

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
УРАЛЬСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПЕРВОГО ПРЕЗИДЕНТА РОССИИ Б.Н. ЕЛЬЦИНА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ И ФИЗИОЛОГИИ
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

УДК 612.6.03

На правах рукописи

Казакова Ирина Александровна

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ МАКРОФАГОВ НА РЕПАРАТИВНУЮ
РЕГЕНЕРАЦИЮ

03.03.01 – физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Юшков Б.Г., доктор медицинских
наук, профессор, ЗДН РФ

Екатеринбург – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	7
Глава 1 Влияние макрофагов на репаративную регенерацию почек и печени	14
1.1 Общая характеристика системы фагоцитирующих мононуклеаров и её эффекторных клеток: моноцитов и макрофагов.....	14
1.2 Резидентные макрофаги почек и их влияние на регенерацию органа	17
1.2.1 Особенности регенерации почек	18
1.2.2 Макрофагальная регуляция репаративной регенерации почек.....	27
1.3 Резидентные макрофаги печени и их влияние на регенерацию органа	29
1.3.1 Особенности регенерации печени.....	31
1.3.2 Макрофагальная регуляция репаративной регенерации печени	41
1.4 SCF/CD117 лиганд/рецепторное взаимодействие: общая характеристика и роль в регенерации почек и печени	42
1.4.1 CD117+ клетки почек и их участие в восстановление органа после повреждения	45
1.4.2 CD117+ клетки печени и их участие в восстановление органа после повреждения	47
Глава 2 Методические вопросы исследования	52
2.1 Общая характеристика лабораторных животных	52
2.2 Моделирование повреждения печени и почек	52
2.2.1 Методика резекции почек	53
2.2.2 Методика резекции печени	53
2.3 Оценка регенеративных процессов в почках и печени.....	53
2.4 Иммуногистохимическое исследование срезов почек/печени	55
2.4.1 Анализ срезов, окрашенных анти-Ki-67 антителами.....	58
2.4.2 Анализ срезов, окрашенных анти- CD172a антителами.....	58
2.4.3 Анализ срезов, окрашенных анти-CD117 антителами.....	59
2.5. Исследование содержания стволовых гемопоэтических клеток в крови и костном мозге мышей при повреждении почек/печени	60

2.6 Методы изменения функционального состояния системы фагоцитирующих мононуклеаров	64
2.7 Статистические методы, используемые для обработки экспериментального материала	65
Глава 3 Изучение регенерации почек и реакции CD117+ клеток различной локализации у мышей после частичной нефрэктомии	66
3.1 Оценка регенеративных показателей почек у животных, перенесших лапаротомию	66
3.2 Репаративная регенерация почек после частичной нефрэктомии.....	67
3.2.1 Реакция гломерулярного аппарата на частичную нефрэктомии.....	68
3.2.2 Реакция канальцевого аппарата на частичную нефрэктомии	69
3.3 Оценка экспрессии CD117 в почках	70
3.3.1 Оценка экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами почек интактных и лапаротомированных мышей	70
3.3.2 Оценка экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами после частичной нефрэктомии	71
3.4 Оценка количества CD117+ стволовых клеток в крови и костном мозге после частичной нефрэктомии	73
3.4.1 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге лапаротомированных мышей.....	74
3.4.2 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге мышей после частичной нефрэктомии	74
3.5 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге мышей	75
3.5.1 Содержание моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге интактных и лапаротомированных мышей	76
3.5.2 Содержание моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге нефрэктомированных мышей	76
3.6 Заключение	78

Глава 4 Изучение регенерации почек и состояния CD117+ клеток различной локализации у мышей после частичной нефрэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ	80
4.1 Оценка показателей репаративной регенерации после частичной нефрэктомии в условиях ингибирования функционального состояния СФМ .	80
4.1.1 Реакция гломерулярного аппарата на частичную нефрэктомию при ингибировании функционального состояния СФМ	80
4.1.2 Реакция канальцевого аппарата на частичную нефрэктомию при ингибировании функционального состояния СФМ	83
4.2. Оценка экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами после частичной нефрэктомии при ингибировании СФМ.....	84
4.3 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге мышей после частичной нефрэктомии при ингибировании СФМ	86
4.4 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге мышей после частичной нефрэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ.....	87
4.5 Заключение	88
Глава 5 Изучение регенерации почек и состояния CD117+ клеток различной локализации у мышей после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ	90
5.1 Оценка показателей репаративной регенерации после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ	90
5.1.1 Реакция гломерулярного аппарата на частичную нефрэктомию при стимуляции функционального состояния СФМ.....	91
5.1.2 Реакция канальцевого аппарата на частичную нефрэктомию при стимуляции функционального состояния СФМ.....	92
5.2 Оценка экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ	94

5.3. Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ	95
5.4 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ.	97
5.5 Заключение	98
Глава 6 Изучение регенерации печени и состояния CD117+ клеток различной локализации у мышей после частичной гепатэктомии.....	99
6.1 Оценка регенеративных показателей печени у животных, перенесших лапаротомию	99
6.2 Оценка регенеративных показателей печени у животных после частичной гепатэктомии	99
6.3 Оценка экспрессии CD117 в печени	102
6.3.1 Оценка экспрессии CD117 гепатоцитами у интактных и лапаротомированных мышей.....	103
6.3.2 Оценка экспрессии CD117 гепатоцитами после частичной гепатэктомии	105
6.4 Оценка количества CD117+ стволовых клеток в крови и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии	108
6.5 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в печени и костном мозге гепатэктомированных мышей	109
6.5 Заключение	110
Глава 7 Изучение регенерации печени и состояния CD117+ клеток различной локализации у мышей после частичной гепатэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ	112
7.1 Оценка показателей репаративной регенерации печени после частичной гепатэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ	112
7.2 Оценка экспрессии CD117 гепатоцитами после частичной гепатэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ	115

7.3 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии при ингибировании СФМ	117
7.4 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в печени и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ.....	119
7.5 Заключение	120
Глава 8 Изучение регенерации печени и состояния CD117+ клеток различной локализации у мышей после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ	121
8.1 Оценка показателей репаративной регенерации печени после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ.....	121
8.2 Оценка экспрессии CD117 гепатоцитами после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ	124
8.3 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ	127
8.4 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в печени и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ.....	128
8.5 Заключение	129
Заключение	130
Выводы.....	139
Список сокращений	141
Список литературы	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Способность органов и тканей к обновлению и восстановлению после повреждения является фундаментальным свойством всех живых существ, находящихся на разных ступенях филогенетического развития. Нет ни одного патологического процесса, в котором регенерация не выступала бы в качестве важнейшей составляющей.

