток костного мозга (ККМ) здоровых крыс-доноров. ОРНК применяли в дозе 30мкг/100г веса животного для ранней активации восстановительных процессов в резецированной печени; 3 группа – опытная (n=25), в которой через 3-5 часов после ОРП внутрибрюшинно однократно вводили моноклеарную фракцию клеток КМ в дозе $30-35,0 \times 10^6$ клеток на крысу.

Эффективность индукционного воздействия оРНК на процессы восстановительной регенерации печени после ОРП оценивали по митотической и пролиферативной активности гепатоцитов в остатке печени через 24, 36, 48 и 72 часа, а также на 5, 7 и 10 сутки после ОРП в опытах 1, 2 и 3 группы экспериментов. Влияние оРНК на процессы восстановления печёночного гомеостаза в организме в ранние сроки после ОРП оценивали путём динамического измерения в сыворотке крови общего белка, общего билирубина и печёночных ферментов цитолиза (АлАТ, АсАТ и ЩФ). Влияние оРНК на темп преодоления критической массы остатка печени и восстановления его до исходных значений после ОРП исследовали динамически в течение 28 суток.

2.3.2 Модель адоптивного переноса для выявления переноса адресных регенерационных сигналов

Для доказательства способности суммарной РНК из ККМ при повреждении печени осуществлять перенос регенерационной информации использовали экспериментальные модели адоптивного переноса [173] и обширной резекции печени (70%), которая, как известно, сопровождается активацией механизмов гипертрофической регенерации с выраженной митотической активностью в оставшейся части органа [174]. Через 12 часов после моделирования ОПН, когда в КМ доноров (n=10) появлялись морфогенетически активные клетки, у животных забирали свежесекретированные проактивированные ККМ и исследовали их приобретенную способность к адоптивному переносу в 3 группах опытов с интактными крысами - реципиентами. Контролем служили интактные крысы с введением 1,0 мл физиологического раствора (группа 1, n=5). В группе 2 (n=10) из свежесекретированных проактивированных ККМ выделяли оРНК и вводили её внутрибрюшинно интактным крысам в дозе 30 ± 5 мкг/100 г. веса животного. В группе 3 (n=12) внутрибрюшинно вводили проактивированные ККМ в дозах ($2,5 \times 10^6$; 5×10^6 ; $3,5 \times 10^7$ на крысу).

В печени реципиента и в почках того же реципиента (для доказательства адресности переноса регенерационных сигналов) изучали митотическую и пролиферативную активность гепатоцитов и клеток канальцевого эпителия на различных сроках (12, 24, 36, 48, 72 часов) после введения ККМ и общей РНК, выделенной из ККМ.

2.3.3 Модель хронического токсического повреждения печени

Модель хронического токсического повреждения печени (ХТПП), характеризующаяся развитием фиброза и цирроза ткани печени, создавали по разработанному нами оригинальному методу (патент № 2633296) путем подкожного введения крысам 60% масляного раствора CCl_4 в сочетании с внутрибрюшинным введением неполного адьюванта Фрейнда.

Схема введения: сначала в первые 2 недели вводили раствор CCl_4 по 0,5 мл на 100 г веса животного 2 раза в неделю с интервалом 3-4 дня, а затем в течение следующих 2 недель по 0,3 мл на 100 г веса животного 2 раза в неделю с интервалом 3-4 дня; далее в течение последующих 3 недель осуществляли введение 60% масляного раствора CCl_4 в дозе 0,5 мл на 100 г веса 1 раз в неделю и дополнительно внутрибрюшинно вводили 1 мл неполного адьюванта Фрейнда 1 раз в неделю в объеме 1 мл, причем неполный адьюванта Фрейнда вводили за сутки до введения 60% масляного раствора CCl_4 . В процессе моделирования погибло 25 животных и к концу затравки выжило 75 животных. Все выжившие крысы, были разделены на 3 группы: группа 1, контрольная (n=25) с однократным введением ФР через 7 сут. после моделирования ХТПП, опытная группа 2 (n=25) - через 7 сут. после моделирования ХТПП внутрибрюшинно однократно вводили оРНК из ККМ здорового животного в эффективной дозе 30 мкг/100 гр. веса животного; опытная 3 группа (n=25) – через 7 сут. после окончания моделирования ХТПП вводили ККМ в дозе $30,0 \times 10^6$ клеток. Контроль состояния восстановительных процессов в печени осуществляли: через неделю, 3, 6 и 9 месяцев после окончания моделирования ХТПП по динамике восстановления показателей функций печени и уменьшения структурных нарушений.

2.4. Методы исследования

2.4.1 Подготовка биопсийных препаратов ткани печени для гистологического исследования.

Эффективность регенерационных процессов под влиянием ККМ (мононуклеарные клетки) и общей РНК, выделенной из ККМ оценивали морфологически на гистологических препаратах печени экспериментальных животных. Для этого у животных под эфирным наркозом, извлекали фрагмент средней доли печени, разрезали его на кусочки размерами 3x4x5 мм и помещали в раствор Буэна (через 24 часа раствор Буэна меняли на 70% этанол) для фиксации. После завершения фиксации кусочки промывали в проточной воде в течение 2-3 ч, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм наклеивали влажным способом на стекла с поли-L-лизиновым покрытием («Thermo», США). Затем препараты высушивали в течение 48 ч в термостате при 37°C, депарафинировали, регидратировали и окрашивали срезы гематоксилином и эозином и по Массону.

2.4.2 Определение пролиферативной активности и митотического индекса в ткани печени

После окрашивания препаратов гематоксилином и эозином изучали митотическую активность гепатоцитов, используя микроскоп фирмы Leica DMLS (Германия). Для этого в 30 полях зрения определяли количество митотически делящихся клеток, а затем рассчитывали митотический индекс (МИ) в промилле, (‰) на разных сроках после выполнения резекции печени. Выраженность пролиферативной активности гепатоцитов печени оценивали также иммуногистохимически с помощью антител Ki-67, являющихся маркерами ядерного антигена пролиферирующих клеток, и путём подсчёта общего количества гепатоцитов в исследуемых полях зрения.

2.4.3 Определение массы печени как показателя восстановительной регенерации печени

Влияние общей РНК на темп преодоления критической массы остатка печени после субтотальной резекции и восстановление массы печени до исходных значений после моделирования ОПН исследовали в течение 28 суток. Для этого у каждого оперированного животного сразу после субтотальной резекции взвешивали резецированную часть печени, которую принимали за 70% от общей массы печени; затем на основании этих измерений рассчитывали исходную массу печени для каждого животного. Далее на каждом исследуемом сроке иссекали остаток оставшейся печени, путём взвешивания определяли его массу и сравнивали её с рассчитанной исходной массой печени для данного животного.

2.4.4 Биохимические методы исследования

Биохимическими методами в сыворотке крови оперируемых животных исследовали содержание ферментов цитолиза гепатоцитов: аланин – аминотрансферазы (АлАТ), аспарагин – аминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ), а также содержание общего белка и общего билирубина для характеристики тяжести печеночной недостаточности и контроля сроков восстановления печеночного гомеостаза. Для этого у крысы под эфирным наркозом надсекали кончик хвоста, пипеткой забирали кровь (28-32 мкл) и наносили ее на специальные тест-полоски Reflotron™, которые сразу же устанавливали в биохимический анализатор Reflotron™ («Roche», Швейцария) (Принцип измерения – рефлексивная фотометрия, точность измерения – $\pm 0.5\%$, воспроизводимость – $\leq 0.2\%$, линейность: $\pm 0.05\%$). Полученные результаты сравнивали с показателями нормы.

2.5 Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов производили на персональном компьютере с использованием специального статистического пакета Biostat; достоверность различий между сравниваемыми группами оценивали по параметрическому критерию t- Стьюдента с учетом поправки Бонферони. В таблицах приведены средние значения величин, где \pm стандартное отклонение (SD). Различия считали достоверными при $p < 0,05$ (Статистический пакет рекомендованный ВОЗ EpiInfo 5.0).

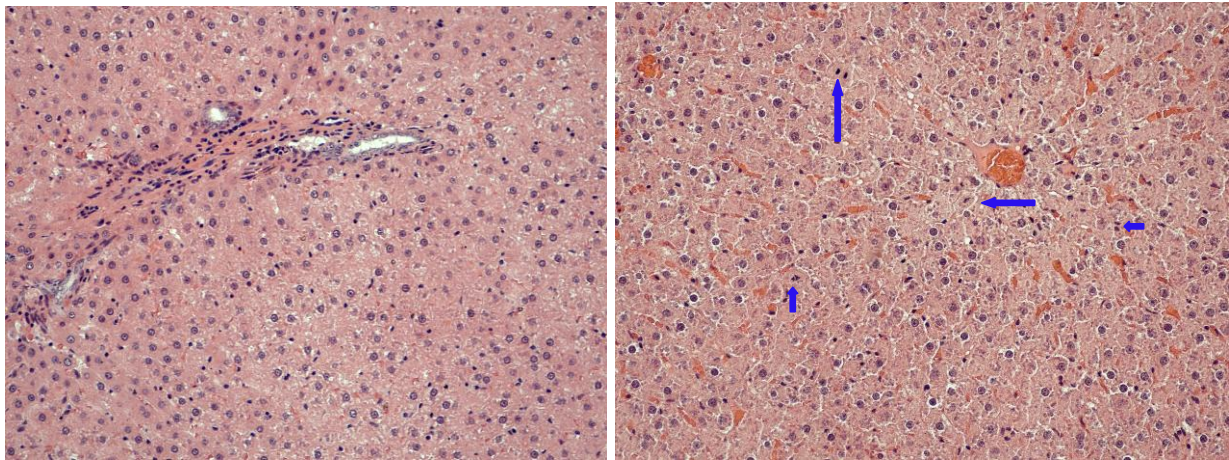
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Приступая к изучению способности общей РНК из моноклеарных клеток костного мозга индуцировать восстановительные процессы в поврежденной печени нам необходимо было, прежде всего, установить, содержит ли общая РНК в своем составе такие сигнальные молекулы РНК, которые способны выполнить функции переносчиков адресных регенерационных сигналов при повреждении печени.

3.1 Изучение способности общей РНК моноклеарных клеток костного мозга служить переносчиком адресных регенерационных сигналов при повреждении печени

Результаты адоптивного переноса донорского материала - фракции моноклеарных ККМ, активированных обширной резекцией, изучали на интактных реципиентах в 3 группах опытов: 1 группа- контроль после введения физиологического раствора; группа 2 после введения общей РНК, выделенной из активированных ККМ и группа 3 после введения самих активированных клеток костного мозга интактным реципиентам. Наше исследование показало, что в группе 1 и в группе 3 на всех исследуемых сроках и при использовании разных доз активированных ККМ достоверные изменения митотической активности гепатоцитов в печени и канальцевого эпителия в почках неоперированных крыс-реципиентов отсутствуют: значения МИ для печени и почек не превышали $\sim 0,02 \pm 0,01\%$ (0-2 митоза на 30 полей зрения), и также как и в группе 1 (введение физиологического раствора, контроль) не отличались от исходных значений. Однако, в отличие от группы 1 в группе 3 на сроках 48 и 72 часа при введении разных доз клеток нами было диагностировано появление в ткани печени только

клеточной инфильтрации (рисунок 1А), свидетельствующей о появлении в организме неоперированных реципиентов гепатоспецифических сигналов.



А

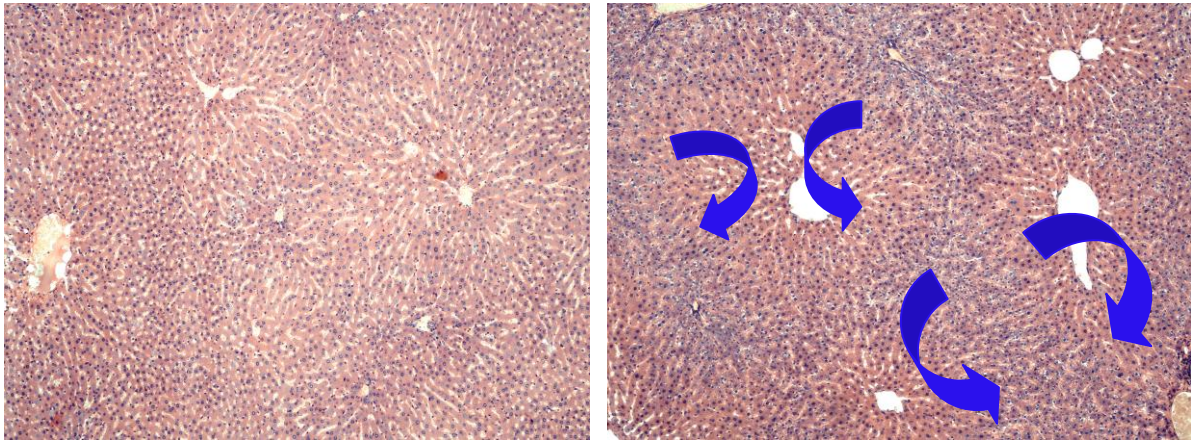
Б

Рисунок 1 Сравнительная гистологическая картина печени здоровой крысы через 48 часов после введения донорского материала от крысы с 70% гепатэктомией: А) – после введения мононуклеарных клеток костного мозга ($3,5 \times 10^7$ кл.). Умеренная лимфоидно-клеточная инфильтрация. Митозов нет; и Б) – после введения оРНК из мононуклеарных клеток костного мозга (30мкг/100г.). Проллиферативная активность гепатоцитов в печени. Митозы в паренхиме печени (указаны стрелками). Гематоксилин и эозин, ув. x 200.

Отсутствие подъёма митотической активности гепатоцитов в печени здоровых крыс-реципиентов на введение активированных гепатэктомией мононуклеарных ККМ, в том числе в больших дозах, было для нас неожиданным. Мы полагали, что, если на введение лимфоцитов селезёнки донора, предварительно активированных частичной гепатэктомией, в организме реципиента достоверно возрастает митотическая активность не только гепатоцитов, но и клеток Купфера [173], то аналогичного повышения митотической активности гепатоцитов в печени реципиента следует ожидать и после введения им ККМ, активированных в организме донора 70-75% гепатэктомией.

Однако, достоверный подъём митотической активности гепатоцитов в печени здоровых крыс-реципиентов и его последующее снижение было выявлено нами только в группе 2 на сроках 48 и 72 часа, где МИ составил $0,7 \pm 0,2\%$ (митозы выявлялись в 5-7 из 30 исследуемых полей зрения) и $0,5 \pm 0,2\%$ (митозы выявлялись

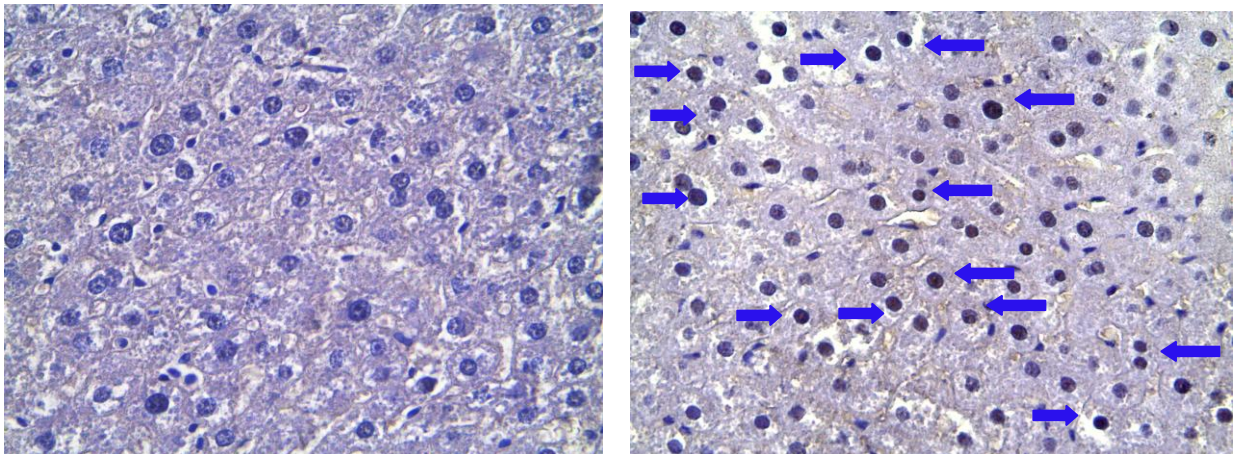
в 3-4 из 30 исследуемых полей зрения) соответственно, при $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем (рисунок 1Б). Кроме того, важно отметить, что в группе 2 с введением оРНК, также, как и в группе 3 с введением моноклеарных ККМ, на сроках 48 и 72 часа нами в ткани печени также диагностировалась клеточная инфильтрация. Примечательно, что всплеск митотической активности гепатоцитов в печени именно через 48 часов был отмечен другими исследователями в опытах с выполнением у животных истинной субтотальной резекции печени [174]. Между тем, в почках крыс-реципиентов группы 2 на сроках 48 и 72 часа достоверного повышения митотической активности клеток почечного эпителия выявлено не было, хотя известно, что после выполнения односторонней нефрэктомии в организме донора и переносе донорских лимфоцитов (спленоцитов) реципиенту, через 48 час в его организме отмечается максимум митотической активности клеток канальцевого эпителия. При исследовании пролиферативной активности гепатоцитов в группе 2 было установлено, что в гистологических препаратах на этом сроке, по сравнению с контролем (группа 1), определяется достоверно большее количество молодых гепатоцитов (клетки малого размера) - $452 \pm 7,66$ против $320 \pm 36,13$ ($p \leq 0,05$), которые располагаются преимущественно по периферии печёночной дольки (рисунок 2). Иммуногистохимическое исследование с помощью маркера Ki67 также подтвердило, что на сроке 48 часов пролиферативная активность клеток существенно возросла в печени крыс группы 2 (рисунок 3А и Б), но на сроке 72 часа пролиферативная активность снижалась также, как и митотическая активность к этому сроку. Возможно, что спад митотической и пролиферативной активности гепатоцитов через 72 часа после введения оРНК наступает в результате активации другой популяции лимфоцитов, обладающей супрессорными свойствами, индукция которых возникала при переносе морфогенетически активных лимфоцитов селезёнки [173]. Не исключено, что этот эффект может быть связан с наступающей к этому сроку элиминацией индуцированных оРНК регенерационных факторов из организма здоровых крыс-реципиентов.



А

Б

Рисунок 2 Сравнительная гистологическая картина печени здоровой крысы через 48 часов: А) – после введения физ. раствора (контроль) и Б) – после введения оРНК из мононуклеарных клеток костного мозга крысы с 70% гепатэктомией. Молодые гепатоциты в периферической зоне печеночной дольки (указаны стрелками). Гематоксилин и эозин, ув. x 100.



А

Б

Рисунок 3. Сравнительная гистологическая картина экспрессии Ki 67 в печени здоровой крысы через 48 часов: А) – после введения физ. раствора (контроль) и Б) – после введения оРНК из мононуклеарных клеток костного мозга крысы с 70% гепатэктомией. Иммуногистохимическое исследование. Многочисленные позитивно окрашенные гепатоциты (указаны стрелками). Ув. x 400.

Появление выраженной пролиферативной и митотической активности гепатоцитов в печени крыс-реципиентов группы 2 и отсутствие аналогичного эффекта в печени крыс-реципиентов после введения им активированных ККМ

(группа 3), по-видимому, можно связать с существующей в организме клеточной специализацией, в том числе и при формировании регенерационного процесса, в котором клетки костного мозга – центрального органа иммуногенеза-выполняют роль аккумулятора и преобразователя регенерационных сигналов, поступающих из очага повреждения, а исполнителями этого процесса уже выступают зрелые активно мигрирующие информированные лимфоциты периферической иммунной системы – лимфоциты из лимфоузлов и селезёнки, но не мононуклеарные ККМ [173]. В роли молекул, обеспечивающих информационный обмен, выступают различные типы РНК, которые доставляются в очаг повреждения с помощью лимфоцитов [16, 175, 176]. Индукция митотической и пролиферативной активности именно гепатоцитов в печени неоперированных реципиентов после введения им общей РНК из активированных мононуклеарных ККМ крыс с 70-75 % гепатэктомией указывают на тот факт, что активированные ККМ не только воспринимают, аккумулируют и формируют тканеспецифические регенерационные сигналы, но и способны реализовать их адресную доставку с помощью общей РНК, после выделения её из этих клеток.

Отсутствие достоверных изменений в митотической активности клеток канальцевого эпителия почек у крыс-реципиентов в исследованных группах на всех сроках подтверждает тот факт, что перенос регенерационных сигналов, аккумулированных в общей РНК из активированных мононуклеарных ККМ от крыс-доноров с резекцией печени, является адресным тканезависимым механизмом.

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что- общая РНК, выделенная из активированных гепатэктомией мононуклеарных клеток костного мозга, в дозе 30 мкг/100 г веса животного аккумулирует и адресно переносит регенерационные (пролиферативные) сигналы именно в ткань печени после моделирования частичной гепатэктомии.

- активированные моноклеарные клетки костного мозга в использованных дозах напрямую не индуцируют и не переносят регенерационные сигналы в ткань печени после моделирования гепатэктомии.

3.2 Использование общей РНК из моноклеарных клеток костного мозга для индукции процессов восстановительной регенерации в печени после обширной резекции

Обширную резекцию печени (ОРП) относят к критической травме (удаляют до 70-75 % и более общей массы печени), т.к. послеоперационный период часто сопровождается клиническими проявлениями пострезекционной острой печёночной недостаточности (ОПН), которая уже к концу первых суток наблюдается у 13-25,8% пациентов, а показатель смертности у этой категории больных в раннем послеоперационном периоде достигает 7% [177].

Развитие ОПН в раннем пострезекционном периоде связывают со стрессорным ингибированием процессов обновления и пролиферации клеток в малом остатке печени, а также с резкой гиперфункцией сохранившихся клеток. Гистологически синдром малого остатка печени проявляется в течение первых 30 часов усилением клеточного повреждения и развитием временного блока митотической активности гепатоцитов [181]. Отмечено, что отчётливые признаки пролиферативной активности клеток печени после ОРП (увеличение митотической и пролиферативной активности) появляются лишь через 48 часов после выполнения этой операции [35] и эта запоздалая, отодвинутая во времени, активация восстановительных процессов в малом остатке печени лежит в основе развития клиники тяжёлой ОПН и летальных исходов у пациентов после ОРП.

В настоящем разделе работы мы поставили цель изучить способность оРНК, выделенной из моноклеарной фракции клеток КМ здорового аллогенного донора, эффективно индуцировать процессы восстановительной регенерации в печени для ускоренного преодоления её критической массы и предотвращения гибели животных после ОРП.

В процессе выполнения исследования нами было установлено, что из 75 крыс, у которых моделировали ОРП, погибло 5 животных в течение первых 5-ти суток после резекции печени и общая летальность составила 6,7%. Однако все животные, погибшие после ОРП, относились к 1-контрольной группе (без специальной терапии, n = 25) и внутри этой группы летальность составила 20%. Во 2 и 3-опытных группах летальность отсутствовала в течение всего срока наблюдения. Отсутствие летальности в этих группах сопровождалось более высоким темпом восстановления печёночного гомеостаза в организме, что выражалось в более ранней нормализации показателей общего белка и цитолитических ферментов в сыворотке крови (Таблицы 3, 4, 5).

Таблица 3 - Динамика изменения общего белка, общего билирубина и ферментов цитолиза клеток печени (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в группе 1 контроль после ОРП и введения физиологического раствора (ФР) (n=20).

Сроки наблюдения (сутки)	Группа 1 (контроль, ФР), n=20				
	АсАТ	АлАТ	ЩФ	Билирубин общий	Белок общий
Исход	58±8	40±6	240±24	0,0±1,67	98±20
2	570±29*	310±10*	1102±21*	10,2±2*	21±16*
3	490±20*	320±21*	1009±29*	12,3±1,5*	24±11*
5	420±27*	290±18*	982±22*	10,8±1,3*	36±13*
7	360±24*	282±15*	893±24*	9,0±1,9*	41±9*
10	299±22*	269±18*	760±24*	8,3±2*	45±6*
14	220±16*	241±13*	640±20*	6,5±1*	51±7*

*-p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем.

Таблица 4 - Динамика изменения общего белка, общего билирубина и ферментов цитолиза клеток печени (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в группе 2 после ОРП и введения оРНК (n=25).

Сроки наблюдения (сутки)	Опытная группа 2 (оРНК), n=25				
	АсАТ	АлАТ	ЩФ	Билирубин общий	Белок общий
Исход	58±8	40±6	240±24	0,0±1,67	98±20
2	323±20*	76±17*	887±30*	6,9±1,3*	48±17*
3	293±18*	88±18*	632±28*	6,5±1,2*	52±16*
5	238±19*	78±19*	460±32*	5,1±1,1*	57±16*
7	115±11*	69±6*	346±26*	3,1±1*	60±7*
10	82±12*	58±16	257±15	2,7±0,9*	68±8*
14	66±7	44±6	230±14	1,9±0,8	84±12

*- $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем

Таблица 5 - Динамика изменения общего белка, общего билирубина и ферментов цитолиза клеток печени (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в группе 3 после ОРП и введения ККМ (n=25).

Сроки наблюдения (сутки)	Опытная группа 3 (мККМ), n=25				
	АсАТ	АлАТ	ЩФ	Билирубин общий	Белок общий
Исход	58±8	40±6	240±24	0,0±1,67	98±20
2	350±10*	122±27*	910±17*	8±2*	36±16*
3	340±12*	119±16*	670±15*	7,1±1,8*	45±10*
5	290±15*	102±21*	486±16*	6,8±1,0*	51±18*
7	150±23*	97±15*	370±13*	4,3±1,3*	54±8*
10	100±12*	79±6*	310±19*	2,9±0,6*	65±5*
14	70±9	61±5*	250±12	2,3±0,2*	88±7

*- $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем

В таблицах 3-5 представлены результаты динамического изучения АсАТ, АлАТ, ЩФ, общего билирубина и общего белка в сыворотке крови крыс после моделирования ОРП в 1 контрольной группе (ОРП + введение физиологического раствора, Таблица 3), во 2 опытной группе (ОРП + введение оРНК, Таблица 4) и в 3 опытной группе (ОРП + введение ККМ, Таблица 5). Из таблицы 3 видно, что в контроле показатели цитолиза у выживших животных резко и неуклонно нарастали в течение первых 5 суток после ОРП, затем стабилизировались и начиная с 10 - 14 суток появлялась отчётливая тенденция их нормализации. Показатели общего белка в течение первых двух суток были резко снижены и начиная с 5 - 7 суток уровень белка в сыворотке крови постепенно увеличивался, но не достигал исходных значений нормы до конца наблюдений (14 сутки) В опытной группе, где после ОРП вводили оРНК (Таблица 4), показатели цитолиза после ОРП нарастали только в течение 1 - 3 суток, но уже к 5 суткам наступало отчётливое снижение цитолитической активности всех исследованных печёночных ферментов в сыворотке крови крыс, которое было достоверным по сравнению с контролем. В результате в опытной группе с введением оРНК нормализация исследуемых показателей в крови наступала к 10 – 14 суткам, тогда как в контрольной группе нормализации не наступало до 14 суток. Восстановление уровня общего белка в сыворотке крови в опытной группе с введением оРНК также происходило в более высоком темпе с восстановлением этого показателя к концу наблюдения. В опытной группе с введением ККМ (Таблица 5), исследуемые показатели изменялись аналогично тем, которые имели место в группе с введением оРНК: показатели цитолиза нарастали в течение первых 3 суток, затем стабилизировались и восстанавливались к 10 – 14 суткам. Сниженный уровень общего белка после ОРП также восстанавливался к концу срока наблюдений (14 суткам). Более высокий темп нормализации показателей печёночного гомеостаза в организме в группах с применением оРНК и ККМ был обусловлен достоверно более высокой активностью пролиферативных процессов в малом остатке печени после резекции.

Исследование митотической активности гепатоцитов из остатка резецированной печени позволило установить её активацию через 48 часов после моделирования ОРП во всех трех исследуемых группах, по сравнению с исходным уровнем: исходный уровень митотической активности, оцениваемый до резекции печени по митотическому индексу (МИ), составил 0,2-0,3 промилле ‰ - (1-2 митоза на 30 полей зрения). Однако, через 48 часов после ОРП выраженность активации МИ в исследуемых группах была разной: в 1-ой контрольной группе МИ составил 5,378‰ (на 6693 клетки определялось 36 митозов), во 2-ой опытной группе МИ составил 23,45 ‰ (на 9678 клеток определялось 227 митозов, т.е. во 2-группе МИ был приблизительно в 5 раз выше, чем в 1-ой контрольной группе: в 3-ой опытной группе МИ составил 6,96‰ (на 8448 клеток определялось 60 митозов). Через 72 часа после моделирования ОРП МИ во всех исследуемых группах оставался на более высоком уровне по сравнению с исходным, но изменился по сравнению с 48 часами: в 1-ой контрольной группе МИ снизился и составил 3,7‰, во 2-ой опытной группе МИ составил 6,36‰, в 3-ой опытной группе МИ составил 10,33‰, т.е. в 1 и 2 группах МИ на 48 часов имел максимальные значения, затем начинал снижаться, тогда, как в 3 группе МИ достиг максимальных значений в 72 часа (Таблица 6 и рисунок 4).

Таблица 6 - Динамика изменения митотического индекса после выполнения ОРП и введения: физиологического раствора (контроль), оРНК и ККМ.

Митотический индекс (МИ) ‰						
Сроки наблюдения	0 Исход	2 дня	3 дня	5 дней	7 дней	10 дней
Контроль (1 гр)	0,2-0,3	5,38	3,7	1,2	0,43	0,33
оРНК (2 гр)		23,45	6,36	0,79	0,2	0
ККМ (3 гр)		6,96	10,33	6,2	0,8	0,2

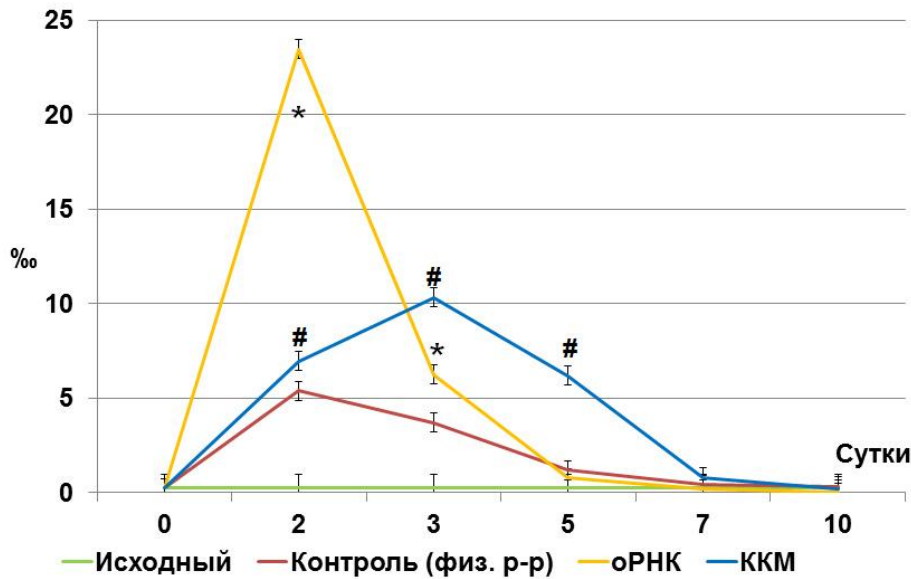


Рисунок 4. Динамика изменения митотического индекса в печени крыс после ОРП: в контрольной группе, в группе с введением oPHK и с введением ККМ.

* $p < 0,05$ по сравнению с 1-ой контрольной группой; # $p < 0,05$ по сравнению с группами 1 и 2.

Таким образом, ОРП во всех группах опытов индуцировала повышение митотической активности гепатоцитов, однако во 2 группе при введении oPHK она была наиболее выраженной и более ранней (на сроке 48 часов) по сравнению с 3 группой, где МИ оставался в два раза меньшим по сравнению со 2 группой. Более высокую митотическую активность клеток печени через 48 часов после ОРП во 2 группе иллюстрирует рисунок 5.

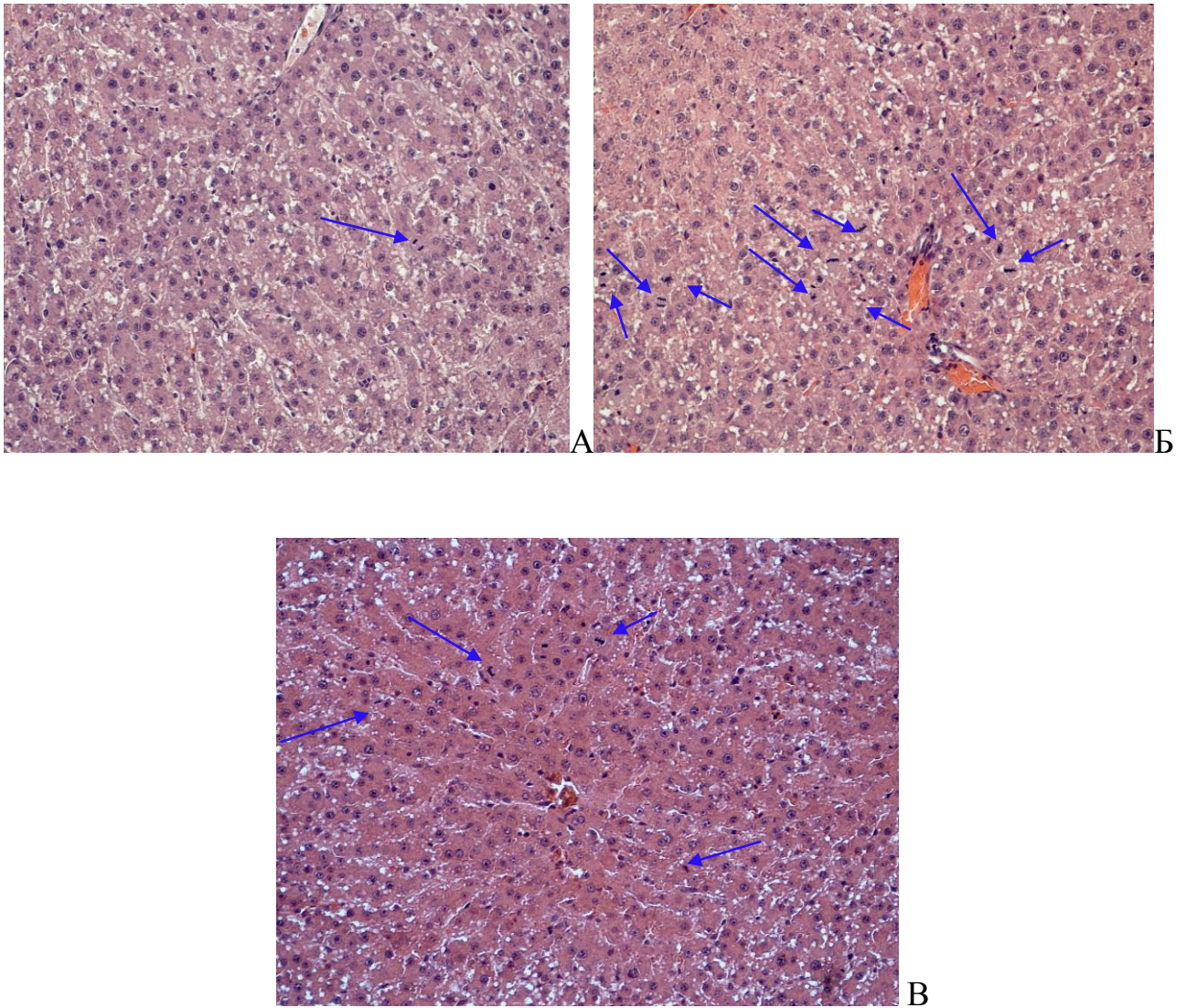


Рисунок 5. Митотическая активность гепатоцитов через 2 суток после ОРП в исследуемых группах: А – контроль (ФР), Б – группа 2 (оРНК), В – группа 3 (ККМ). Гематоксилин и эозин, ув. х 200. Стрелками указаны гепатоциты в стадии митоза.

Повышение митотической активности в 3 группе через 72 часа наглядно видно на рисунке 6.

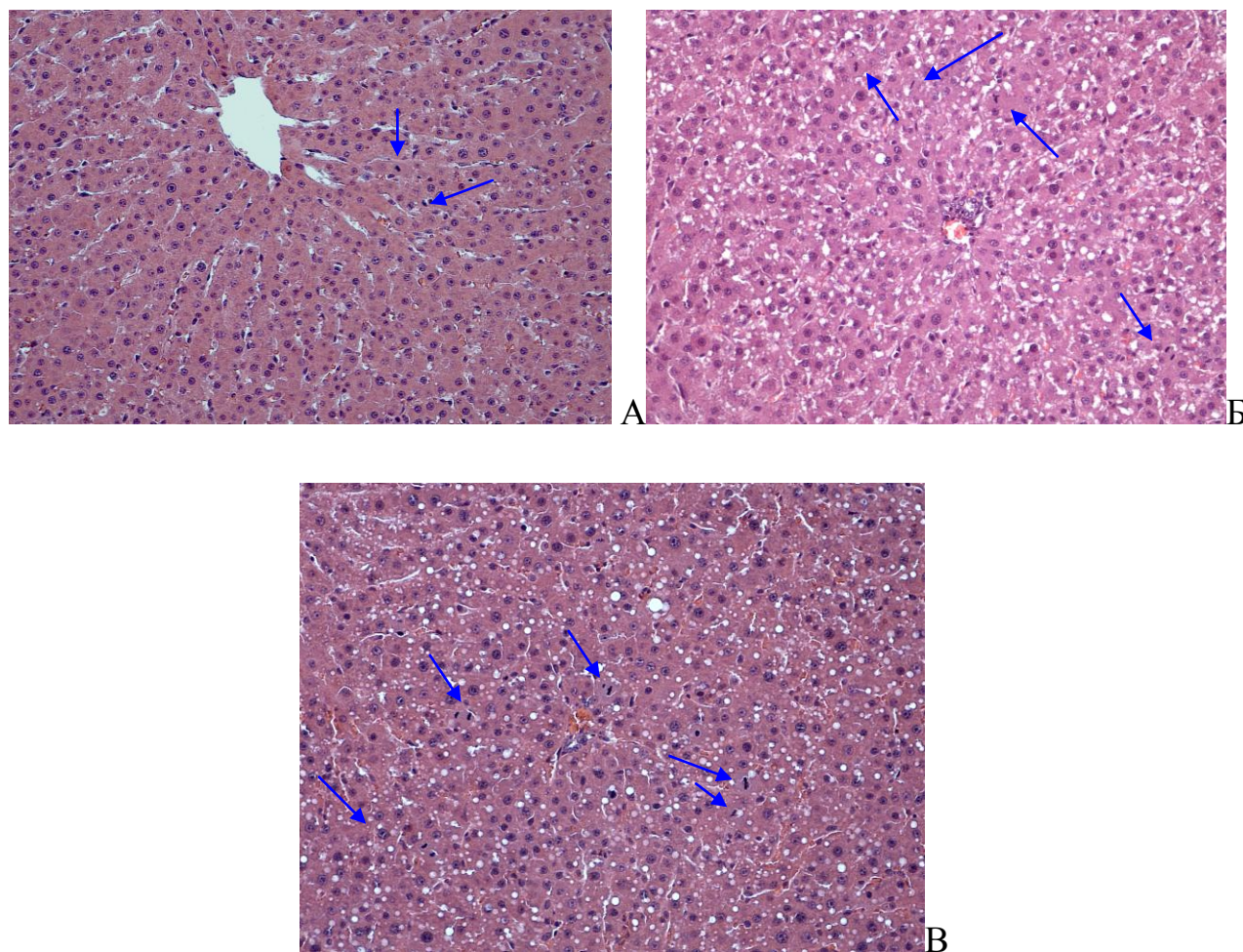


Рисунок 6. Митотическая активность гепатоцитов через 72 часа после ОРП и введения: А – ФР (контроль), Б – оРНК из ККМ, В – ККМ. Гематоксилин и эозин, ув. х 200. Стрелками указаны гепатоциты в стадии митоза.

Сравнительное изучение митотической активности гепатоцитов в 1, 2 и 3 группах в течение последующих 10 суток после ОРП представлено в таблице 6 и на рисунке 4. Из полученных результатов изучения митотической активности следует, что ОРП сама по себе индуцирует пролиферативную активность гепатоцитов, а применение оРНК и ККМ усиливают пролиферативную активность клеток, причем оРНК оказывала наиболее мощное индукционное воздействие на пролиферацию гепатоцитов в малом остатке печени.

Более высокая митотическая активность гепатоцитов во 2 группе нашла отражение в ускоренном темпе восстановления массы печени после ОРП.

В таблице 7 и рисунке 7 представлена динамика восстановления массы печени в трех исследуемых группах.

Таблица 7 – Динамика восстановления массы печени после ОРП в контрольной группе, в группе с введением оРНК и в группе с введением ККМ.