К настоящему времени достаточно детально исследована динамика репаративных процессов в физиологических условиях, при повреждении и патологии тканей, выделены различные типы регенерации, описаны видовая, органная и тканевая специфики восстановительных процессов, дана биохимическая их характеристика.

Вместе с тем, в теории регенерации многие проблемы остаются нерешенными.

Ключевыми представляются исследования, касающиеся расшифровки механизмов регуляции регенерации поврежденных органов, поскольку они определяют направление поиска лекарственных препаратов, ускоряющих или замедляющих этот процесс.

Достаточно хорошо изучена нервная и эндокринная регуляция регенерации [20, 21, 22, 23, 24, 30, 31, 51, 74, 75].

В настоящее время большое внимание привлекают вопросы участия иммунной системы в регуляции восстановления органов после повреждения

Предпринимавшиеся попытки использовать для этих целей гуморальные антитела (цитотоксические сыворотки), несмотря на первоначально обнадеживающие результаты, не оправдали надежд исследователей и практических врачей [18].

В последующем исследования сместились в область изучения отдельных клеток иммунной системы, поскольку это открывает перспективы использования иммуномодуляторов для коррекции репаративных процессов.

Наиболее полно исследовано влияние лимфоцитов на регенерацию. В работах Бабаевой А.Г. показана роль лимфоцитов на ранних этапах развития

репарации органов [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. Большое внимание уделялось и уделяется исследованиям механизмов лимфоидной регуляции кроветворения, остеогенеза, восстановления забарьерных органов [25, 26, 67].

Доказана роль системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ) в репаративной регенерации печени, кроветворной ткани, поджелудочной железы и пародонта [28, 43, 45, 47, 56]. Установлено, что стимуляция СФМ приводит к усилению регенеративных процессов, тогда как блокирование функций макрофагов может в значительной степени замедлять репарацию [28, 39].

Признание факта участия СФМ в регуляции регенерации ставит вопрос о расшифровке конкретных механизмов этого процесса.

В последние десятилетия исследователи уделяли внимание в основном синтезируемым макрофагами цитокинам и ростовым факторам.

Клетки Купфера секретируют TNF- α (фактор некроза опухоли- α) и IL-6 (интерлейкин-6), участвующие в запуске ранних сигнальных путей, регулирующих пролиферацию гепатоцитов. Они синтезируют также и основной митоген гепатоцитов – HGF (фактор роста гепатоцитов) [39, 77, 85, 130, 159].

Макрофаги почек вырабатывают оказывающие влияние на пролиферацию канальцевых эпителиоцитов HGF и Wnt7b (белок, активирующий сигнальный путь Wnt) [183, 184, 186].

Появляются публикации, свидетельствующие о роли SCF/CD117 лиганд/рецепторного взаимодействия в регуляции репарации органов, в частности почек и печени [101, 144, 222, 240, 243]. Клетки Купфера синтезируют SCF (фактор стволовой клетки), а также активируют его синтез гепатоцитами за счет действия TNF- α и IL-6 [121, 208]. Макрофаги почек хоть и не способны напрямую синтезировать лиганд к CD117, тем не менее, могут активировать его мембрансвязанную форму за счет синтеза матриксной металлопротеиназы 9 [192].

Вместе с тем, другие механизмы макрофагальной регуляции регенерации находятся вне поля зрения исследователей.

Остается не изученным вопрос о значимости макрофагальной регуляции для различных типов регенерации – внутриклеточного и клеточного.

Наличие в органах ростковых зон ставит вопрос об их влиянии на распределение макрофагов в органе в физиологических условиях и при повреждении.

Также абсолютно неисследованным остается вопрос о возможном влиянии макрофагов на экспрессию рецепторов к ростовым факторам.

С открытием стволовых клеток широкое распространение получила гипотеза об их миграции из костного мозга в поврежденный орган и дифференцировки в специфические клетки, обеспечивающие восстановление утраченных структур [90, 137, 138, 145, 217, 271]. Данная гипотеза ставит вопрос о влиянии на эти процессы СФМ.

В регуляции миграции, пролиферации и дифференцировки стволовых клеток костного мозга центральное место отводится SCF [92, 221]. Тем не менее, есть основание предполагать, что рецептор к этому цитокину содержится и на других, более зрелых, пролиферирующих не гемопоэтических клетках [118, 122, 168, 261], а, значит, сам SCF может выступать в качестве универсального регулятора репарации. Не ясна и связь SCF с макрофагальной регуляцией репаративных процессов.

Цель исследования: изучить механизмы влияния макрофагов на восстановление органов с преобладанием клеточной (почки) и внутриклеточной (печень) регенерации.

Задачи исследования:

1. Выявить новые механизмы влияния макрофагов на регенерацию органов.
2. Оценить действие макрофагов на репарацию органов с преобладанием клеточного (почки) и внутриклеточного (печень) типа регенерации.
3. Провести анализ реакции CD117-позитивных дифференцированных клеток на повреждение.
4. Оценить органно-специфические особенности макрофаг-зависимого ответа данных клеток при репаративной регенерации.
5. Сравнить особенности реакции различных субпопуляций CD117-позитивных стволовых клеток костного мозга на повреждение органов с преобладанием клеточной и внутриклеточной регенерации.

6. Проанализировать влияние макрофагов на миграцию CD117-позитивных стволовых клеток из костного мозга к месту повреждения.

Научная новизна работы. Впервые показано, что макрофаги регулируют течение регенерации за счет влияния на степень экспрессии рецепторов к ростовым факторам у дифференцированных клеток поврежденных органов, в частности на экспрессию CD117. Доказано, что миграция гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является макрофаг-зависимым процессом.

Установлено, что макрофаги преимущественно влияют на тот тип регенерации, который в органе выражен в большей степени (в почках на клеточную регенерацию, в печени – на внутриклеточную). Продемонстрирована различная зависимость клеточной и внутриклеточной регенерации от функционального состояния СФМ.