Группы опытов	Сроки наблюдения							
	0	3 дня	5 дней	7 дней	10 дней	14 дней	18 дней	22 дня
Контроль n=20	13,7±2,3	9,4±0,2	9,6±0,1	8,8±0,2	9,7±0,23	11,6±0,31	12,5±0,7	13,5±0,2
оРНК n=25		8,1±0,15*	8,5±0,2	9,4±0,1*	11,4±0,15*	13,5±0,25*	13,7±0,3	13,7±0,1
ККМ n=25		8,6±0,17*	9,0±0,1*	9,0±0,2	10,1±0,15	12±0,12	13,3±0,2	13,7±0,1

**-p<0,05 по сравнению с контролем на том же сроке*

ДИНАМИКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ МАССЫ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ОБШИРНОЙ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ (граммы).

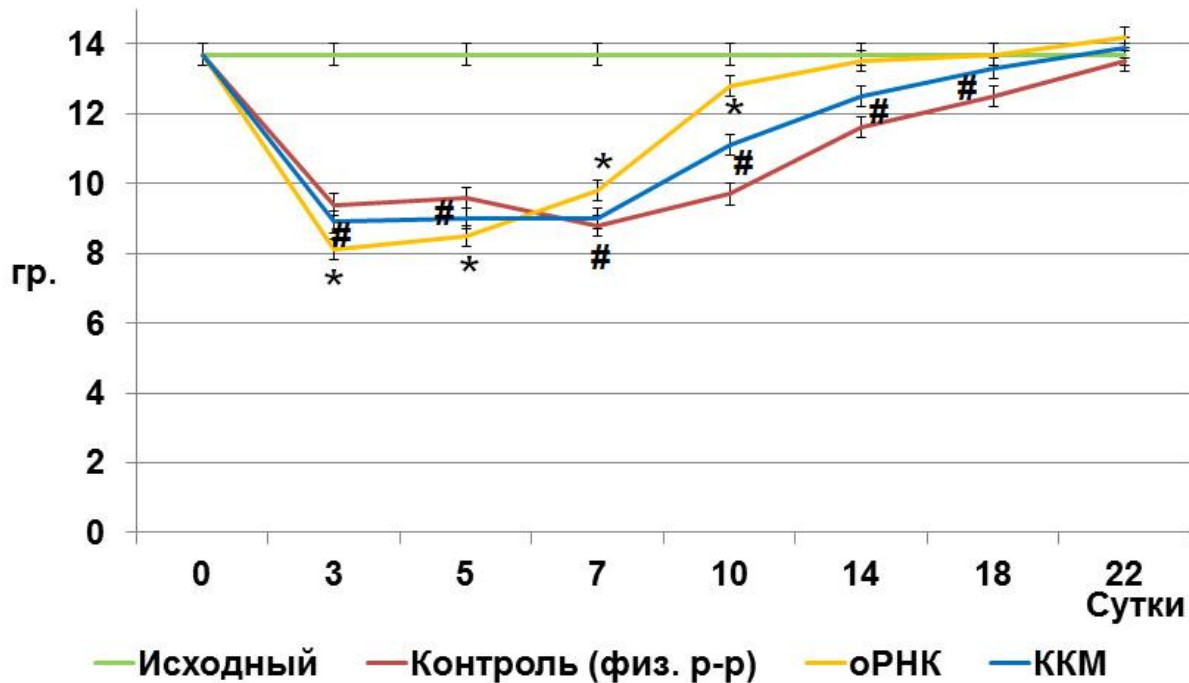


Рисунок 7. Динамика изменения массы печени после ОРП в исследуемых группах. Обозначения: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группами 1 и 2.

Из представленных материалов следует, что наиболее высокий темп восстановления массы печени отмечался во 2 группе экспериментов, где через 3-5 часов после ОРП внутрибрюшинно вводили oRNK (восстановление массы печени происходило к 10-12 суткам). Введение ККМ также ускоряло восстановительные процессы в малом остатке печени и восстановление исходных значений массы печени происходило к 14-18 суткам. В контрольной группе опытов с введением физиологического раствора, восстановление массы печени происходило на 18-22 сутки после ОРП. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что oRNK в дозе 30мкг/100г веса животного вызывает наиболее активную индукционную реакцию.

Эквивалентное количество применяемых ККМ также способствует ускорению восстановительных процессов, которые, однако, протекают в более замедленном темпе, чем при использовании оРНК.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что:

- применение общей РНК моноклеарных клеток костного мозга или суспензии моноклеарных клеток костного мозга в используемых дозах устраняет опасность развития летальных исходов после ОРП, т.к. в более ранние сроки по сравнению с контролем восстанавливается печёночный гомеостаз в организме.
- общая РНК из моноклеарных клеток костного мозга по сравнению с самими клетками костного мозга обладает более мощным стимулирующим воздействием на регенерационные процессы в клетках печени после ОРП. Это выражается в более раннем и интенсивном повышении уровня митотической активности гепатоцитов, а также в достоверно более раннем восстановлении массы печени после ОРП по сравнению с контролем и введением моноклеарных клеток костного мозга.
- общая РНК из моноклеарных клеток костного мозга, представляя собой комплекс сигнальных молекул, по сравнению с моноклеарными клетками костного мозга, развивает более выраженный регенерационный эффект за счёт более мощного включения эволюционно выработанного механизма защиты клеток - неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем. Это проявлялось на ранних сроках после ОРП достоверно более выраженным первоначальным кратковременным снижением массы печени по сравнению с контролем и введением моноклеарных клеток костного мозга.
- при индукции восстановительных процессов в резецированной печени после ОРП, используя стимулирующее воздействие моноклеарных клеток костного мозга и оРНК из них, предпочтение, следует отдавать оРНК.

3.3 Использование общей РНК клеток костного мозга для коррекции структурных нарушений в ткани печени при ее хроническом токсическом повреждении

Принято считать, что цирротическое повреждение печени необратимо. Однако, в ряде исследований, выполненных как в эксперименте, так и в клинике, была показана возможность, хотя бы частичного регресса уже сформировавшегося фиброза с помощью клеточных технологий: - при трансплантации изолированных прогениторных клеток печени, а также стволовых/прогениторных ККМ - гемопоэтического и стромального ряда [6, 137-144]. Однако не все исследователи признают фибролитический эффект стволовых клеток КМ и указывают даже на возможность усиления фиброза особенно при использовании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга от пациентов с ХПН [145].

Констатация диаметрально противоположных результатов от применения стволовых клеток костного мозга может быть следствием недоучета ряда факторов: типа использованных клеток (гемопоэтические или стромальные), их биорегуляторного потенциала (аллогенные клетки здорового донора или аутологичные клетки пациента с ХПН), а также результатом недоучета тяжести и обратимости имеющихся повреждений в печени, отражением которых является степень тяжести иммунного дисбаланса в организме, с возникновением которого связывают состоявшуюся перестройку регенерационных процессов в печени с восстановительного типа на заместительный с прогрессированием склеротических процессов в ней (развитие фиброза и цирроза печени). Отсутствие или кратковременность фибролитических процессов в печени может быть обусловлена, прежде всего, применением аутологичных клеток костного мозга больного, в организме которого уже развился иммунный дисбаланс, ингибирующий функциональную активность самих ККМ [182]. Следует признать, также, что все мероприятия, используемые для предварительного восстановления регуляторной активности аутологичных ККМ у таких больных [37], являются временными и

неполными так как после возвращения восстановленных клеток в организм больного с ХПН эти клетки вновь оказываются под воздействием иммунопатологических факторов, парализующих их активность. Предсуществующие иммунопатологические факторы организма, по-видимому, способны оказать свое парализующее воздействие и на аллогенные ККМ.

В последние годы способность ККМ реализовывать свой регенерационный потенциал (ускорять темп регенерационных процессов в поврежденных органах и/или изменять их направленность) стали связывать с недавно открытым классом многочисленных белок некодирующих РНК этих клеток, и прежде всего, с молекулами микроРНК [18-25].

Адресная доставка регенерационных сигналов, в поврежденный орган, осуществляемая молекулами оРНК, указывает на перенос молекулами оРНК не только регенерационных сигналов, но и на перенос заложенной в них иммунологической (органоспецифической) информации [185]. Этот факт заставил нас предположить, что оРНК, как химическая структура, введенная в организм с иммунным дисбалансом, вызванным развитием тяжелой стадии ХПН, будет действовать более независимо и более эффективно, чем ККМ, которые способны подвергаться адаптивному влиянию окружающей патологически измененной среды организма.

В настоящем разделе работы была поставлена цель изучить способность ККМ и общей РНК из ККМ, используемых в эффективной дозе, препятствовать развитию деструктивных процессов в печени и способствовать полному восстановлению структуры печени при моделировании хронического токсического повреждения печени (ХТПП), а также сравнить эффективность восстановительных процессов в печени при воздействии ККМ и оРНК из ККМ.

Работу выполняли на 140 крысах-самцах породы Вистар, у 100 из которых моделировали ХТПП путем хронической затравки CCl_4 в сочетании с неполным адьювантом Фрейнда по предложенной нами схеме в течение 42 суток. При моделировании ХПН погибло 25 животных и к концу затравки выжило 75. Все выжившие крысы, после моделирования ХТПП были разделены на 3 группы: 1-

группа контрольная (n=25) с однократным введением физиологического раствора через 7 суток после окончания затравки, 2 группа-опытная (n=25), в которой через 7 суток после моделирования ХТПП внутрибрюшинно однократно вводили общую РНК (оРНК) из ККМ здорового животного в эффективной дозе 30 мкг/100 грамм веса животного; 3 группа – опытная (n=25), в которой через 7 суток после моделирования ХТПП внутрибрюшинно однократно вводили 30×10^6 несортированных моноклеарных ККМ.

Эффективность индукционного воздействия оРНК и ККМ на регуляцию восстановительных (структурных) процессов в печени после моделирования ХТПП оценивали по летальности животных в 3-х исследуемых группах, а также по динамике структурных изменений в печени на 7 сутки, и через 3 и 6 месяцев после окончания затравки. Изучение структурных перестроек в ткани печени на более отдаленных сроках не производилось, так как уже через 6 месяцев после затравки в печени крыс контрольной группы активизировались процессы спонтанной восстановительной регенерации из-за чрезвычайно высокой пластичности этого органа. Отдельные биохимические показатели функционального состояния печени в сыворотке крови крыс (аланиновая аминотрансфераза (АлАТ), аспарагиновая аминотрансфераза (АсАТ, щелочная фосфатаза (ЩФ)) были нарушены в исследуемых группах только в течение 1 месяца после моделирования ХТПП, тогда как другие биохимические показатели (общий билирубин, общий белок и альбумин) оставались нарушенными в течение более длительного времени: в контроле в течение 6 месяцев, а в группах 2 и 3 в течение 3 месяцев (общий билирубин - оставался повышенным, а общий белок и альбумин были пониженными), но постепенно нормализовались к концу наблюдения (8-9 мес.). Хотя данные оценки функционального состояния печени свидетельствовали о постепенном устранении признаков ХПН в печени крыс всех трех исследуемых групп к 3 месяцу после затравки во всех группах формировался цирротический процесс. В печени 1 – контрольной и 3 – опытной группах, цирроз был особенно выражен, тогда как во 2 – опытной группе с применением оРНК к этому сроку уже развивался постепенный лизис фиброзной ткани. В связи с отсутствием взаимосвязи функциональных и

морфологических показателей было решено биохимические показатели не рассматривать, в качестве значимых, отражающих динамику восстановительных процессов в печени после моделирования ХТПП у крыс. Для характеристики сохраняющихся структурных нарушений в печени в указанные исследуемые сроки иссекали печень, готовили из неё гистологические препараты с последующей окраской срезов гематоксилином и эозином и по Массону на соединительную ткань.

Различия в структуре ткани печени в 1 - контрольной и двух опытных группах оценивали по степени выраженности фибролитических процессов в соединительной ткани, а также по степени выраженности количества молодых новообразованных гепатоцитов в структурах печеночных долек на одинаковых сроках.

Было констатировано, что в контрольной группе в течение первых 3 месяцев из 25 крыс погибло 3, что составило 12 %; во 2 и 3 опытных группах летальность составила 4% (по 1 крысе в каждой группе) в течение всего срока наблюдения.

Изучение динамики развития морфологических изменений в печени при моделировании ХТПП показало, что через 1 неделю у всех крыс после окончания затравки в перицентральных зонах печени выявляются выраженные некротические и дистрофические изменения гепатоцитов, а также нарушения дольковой и балочной структуры ткани печени (рисунок 8 А, Б).

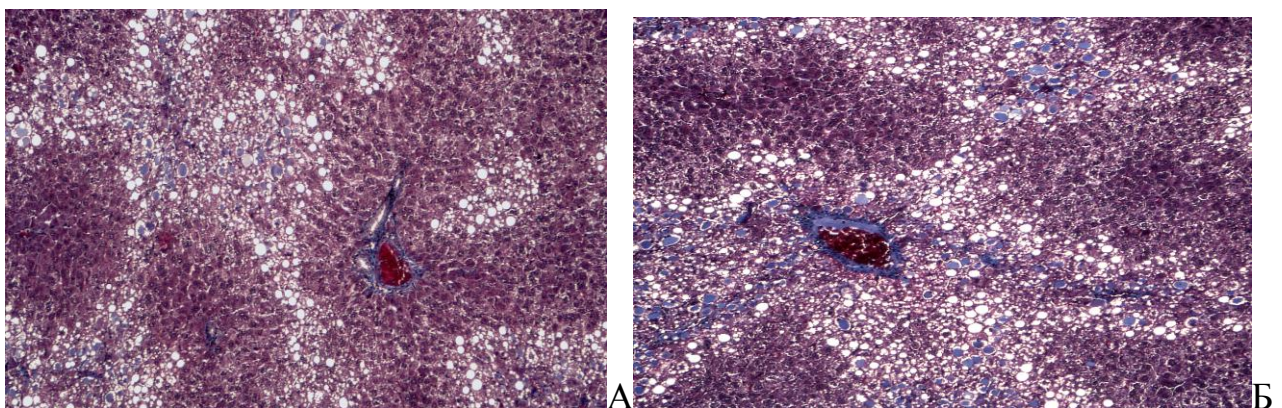


Рисунок 8 (А, Б). Гистологическая структура печени крысы через 1 неделю после завершения моделирования ХТПП, ув.х100. Окраска по Массону.

А-перипортальная зона с минимально выраженными дистрофическими изменениями гепатоцитов. Б-перицентральная зона с выраженными некротическими и дистрофическими изменениями гепатоцитов (жировая и белковая дистрофия).

Через 3 месяца после окончания затравки и введения физиологического раствора в печени крыс 1 - контрольной группы выявляется четкое нарушение балочного строения печеночной ткани и формирование ложных долек; гепатоциты в печени были без выраженных дистрофических изменений, отмечалась также не резко выраженная клеточная инфильтрация (рисунок 9 А, Б, В).

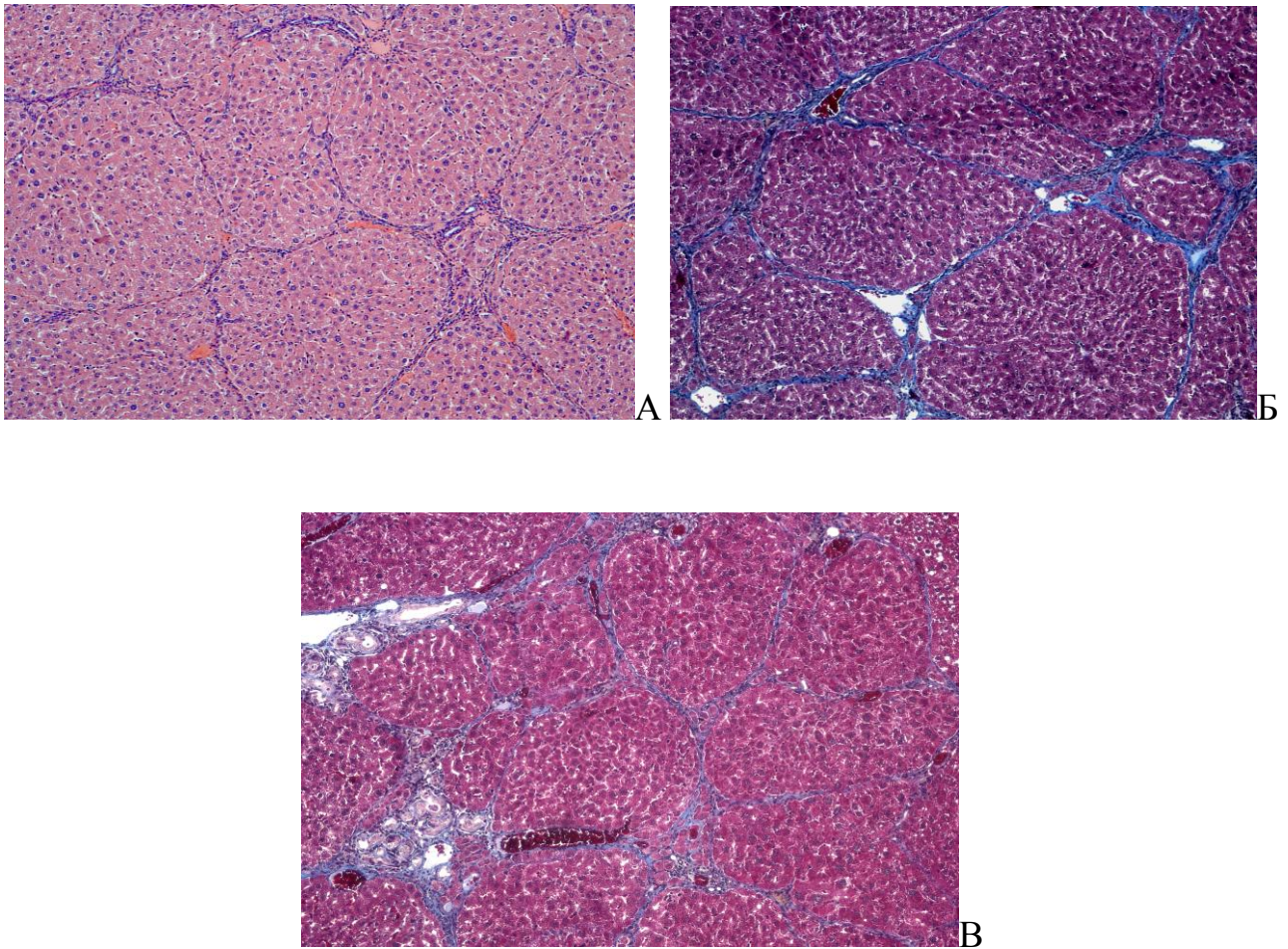


Рисунок 9 (А, Б, В). Гистологическая структура печени крысы через 3 месяца после окончания моделирования ХТПП и введения физиологического раствора. Ув.х100.А. Окраска Гематоксилин-эозином. Б и В- окраска по Массону. Сформировавшийся цирроз печени.

Таким образом, уже к 3-му месяцу после окончания хронической затравки в печени крыс 1 – контрольной группы формируется гистологическая картина цирроза. Аналогичные результаты структурных нарушений в печени были получены у крыс 3 – опытной группы, которым вводили несортированные мононуклеарные ККМ (рисунок 10).

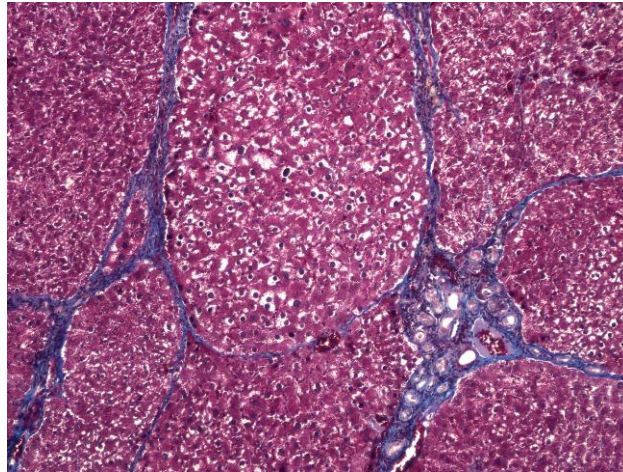


Рисунок 10. Гистологическая структура печени крысы через 3 месяца после окончания моделирования ХТПП и введения несортированных мононуклеарных ККМ. Ув.х100, окраска по Массону. Сформировавшийся цирроз печени.

Между тем, у крыс 2 - опытной группы, которым после окончания затравки однократно вводили оРНК, выделенную из ККМ, на 3-м месяце на фоне сформировавшегося цирроза появляются отчетливые признаки фибролиза септ, и образовавшихся ложных долек. Кроме того, в структуре ложных долек выявляются значительные участки молодых (новообразованных) гепатоцитов (рисунок 11 А, Б, В и рисунок 12 А, Б, В, Г). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что оРНК к 3 месяцу тормозит процессы фиброгенеза в печени по сравнению с контролем и 3 – опытной группой, где процессы склерозирования остаются отчетливо выраженными. Однако на 3-м месяце во 2 – опытной группе, также, как и в контрольной группе и в 3 – опытной группе, сохраняются ложные дольки и нарушение балочной структуры печени.

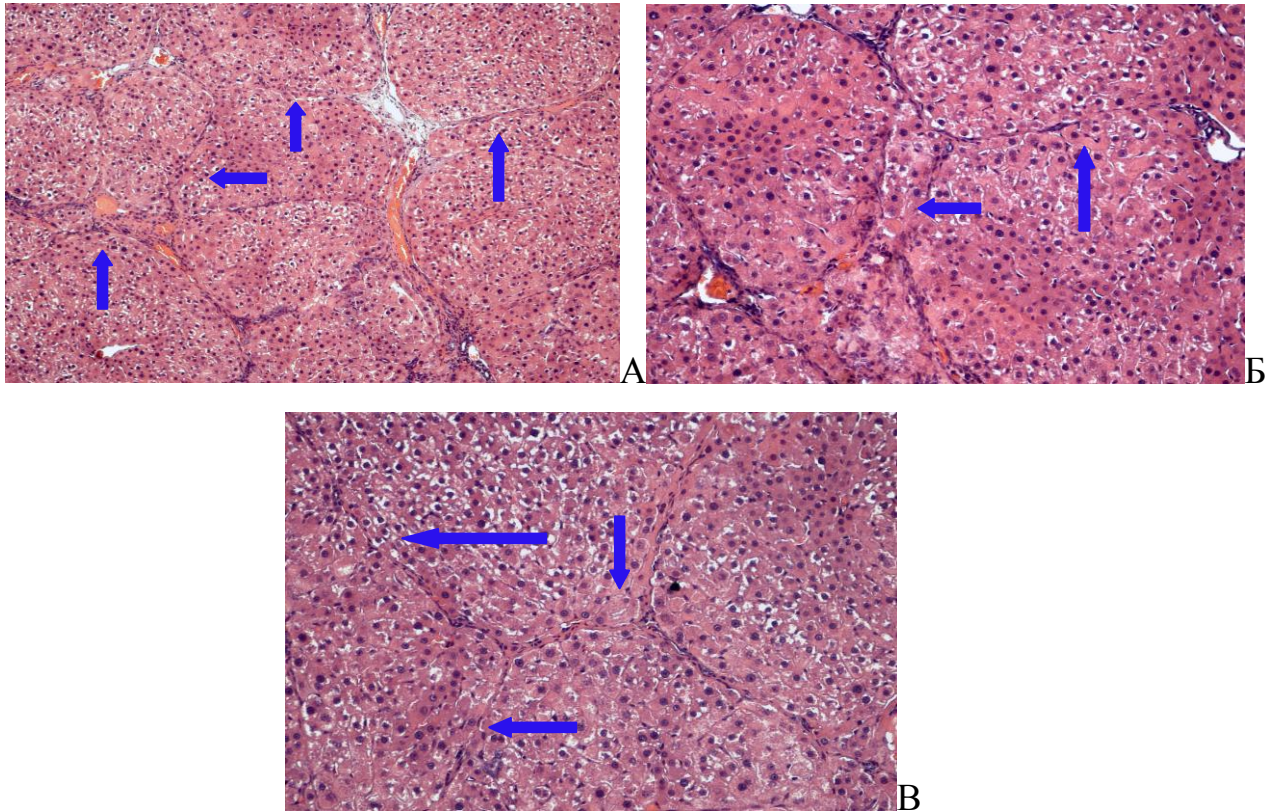


Рисунок 11 (А, Б, В). Гистологическая структура печени крысы через 3 месяца после окончания моделирования ХТПП и введения оРНК из ККМ в дозе 30мкг/100 г веса животного. Окраска гематоксилином и эозином. А - ув.х100; Б и В-ув.х200. Лизис септ ложных долек и появление значительных участков молодых гепатоцитов. Стрелками указаны зоны лизированных септ и участки скопления молодых гепатоцитов.

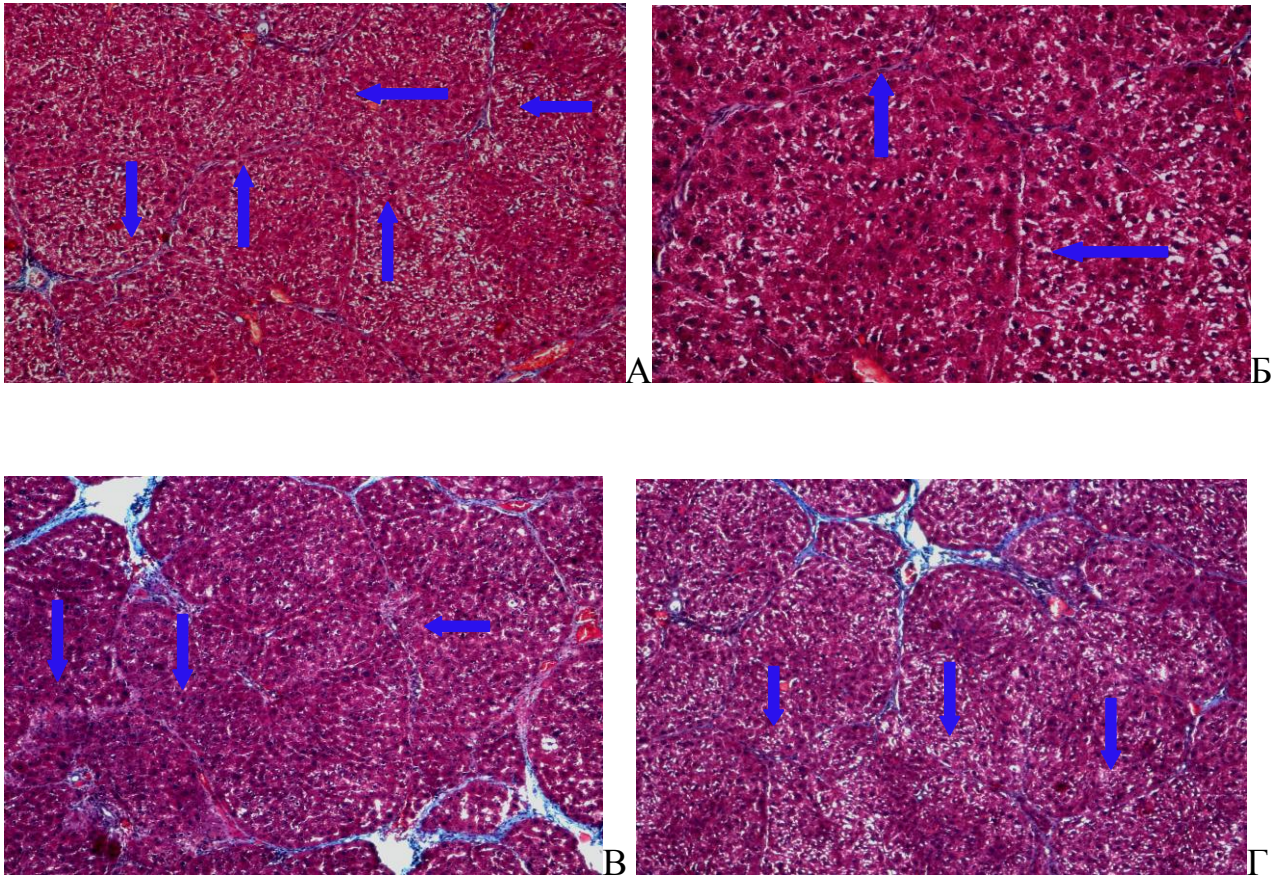


Рисунок 12 (А, Б, В, Г). Гистологическая структура печени крысы через 3 мес. после окончания моделирования ХТПП и введения общей РНК из ККМ в дозе 30 мкг/100 г веса животного. Окраска по Массону А, Б, В-ув.х100, разные поля зрения; Г- ув.х200. Лизис септ ложных долек. Появление значительных участков молодых гепатоцитов. Сохраняются зоны гепатоцитов с жировой дистрофией. Стрелками указаны лизированные септы долек.

Продолжая динамическое изучение морфологических изменений в печени крыс контрольной и опытных групп, мы отметили, что через 6 мес в печени крыс контрольной и 3 – опытной группы появляются участки спонтанного лизирования септ ложных долек и зоны молодых гепатоцитов (рисунок 13 А, Б, В и рисунок 14 А, Б).

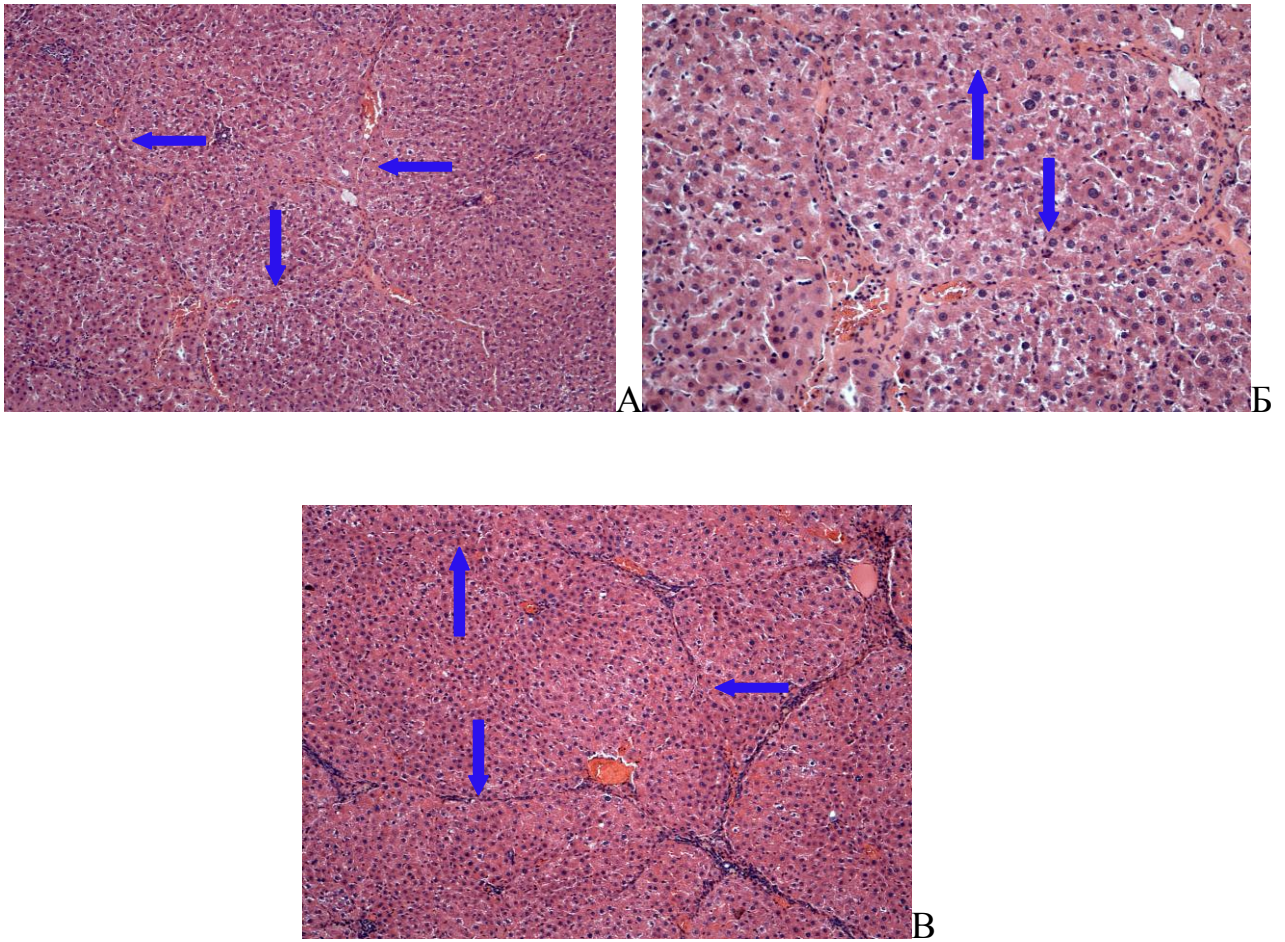


Рисунок 13 (А, Б, В). Гистологическая структура печени крысы через 6 мес. после окончания моделирования ХТПП и введения физиологического раствора (контроль). Окраска гематоксилином и эозином. Разные поля зрения А и Б ув.х100,Б- ув.х200; стрелками указаны участки фиброза септ ложных долек; видны также зоны молодых(новообразованных) гепатоцитов.

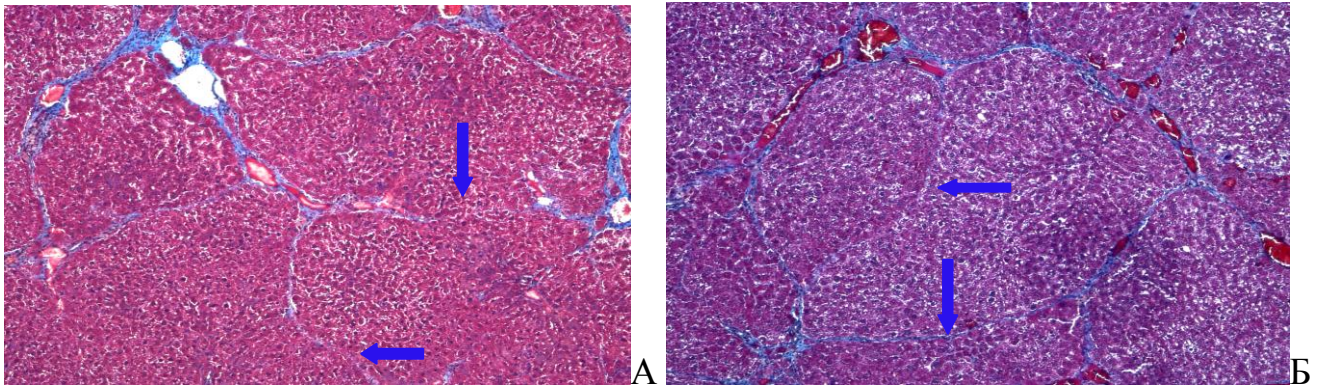


Рисунок 14 (А, Б). Гистологическая структура печени крысы через 6 мес. после окончания моделирования ХТПП и введения физиологического раствора (контроль). Окраска по Массону. Разные поля зрения ув. $\times 100$. Стрелками указаны участки фиброза септ ложных долек; видны зоны молодых гепатоцитов.

В тоже время в печени крыс 2 -й опытной группы к этому сроку - т.е. к 6 месяцу после введения оРНК, наступает полное восстановление гистологической структуры печени (рисунок 15 А, Б, В): восстанавливается структура печеночных долек и их балочная структура, происходит полный лизис соединительнотканых септ в ткани печени и не выявляются какие-либо другие структурные нарушения.

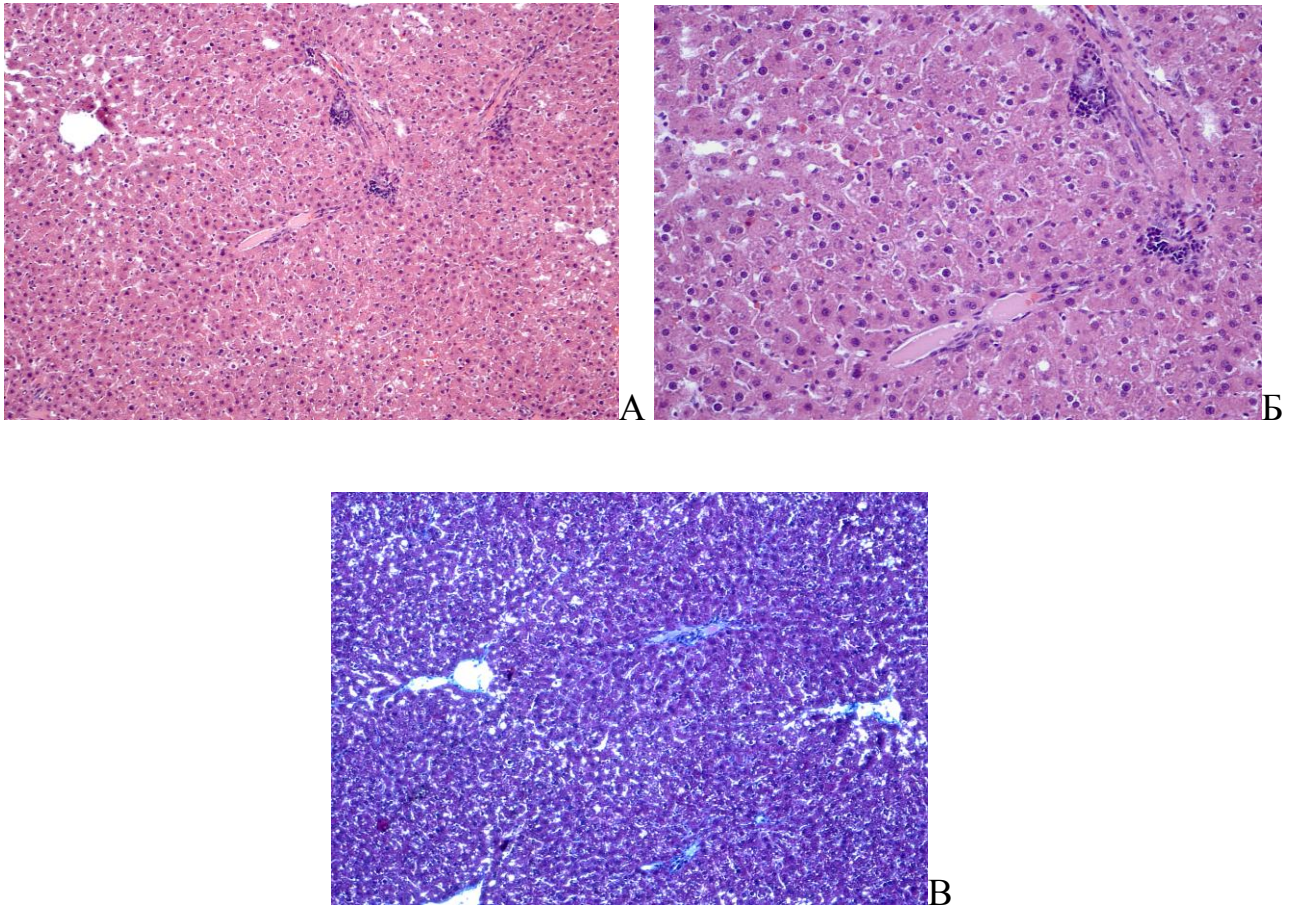


Рисунок 15 (А, Б, В). Гистологическая структура печени крысы через 6 мес. после окончания моделирования ХТПП и введения общей РНК из ККМ. Окраска гематоксилином и эозином (А и Б), окраска по Массону (В) А и В-ув.х100; Б-ув.х200. Нормальная структура ткани печени.

Сравнительное изучение ткани печени в трёх исследуемых группах позволяет прийти к заключению, что оРНК из ККМ ускоряет темп восстановления структуры ткани печени после осуществления хронического токсического воздействия на нее и что ткань печени крыс имеет огромный потенциал пластичности, так как длительно сохраняет способность к осуществлению спонтанного лизиса фиброзной ткани. В тоже время введение ККМ проявляло свое регуляторное воздействие только на функциональные показатели печени и практически не влияло на восстановление структурных нарушений в ней. К 9 месяцу после хронической затравки крыс структура ткани печени в опытах контрольной и 3 – опытной групп нормализуется, хотя местами сохраняются участки соединительно-тканых септ рисунок 16 (А и Б).