Установлено, что рецептор к фактору стволовой клетки экспрессируется не только стволовыми клетками костного мозга, но и зрелыми клетками, что позволяет рассматривать SCF/CD117 лиганд/рецепторное взаимодействие как универсальный механизм регуляции регенерации.

Впервые проведена оценка органной специфичности макрофаг-зависимой реакции CD117-позитивных дифференцированных и стволовых клеток.

Теоретическая значимость работы. Результаты исследования носят фундаментальный характер и расширяют представления о макрофагальной регуляции восстановления органов после повреждения.

Полученные данные свидетельствуют о существовании, по крайней мере, двух не описанных ранее механизмов действия макрофагов на репарацию. Во-первых, фагоцитирующие мононуклеары влияют на экспрессию зрелыми клетками поврежденных органов рецепторов к ростовым факторам, в частности на экспрессию CD117. Изменение степени экспрессии CD117 меняет чувствительность клетки к действию лиганда, что влияет на регенерацию клеток. Во-вторых, макрофаги действуют на CD117-позитивные ГСК, контролируя их миграцию.

Продемонстрировано, что макрофаг-зависимые реакции CD117-позитивных дифференцированных и стволовых клеток имеют отчетливо выраженную органную зависимость.

Результаты исследования дополняют имеющиеся в литературе сведения о влиянии макрофагов на внутриклеточную и клеточную регенерацию. Показано, что макрофаги действуют на тот тип регенерации, который в органе выражен в большей степени. Проведенное исследование создает теоретическую основу для разработки методов влияния на макрофагальную регуляцию регенерации органов путем изменения функциональной активности СФМ.

Практическая значимость работы. Применяемый в исследовании метод оценки уровня экспрессии рецептора CD117 канальцевыми эпителиоцитами и гепатоцитами на основе анализа оптической плотности данных клеток может быть использован в научной практике при изучении выраженности экспрессии любых других рецепторов. Результаты исследования могут найти применение при создании новых методов коррекции репаративной регенерации органов путем целенаправленного изменения функционального состояния фагоцитирующих мононуклеаров с помощью иммуномодулирующих лекарственных препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Макрофагальная регуляция регенерации включает в себя влияние СФМ на уровень экспрессии рецепторов к ростовым факторам клетками поврежденных органов и на миграцию клеток-предшественников из костного мозга в поврежденную ткань.

2. Макрофаг-зависимое восстановление поврежденного органа зависит от типа регенерации (клеточный или внутриклеточный), преобладающего в органе в физиологических условиях.

3. Клетки ростковых зон органов экспрессируют рецептор к SCF, что позволяет рассматривать SCF/CD117 лиганд/рецепторное взаимодействие как универсальный механизм регуляции регенерации.

4. При повреждении органов с преимущественно клеточным типом регенерации (почки) и ингибирование, и стимуляция СФМ приводят к одинаковому эффекту – наблюдается увеличение количества CD117-позитивных канальцевых эпителиоцитов, рост степени экспрессии клетками рецептора, торможение миграции ГСК.

При повреждении органов с выраженной внутриклеточной регенерацией (печень) ингибирование функциональной активности макрофагов сопровождается

снижением количества CD117-позитивных гепатоцитов с уменьшением степени экспрессии данного рецептора и замедлением миграции ГСК, а стимуляция СФМ вызывает противоположную реакцию.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре физиологии человека и животных департамента «Биологический факультет» института естественных наук Уральского Федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, а также в научной работе лабораторий морфологии и биохимии и иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на I Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецк, 2009); XIII Всероссийском научном форуме с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2009); IV Съезде физиологов Урала с международным участием (Екатеринбург, 2009); XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2010); II Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия» (Пермь, 2009); Российской конференции с международным участием «Фундаментальные вопросы гематологии. Достижения и перспективы» (Екатеринбург, 2010); IX Российской конференции иммунологов Урала, посвященной 90-летию профессора Л.Я. Эберта (Челябинск, 2011); школе-конференции для молодых ученых «Клеточные технологии для регенеративной медицины» (Санкт-Петербург, 2011); XII Съезде научного общества гастроэнтерологов России «Классическая и прикладная гастроэнтерология» (Москва, 2012); II Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биология будущего: традиции и новации» (Екатеринбург, 2012); 87-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 155-летию со дня рождения Л.О. Даркшевича (Казань, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 27 работ, в том числе 16 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

ГЛАВА 1 ВЛИЯНИЕ МАКРОФАГОВ НА РЕПАРАТИВНУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОЧЕК И ПЕЧЕНИ

1.1 Общая характеристика системы фагоцитирующих мононуклеаров и её эффекторных клеток: моноцитов и макрофагов

Согласно современным представлениям, система фагоцитирующих мононуклеаров включает в себя кроветворные клетки-предшественники моноцитов-макрофагов костного мозга, монобласты и промоноциты, а также зрелые клетки – моноциты и макрофаги [28,39,45,47,61].

Моноцитам свойственна фенотипическая и функциональная гетерогенность. Так, моноциты человека характеризуются различным уровнем экспрессии CD14 и CD16. Клетки с фенотипом CD14^{hi}CD16⁻ составляют 90-95 процентов от общего числа моноцитов крови и носят название «классических» моноцитов. Минорная субпопуляция имеет фенотип CD14⁺CD16⁺. Данным клеткам свойственна более высокая скорость миграции в очаг воспаления, потому они и названы «провоспалительными» [131, 143, 206, 250, 253, 280]. Кроме того, моноциты крови человека отличаются и по экспрессии других поверхностных молекул, среди которых рецепторы хемокинов CCR5 и CX3CR1, а также CD64 и CD56 [133, 143, 245].

В крови мышей также обнаружены две субпопуляции моноцитов. Одна из них имеет фенотип CX3CR1⁺CCR2⁺Ly6C^{hi} - по экспрессии хемокиновых рецепторов и морфологии сходна с «классическими» моноцитами у человека, однако для данных клеток характерна быстрая миграция в очаг воспаления, поэтому по функциям они аналогичны «провоспалительным» моноцитам. Мышиные CX3CR1^{hi}CCR2⁻Ly6C^{low} клетки, наоборот, длительное время присутствуют в крови и тканях в норме, а потому получили название «резидентных». Предполагают, что они выполняют функции «патрулирования», а

именно: исследуют эндотелиальные клетки и окружающие ткани на наличие повреждений и инфекций [109, 135, 143, 173, 245, 249, 250, 263]. У мышей моноциты характеризуются также и различной экспрессией рецепторов хемокинов CCR7 и CCR8 [150, 154, 207].