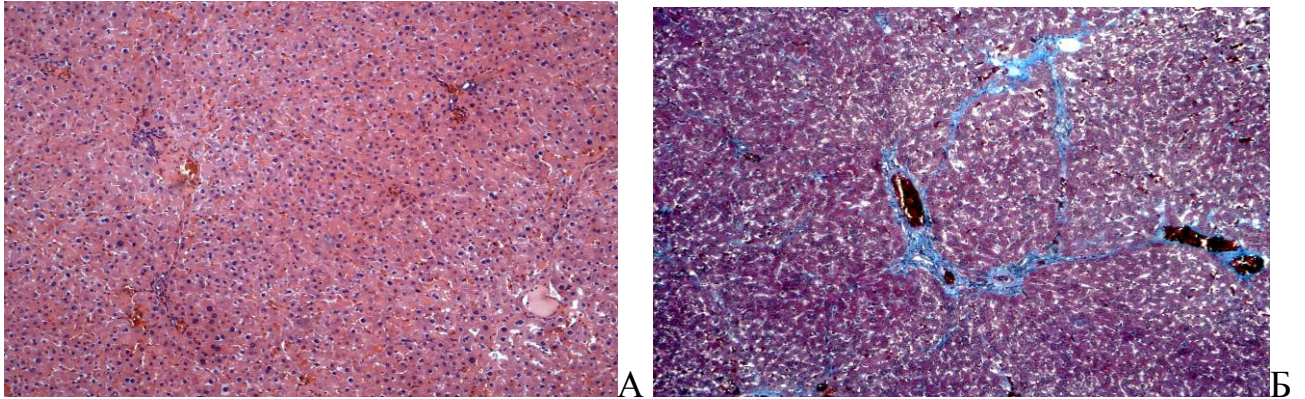


Рисунок 16 (А и Б). Гистологическая структура печени крысы через 9 мес. после окончания моделирования ХТПП и введения физиологического раствора (контроль). Ув.х100. А-окраска гематоксилином и эозином, Б- окраска Массону. Сохраняются участки соединительнотканых септ.

Таким образом, морфологические исследования печени, проведенные нами после моделирования фиброзирующих процессов в печени крыс путем длительной заправки CCl_4 по предложенной нами схеме, позволили установить, что:

- печень исходно здоровых крыс обладает чрезвычайно высоким потенциалом пластичности (регенерационной восстановительной активности), т.к. несмотря на хроническую заправку путем комбинированного применения CCl_4 и адьюванта Фрейнда (по схеме) позволяет воспроизвести процессы фиброзирования в печени в сроках, не превышающих 6 месяцев.
- через 6 месяцев после заправки по предложенной схеме наступает и прогрессирует процесс постепенного спонтанного лизирования фиброзной ткани в печени.
- введение ККМ от здоровых крыс способствовало ускорению восстановления функциональных показателей поврежденной печени и не влияло на восстановление структуры ткани печени, т.к. процесс лизирования фиброзной ткани печени на 6-ом месяце после заправки не отличался от контроля.

- введение общей РНК из ККМ здоровых крыс через 7 суток после окончания моделирования ХТПП индуцирует ускорение темпа восстановительных процессов в поврежденной печени, что выражается в более раннем восстановлении всех функциональных и морфологических показателей печени по сравнению с контролем.

- после однократного введения оРНК уже через 3 месяца возникает лизис фиброзных септ ложных долек, и образуются зоны молодых (новообразованных) гепатоцитов; к 6 месяцу после введения оРНК происходит полное восстановление структуры печеночной ткани. Восстановление структуры ткани печени контрольных крыс наступает лишь к 9 месяцу.

- оРНК из ККМ здорового донора может быть использована в качестве альтернативного средства биотехнологического воздействия на поврежденную печень для инициации ускорения темпа восстановительной регенерации этого органа при моделировании ХТПП.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На протяжении последних десятилетий проблема лечения острой и хронической печеночной недостаточности остается нерешенной проблемой, т.к. летальность как при ОПН [177], так и при ХПН с исходом в цирроз печени [37] по-прежнему остается на высоком уровне и не имеет тенденции к снижению, что указывает на необходимость разработки новых более эффективных методов терапии. Настоятельная необходимость разработки более эффективных способов лечения печеночной недостаточности диктуется также неутешительными прогнозами повышения заболеваемости во всех странах мира в ближайшее десятилетие [4].

В настоящее время сложилось представление о том, что пусковым фактором развития как ОПН, так и ХПН является снижение регенерационного (пролиферативного) потенциала гепатоцитов и уменьшение массы адекватно функционирующих клеток печени в результате воздействия какого-либо мощного гепатоспецифического стрессорного фактора, ингибирующего процессы восстановительной регенерации печени. Длительное торможение пролиферации гепатоцитов, нарушение микроокружения и взаимодействия гепатоцитов с другими клетками печени растормаживает пролиферативные потенции клеток внеклеточного матрикса, что ведет к избыточному разрастанию соединительной ткани печени, развитию фиброза, а также образованию ложных долек и нарушению балочной структуры ткани печени, характеризующих развитие цирроза печени [4,30].

Эффективность применения медикаментозных [76, 114-117, 118-123] и экстракорпоральных систем детоксикации организма [178] для активации восстановительных регенерационных процессов в печени была признана недостаточной из-за сохраняющегося и не восполняемого при этих методах терапии дефицита гепатоспецифических биорегуляторных факторов.

Это обстоятельство послужило основанием для разработки в эксперименте биотехнологических методов интенсивной терапии ОПН и ХПН, основанных на применении экстрактов ткани печени, полученных либо от крыс с 70% резекцией, либо от неонатальных поросят [179]. Однако этот метод пока не получил одобрения для применения в клинике, т.к. при использовании экстрактов из нативных тканей всегда существует потенциальная опасность заражения пациента трансмиссивными инфекциями животных, а изготовление высокоэффективного медикаментозного препарата из экстракта животных тканей предполагает идентификацию химического переносчика биологических эффектов и выделение его из тканевого экстракта, чего авторами не было предпринято.

В последние годы стал известен новый биотехнологический способ лечения печеночной недостаточности, который основан на имплантации в печень или брыжейку тонкой кишки клеточно-инженерных конструкций, состоящих из сокультивированных аллогенных клеток печени и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) в составе биополимерного гетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БГКГ) [180]. Будучи эффективным методом в плане лечения печеночной недостаточности этот метод не лишен тех недостатков, которые присущи методам клеточной терапии (опасность мутаций и малигнизаций, используемых стволовых/прогениторных клеток), и поэтому этот метод пока не находит применения в клинике.

Между тем, ККМ по-прежнему остаются привлекательным материалом для разработки и использования биотехнологических методов лечения печеночной недостаточности. Так в ряде исследований, выполненных в эксперименте и клинике [6,137-144], показана эффективность применения стволовых/прогениторных ККМ – гемопоэтического и стромального ряда для лечения хронической печеночной недостаточности с индукцией в ткани печени, хотя бы частичного регресса уже сформировавшегося фиброза [32]. Однако, не все исследователи признают фибролитический эффект стволовых клеток костного мозга и указывают даже на возможность усиления фиброза в печени при их использовании [145] особенно при использовании мультипотентных

мезенхимальных стромальных клеток аутологичного костного мозга от пациентов с хронической печеночной недостаточностью. Констатация противоречивых результатов применения стволовых клеток костного мозга может быть следствием недоучета роли типа используемых клеток (гемопоэтические или стромальные), их биорегуляторных резервов (клетки аллогенного здорового донора или аутологичные клетки от пациента с хронической печеночной недостаточностью), а также результатом недоучета степени тяжести и обратимости имеющихся повреждений в печени, клиническим отражением которых может служить степень выраженности в организме иммунного дисбаланса (развитие системной воспалительной реакции и вторичного иммунного дефицита, вплоть до иммунного паралича) при развитии конечной стадии печеночной недостаточности [182-183]. Именно возникновение иммунного дисбаланса указывает на глубокую перестройку регенерационных процессов в организме с восстановительного типа на заместительный (развитие склероза, фиброза и цирроза печени), так как известно, что иммунная система ответственна в организме за состояние и регуляцию регенерационных процессов [184].

Так как костный мозг является центральным органом иммуногенеза, то очевидно, что при использовании для лечения ХПН аутологичных клеток костного мозга невозможно добиться надежного терапевтического эффекта, ибо у клеток костного мозга уже снижен или даже нарушен регенерационный потенциал. Для восстановления регенерационной активности аутологичных ККМ их подвергают предварительной активации – или после изъятия (это прежде всего относится к ММСК костного мозга) [37], или даже до забора ККМ т.е. в организме с помощью G-CSF [182, 183]. Однако, следует признать, что повышение регенерационной активности аутологичных ККМ указанными способами является временным и неполным, так как подготовленные клетки вновь возвращаются в иммунопатологическую среду больного организма, которая нарушает адекватность их физиологических функций (в том числе участие в регенерационных процессах). Даже при использовании аллогенных ККМ иммунопатологическая среда, в которую они попадают при лечении ХПН, быстро

угнетает их свойства (эффект адаптивного воздействия). В результате аллогенные ККМ также оказываются не в состоянии длительно выполнять свои регуляторные терапевтические функции. Таким образом, можно считать, что стойкая иммунопатологическая среда организма больного с ХПН, особенно с конечной стадией, становится ведущей причиной недостаточной эффективности клеточной терапии аллогенными или аутологичными ККМ. Однако, внедрение в терапевтическую практику клеточных технологий не получает единодушного одобрения и тормозится не только из-за недостаточной эффективности клеточной терапии и гибели клеток в иммунопатологической среде больного организма; при использовании стволовых/прогениторных клеток существует также опасность малигнизации этих клеток и возникновения генетических мутаций после их трансплантации. Альтернативой клинического использования клеток в регенерационной медицине могли бы стать технологии, основанные на применении выделенного из ККМ комплекса биологически активных компонентов, способных осуществить перенос содержащейся в них «регенерационной информации» в неизменном виде клеткам поврежденного органа, устранить опасность, негативные последствия и недостаточную эффективность применения клеточной терапии и тем самым повысить качество и безопасность биотехнологических методов терапии различных острых и хронических заболеваний, в том числе заболеваний печени.

В последние годы способность ККМ реализовывать свой регенерационный потенциал (ускорять темп регенерационных процессов в поврежденном органе и/или изменять их направленность) стали связывать с недано открытым классом многочисленных белок некодирующих РНК этих клеток [14, 17] и прежде всего с молекулами микроРНК [18]. Между тем, известно, что РНК в ККМ, как и в других клетках организма, представляет собой сложную систему комплексно реагирующих сигнальных молекул различных классов РНК, результирующий регуляторный эффект которых достигается взаимодействием не только многочисленных белок некодирующих РНК, но и белок кодирующих РНК [20-27]. Представление об определяющей регуляторной роли комплекса различных

классов РНК в клетках позволило уже в настоящее время с успехом применять экзогенную суммарную РНК из лимфоцитов периферической крови или из гемопозитической (моноклеарной) фракции ККМ здорового донора для индукции восстановительных процессов в самом костном мозге при различных патологических состояниях кроветворной системы [17, 175, 176].

Однако, наше внимание общая РНК привлекла не только потому, что способна осуществлять перенос «регенерационной информации», она способна также осуществлять и перенос иммунологической информации- все виды иммунного ответа включая иммунную память [185]. Это дало нам основание предположить, что оРНК способна осуществлять адресный (органоспецифический) перенос регенерационной информации в ткань поврежденного органа. Полагая, что именно оРНК из ККМ может стать наиболее эффективным и устойчивым (не зависимым от измененного состояния внутренней среды организма) переносчиком регенерационных сигналов и индуктором восстановительных процессов в печени, мы в своей работе поставили цель - исследовать способность оРНК, полученной из моноклеарных ККМ, обеспечивать адресный перенос регенерационных сигналов и стимулировать восстановительные процессы в печени при ее остром и хроническом повреждении. Для достижения поставленной цели было сформулировано 5 задач (см. раздел введение), согласно которым необходимо было:

- разработать протокол выделения оРНК из ККМ;
- доказать, что оРНК, полученная нами из ККМ, способна осуществлять перенос адресных регенерационных сигналов в ткань поврежденной печени;
- изучить способность оРНК из ККМ индуцировать восстановительные процессы в печени при моделировании ОПН путем обширной резекции;
- изучить способность оРНК, из ККМ индуцировать восстановительные процессы в печени при ее хроническом повреждении, сопровождающемся развитием фиброза и цирроза, используя модель ХТПП.
- сравнить эффективность регенерационного воздействия на печень ККМ и оРНК из ККМ, используемых в эквивалентных дозах при моделировании ОПН.

Протокол выделения оРНК из ККМ включал несколько этапов: выделение суспензии ККМ и приготовление из неё фракции несортированных мононуклеарных ККМ, затем приступали к выделению оРНК из полученных ККМ, используя реагент Extract RNA и методику, разработанную компанией «Евроген» (Россия). Было установлено, что из каждых $35,0 \times 10^6$ ККМ выделялось от 115,5 до 160,8 мкг оРНК, что в среднем составило $148,5 \pm 22,3$ мкг оРНК. Эффективная доза оРНК для крыс колебалась от 15 до 60 мкг/100 грамм веса животного и в последующих экспериментах нами использовалась доза оРНК 30 мкг/100 грамм веса. Кроме того, необходимо было отработать модель ОПН, создаваемой путем обширной резекции (70% массы печени) и разработать модель хронического токсического повреждения печени (ХТПП), при которой пролонгирование фиброзирующего и цирротического повреждения печени достигалось путем сочетанного применения CCl_4 и неполного Адьюванта Фрейнда по предложенной нами схеме (патент РФ № 2633296).

Для доказательства способности оРНК к адресному переносу регенерационных сигналов при повреждении печени нами использовалась модель адоптивного переноса. Сущность выполнения этого исследования состояла в том, что от крыс-доноров с обширной резекцией печени (ОРП) через 12 часов после резекции печени (интервал необходимый для появления морфогенетически активных клеток), забирали костный мозг и выделяли ККМ. Интактные здоровые крысы-реципиенты, на которых исследовали адоптивный перенос, составили 3 группы: им внутривенно однократно вводили либо физиологический раствор (общий контроль), либо оРНК, приготовленную из активированных ККМ донора в дозе 30 мкг/100 грамм веса животного, либо сами активированные ККМ в разных дозах ($2,5 \times 10^6$; 5×10^6 ; $3,5 \times 10^7$ клеток). В печени и почках реципиентов (для контроля адресного переноса регенерационных сигналов) изучали митотическую и пролиферативную активность гепатоцитов и почечного эпителия на различных сроках (12, 24, 36, 48, 72 часа) после введения ККМ и оРНК из ККМ.

Исследование результатов адоптивного переноса донорского материала (ККМ и оРНК из ККМ) от крыс с резекцией печени (частичная гепатэктомия) интактным реципиентам показало, что у крыс с переносом ККМ в печени и почках отсутствовали достоверные изменения митотической активности гепатоцитов по сравнению с исходным уровнем ($0,02 \pm 0,01\%$).

У крыс с переносом ККМ было отмечено только появление клеточной инфильтрации на сроках 48 и 72 часа после переноса клеток, что свидетельствовало о появлении в организме неоперированных реципиентов гепатоспецифических сигналов (рисунок 1А). Однако достоверный подъем митотической активности гепатоцитов на тех же сроках (48 и 72 часа) был выявлен нами в печени крыс неоперированных интактных реципиентов только после введения им оРНК из ККМ от доноров с резекцией печени: МИ на этих сроках составил $0,7 \pm 0,02\%$ и $0,5 \pm 0,02\%$ соответственно (рисунок 1Б) и свидетельствовал об индукционном воздействии перенесенной оРНК на ткань печени. Кроме того, мы отметили, что всплеск митотической активности в печени на сроках 48 часов и 72 часа у крыс с введением оРНК не сопровождался достоверным повышением митотической активности почечного эпителия ($0,02 \pm 0,01\%$ и $0,03 \pm 0,02\%$) и этот факт мы рассматривали как доказательство способности оРНК осуществлять именно адресный перенос регенерационных сигналов. Возросшая пролиферативная активность клеток печени в организме неоперированного реципиента после переноса оРНК, подтверждалась также выявлением в гистологических препаратах печени этих крыс достоверно большего количества молодых гепатоцитов (клетки малого размера) $452 \pm 7,66$ в поле зрения вместо $320 \pm 36,13$ в исходе, которые располагались по периферии дольки (рисунок 2). Иммуногистохимическое исследование с помощью маркера Ki67 также подтвердило возросшую пролиферативную активность гепатоцитов именно после введения оРНК (рисунок 3А и Б). Возросшая митотическая и пролиферативная активность гепатоцитов после введения оРНК из активированных ККМ и отсутствие аналогичной реакции в ответ на введение активированных ККМ явилось для

неожиданным, так как известно [16], что лимфоциты периферической крови активно участвуют в осуществлении адоптивного переноса. Полученный результат, по-видимому, можно связать с существующей в организме клеточной специализацией, в том числе, и при формировании регенерационного процесса. Клетки костного мозга - центрального органа иммуногенеза, вероятно, выполняют роль аккумулятора и преобразователя регенерационных сигналов, поступающих из очага повреждения, а исполнителями этого процесса уже выступают зрелые активно мигрирующие информированные лимфоциты периферической иммунной системы - лимфоциты из лимфоузлов и селезенки, но не мононуклеарные ККМ [174]. В роли молекул, непосредственно осуществляющих информационный обмен, выступают различные типы РНК, которые доставляют в очаг повреждения регенерационную информацию с помощью лимфоцитов [16, 175, 176]. Тот факт, что оРНК выделенная из активированных частичной гепатэктомией ККМ, обладает митотической и пролиферативной активностью, подтверждает наше предположение, что активированные ККМ не только воспринимают, аккумулируют и формируют тканеспецифические регенерационные сигналы, но и способны реализовать их адресную доставку с помощью оРНК. Полученные результаты убеждают в том, что оРНК, выделенная из активированных гепатэктомией ККМ, адресно переносит регенерационные сигналы именно в ткань печени.

Проведенное исследование позволило выдвинуть предположение, что применение оРНК для стимуляции восстановительных процессов в поврежденной печени может оказаться более эффективным и перспективным способом терапии, чем ККМ. Для получения обоснованного ответа на выдвинутое предположение, было проведено сравнительное исследование индукционной активности процессов восстановительной регенерации печени после ее обширной резекции при использовании ККМ и оРНК из ККМ. Опыты проводили на 3 группах крыс (n=75) у которых воспроизводили модель обширной резекции печени (ОРП): 1 группа – контрольная проводили

одноразовое введение физиологического раствора; 2 группа – введение оРНК в дозе 30мкг/100г веса животного через 3-5 часов после ОРП; 3 группа – введение ККМ в дозе $30-35 \times 10^6$ клеток. Эффективность воздействия стимулирующей способности оРНК из ККМ и ККМ на восстановительные процессы в резецированной печени оценивали по митотической активности гепатоцитов в остатке печени, по срокам восстановления печеночного гомеостаза путем изучения биохимических печеночных показателей в сыворотке крови и по срокам преодоления критической массы остатка печени и восстановления его до исходных значений. Было показано, что из 75 крыс после ОРП погибло 5 и все они относились к контрольной группе (n=25) и внутри этой группы летальность составила 20%; во 2 и 3 группах летальность отсутствовала в течение всего срока наблюдения (1 месяц) и отсутствие летальности в этих группах сопровождалось более высоким темпом нормализации показателей печеночного гомеостаза в организме. В таблицах 3, 4, 5 представлены динамика изменения в сыворотке крови общего белка, общего билирубина, и ферментов цитолиза (АлАТ, АсАТ и ЩФ) у крыс контрольной и 2 опытных групп. При сравнительном анализе этих таблиц видно, что в контрольной группе крыс (таблица 3) показатели цитолиза резко нарастали в течение первых 5 суток и только на 10 и 14 сутки появлялась отчетливая тенденция их нормализации. Первоначально снизившиеся показатели общего белка начали повышаться на 5 и 7 сутки после ОРП, но и к 14 суткам не достигали исходных значений нормы. В опытных группах с введением оРНК (таблица 4) и с введением ККМ (таблица 5) показатели цитолиза нарастали только до 3 суток, а уже к 5 суткам наступало достоверное снижение всех цитолитических ферментов; к 10-14 суткам наступала нормализация всех исследуемых показателей. Более высокий темп нормализации показателей печеночного гомеостаза в организме в группах с применением оРНК и ККМ был обусловлен достоверно более высокой активностью пролиферативных процессов в резецированной печени по сравнению с контролем (таблица 6, рисунок 4). Было установлено, что на сроках 48 и 72 часа после ОРП во всех исследуемых группах отмечалось

повышение митотической активности гепатоцитов по сравнению с исходом. Но степень повышения митотической активности была разной на разных сроках наблюдения: на 48 часов митотический индекс в контрольной группе составил 5,37‰, в группе с применением оРНК-23,45‰, а в группе с применением ККМ-6,96‰; на 72 часа МИ в печени крыс контрольной группы составил 3,7‰, в группе с применением оРНК-6,36‰, а в группе с применением ККМ 10,33‰. Анализируя результаты исследования МИ гепатоцитов в разных группах после ОРП, мы отметили, что оРНК и ККМ более эффективно повышали МИ гепатоцитов на ранних сроках после ОРП по сравнению с контролем, причем через 48 часов МИ был более высоким при использовании оРНК, а через 72 часа при использовании ККМ (рисунок 5 А, Б, В и рисунок 6 А, Б, В), однако суммарный МИ первых 10 суток наблюдения был на более высоком уровне при использовании оРНК. Более высокий уровень МИ гепатоцитов в группе с применением оРНК индуцировал и более высокий темп восстановления массы печени после ОРП. Было установлено, что в контроле восстановление массы печени наступало к 18-22 суткам после ОРП, в группе с применением ККМ - к 14-18 суткам, тогда как в группе с применением оРНК к 10-12 суткам (таблица 7, рисунок 7). Примечательно, что более высокий темп восстановления массы печени под воздействием оРНК и ККМ сопровождался в первые 3 суток после ОРП достоверным снижением оставшейся массы печени по сравнению с контролем, причем при использовании оРНК снижение массы печени было более выраженным.

Выявленная особенность динамики восстановления (двухфазная динамика) массы печени после ОРП была для нас неожиданной, но постоянно воспроизводимой. Полученный результат мы связали с тем, что применяемый способ стимуляции вызывал, прежде всего, дополнительную адаптивную перестройку в ткани печени и по-видимому более резко усиливала процессы клеточного повреждения (некроз, клеточный апоптоз и структурно-метаболическая перестройка), которые, как известно отмечаются в первые часы и сутки после ОРП [181]. Наступающий в последующие сроки более высокий

темп восстановления массы печени является, по нашему мнению, результатом адаптационного и индукционного воздействия ККМ и оРНК. Таким образом, проведенное нами сравнительное изучение эффективности применения ККМ и оРНК показало сходство результатов их применения для индукции восстановительных процессов в печени и коррекции ОПН после моделирования ОРП. Однако, эффект от применения оРНК в дозе эквивалентной применению ККМ был более выраженным и более ранним, что позволило нам считать применение оРНК для коррекции ОПН после ОРП более предпочтительным. Мы считаем важным отметить что выраженное ускорение темпа восстановительной регенерации печени при использовании ККМ и оРНК при ОРП определяется несколькими факторами- использованием для терапии биотехнологических продуктов, полученных от здорового донора, то есть имеющих исходно высокий регенерационный потенциал; а также применением этих биотехнологических продуктов в организме в условиях острого хирургического стресса, сопровождающегося не только резким снижением массы функционирующих клеток печени, но и развитием острого стрессорного угнетения иммунитета, то есть в условиях угнетения функциональной активности клеток костного мозга (без изменения программы их функционирования), которые были успешно активированы и восстановлены с помощью ККМ и оРНК.

При хронической печеночной недостаточности в результате хронически сопутствующего угнетения иммунитета и длительной вялотекущей восстановительной регенерации в печени нарушаются нормальные взаимодействия гепатоцитов с другими клетками печени. На этом фоне создаются условия для разрастания соединительной ткани. Для предотвращения гибели гепатоцитов, а также процессов склерозирования и фибрирования печени иммунная система начинает себя еще более резко тормозить вплоть до развития вторичного иммунодефицита, и иммунного паралича [182, 183]. Выше мы уже указывали, что прогрессирование склероза, фиброза и цирроза в печени свидетельствует о нарушении и изменении

программы участия всей системы иммунитета (и, следовательно, ККМ) в процессах регенерации: активируются процессы не восстановительной, а заместительной регенерации, и это в итоге формирует конечную стадию печеночной недостаточности и гибель пациента. С учетом выше изложенных представлений о стадийности в патогенезе ХПН не удивительно, что разные исследователи сообщают о диаметрально противоположных результатах применения клеточной терапии, которую до последнего времени применяли без учета стадии развития ХПН. Полагая, что если использовать более эффективный и стабильный биотехнологический препарат, который сохраняет свои регуляторные свойства независимо от окружающей его среды – то есть оРНК, а не ККМ, а также если применить оРНК на той стадии ХПН, когда процессы фиброзирования и иммунного дисбаланса не достигли стадии необратимости (конечная стадия ХПН), то можно создать условия в печени для перепрограммирования регенерационных процессов с заместительного типа на восстановительный. Для проверки этого предположения и изучения эффективности применения оРНК для индукции процессов дефиброзирования печени нами на 100 крысах (всего в этой серии опытов было использовано 140 крыс, 40 из которых служили донорами ККМ для выделения из них оРНК) была создана модель хронического токсического повреждения печени (ХТПП). Из 100 крыс в процессе затравки погибло 25, а 75 крыс были разбиты на 3 группы: 1 группа контроль ХТПП с введением физиологического раствора, 2 группа-опытная с однократным введением оРНК из ККМ в дозе 30мкг/10 грамм веса животного через 7 суток после окончания затравки и 3 группа-опытная с однократным введением несортированных моноклеарных ККМ в дозе 30×10^6 кл. через 7 суток после окончания моделтирования ХТПП. Наше исследование показало, что в течение первых 3-х месяцев после моделирования ХТПП в контрольной группе из 25 крыс погибло 3 крысы, что составило 12%; в 2-х опытных группах летальность составила 4% (по 1 крысе в каждой группе) в течение всего срока наблюдения. Через 1 неделю после завершения моделирования ХТПП во всех группах до начала терапии в перицентральных

зонах печени выявлялись дистрофические изменения гепатоцитов, а также нарушения дольковой и балочной структуры ткани печени (рисунок 8 А, Б).

Через 3 месяца после затравки в печени крыс контрольной группы формировался цирроз с нарушением балочного строения и появлением ложных долек. Гепатоциты были без выраженных дистрофических изменений, отмечалась нерезко выраженная клеточная инфильтрация (рисунок 9 А, Б, В). Аналогичные результаты на сроке 3 месяца были получены в 3 – опытной группе, где использовались несортированные моноклеарные ККМ (рисунок 10). Однако у крыс 2 - опытной группы через 3 месяца после затравки на фоне сформировавшегося цирроза появляются отчетливые признаки фибролиза септ и образовавшихся ложных долек; кроме того, в структуре ложных долек выявляются значительные количества молодых новообразованных гепатоцитов (рисунок 11 А, Б, В и рисунок 12 А, Б, В, Г). Полученные данные свидетельствуют о том, что введение оРНК на фоне формирующегося деструктивного процесса в печени тормозит в ней процессы фиброгенеза по сравнению с контролем и 3 – опытной группой: на 3-ем месяце в 3 – опытной группе, как и в контрольной группе сохраняются ложные дольки и нарушения балочной структуры.

Через 6 месяцев после окончания моделирования ХТПП в печени крыс контрольной группы появляются участки спонтанного лизирования септ ложных долек и зоны молодых гепатоцитов (рисунок 13 А, Б, В и рисунок 14 А, Б). Аналогичные данные были получены в 3 – опытной группе. В то же время в печени крыс 2 - опытной группы к 6 месяцу после введения оРНК наступает полное восстановление гистологической структуры печени (рисунок 15 А, Б, В): восстанавливается структура печеночных долек и их балочная структура, происходит полный лизис соединительнотканых септ. Восстановление структуры ткани печени у крыс контрольной группы происходило на 9 месяце, хотя местами сохранялись участки соединительнотканых септ (рисунок 16 А, Б).

Проведенные эксперименты по использованию оРНК из ККМ для коррекции деструктивных процессов в печени при моделировании ХТПП позволяют прийти к выводу, что печень крыс обладает чрезвычайно высоким потенциалом пластичности и регенерационной активности, в результате чего, у этих животных удается воспроизвести процессы фиброзирования печени в сроках, не превышающих 6 месяцев. Раннее применение оРНК (через 7 суток после окончания моделирования ХТПП), индуцирует ускорение темпа восстановительных процессов по сравнению с контролем: через 3 месяца после моделирования ХТПП в контрольной группе в печени имели место отчетливо выраженные морфологические признаки цирроза; через 3 месяца после введения оРНК - наступал лизис фиброзных септ ложных долек и образовывались зоны молодых (новообразованных) гепатоцитов. К 6 месяцу после введения оРНК морфологическая структура ткани печени полностью восстанавливалась. В контроле к 6 месяцу начинал активироваться процесс дефиброзирования печени, который завершался спонтанно к 9 месяцам. В 3 – опытной группе в отличие от контроля применение ККМ ускоряло процессы восстановления функциональных показателей печени, но также как в контроле не оказывало выраженного воздействия на восстановление структуры ткани печени. Проведенные эксперименты позволили нам прийти к заключению, что оРНК из ККМ здорового донора может быть использована в качестве альтернативного средства биотехнологического воздействия на поврежденную печень для инициации ускоренного темпа восстановительной регенерации этого органа не только при остром повреждении (при обширной резекции печени), но и при хроническом деструктивном токсическом повреждении (при сохраняющихся резервах обратимости структурных нарушений).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было предпринято с целью совершенствования метода клеточной терапии стволовыми/прогениторными ККМ, который, несмотря на признание и свои многообещающие возможности, до сих пор не внедрен в широкую клиническую практику. Препятствием для использования ККМ в качестве эффективного средства индукционной терапии восстановительных процессов в поврежденных органах является, прежде всего, отсутствие уверенности в безопасности применения стволовых/прогениторных ККМ, которые, как известно, могут проявлять мутагенные и канцерогенные свойства. Кроме того, известно, что применение ККМ, как аутологичных, так и аллогенных, часто оказывается мало эффективным, особенно у пациентов с тяжелым повреждением жизненно важных органов, сопровождающимся иммунопатологическими сдвигами внутренней среды организма, так как в этих условиях используемые клетки быстро утрачивают свой регенерационный потенциал (адаптивное воздействие патологически измененной среды). В связи с указанными обстоятельствами и для повышения эффективности, надежности и безопасности применения клеточных технологий в регенерационной медицине мы считали целесообразным перейти к использованию не клеток, а тех клеточных структур - сигнальных молекул, которые обеспечивают перенос регенерационной информации в поврежденные ткани. Опираясь на результаты многочисленных исследований последних лет, мы пришли к заключению, что такими регуляторными переносчиками регенерационных сигналов в ККМ могут являться не отдельные белок-некодирующие микро РНК, а разнообразные по своим структурным и функциональным свойствам молекулы как белок некодирующих, так и белок кодирующих РНК, которые образуют в клетках единую сигнальную систему, содержащуюся в общей РНК этих клеток.

Своими исследованиями на модели адоптивного переноса мы доказали, что общая РНК действительно является переносчиком адресных регенерационных сигналов в поврежденный орган (печень), а на моделях острой печеночной недостаточности путем обширной резекции печени и хронической печеночной недостаточности при моделировании хронического токсического повреждения печени (обратимого повреждения) мы убедительно показали, что общая РНК не только индуцирует процессы ускоренного восстановления ткани поврежденной печени, но и по сравнению с ККМ воздействует на регенерационные процессы более выражено, более эффективно и на более ранних сроках.

Так как в экспериментах с моделированием хронического токсического повреждения печени раннее введение общей РНК не препятствовало развитию цирроза печени, но ускоряло процессы дефиброзирования печени по сравнению с контролем и опытами, где применяли ККМ - то мы полагаем, что для предотвращения развития цирроза и для лизиса септ ложных долек при тяжелом цирротическом процессе в печени будет целесообразно использовать курсовое применение оРНК из ККМ, а также выделять и применять оРНК из ММСК КМ, которые в составе оРНК в отличие от РНК из мононуклеарных клеток, должны содержать молекулы РНК, интенсивно регулирующие фибролитические процессы. Исследования в этом направлении необходимо продолжить.

ВЫВОДЫ

1. Разработан протокол технологии выделения оРНК из клеток костного мозга и установлена прямая зависимость содержания оРНК от количества клеток костного мозга.
2. Методом адоптивного переноса выявлена способность оРНК к адресному переносу регенерационных сигналов и установлена средняя эффективная доза оРНК из клеток костного мозга (30 ± 5 мкг/100 г веса животного), которая индуцирует в организме интактных крыс-реципиентов митотическую активность и пролиферацию гепатоцитов при введении оРНК из клеток костного мозга от крыс-доноров с обширной резекцией печени. Способность активированных частичной гепатэктомией клеток костного мозга осуществлять адресный перенос регенерационных сигналов в ткань печени интактных крыс не была выявлена в исследуемых сроках.
3. На модели обширной резекции печени проведен сравнительный анализ способности оРНК из клеток костного мозга и клеток костного мозга стимулировать восстановительные регенерационные процессы в поврежденной печени. Показано, что при введении животным средней эффективной дозы оРНК из клеток костного мозга наблюдаются достоверно более высокие значения митотического индекса гепатоцитов и сокращаются сроки восстановления массы печени до исходного уровня по сравнению с введением клеток костного мозга в дозе $30-35 \times 10^6$, используемой для выделения средней эффективной дозы оРНК.
4. Созданная модель хронического токсического повреждения печени путем комбинированного использования токсических доз CCl_4 и неполного адьюванта Фрейнда позволяет воспроизвести и сохранить морфологические признаки цирроза печени в течение 6 месяцев.
5. Введение средней эффективной дозы оРНК из клеток костного мозга животным с хроническим токсическим повреждением печени достоверно ускоряет темп дефиброзирования и восстановления структуры ткани печени по сравнению с контролем. При введении клеток костного мозга ускорение темпа дефиброзирования печени в этой модели не было обнаружено.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При выборе способа регуляции восстановительных регенерационных процессов в поврежденной печени предпочтение следует отдавать не клеткам костного мозга, а оРНК, выделенной из них.
2. Для регуляции восстановительных процессов в поврежденной печени оРНК может быть использована в средней эффективной дозе 30 мкг/100 г веса, что обеспечивает высокий темп восстановления структуры, функции и массы печени.
3. Созданная модель хронического (фиброзирующего) повреждения печени может быть использована для скрининговой оценки эффективности различных биомедицинских методов коррекции хронической печеночной недостаточности.

Список основных сокращений

ВКМ – внеклеточный матрикс
Гп – гепатоцит
ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
ЗК – звездчатые клетки
КК – клетки Купфера
КМ – костный мозг
ККМ – мононуклеарные клетки костного мозга
МСК – мезенхимальные стволовые клетки
ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
МИ – митотический индекс
оРНК – общая рибонуклеиновая кислота
ОРП – обширная резекция печени
ОПН – острая печеночная недостаточность
ПН – печеночная недостаточность
СК – синусоидальные клетки
СПК – стволовые прогениторные клетки
miRNAs – микро рибонуклеиновая кислота
CCl₄ – четыреххлористый углерод
ХТПП – хроническое токсическое повреждение печени
ХПН – хроническая печеночная недостаточность
ФР – физиологический раствор
INFs – интерфероны
HGF – фактор роста гепатоцитов
SCF – фактор стволовых/прогениторных клеток
 α SMA – α -гладкомышечный актин
VEGF – сосудистый эндотелиальный ростовой фактор
PDGF – тромбоцит-деривированный ростовой фактор
TGF- β – трансформирующий ростовой фактор- β
CTGF – фактор роста соединительной ткани
INFs – интерфероны
ILs – интерлекины
ЧГЭ – частичная гепатэктомия
NASH – неалкогольного стеатогепатита
NAFLD – неалкогольный жировой гепатоз
KGF – фактор роста кератиноцитов

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ивашкин В.Т. Преждевременная смертность в Российской Федерации и пути ее снижения. Стратегия "шесть в четырех" / В. Т. Ивашкин, И. Н. Уланова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2006.- №1.- С.8-14.
2. Рахманова А.Г. Хронический вирусный гепатит С и цирроз печени. / А.Г.Рахманова, А.А. Яковлев, В.А. Кащенко, В.В. Шаройко // СПб: Спецлит.- 2006.- С.- 413.
3. Friedman S.L. Hepatic fibrosis – overview. / S.L. Friedman // Toxicology.- 2008 Dec. 30; Vol. 254(3).-P. 120-129.
4. Плеханов А.Н. Современные подходы к диагностике и лечению печёночной недостаточности (обзор литературы). / А.Н. Плеханов А.И. Товаршинов // Бюллетень ВСНЦ, 2016, Том 1, Vol. 4 (110).- С.136.
5. Smets F.M. Cell transplantation in the treatment of liver diseases. / F.M. Smets, S.F. Najimi, E.M. Sokal // Pediatric Transplantation. - 2008.- Vol. 12.-P. 6–13.
6. Киясов А.П. Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами. / А.П. Киясов, А.Х. Одинцова, А.А. Гумерова [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.- 2008.- Т.- 3. Vol. 1. С.-70–75.
7. Kallis Y.N. Bone marrow stem cells and liver disease. / Y.N. Kallis, M.R. Alison, S.J. Forbes // Gut/- 2007.-Vol. 56.-P.-716–724.
8. Burt R.K. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. / R.K. Burt, Y. Loh, W. Pearce, N. Beohar, W.G. Barr, R. Craig, Y. Wen, J.A. Rapp, J. Kessler // JAMA.- 2008.-Vol. 299(8). -P.-925-936.
9. Lyra A.C. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. / A.C. Lyra, M.B. Soares,

L.F. da Silva [et al] // European Journal of Gastroenterology & Hepatology.- 2010.- Vol. 22(1).- P.33-42.

10. Ismail A. Stem cell therapy improves the outcome of liver resection in cirrhotics. / A. Ismail, O. Fouad, A. Abdelnasser, A. Chowdhury, A. Selim // Journal of Gastrointestinal Cancer. Gastrointest. Canc.- 2010.-Vol.-41(1). - P.17-23.

11. Amer M.E. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. / M.E. Amer, S.Z. El-Sayed, W.A. El-Kheir [et al] // European Journal of Gastroenterology & Hepatology.- 2011.- Vol.-23(10).- P.936-941.

12. Stutchfield B.M. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. / B.M. Stutchfield, S.J. Forbes, S.J. Wigmore // Liver Transplantation.- 2010.- Vol.-16(7).-827-836.

13. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases / H. Lin, R. Xu, Z. Zhang, L. Chen, M. Shi, F.S. Wang // Cellular & Molecular Immunology.- 2011.-Vol. 8(1).P.-19-22.

14. M. Eldh Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. / M. Eldh, K. Ekstrom, H. Valadi [et al.] // PLoS One. -2010. -Vol.-5. № 12. P.-15353.

15. Dickey J.S. The role of miRNA in the direct and indirect effects of ionizing radiation. / J.S. Dickey, F.J. Zemp, O.A. Martin, O. Kovalchuk // Radiation and Environmental Biophysics.- 2011.- Vol.-50. P. 491-499.

16. Тишевская Н.В. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. / Н.В.Тишевская, А.Г. Бабаева, Н.М. Геворкян // Российский Физиологический Журнал им. И.М. Сеченова.- 2016.- Т.102.- Vol.-11.- С. 1280-1301.

17. Бабаева А. Г. О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах. / А. Г. Бабаева, Н. В. Тишевская, Н. М. Геворкян // Российская академия наук.- Научно-исследовательский институт морфологии человека. – Москва.- 2016.- С.272.

18. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. / D.P. Bartel // *Cell*.-2009.- Vol.-136(2).- P. 215-233.
19. Peterson S.M. Common features of microRNA target prediction tools. / S.M. Peterson, J.A. Thompson, M.L. Ufkin, P. Sthyanarayana, L. Liaw, C.B. Congdon // *Frontiers in Genetics*.- 2014.-Vol.-5.- S.M. P.23.
20. Yan I.K. Circulating Extracellular RNA Markers of Liver Regeneration. / I.K. Yan , X. Wang , Y.W. Asmann, H. Haga , T. Patel // *PLoS One*.-2016.-Vol.11(7).
21. Li J. Expression Profile and Function Analysis of LncRNAs during Priming Phase of Rat Liver Regeneration// J. Li , W. Jin , Y. Qin , W. Zhao , C. Chang , C. Xu // *PLoS One*.-2016 Jun 21.- Vol.-11(6).
22. Li C. The role of lncRNA MALAT1 in the regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration. / C. Li , L. Chang , Z. Chen , Z. Liu , Y. Wang, Q. Ye // *Int. J. Mol. Med*. 2017 Feb.- Vol.-39(2).-P.347-356.
23. Lauschke V.M. Rezayee F,Nordling Å,Hendriks DF,Bell CC,Sison-Young R,Park BK,Goldring CE,Ellis E,Johansson I,Mkrtchian S,Andersson TB,Ingelman-Sundberg M. Massive rearrangements of cellular MicroRNA signatures are key drivers of hepatocyte dedifferentiation. / V.M. Lauschke, S.U. Vorrink, S.M. Moro // *Hepatology*.-2016.-Vol.-64(5).-P.1743-1756.
24. Qiao J. Long non-coding RNAs expression profiles in hepatocytes of mice after hematopoietic stem cell transplantation. / J. Qiao, H. Yao, Y Xia, P Chu [et al] // *IUBMB Life*.-2016 Mar.-Vol.-68(3).-P.232-241.
25. Huang L. Partial Hepatectomy Induced Long Noncoding RNA Inhibits Hepatocyte Proliferation during Liver Regeneration. L. Huang , S.S. Damle, S. Booten, P. Singh, M. Sabripour, [et al] // *PLoS One*.- 2015 Jul 24.-Vol.-10(7).
26. Mottaghitlab F. Prospects of siRNA applications in regenerative medicine. / F. Mottaghitlab, A. Rastegari, M. Farokhi, R. Dinarvand, H Hosseinkhani [et al] // *International Journal of Pharmaceutics*.2017 May 30.-Vol.-524(1-2).-P.312-329.
27. Ma H. IL-1 β siRNA adenovirus benefits liver regeneration by improving mesenchymal stem cells survival after acute liver failure. / H. Ma, X. Shi, X. Yuan, Y. Ding // *Annals of Hepatology*.-2016.-Vol.-15(2).-P.260-270.