Морфофункциональная гетерогенность макрофагов.

Фенотипическая и функциональная гетерогенность присуща и макрофагам.

Являясь одним из звеньев врожденного иммунитета, фагоцитирующие мононуклеары обеспечивают защиту организма от различных патогенов, а также собственных трансформированных клеток, вырабатывая широкий спектр веществ с микробицидной и противоопухолевой активностью. Кроме того, данные клетки способны к презентации антигена и выработке хемокинов, привлекающих в очаг воспаления другие лейкоциты, тем самым обеспечивая связь врожденного и адаптивного иммунитета [35, 37, 46, 50, 52, 60, 62, 106, 203].

В зависимости от активационного стимула макрофаги могут выполнять противоположные по своей сути функции, стимулируя или же подавляя воспаление, участвуя в разрушении ткани или же в репаративной регенерации.

В настоящее время принято выделять три типа макрофагов: классические, макрофаги заживающих ран и регуляторные макрофаги.

Основными индукторами образования **классических** макрофагов являются IFN- γ (интерферон- γ) и TNF. Действуя на макрофаги, они стимулируют их микробицидную и противоопухолевую активность, а также секрецию высоких уровней провоспалительных цитокинов и медиаторов, супероксид-анионов, радикалов кислорода и азота [106, 203, 244].

Макрофаги заживающих ран (МЗР). Основным индуктором их образования является IL-4 [83, 152]. Данный интерлейкин стимулирует у макрофагов активность аргиназы, что позволяет им конвертировать аргинин в орнитин, предшественник полиаминов и коллагена, что способствует образованию внеклеточного матрикса, а, следовательно, основная функция МЗР – это секреция компонентов внеклеточного матрикса. Кроме того, образующиеся из

орнитина полиамины могут влиять и на продукцию цитокинов, подавляя клональную экспансию лимфоцитов [88, 158].

Роль данного типа макрофагов в защите организма от патогенов остается мало изученной. Установлено, что они принимают участие в защите от гельминтов [188, 251], но доказательств их бактерицидной активности недостаточно.

Регуляторные макрофаги образуются в ответ на разнообразные стимулы, включающие в себя иммунные комплексы, простагландины, глюкокортикоиды, апоптотические клетки, а также IL-10. Однако установлено, что сами по себе данные стимулы не приводят к образованию регуляторных макрофагов, но в сочетании со вторым стимулом, а именно с TLR-лигандом, происходит перепрограммирование макрофагов на синтез IL-10. К другим индукторам образования регуляторных макрофагов также относят аденозин, дофамин и гистамин. Как правило, регуляторные макрофаги появляются на поздних стадиях иммунного ответа. Основная роль их состоит в том, чтобы ослабить иммунный ответ и ограничить воспаление [59].

Существует и иная классификация макрофагов по характеру их функциональной активности. Согласно этой классификации, принято выделять 2 группы макрофагов.

Классически активированные (M1) макрофаги появляются при действии цитокинов Th1 (IFN- γ и TNF) или же при распознавании макрофагами липополисахаридов. M1 макрофаги характеризуются высоким уровнем продукции IL-12 и IL23 и низким уровнем продукции IL-10. Данные клетки выделяют провоспалительные цитокины (TNF, IL-6, IL-1 β) и обладают мощными микробицидными свойствами [146].

Развивающееся в ткани воспаление, как правило, ограничено в пространстве и во времени действием **альтернативно активированных** макрофагов (M2). Данные клетки характеризуются высоким уровнем продукции IL-10 и TGF- β (трансформирующий ростовой фактор- β) и низким уровнем продукции IL-12, а основной их функцией принято считать защиту окружающих

тканей от развивающегося воспаления. Кроме того, M2 макрофаги участвуют в репарации ткани, стимулируя сосудобразование, фагоцитируя апоптотические клетки и способствуя образованию межклеточного матрикса [132]. Именно фагоцитоз апоптотических клеток некоторые авторы рассматривают как один из основных признаков альтернативной активации, в то время как фагоцитоз и внутриклеточный киллинг патогенов присущ M1 макрофагам [99, 114, 219].

Таким образом, в настоящее время факт участия макрофагов в неиммунных процессах, в частности в регуляции регенерации органов (макрофаги заживающих ран или же M2 макрофаги), является общепризнанным, что ставит вопросы о конкретных механизмах реализации фагоцитирующими мононуклеарами данной функции и об особенностях макрофагальной регуляции репарации органов с различным типом регенерации.

1.2 Резидентные макрофаги почек и их влияние на регенерацию органа

Макрофаги почек локализованы в межканальцевом интерстиции коркового (преимущественно) и мозгового вещества. Их накопление в интерстиции является отличительной чертой повреждения почек, независимо от природы повреждающего фактора, что косвенно свидетельствует об их регуляторном влиянии на репарацию органа.

Увеличение численности макрофагов возможно как в результате миграции костномозговых предшественников (моноцитов) благодаря синтезу канальцевыми эпителиоцитами хемокинов и молекул адгезии, так и в результате пролиферации резидентных макрофагов благодаря синтезу клетками канальцев M-KCF (колоние-стимулирующий фактор макрофагов) – основного макрофагального митогена [105, 167].

1.2.1 Особенности регенерации почек

Почки представляют собой орган, где в физиологических условиях преобладает клеточный тип регенерации. Репаративная же регенерация возможна как за счет пролиферации клеток нефрона, так и за счет их гипертрофии.

В экспериментах на грызунах показано, что уже через 48 часов после частичной нефрэктомии происходит резкое увеличение митотического индекса канальцевых эпителиоцитов. Этому предшествует рост синтеза РНК и ДНК, который начинается через 12 часов после повреждения. Количество пролиферирующих клеток канальцев прямо пропорционально объему удаленной ткани: при удалении 25%, 50%, 75% ткани почки число митозов возрастает соответственно в 7, 11 и 20 раз [36].

Важно отметить, что пролиферации эпителиоцитов предшествует их дедифференцировка, что, в случае контролируемого роста, является особенностью быстро делящихся клеток [91, 113, 128, 177, 277].