28. Бабаева А. Г. Тишевская Н. В., Геворкян Н. М. и др. О стимулирующих эритропоз свойствах суммарной РНК лимфоцитов периферической крови при эритремии: // Клиническая и экспериментальная морфология. - 2015. – №1. - С. 33-37.
29. Mokdad A.A. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. / A.A. Mokdad, A.D. Lopez, S. Shahrzad, R. Lozano, A.H. Mokdad, [et al] // BMC Med.-2014 Sep 18.- Vol.-112.- P.145.
30. Wen-Ce Z. Pathogenesis of liver cirrhosis. / Z. Wen-Ce, Z. Quan-Bao, and Q. Liang. // World J Gastroenterol. 2014 Jun 21.-Vol.-20(23).-P. 7312-7324.
31. Frei P. Liver transplantation. / P. Frei, A. Geier, P. Dutkowski, B. Müllhaupt. // Therapeutische Umschau.-2011.-Vol.-68.-P.214–219.
32. Sohrabpour A.A. Review article: the reversibility of cirrhosis. A.A. Sohrabpour, M. Mohamadnejad, R. Malekzadeh // Alimentary Pharmacology and Therapeutics.-2012.-Vol.-36(9).-P.824-832.
33. Онищенко Н.А. Синусоидальные клетки печени и клетки костного мозга как компоненты единой функциональной системы регуляции восстановительного морфогенеза в здоровой и поврежденной печени. / Н.А. Онищенко, А.В. Люндуп, Р.В. Деев, М.Ю. Шагидулин, М.Е. Крашенинников // Гены & Клетки: Том VI, №2, 2011 год,-С.78-92.
34. Ельчанинов А.В. Регенерация печени млекопитающих. // Клиническая и экспериментальная морфология. / А.В. Ельчанинов,Т.Х. Фатхудинов, А.В. Макаров. –2012. –№ 4. – С.57-61.
35. Ельчанинов А.В. Молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после субтотальной резекции в эксперименте. / А.В. Ельчанинов автореферат дис. д.м.н.- 2017.- Москва.- 41 С.
36. Canbay A. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. / A. Canbay, P. Taimr, N. Torok [et al]. // Lab. Invest.-2003.-Vol.-83(5).-P.655-663.

37. Шумаков В. И., Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. / В. И. Шумаков, Н.А. Онищенко. // Москва 2009.
38. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional and enigmatic cells of liver. / S.L. Friedman // *Physiol. Rev.*-2008.-Vol.-88(1). - P.125-172.
39. Sawitza I. The niche of stellate cells within rat liver. / I. Sawitza, Kordes C., D. Hausinger // *J. Hepatol.* 2009.-Vol.-50(5).-P.1617-1624.
40. Kordes C. CD34 hepatic stellate cells are progenitor cells. / C. Kordes, J. Sawitzal, A. Miller-Marbach [et al] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*-2007.-Vol.-7.-P.352-410.
41. Dezso K. Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-mediated liver regeneration. / K Dezso, P. Jelnes, V. Laszlo [et al] // *Am. J. Pathol.*- 2007.-Vol.-131(1)P.115-127.
42. Гумерова А.А. Могут ли перисинусоидальные клетки быть региональными стволовыми клетками (прогениторными) клетками печени? / А.А. Гумерова, А.П. Киясов // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2010.-Т.-5(1).-С.33–40.
43. Elsharkawy A.M. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. / A.M. Elsharkawy, F. Oakley, D.A. Mann // *Apoptosis.*-2005.-Vol.-10(5).-P.927-939.
44. Lakner A.M. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis. / A.M. Lakner, N.M. Steuerwald, T.L. Walling, S. Ghosh [et al] // *Hepatology.*-2012.-Vol.-56(1).-P.300-310.
45. Oakley F. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. / F. Oakley, M. Meso, J.P. Iredale, K. Green [et al] // *Gastroenterology.* -2005.-Vol.-128(1).-P.108-120.
46. He Y. The potential of microRNAs in liver fibrosis. / Y. He, C. Huang, S.P. Zhang, X. Sun, X.R. Long, J. Li // *Cell Signal.* -2012.-Vol.-24.-P.2258–2272.

47. Safadi R. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. / R. Safadi, M. Ohta, C.E. Alvarez [et al] // *Gastroenterology* 2004.- Vol.-127(3).-P.870–882.
48. Øie C.I. Rat liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) express functional low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). / C.I. Øie, R.S. Appa, I. Hilden, H.H. Petersen [et al] // *J Hepatol.* -2011.-Vol.-55.-P.1346–1352.
49. Yokomori H. Recent advances in liver sinusoidal endothelial ultrastructure and fine structure immunocytochemistry. / H. Yokomori, M. Oda, K. Yoshimura, T. Hibi // *Micron.* -2012.-Vol.-43.-P.129–134.
50. Marvie P. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. / P. Marvie, M. Lisbonne, A. L'helgoualc'h // *J Cell Mol Med.*-2010.-Vol.-14.-P.1726–1739.
51. Deleve L.D. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. / L.D. Deleve, X. Wang, Y. Guo // *Hepatology.*-2008.-Vol.-48.-P.920–930.
52. Xie G. Role of differentiation of liver sinusoidal endothelial cells in progression and regression of hepatic fibrosis in rats. / G. Xie, X. Wang, L. Wang, L. Wang [et al] // *Gastroenterology.* -2012.-Vol.-142.-P.918–927.
53. Kolios G Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. / G. Kolios V. Valatas, E. Kouroumalis // *World J Gastroenterol.*-2006.-Vol.-12.-P.7413–7420.
54. López-Navarrete G Th2-associated alternative Kupffer cell activation promotes liver fibrosis without inducing local inflammation. / G. López-Navarrete, E Ramos-Martínez, K Suárez-Álvarez [et al] // *Int J Biol Sci.*-2011.-Vol.-7.-P.1273–1286.
55. Bataller R. Liver fibrosis. / R. Bataller, D.A. Brenner // *J Clin Invest.*-2005.-Vol.-115.-P.209–218.
56. Marshall A. Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. / A. Marshall, S. Rushbrook, S.E. Davies, [et al] // *Gastroenterology.* -2005.-Vol.-128.-P.33–42.
57. Lunz J.G. An inhibitor of cyclin-dependent kinase, stress-induced p21Waf-1/Cip-1, mediates hepatocyte mitotic inhibition during the evolution of cirrhosis. / J.G

Lunz, H. Tsuji, I. Nozaki, N. Murase, A.J. Demetris // *Hepatology*.-2005.-Vol.-41.-P.1262–1271.

58. Garcíade L. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrhotic rat liver. / L. Garcíade, I. Montfort, E. Tello [et al] *Mol Pathol*. -2006.-Vol.-80.-P.97–108.

59. Jeong W.I. Hypoxia potentiates transforming growth factor-beta expression of hepatocyte during the cirrhotic condition in rat liver. / W.I. Jeong, S.H. Do, H.S. Yun, B.J. Song, [et al] // *Liver Int*.-2004.-Vol.- 24.-P.658–668.

60. Wiemann S.U. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. / S.U. Wiemann, A. Satyanarayana, M. Tsahuridu [et al] // *FASEB J*.-2002.- Vol.-16.-P.935–942.

61. Martin I.V. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C neutralization reveals differential roles of PDGF receptors in liver and kidney fibrosis. / I.V. Martin, E. Borkham-Kamphorst, S. Zok, C.R. van Roeyen [et al] // *Am J Pathol*. -2013.-Vol.-182.-P.107–117.

62. Cao S. Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. / S. Cao, U. Yaqoob, A. Das [et al]. // *J Clin Invest*. -2010.-Vol.-120.-P.2379–2394.

63. Borkham-Kamphorst E. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. E. Borkham-Kamphorst, C.R. van Roeyen, T. Ostendorf, J. Floege, A.M. Gressner, R. Weiskirchen. // *J Hepatol*. -2007.-Vol.-46.-P.1064–1074.

64. Czochra P. Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice. / P. Czochra, B. Klopčič, E. Meyer, J. Herkel [et al] // *J Hepatol*. -2006.-Vol.-45.-P.-419–428.

65. Kamari Y. Lack of interleukin-1 α or interleukin-1 β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. / Y. Kamari, A. Shaish, E. Vax, S. Shemesh [et al] // *J Hepatol*. -2011.-Vol.-55.-P.1086–1094.

66. Kirmaz C. Serum transforming growth factor-beta1(TGF-beta1) in patients with cirrhosis, chronic hepatitis B and chronic hepatitis C [corrected]. / C. Kirmaz E.

Terzioglu, O. Topalak, P. Bayrak, O. Yilmaz, G. Ersoz, F. Sebik // *Eur Cytokine Netw.* -2004.-Vol.-15.-P.112–116.

67. Liu X. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. / X. Liu, H. Hu, J.Q. Yin // *Liver Int.*-2006.-Vol.-26.-P.8–22.

68. Wells R.G. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. / R.G. Wells, E. Kruglov, J.A. Dranoff // *FEBS Lett.*-2004.-Vol.-559.-P.107–110.

69. Cui Q. HGF inhibits TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation and ECM deposition via MMP-2 in Achilles tendon in rat. / Q. Cui, Z. Wang, D. Jiang, L. Qu, J. Guo, Z. Li. // *Eur J Appl Physiol.*-2011.-Vol.-111.-P.1457–1463.

70. Connolly M.K. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha. / M.K. Connolly A.S. Bedrosian, J. Mallen-St Clair [et al] // *J Clin Invest*-2009.-Vol.-119.-P.3213–3225.

71. Taimr P. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. / P. Taimr, H. Higuchi, E. Kocova, R.A. Rippe, S. Friedman, G.J. Gores // *Hepatology.* -2003.-Vol.-37.-P.87–95.

72. Varela-Rey M. Glutathione depletion is involved in the inhibition of procollagen alpha1(I) mRNA levels caused by TNF-alpha on hepatic stellate cells. / M. Varela-Rey, L. Fontán-Gabás, P. Blanco, M.J. López-Zabalza, M.J. Iraburu // *Cytokine.*-2007.-Vol.-37.-P.212–217.

73. Koca S.S. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. / S.S. Koca, I.H. Bahcecioglu, O.K. Poyrazoglu, I.H. Ozercan, K. Sahin, B. Ustundag // *Inflammation.*-2008.-Vol.-31.-P.91–98.

74. Tomita K. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. / K. Tomita, G. Tamiya, S. Ando [et al] // *Gut.* -2006.-Vol.-55.-P.415–424.

75. Furuya S. Interleukin-17A plays a pivotal role after partial hepatectomy in mice. / S. Furuya, H. Kono, M. Hara, K. Hirayama, M. Tsuchiya, H. Fuji // *J Surg Res.*-2013 Oct.-Vol.-184(2).-P.838-846.
76. Poynard T. Impact of interferon-alpha treatment on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B: an overview of published trials. / T. Poynard, J. Massard, M. Rudleret [et al] // *Gastroenterol Clin Biol.*-2009.-Vol.-33.-P.916–922.
77. Ogawa T. Effect of natural interferon α on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. / T. Ogawa N. Kawada, K. Ikeda // *Hepatol Int.*-2009.-Vol.-3.-P.497–503.
78. Rao H.Y. Inhibitory effect of human interferon-beta-1a on activated rat and human hepatic stellate cells. / H.Y. Rao, L. Wei, J.H. Wang, R. Fei, D. Jiang [et al] // *J Gastroenterol Hepatol.*-2010.-Vol.-25.-P.1777–1784.
79. Du S. *Houttuynia cordata* inhibits lipopolysaccharide-induced rapid pulmonary fibrosis by up-regulating IFN- γ and inhibiting the TGF- β 1/Smad pathway. / S. Du, H. Li, Y. Cui, L. Yang, J. Wu, H. Huang [et al] // *Int Immunopharmacol.*-2012.-Vol.-13.-P.331–340.
80. Saile B. Interferon-gamma acts proapoptotic on hepatic stellate cells (HSC) and abrogates the antiapoptotic effect of interferon-alpha by an HSP70-dependant pathway. / B. Saile, C. Eisenbach, J. Dudas, H. El-Armouche, G. Ramadori // *Eur J Cell Biol.*-2004.-Vol.-83.-P.469–476.
81. Gieling R.G. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. / R.G. Gieling, K. Wallace, Y.P. Han // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*-2009.-Vol.-296.-P.1324–1331.
82. Petrasek J. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. / J. Petrasek, S. Bala, T. Csak, D. Lippai, K. Kodys [et al] // *J Clin Invest.* -2012.-Vol.-122.-P.3476–3489.
83. Du W.J. Expression of interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection. / W.J. Du, J.H. Zhen, Z.Q. Zeng // *Diagn Pathol.* -2013Vol.-8.-P.40.

84. Hara M. Interleukin-17A plays a pivotal role in cholestatic liver fibrosis in mice. / M. Hara, H. Kono, S. Furuya, K. Hirayama, M. Tsuchiya, H. Fujii // *J Surg Res.* -2013.-Vol.-183.-P.574–582.
85. Meng F. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. / F. Meng, K. Wang, T. Aoyama [et al] // *Gastroenterology.* -2012.-Vol.-143(3).-P.765-776.
86. Chou W.Y. Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP and TIMP modulation. / W.Y. Chou, C.N. Lu, T.H. Lee, C.L. Wu, K.S. Hung, A.M. Concejero, B. Jawan, C.H. Wang // *Acta Pharmacol Sin.* -2006.-Vol.-27.-P.469–476.
87. Zhang L.J. Antifibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis. / L.J. Zhang, W.D. Zheng, Y.X. Chen, Y.H. Huang, Z.X. Chen, S.J. Zhang, M.N. Shi, X.Z. Wang // *Hepatogastroenterology.*-2007.-Vol.-54.-P.2092–2098.
88. Huang Y.H. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. / Y.H. Huang, M.N. Shi, W.D. Zheng, L.J. Zhang, Z.X. Chen, X.Z. Wang // *World J Gastroenterol.*-2006.-Vol.-12.-P.1386–1391.
89. Kong X. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. / X. Kong, D. Feng, H. Wang, F. Hong, A. Bertola, F.S. Wang // *Gao B. Hepatology.*-2012.-Vol.-56.-P.1150–1159.
90. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. / T. Kishimoto // *Int Immunol.* -2010.-Vol.-22.-P.347–352.
91. Nasir G.A. Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. / G.A. Nasir, S. Mohsin, M. Khan, S. Shams, G. Ali, S.N. Khan, S. Riazuddin // *J Transl Med.*-2013.-Vol.-11.-P.78.
92. Tarantino G. Could inflammatory markers help diagnose nonalcoholic steatohepatitis? / G. Tarantino, P. Conca, F. Pasanisi, M. Ariello, M. Mastrolia, A. Arena, M. Tarantino, F. Scopacasa, R. Vecchione // *Eur J Gastroenterol Hepatol.*-2009.-Vol.-21.-P.504–511.

93. Tarantino G. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. / G. Tarantino, S. Savastano, A. Colao // *World J Gastroenterol.* -2010.-Vol.-16.-P.4773–4783.
94. Finch M.L. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease. / M.L. Finch, J.U. Marquardt, G.C. Yeoh , B.A. Callus // *Int J Biochem Cell Biol.*-2014.-Vol.-54.-P.288-303.
95. Chen Y. MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function. Y. Chen , C.M. Verfaillie // *Liver Int.*-2014.-Vol.-34(7).-P.976-990.
96. Salehi S. Human liver regeneration is characterized by the coordinated expression of distinct microRNA governing cell cycle fate. / S. Salehi, H.C. Brereton, M.J. Arno, D. Darling, A. Quaglia, J. O'Grady, N. Heaton, V.R. Aluvihare / *Am J Transplant.*-2013.-Vol.-13(5).-P.1282-1295.
97. Huleihel L. The Influence of Extracellular RNA on Cell Behavior in Health, Disease and Regeneration. / L. Huleihel, M.E. Scarritt, S.F. Badylak // *Curr Pathobiol Rep.*-2017.-Vol.-5(1).-P.13-22.
98. Bandiera S. miR-122-a key factor and therapeutic target in liver disease. / S. Bandiera, S. Pfeffer, T.F. Baumert, M.B. Zeisel // *J Hepatol.*-2015 .-Vol.-62(2).-P.448-457.
99. Antoine D.J. Understanding the pathophysiological regulatory role of microRNAs in acute liver failure. / D.J. Antoine, J.W. Dear, C.E. Goldring, B.K. Park // *Hepatology.*- 2015.-Vol.-61(4).-P.1439-1440.
100. John K MicroRNAs play a role in spontaneous recovery from acute liver failure. K. John, J. Hadem, T. Krech, K. Wahl, M.P. Manns, S. Dooley, S. Batkai, T. Thum, K. Schulze-Osthoff, H. Bantel // *Hepatology.*-2014.-Vol.-60(4).-P.1346-1355.
101. Park H.K. Time-course changes in the expression levels of miR-122, -155, and -21 as markers of liver cell damage, inflammation, and regeneration in acetaminophen-induced liver injury in rats. / H.K Park, W. Jo, H.J. Choi, S. Jang, J.E. Ryu, H.J. Lee, H. Lee, H. Kim, E.S. Yu, W.C. Son // *J Vet Sci.*-2016.-Vol.-17(1).-P.45-51.

102. Juskeviciute E. Inhibition of miR-21 rescues liver regeneration after partial hepatectomy in ethanol-fed rats. / E. Juskeviciute, R.P. Dippold, A.N. Antony, A. Swarup, R. Vadigepalli, J.B. Hoek // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*-2016.-Vol.-311(5).-P.794-806.
103. Wang B. miR-181b promotes hepatic stellate cells proliferation by targeting p27 and is elevated in the serum of cirrhosis patients. / B. Wang, W. Li, K. Guo, Y. Xiao, Y. Wang // *J. Biochem Biophys Res Commun.* -2012.-Vol.-421.-P.4–8.
104. Iizuka M. Induction of microRNA-214-5p in human and rodent liver fibrosis. / M. Iizuka, T. Ogawa, M. Enomoto, H. Motoyama, K. Yoshizato, K. Ikeda, N. Kawada. // *Fibrogenesis Tissue Repair.* -2012.- Vol.-5.-P.12.
105. Ogawa T. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. / T. Ogawa, M. Enomoto, H. Fujii, Y. Sekiya, K. Yoshizato, K. Ikeda, N. Kawada // *Gut.*-2012Vol.-61.-P.1600–1609.
106. Murakami Y. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. / Y. Murakami, H. Toyoda, M. Tanaka, M. Kuroda [et al] // *PLoS One.*-2011.-Vol.-6.
107. Venugopal S.K. Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. / S.K. Venugopal, J. Jiang, T.H. Kim, Y. Li, S.S. Wang, N.J. Torok, J. Wu, M.A. Zern // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*-2010.-Vol.-298.-P.101–106.
108. Roderburg C. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. / C. Roderburg, G.W. Urban, K. Bettermann, M. Vucur, H. Zimmermann [et al] // *Hepatology.*-2011.-Vol.-53.-P.209–218.
109. Roderburg C. miR-133a mediates TGF- β -dependent derepression of collagen synthesis in hepatic stellate cells during liver fibrosis. / M. Luedde, D. Vargas Cardenas, M. Vucur, T. Mollnow, H.W. Zimmermann, A. Koch, C. Hellerbrand, R. Weiskirchen, N. Frey [et al] // *J Hepatol.*-2013.-Vol.-58.P.736–742.