Humphreys et al. исследовали несколько раундов деления канальцевых эпителиоцитов после ишемии/реперфузии почек и показали, что делились именно те клетки, которые претерпевали дедифференцировку, что проявлялось в экспрессии данными клетками Pax-2 и в снижении экспрессии Na^+K^+ -АТФазы [161]. Fujigaki Y. et al. показали, что при повреждении почек высокими дозами нефротоксического агента (уранил ацетата) первыми вступают в пролиферацию клетки, которые экспрессируют виментин, но показывают потерю канальцевого фенотипа (снижение экспрессии мегалина, аквапорина, Na^+K^+ -АТФазы). Однако при введении животным низких доз уранил ацетата канальцевые эпителиоциты сначала пролиферируют без потери своего исходного фенотипа, но в дальнейшем, тем не менее, дедифференцируются. Таким образом, автор приходит к выводу, что изначально канальцевые эпителиоциты могут войти в митотический цикл без дедифференцировки, что обычно и происходит в физиологических условиях, но далее клетка все-таки дедифференцируется [128].

Восстановление канальцев после повреждения возможно и за счет гипертрофии эпителиоцитов. На ультраструктурном уровне гипертрофия данных клеток проявляется в расширении цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭПР), росте количества мембран комплекса Гольджи и гладкого ЭПР и увеличении количества свободных рибосом в гиалоплазме. Своего пика гипертрофия клеток канальцев достигает через 24 часа после повреждения почек. В этот период в клетке появляются абсорбционные капли, и растет число микротрубочек, располагающихся вдоль оси клетки. На более поздних сроках (10-30 дней после повреждения) в канальцевых эпителиоцитах отмечается увеличение количества и размера органоидов, в частности митохондрий. В комплексе Гольджи снижается количество крупных вакуолей, но растет число плоских цистерн. Наблюдается увеличение численности профилей шероховатого ЭПР, площади щеточной каемки и количества складок базальной плазматической мембраны в клетках проксимальных и дистальных канальцев, а также в собирательных трубочках [36].

Повреждение почек может затрагивать не только канальцевый аппарат, но и почечные клубочки. Согласно современным представлениям, миграция и деление выживших подоцитов для замещения погибших клеток невозможна или же, во всяком случае, крайне затруднена, что, по всей видимости, объясняется сложностью организации их актинового цитоскелета. При экспериментальной стимуляции вступления подоцитов в митоз установлено, что данные клетки не могут эффективно завершить цитокинез, в результате чего образуются анеуплоидные подоциты, которые, как правило, погибают. Данный процесс получил название «митотической катастрофы». Таким образом, восстановление почечных клубочков, которое нередко наблюдается при их повреждении, возможно либо за счет гипертрофии подоцитов, либо за счет пролиферации стволовых клеток [210].

Ростовые факторы в регенерации почек

Репаративная регенерация почек представляет собой сложный процесс, регулируемый различными ростовыми факторами, действующими аутокринно,

паракринно и эндокринно. В основном, их действие направлено на стимуляцию пролиферации клеток, гипертрофии внутриклеточных структур и на препятствование вступлению клетки в апоптоз.

Одним из основных ростовых факторов, оказывающих влияние на восстановление почек после повреждения, является HGF (hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов). В клубочках HGF синтезируется эндотелиоцитами и мезангиальными клетками и действует как аутокринно, стимулируя ангиогенез и препятствуя апоптозу, так и паракринно на подоциты, усиливая их рост. В канальцевом аппарате HGF синтезируют макрофаги и эндотелиальные клетки. Действие HGF на канальцевые эпителиоциты заключается в стимуляции пролиферации и миграции клеток по базальной мембране, стимуляции тубулогенеза и блокировании их апоптоза [186]. В исследованиях Y. Liu установлено, что антиапоптотический эффект HGF непосредственно связан с запуском фосфатидилинозитол-3-киназного Akt сигнального пути, что приводит к фосфорилированию Bad и его инактивации. Кроме того, наблюдается индукция экспрессии ингибитора апоптоза - белка Bcl-XL [180].

HGF обладает и антифиброгенным эффектом при репаративной регенерации почек. Это связано, прежде всего, с регуляцией HGF баланса между синтезом и деградацией матриксных белков за счет стимуляции синтеза матриксных металлопротеиназ и снижения продукции их ингибиторов. Установлено также, что HGF способен блокировать TGF- β /Smad путь и подавлять экспрессию рецепторов к TGF- β – основному профиброгенному цитокину. Так, в экспериментах Y. Liu показано, что ежедневные инъекции HGF предотвращают прогрессирование хронической нефропатии у крыс с трансплантированной почкой и при нефропатии, вызванной сахарным диабетом [127, 179]. Таким образом, именно соотношение HGF и TGF- β определяет исход травмы.

Участие в восстановлении почек после повреждения принимает и IGF-1 (insulin-like growth factor, инсулиноподобный ростовой фактор 1). Показано, что в почках данный ростовой фактор синтезируется клетками клубочков и собирательных трубочек, а специфические рецепторы к нему обнаружены в

клетках клубочков и проксимальных канальцев. Взаимодействие IGF-1 с его рецептором стимулирует клетку к вступлению в митоз, способствует гипертрофии внутриклеточных структур. В экспериментах Miller S.B. et al. и Ding H. et al. показано, что введение животным IGF-1 способствует восстановлению функций почек (о чем судили по уровню креатинина и мочевины в крови) по всей видимости, за счет стимуляции образования новых канальцевых эпителиоцитов и увеличения скорости клубочковой фильтрации [156, 220].

Стимулирующее влияние на пролиферацию канальцевых эпителиоцитов оказывает также и эпидермальный ростовой фактор (EGF), уровень которого существенно увеличивается после повреждения почек. EGF синтезируется самими канальцевыми эпителиоцитами, действуя, таким образом, аутокринно. Кроме того, в экспериментах Zhuang S. et al., проведенных *in vitro*, установлено, что рецептор к EGF конститутивно активирован на канальцевых эпителиоцитах при моделировании ишемии и регулирует миграцию и пролиферацию клеток в отсутствие самого ростового фактора за счет активации при интегрин опосредованной адгезии [127, 279].

В экспериментах Stokman G. et al. показано аутокринное влияние SDF-1 (stromal cell-derived factor-1, фактора стромальных клеток-1) на восстановление клеток канальцев, которое заключается в индукции резистентности к апоптозу [231].

Аутокринная регуляция восстановления клеток канальцев может осуществляться и при участии CSF-1 (колониестимулирующий фактор-1), синтез которого канальцевыми эпителиоцитами усиливается в ответ на повреждение почек. Как показано в исследованиях Menke J. et al., данный цитокин способен активировать миграцию макрофагов к поврежденному органу, регулировать их переход в M2 фенотип, а также действовать и на сами канальцевые эпителиоциты, так как они коэкспрессируют рецептор к CSF-1 [105].

В экспериментах Cantaluppi V. et al. показано, что MSP (macrophage stimulating protein, белок, стимулирующий макрофаги) *in vitro* стимулирует

пролиферацию канальцевых эпителиоцитов и блокирует цисплатин-индуцированный апоптоз [183].

В регенерации почек после повреждения большое значение имеет и восстановление микроциркуляции. Основным ангиогенным фактором при репарации почек является VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) – митоген для эндотелиоцитов. Кроме того, как показано в исследовании Kanellis J. et al., клетки канальцев экспрессируют специфические рецепторы для VEGF: VEGFR-1 экспрессирован на апикальной части и в цитоплазме проксимальных и дистальных канальцевых эпителиоцитов, в клетках собирательных трубочек и в наружной части мозгового вещества, а VEGFR-2 – в клетках дистальных собирательных трубочек. In vitro инкубация канальцевых эпителиоцитов с VEGF показала усиление пролиферации клеток и уменьшение H_2O_2 индуцированного апоптоза [272].

Таким образом, в регуляции репаративной регенерации почек принимает участие большое число цитокинов и ростовых факторов, действие которых может быть направлено на канальцевые эпителиоциты, клетки клубочков и эндотелиальные клетки, вызывая как их пролиферацию и гипертрофию, так и блокируя апоптоз.

Участие стволовых клеток в восстановлении почек после повреждения

Несмотря на то, что канальцевые эпителиоциты относятся к активно пролиферирующим клеткам и восстановление поврежденных канальцев, как правило, происходит за счет миграции и деления выживших клеток, вопросы участия стволовых клеток в репарации почек привлекают внимание ученых. Это связано как с тем, что при обширных повреждения собственных регенераторных резервов почек может быть недостаточно, так и с тем, что в почках присутствуют и клетки, неспособные к делению (подоциты), восстановление которых также важно. Кроме того, использование стволовых клеток может быть одним из прогрессивных терапевтических подходов в лечении заболеваний почек.

Участие стволовых клеток костного мозга в регенерации почек

В последние годы вопрос участия стволовых клеток костного мозга в репаративной регенерации неиммунных органов широко обсуждается. Есть данные, свидетельствующие об участии как мезенхимальных (МСК), так и гемопоэтических стволовых клеток в репарации печени, сердца, органов желудочно-кишечного тракта и др. [138]. Также пристальное внимание ученых привлекает и возможная роль ГСК и МСК в восстановлении почек после повреждения [79].

В исследованиях Lin F. et al. самкам мышей вводили ГСК трансгенных мышей-самцов, клетки которых экспрессировали бактериальную галактозидазу, используемую в качестве маркера. Самкам проводили ишемию/реперфузию почек, после чего вводили внутривенно ГСК самцов. Через 4 недели в почках реципиентов были обнаружены клетки, экспрессировавшие галактозидазу и несущие Y-хромосому. Данные клетки были преимущественно локализованы в проксимальных канальцах. Основываясь на этих результатах, авторы приходят к выводу, что ГСК способны трансдифференцироваться в клетки почек при их повреждении [138].

Группа ученых под руководством Kale S. вводила донорские ГСК мышей с геном галактозидазы сублетально облученным мышам в количестве $5 \cdot 10^3$ клеток. Через 17 недель около 25% клеток костного мозга реципиентов экспрессировали галактозидазу. Далее мышам-реципиентам проводили одностороннюю ишемию/реперфузию по стандартной методике. Через сутки после операции уровень ГСК в периферической крови резко возрастал с 1,4% у контрольных животных до 23,8% у оперированных, что авторы объясняют их миграцией к поврежденному органу. Уже через 1 неделю после ишемии/реперфузии количество позитивных по галактозидазе клеток во внешней части мозгового вещества поврежденной почки составило в среднем 20,9%, тогда как в контрлатеральном органе, не подвергавшемся ишемии, данные клетки отсутствовали. Таким образом, авторы подтверждают не только саму

возможность трансдифференцировки ГСК в клетки канальцев, но и демонстрируют существенную роль данного процесса в репарации почек [90].

Способность ГСК к трансдифференцировке в канальцевые эпителиоциты была оценена *in vitro* группой исследователей под руководством L. Li. Клетки костного мозга, не несущие линейных маркеров, обрабатывались различными цитокинами и факторами роста в определенной последовательности, после чего они не только изменяли свой молекулярный фенотип (экспрессировали Pax2, Lim1, Six2, кадгерин 6 и 16, что свидетельствует о трансдифференцировке в канальцевые эпителиоциты), но и менялись морфологически: увеличивался их размер, в колонии они формировали эпителиоподобные структуры. Однако преобразование ГСК в канальцевые эпителиоциты было неполным, так как клетки не образовывали плотных контактов и не несли некоторых ключевых маркеров эпителиальных клеток канальцев. Тем не менее, при пересадке данных клеток под капсулу почек мышей, перенесшим ишемию/реперфузию почек, наблюдалась их интеграция в канальцы [271].

Несмотря на многочисленные исследования, доказывающие способность ГСК к трансдифференцировке, данный факт до сих пор вызывает сомнения у некоторых ученых. Так, Duffield J.S. et al. показали, что при пересадке клеток от мышей-самцов самкам с ишемией/реперфузией, предварительно подвергавшихся облучению, лишь около 0,06% канальцевых эпителиоцитов имеют Y-хромосому (срезы изучались на 2,7,15 и 21 день после операции), а восстановление почек обусловлено активной пролиферацией неповрежденных канальцевых эпителиоцитов [223].

ГСК могут принимать участие в восстановлении почек после повреждения за счет их способности к синтезу различных цитокинов и ростовых факторов. Li B. et al. вводили ГСК человека внутривенно иммунодефицитным мышам через 1 сутки после проведенной им ишемии/реперфузии и наблюдали улучшение репарации микрососудов почек, уменьшение уровня креатинина в плазме крови, что свидетельствует о более активном восстановлении канальцевых эпителиоцитов, а также отмечали рост процента выживших мышей с 50 до 90%.