110. Xu H. Lipid deposition in liver cells: The influence of short form augments of liver regeneration. / H. Xu, H. Wang, N. Zhao, F. Zhou, J. Yang . // Clin Res Hepatol Gastroenterol.-2016.-Vol.-40(2).P.-186-194.
111. Chen X. MicroRNA-21 Contributes to Liver Regeneration by Targeting PTEN. / X. Chen, M. Song, W. Chen, J. Dimitrova-Shumkovska, Y. Zhao [et al] // Med Sci Monit.-2016.-Vol.-22.-P.83-91.
112. Yan-nan B. MicroRNA-21 accelerates hepatocyte proliferation in vitro via PI3K/Akt signaling by targeting PTEN. / B. Yan-nan, Y. Zhao-yan, L. Li-xi, Y Jiang, X. Qing-jie, Z. Yong // Biochem Biophys Res Commun.-2014.-Vol.-443(3).-P.802-807.
113. Silveira M.R. Ex situ regeneration of liver remnants hypothermically preserved for 24 hours. / M.R. Silveira, T. Silva, P.C. Novaes, L.F. Tirapelli, D.P. Tirapelli //Transplant Proc.-2014.-Vol.-46(6).-P.1857-1861.
114. Başar O , Non-invasive tests in prediction of liver fibrosis in chronic hepatitis B and comparison with post-antiviral treatment results. / O. Başar, B. Yılmaz, F. Ekiz, Z. Giniş, A. Altınbaş, B. Aktaş, Y. Tuna, S. Çoban, N. Delibaş, O. Yüksel // Clin Res Hepatol Gastroenterol. -2013.-Vol.-37.-P.152–158.
115. Berenguer M. Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: mechanisms, assessment and treatment. / M. Berenguer, D. Schuppan. // J Hepatol. - 2013.-Vol.-58.-P.1028–1041.
116. Hou G. Improvement in dissolution of liver fibrosis in an animal model by tetrathiomolybdate. / G. Hou, R. Dick, G.J. Brewer // Exp Biol Med (Maywood) 2009.-Vol.-234.-P.662–665.
117. Kim S.U. Non-invasive assessment of changes in liver fibrosis via liver stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B: impact of antiviral treatment on fibrosis regression. / S.U. Kim, J.Y. Park, Y. Kim do, S.H. Ahn, Choi [et al] // Hepatol Int.-2010Vol.-4.-P.673–680.
118. Chávez E. Antifibrotic and fibrolytic properties of celecoxib in liver damage induced by carbon tetrachloride in the rat. / E. Chávez, J. Segovia, M. Shibayama, V.

Tsutsumi, P. Vergara, L. Castro-Sánchez, E.P. Salazar, M.G. Moreno, P. Muriel // *Liver Int.*-2010.-Vol.-30.-P.969–978.

119. Wang X. Vitamin E reduces hepatic fibrosis in mice with *Schistosoma japonicum* infection. / X. Wang, R. Zhang, J. Du, Y. Hu, L. Xu, J. Lu, S. Yo // *Mol Med Rep.*-2012.-Vol.-5.-P.465–468.

120. Mohamadnejad M Impact of immunosuppressive treatment on liver fibrosis in autoimmune hepatitis. / M. Mohamadnejad, R. Malekzadeh, S. Nasser-Moghaddam, S. Hagh-Azali, [et al] // *Dig Dis Sci.*-2005.-Vol.-50.-P.547–551.

121. Nikolaidis N. Colchicine treatment of liver fibrosis. / N. Nikolaidis, J. Kountouras, O. Giouleme [et al] // *Hepatogastroenterology.*-2006.-Vol.-53.-P.281–285.

122. Biecker E. Long-term treatment of bile duct-ligated rats with rapamycin (sirolimus) significantly attenuates liver fibrosis: analysis of the underlying mechanisms. / E. Biecker, A. De Gottardi, M. Neef, M. Unternährer [et al] // *Pharmacol Exp Ther.*-2005.-Vol.-313.-P.952–961.

123. Neef M. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. / M. Neef, M. Ledermann, H. Saegesser, V. Schneider, J. Reichen. // *J Hepatol.*-2006.-Vol.-45.-P.786–796.

124. Klironomos S. Octreotide modulates the effects on fibrosis of TNF- α , TGF- β and PDGF in activated rat hepatic stellate cells. / S. Klironomos, G. Notas, O Sfakianaki, F. Kiagiadaki, C. Xidakis, E. Kouroumalis // *Regul Pept.*-2014Vol.-188.-P.5–12.

125. Tao Y.Y. Salvianolic acid B inhibits hepatic stellate cell activation through transforming growth factor beta-1 signal transduction pathway in vivo and in vitro. / Y.Y. Tao, Q.L. Wang, L. Shen, W.W. Fu, C.H. Liu // *Exp Biol Med (Maywood)* 2013.-Vol.- 238.-P.1284–1296.

126. Xu M. Tumor Necrosis Factor-Like Weak Inducer of Apoptosis Promotes Hepatic Stellate Cells Migration via Canonical NF- κ B/MMP9 Pathway. // M. Xu,

Zhang F, A. Wang , C. Wang , Y. Cao , M. Zhang [et al] // PLoS One. 2016.-Vol.-11(12).

127. Saile B. IGF-I induces DNA synthesis and apoptosis in rat liver hepatic stellate cells (HSC) but DNA synthesis and proliferation in rat liver myofibroblasts (rMF) B. Saile, P. DiRocco, J. Dudas, H. El-Armouche, H. Sebb, C. Eisenbach, K. Neubauer, G. Ramadori. Lab Invest. -2004.-Vol.-84.-P.1037–1049.

128. Lee M.F. Pterostilbene inhibits dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. / M.F. Lee, M.L. Liu, A.C. Cheng, M.L. Tsai, C.T. Ho, W.S. Liou, M.H. Pan // Food Chem.-2013.-Vol.-138.-P.802–807.

129. Saller R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. / R. Saller, R. Meier, R. Brignoli // Drugs.+2001Vol.-61.-P.2035–2063.

130. Mas N, Tasci I, Comert B, Ocal R, Mas MR. Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis. World J Gastroenterol.2008.

131. Pan X.L. Efficacy and safety of tauroursodeoxycholic acid in the treatment of liver cirrhosis: a double-blind randomized controlled trial. / X.L. Pan, L. Zhao, L. Li, A.H. Li, J. Ye, L. Yang, K.S. Xu, X.H. Hou // J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.-2013.-Vol.-33.-P.189–194.

132. Xu D. Protective effect of verapamil on multiple hepatotoxic factors-induced liver fibrosis in rats. / D. Xu, Y. Wu, Z.X. Liao, H. Wang // Pharmacol. Res.2007.-Vol.-55.-P.280–286.

133. Люндуп А.В. О роли синусоидальных клеток печени и клеток костного мозга в обеспечении регенераторной стратегии здоровой и поврежденной печени. (Аналитический обзор). / А.В. Люндуп, Н.А. Онищенко, М.Е. Крашенинников, М.Ю. Шагидулин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. -2010.-Т.ХII. -№1.-С.78-85.

134. Люндуп А.В. Стволовые/прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени Вестник трансплантологии и искусственных органов. / А.В. Люндуп, Н.А. Онищенко, М.Ю. Шагидулин, М.Е. Крашенинников. - 2010.-Т.-ХII.-№2.-С.100-107.

135. Zhang S.H. Efficacy of HGF carried by ultrasound microbubble-cationic nanoliposomes complex for treating hepatic fibrosis in a bile duct ligation rat model, and its relationship with the diffusion-weighted MRI parameters. / S.H. Zhang, K.M. Wen, W. Wu, W.Y. Li, J.N. Zhao. // *Clin Res Hepatol Gastroenterol.*-2013.-Vol.-37.-P.602–607.
136. Wang Z.X. The treatment of liver fibrosis induced by hepatocyte growth factor-directed, ultrasound-targeted microbubble destruction in rats. / Z.X. Wang, Z.G. Wang, H.T. Ran, J.L. Ren, Y. Zhang, Q. Li, Y.F. Zhu, M. Ao. // *Clin Imaging.*-2009.-Vol.-33.-P.454–461.
137. McKenzie T.J. Artificial and bioartificial liver support. / T.J. McKenzie, J.B. Lillegard, S.L. Nyberg // *Semin Liver Dis.* 2008.- Vol.-28.-P.210–217.
138. Dai L.J. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. L.J. Dai, H.Y. Li [et al] // *Stem Cell Res.*- 2009.-Vol.-2(1).-P.16-25.
139. Люндуп А. В. Применение мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при хроническом фиброзирующем повреждении печени (экспериментальное исследование). / А. В. Люндуп // Дисс. к.м.н. М. 2011 150.с.
140. Levicar N. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34+ cells in patients with chronic liver disease. / N. Levicar, M. Pai, N.A. Habib, P. Tait, L.R. Jiao, S.B. Marley [et al] *Cell Prolif.* 2008.-Vol.-41.-P.-115-125.
141. Pai M. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. / M. Pai, D. Zacharoulis, M.N. Milicevic, S. Helmy, L.R. Jiao, N. Levicar, Tait P. [et al] // *Am. J. Gastroenterol.*-2008.-103.-Vol.-P.1952-1958.
142. Kuo T.K. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success for using bone marrow mesenchymal stem cells. / T.K. Kuo, S. Hung [et al] // *Gastroenterology.* -2008.-134.-Vol.-P.2111- 2121.

143. Souza B.S. Current status of stem cell therapy for liver diseases. / B.S. Souza, R.C. Nogueira, S.A. de Oliveira [et al] // Cell Transplant. -2009.-Vol.-18.-P.1261-1279.
144. Takami T. Stem cell therapy in chronic liver disease. / T. Takami, S. Terai, I. Sakaida // Current Opinion in Gastroenterology.-2012.-Vol.-28.-P.203-208.
145. Carvalho A.B. Bone marrow multipotent mesenchymal stem cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. / A.B. Carvalho, L.F. Quintannilha, Dias [et al] // Stem Cells 2008.-Vol-26.-P.1307–1314.
146. Hoogduijn M. J. Advancement of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Solid Organ Transplantation (MISOT). M. J. Hoogduijn, F. C. Popp, A. Grohnert, P. Renner, L. J. W. van der Laan., B. Christ, M. Shagidulin, G. Remuzzi and the MISOT Study Group // Transplantation. -2010.-Vol/-90 (2).-P.124-126.
147. Franquesa M. the MiSOT Study Group. MesenchymalStem Cells in Solid Organ Transplantation (MiSOT) Fourth Meeting: Lessons Learned from First Clinical Trials. / M. Franquesa, M.J. Hoogduijn, E. Eggenhofer, J. Pinxteren, B. Christ, M. Shagidulin, N. Obermajer [et al] // Transplantation. -2013.-Vol.- 96(3).-P.234-238.
148. Fox I.J. To be or not to be: generation of hepatocytes from cells outside the liver. / I.J. Fox, S.C. // Strom Gastroenterology. - 2008.-Vol.-134.-P.878–881.
149. Zhang Z.X. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. / Z.X. Zhang, L.X. Guan, K. Zhang [et al] // Cytotherapy. -2008.-10.-P.-134– 139.
150. Cantz T. Stem cells in liver regeneration and therapy. / T. Cantz, M. P. Manns, M. Ott // Cell Tissue Res. -2008.-Vol.-331.-P.-271–282.
151. Yang J.F. Mesenchymal stem cells from the human umbilical cord ameliorate fulminant hepatic failure and increase survival in mice. J.F. Yang, H.C. Cao, Q.L. Pan, J. Yu , J. Li, L.J. Li // Hepatobiliary Pancreat Dis Int. -2015.-Vol.-14(2).-P.-186-193.

152. Jin S. Mesenchymal Stem Cells with Enhanced Bcl-2 Expression Promote Liver Recovery in a Rat Model of Hepatic Cirrhosis. / S. Jin, Li H, M. Han, M. Ruan, Z. Liu, F. Zhang, C. Zhang, Y. Cho, B. Liu // *Cell Physiol Biochem.*-2016.- Jin S.Vol.-40(5).-P.1117-1128.
153. Tsai P.C. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. / P.C. Tsai, T.W. Fu, Y.M. Chen, T.L. Ko, T.H. Chen, Y.H. Shih, S.C. Hung, Y.S. Fu // *Liver Transpl.* -2009.-Vol.-15.-P.484-495.
154. Terai S Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. / Terai S., T. Takami, N. Yamamoto, K. Fujisawa, T. Ishikawa, Y. Urata, H. Tanimoto, T. Iwamoto, Y. Mizunaga, T. Matsuda [et al] // *Tissue Eng Part B Rev.* -2014.-Vol.-20.-P.206-210.
155. Seo K.W. Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on liver fibrosis in rats. / K.W. Seo, S.Y. Sohn, D.H. Bhang, M.J. Nam, H.W. Lee, H.Y. Youn // *Cell Biol Int.*2014.-Vol.-20.-P.206-210.
156. Doh K.O. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by ribbon antisense to transforming growth factor-beta1. / K.O. Doh, H.K. Jung, I.J. Moon, H.G. Kang, J.H. Park, J.G. Park // *Int J Mol Med.* -2008.-Vol.-21.-P.33-39.
157. Nie Q.H. Inhibitory effect of antisense oligonucleotide targeting TIMP-2 on immune-induced liver fibrosis. / Q.H. Nie, C.L. Zhu, Y.F. Zhang, J. Yang, J.C. Zhang, R.T. Gao // *Dig Dis Sci.*2010.-Vol.-55.-P.1286-1295.
158. Lang Q. The antifibrotic effects of TGF- β 1 siRNA on hepatic fibrosis in rats. / Q. Lang, Q. Liu, N. Xu, K.L. Qian, J.H. Qi, Y.C. Sun, L. Xiao, X.F. Shi // *Biochem Biophys Res Commun.*2011.-Vol.-409.-P.448-453.
159. Park K. Target specific systemic delivery of TGF- β siRNA/(PEI-SS)-g-HA complex for the treatment of liver cirrhosis. / K. Park, S.W- Hong, W. Hur, M.Y. Lee, J.A. Yang, S.W. Kim, S.K. Yoon, S.K. Hahn // *Biomaterials.* -2011.-Vol.-32.-P.4951-4958.

160. Chen S.L. A new strategy for treatment of liver fibrosis: letting MicroRNAs do the job. / S.L. Chen, M.H. Zheng, K.Q. Shi, T. Yang, Y.P. Chen // *BioDrugs*. -2013.-Vol.-27.-P.25–34.
161. Daneshpour N. Targeted delivery of a novel group of site-directed transglutaminase inhibitors to the liver using liposomes: a new approach for the potential treatment of liver fibrosis. / N. Daneshpour, M. Griffin, R. Collighan, Y. Perrie // *J Drug Target*. -2011.- Daneshpour N. Vol.-19.-P.624–631.
162. Li F. Targeted delivery of drugs for liver fibrosis. / F. Li, J.Y. Wang // *Expert Opin Drug Deliv*. -2009.-Vol.-6.-P.531–541.
163. Chen L. Suppression of MicroRNA-219-5p Activates Keratinocyte Growth Factor to Mitigate Severity of Experimental Cirrhosis. / L. Chen, X. Cui, P. Li, C. Feng, L. Wang , H. Wang, X. Zhou, B. Yang, F. Lv, T. Li. / *Cell Physiol Biochem*. -2016.-Vol.-40(1-2).-P.253-262.
164. Bi Z.M. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate experimental cirrhosis through activation of keratinocyte growth factor by suppressing microRNA-199. / Z.M. Bi, Q.F. Zhou, Y. Geng, H.M. Zhang // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. -2016.-Vol.-20(23).-P.4905-4912.
165. Zheng X.B. miR-203 inhibits augmented proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma residual in the promoted regenerating liver. / X.B. Zheng, X.B. Chen, L.L. Xu , M. Zhang , L. Feng, P.S. Yi, J.W. Tang , M.Q. Xu // *Cancer Sci*. 2017 Mar.-Vol.-108(3).-P.338-346.
166. Chen X.B. MicroRNA-203 promotes liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats. / X.B. Chen, X.B. Zheng, Z.X. Cai, X.J. Lin, M.Q. Xu // *J Surg Res*. 2017 May 1.-Vol.-211.-P.53-63.
167. Chen K.D. MicroRNA-27b Enhances the Hepatic Regenerative Properties of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. / K.D. Chen, K.T. Huang, C.C. Lin [et al] // *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016 Feb 2.-Vol.-5.
168. Zhou J. miR-26a regulates mouse hepatocyte proliferation via directly targeting the 3' untranslated region of CCND2 and CCNE2. / J. Zhou, W.Q. Ju, X.P. Yuan,

- X.F. Zhu, D.P. Wang, X.S. He // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2016 Feb.-Vol.-15(1).-P.65-72.
169. Wang X.P. MicroRNA-34a regulates liver regeneration and the development of liver cancer in rats by targeting Notch signaling pathway. / X.P. Wang, J. Zhou, M. Han, C.B.Chen, Y.T. Zheng, X.S. He, X.P. Yuan // *Oncotarget.* 2017 Feb 21. -Vol.-8(8).-P.13264-13276.
170. Geng X Integrative proteomic and microRNA analysis of the priming phase during rat liver regeneration. / X. Geng, C. Chang, X. Zang, J. Sun, P. Li, J. Guo, C. Xu // *Gene.* 2016 Jan 10.- Geng Vol.-575(2 Pt 1).-P.224-32.
171. Yi P.S. Role of microRNA in liver regeneration. / P.S. Yi, M. Zhang, M.Q. Xu // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2016 Apr.-Vol.-15(2).-P.141-6.
172. Li L. Comprehensive CircRNA expression profile and selection of key CircRNAs during priming phase of rat liver regeneration. / L. Li, J. Guo, Y. Chen, C. Chang, C. Xu // *BMC Genomics.* 2017 Jan 13.-Vol.-18(1).-P.80.
173. Бабаева А.Г. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. / А.Г. Бабаева, Н.М. Геворкян, Е.А. Зотиков // Москва.-Изд. РАМН.-2009.-С.-107.
174. Ельчанинов А.В. Экспрессия генов цитокинов и факторов роста в печени после субтотальной резекции у крыс. / А.В. Ельчанинов, Т.Х. Фатхудинов, Н.Ю. Усман [и др.] // *Гены и клетки.*- 2016.-т.11.- №1, С.-61-67.
175. Тишевская Н.В Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезёнки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии. / Н.В. Тишевская, Н.М. Геворкян, А.Г. Бабаева, Ю.М. Захаров [и др.] // *Российский физиол. Журнал им. И.М.Сеченова,* 2015.-т.-101.-№4.- С.451-461.
176. Бабаева А.Г. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. / А.Г. Бабаева, Н.М. Геворкян, Н.В. Тишевская, Л.Л. Головкина [и др.] // *Онкогематология.*-2015.-№2(10).- С.58-626.

177. Котельникова Л.П. Профилактика и лечение осложнений после резекции печени. / Л.П. Котельникова, И.М. Будянская // Вестник хирургии им. И.И. Грекова, 2012.-№171(3).-С.67-71.
178. Чикотеев С.П. Очерки хирургии печени и поджелудочной железы: монография. / С.П. Чикотеев, А.Н. Плеханов // Иркутск. -2002. -259с.
179. Гальперин Э.И. «Уменьшение повреждения печени при её обширной резекции и токсическом поражении». / Э.И. Гальперин Т.Г. Дюжева, Л.В. Платонова [и др.] // Анналы хирургической гепатологии, 2008.-т.13.-№1.-С.51-55.
180. Shagidulin M. Transplantation liver cells and multipotent mesenchymal stromal cells for correction and treatment of hepatic failure. / M. Shagidulin N. Onishchenko, M. Krashennnikov [et al] // Medimond. International Proceedings. – 2010.-P.83-86.
181. Рудаков В. С. Влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на регенерацию печени после её обширной резекции (экспериментальное исследование). / В. С. Рудаков // Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук Москва. – 2017.
182. Bihari C. Bone marrow stem cells and their niche components are adversely affected in advanced cirrhosis of the liver. / C. Bihari , L. Anand, S. Rooge, D. Kumar , P. Saxena, S. Shubham [et al] // Hepatology.-2016 Oct.-64(4.-P.1273-1288.
183. Margini Cristina Bone marrow derived stem cells for the treatment of end-stage liver disease. , Ranka Vukotic, Lucia Brodosi, Mauro Bernardi [et al] // World J Gastroenterol. 2014 Jul 21.-Vol.-20(27).-P.-9098–9105.
184. Бабаева А.Г. Репаративные процессы и иммунитет. / А.Г. Бабаева // Изв. АН. Сер. биол. 1999.-№3.-С.261-269.
185. Смирнов А.В. Специфические эффекты и возможные механизмы действия экзогенных РНК. / А.В. Смирнов // Успехи современной биологии.-1988.-Т.-106.-Вып. 1(4). С. 20-36.