Донорские ГСК не встраивались в канальца почек, а локализовались преимущественно вокруг сосудов. ГСК как *in vitro*, так и *in vivo* синтезировали большое количество мРНК для некоторых проангиогенных цитокинов и для HGF и IGF-1, стимулирующих пролиферацию клеток канальцев. Иными словами влияние ГСК на репаративную регенерацию почек основано на паракринных механизмах [193]. Однако в экспериментах Stokman G. et al. мобилизация ГСК за счет подкожного введения SCF и G-CSF мышам с односторонней обструкцией мочеточника не сопровождалась активацией регенерации почки, развивался фиброз [115].

В исследованиях, касающихся участия стволовых клеток в репарации почек, как правило, изучаются ГСК, так как они имеют общее происхождение с эмбриональной почкой (область аорто-гонадо-мезонефроса участвует в раннем кроветворении). Тем не менее, возможно и участие МСК в восстановлении почек после повреждения.

Imberti V. et al. показали, что введение МСК мышам, канальцевые эпителиоциты которых повреждены цисплатином, способствует восстановлению структуры канальцев *in vivo*, однако не за счет трансдифференцировки МСК, а в результате стимуляции пролиферации клеток канальцев. Исследование сокультивированных МСК и канальцевых эпителиоцитов показало, что МСК синтезируют высокие уровни IGF-1, что вероятно, и объясняет их влияние на клетки канальцев. Кроме того, введение МСК, неспособных к синтезу IGF-1, мышам, подвергавшимся действию цисплатина, значительно снижает защитное действие стволовых клеток на почки [157]. В исследованиях Tögel F. et al. получены аналогичные данные по влиянию МСК на восстановление эндотелиальных клеток почек. Кроме IGF-1 данной группой ученых в среде сокультивированными МСК и эндотелиоцитами были обнаружены VEGF и HGF [273].

Таким образом, участие ГСК и МСК в восстановлении почек после повреждения осуществляется, по всей вероятности, не за счет их трансдифференцировки в канальцевые эпителиоциты, а за счет синтеза ими

ростовых факторов, способных стимулировать пролиферацию как эпителиальных клеток канальцев, так и других клеток почек.

*Участие собственных стволовых клеток почек в репаративной
регенерации органа*

Собственные стволовые клетки почек могут быть идентифицированы по включению бромодезоксиуридина. Такие клетки обнаружены в почках крыс в проксимальных и дистальных канальцах, собирательных трубочках и почечном сосочке. *In vitro* данные клетки пролиферируют и дифференцируются в фибробласты, канальцевые эпителиоциты, клетки собирательных трубочек, формируют трубчатые структуры.

В почках обнаружены и клетки SP-фенотипа. Термин *Side population* изначально использовался для ГСК и характеризовал клетки, не поглощающие витальные красители (родамин, hoeschst33342) за счет наличия в мембране белка-транспортера ABC. SP клетки получены из почек грызунов и *in vitro* они способны дифференцироваться в различные клеточные типы. Инъекция данных клеток мышам уменьшает повреждающее действие ишемии на почки, но интегрирования клеток не обнаруживается, то есть их действие, скорее всего, основано на паракринных механизмах [224, 276].

В настоящее время большинство ученых характеризуют стволовые клетки почек, как клетки, экспрессирующие кластеры дифференцировки CD133 и CD24, но не экспрессирующие маркер подоцитов PDX (*podocalyxin*). Данные клетки локализованы в мочевом полюсе капсулы Боумена – единственном месте в почках, которое граничит и с подоцитами клубочка, и с канальцевыми эпителиоцитами. В исследованиях *in vitro* установлено, что CD133+CD24+PDX-клетки способны к самоподдержанию и могут дифференцироваться в подоциты и канальцевые эпителиоциты [187, 227, 276].

Следует отметить, что вступление CD133+CD24+PDX- клеток в дифференцировку во многом зависит от микроокружения и, по всей видимости, становится возможным лишь при значительном повреждении почек. L. Lasagni и P. Romagnani установлено, что введение данных клеток под капсулу

поврежденной почки (при частичной односторонней нефрэктомии) сопровождается образованием новых клубочковых и гломерулярных структур, в то время как введение их под капсулу контрлатеральной почки подобных изменений не вызывает [174].

1.2.2 Макрофагальная регуляция репаративной регенерации почек

Участие макрофагов в репаративной регенерации почек не вызывает сомнений, однако характер их воздействия на регенерирующую почку остается предметом дискуссии.

Как уже упоминалось выше, в исследованиях К. Matsumoto показано, что основной митоген канальцевых эпителиоцитов, HGF, синтезируется макрофагами. [186].

Lin S.L. et al. установили, что в почках макрофаги синтезируют Wnt7b – важнейший лиганд, запускающий канонический путь Wnt, известный как один из внутриклеточных путей активации, связанных с определением судьбы клетки и морфогенезом и имеющим большое значение для репарации канальцевых эпителиоцитов. На модели ишемического повреждения почек (ишемия/реперфузия) исследователи показали, что деплеция макрофагов приводит к снижению активации Wnt-пути в канальцевых эпителиоцитах, что сопровождается замедлением процессов восстановления эпителия канальцев [184].

Макрофаги почек могут стимулировать репаративную регенерацию не только за счет синтеза факторов роста и цитокинов, но также и за счет их способности к активации неактивных форм различных веществ. В исследованиях Cantaluppi V. et al. показано, что MSP, основным источником которого является печень, циркулирует в крови в виде неактивного предшественника pro-MSP. Попадая в почки, до активной формы он расщепляется под действием мембранных протеаз макрофагов [183].

Тем не менее, влияние макрофагов на восстановление почек весьма неоднозначно. Так, например, в работе Lange-Sperandio B. et al. показано, что при блокировании инфильтрации макрофагами поврежденных почек снижается количество канальцевых эпителиоцитов, вступающих в апоптоз и, следовательно, уменьшается уровень тубулоинтестинального фиброза почек. Данное исследование проводилось на нокаутных мышцах, у которых не синтезировались специфические молекулы адгезии (e-, p-, I-селектины), необходимые для рекрутинга предшественников макрофагов из периферической крови [232].

Цитотоксичность макрофагов может реализовываться за счет двух механизмов: прямого и непрямого. Прямой механизм связан с действием TNF- α и NO, образуемых активированными макрофагами.

Существуют и не прямые механизмы цитотоксического влияния макрофагов. На модели частичной нефрэктомии Kang et al. показали корреляцию степени инфильтрации почек макрофагами с потерей канальцевыми эпителиоцитами экспрессии VEGF – митогена эндотелиоцитов. В экспериментах *in vitro* ученые установили, что синтезируемые макрофагами TNF- α и IL-1 β снижают уровень как мРНК VEGF, так и самого VEGF в почках, что приводит к замедлению капиллярообразования, и, как следствие, вызывает гипоксию и ишемию почек, апоптоз канальцевых эпителиоцитов и эндотелиоцитов [167].

Кроме того, инфильтрация почек макрофагами коррелирует с накоплением экстрацеллюлярных матриксных белков и увеличением числа миофибробластов, что также приводит к фиброзу почек [182, 226]. В экспериментах Tan T.K. et al. показано, что MMP9 (может расщеплять белки базальной мембраны канальцевых эпителиоцитов, приводя к её повреждению и способствуя так называемому эпителиомезенхимальному переходу – трансдифференцировке канальцевых эпителиоцитов в миофибробласты – и, в конечном итоге, фиброзу почек [182].

Столь противоречивые данные о роли макрофагов в репаративной регенерации почек связаны, по всей видимости, с тем, что в различных условиях данные клетки могут иметь различный фенотип. У мышей деплеция макрофагов при воспалении приводит к уменьшению количества миофибробластов и, как

следствие, к уменьшению образования рубцов. Удаление же мононуклеаров в процессе восстановления сопровождается замедлением процесса деградации матрикса, приводящего к фиброзу почек, что доказывает участие в данных процесса M1 и M2 макрофагов. Действительно, введение активированных *ex vivo* M2 макрофагов мышам с диабетом приводит к уменьшению гипертрофии клубочков, снижению канальцевой атрофии и интерстициального фиброза. Защитный эффект M2 макрофагов, вероятно, связан с синтезом ими противовоспалительных цитокинов [199, 225, 275].

Таким образом, большое значение макрофагов для регенерации почек не вызывает сомнений, однако, многие вопросы, касающиеся, прежде всего, характера и механизмов влияния фагоцитирующих мононуклеаров на репарацию еще далеки от своего разрешения.

Наибольшее внимание ученых уделяется изучению прямого влияния синтезируемых макрофагами биологически активных веществ на пролиферацию клеток нефрона. Однако абсолютно неисследованным остается возможность макрофагальной регуляции миграции стволовых клеток к поврежденным почкам, а также и влияние макрофагов на чувствительность клеток нефрона к действию цитокинов и ростовых факторов.

1.3 Резидентные макрофаги печени и их влияние на регенерацию органа

Клетки Купфера (резидентные макрофаги печени) составляют около 15% от общего количества клеток печени, и у здорового человека их численность оценивается как $1,4-2 \cdot 10^7$ клеток в 1 г органа. Как правило, клетки Купфера располагаются в синусоидном пространстве сверху или между эндотелиальными клетками и иногда также в пространстве Диссе. Они имеют неправильную форму, содержат большое количество лизосом и фагосом, хорошо развитую эндоплазматическую сеть и комплекс Гольджи [94, 172].

В пределах дольки клетки Купфера распределены неравномерно: в основном они встречаются в перипортальной области (43%), в средней зоне локализовано 28%, а в области, прилежащей к центральной вене, 29% макрофагов. При этом клетки Купфера, локализованные в разных частях печеночной дольки отличаются по некоторым ключевым ферментам, рецепторам и внутриклеточным структурам и, следовательно, имеют различные функциональные возможности. Вероятно, это связано с особенностью кровоснабжения клеток, расположенных перипортально или же, наоборот, ближе к центральной вене дольки. Клетки Купфера, расположенные вблизи портального тракта, являются более крупными, более зрелыми клетками, обладают большей фагоцитарной активностью, кроме того, выделяют большее количество TNF- α , IL-1 и простагландина E. Более мелкие клетки Купфера расположены перицентрально и являются менее зрелыми клетками. При этом они активнее синтезируют оксид азота и супероксид анион, кроме того, характеризуются большей цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам и большей восприимчивостью к активации [175].

Клетки Купфера – это долгоживущие клетки, что показано в экспериментах с введением H³-тимидина (в печени крысы их митотический индекс составляет 0,06%). При повреждении печени их популяция восстанавливается, однако, до сих пор предметом дискуссии остается тот факт, идет ли восстановление за счет пролиферации резидентных клеток или же за счет миграции клеток-предшественников из внепеченочных источников. Установлено, что после частичной гепатэктомии, введения зимозана или IL-2 митотический индекс клеток Купфера резко возрастает и восстановление популяции идет преимущественно за счет пролиферации. В пользу этой точки зрения говорит и тот факт, что переходные формы между моноцитами, мигрирующими из периферической крови, и макрофагами печени до сих пор не описаны. Кроме того, в экспериментах, связанных с облучением костного мозга и селезенки, обнаружено восстановление популяции клеток Купфера после повреждения печени, тогда как при облучении самой печени этого не происходит. Тем не

менее, в экспериментах по трансплантации печени или по трансплантации костного мозга летально облученным животным доказано, что восстановление популяции резидентных макрофагов печени возможно за счет миграции клеток из костного мозга [209, 248].

Клетки Купфера, являясь резидентными макрофагами, осуществляют фагоцитоз липополисахаридов, старых и чужеродных клеток, паразитов, бактерий, вирусов, продуктов деградации фибрина, раковых клеток, что сопровождается их активацией. Активированные клетки Купфера синтезируют супероксид анион, перекись водорода, оксид азота, гидролитические ферменты, эйкозаноиды для уничтожения патогена, а также многочисленные иммунорегуляторные цитокины (IL-1,6, TNF- α , TGF- β , IFN- γ , SCF и др.) [198, 204, 274].

1.3.1 Особенности регенерации печени

Печень относится к органам, в которых в физиологических условиях преобладает внутриклеточная регенерация. Однако в ответ на повреждение гепатоциты способны активно пролиферировать, что приводит к гипертрофии органа [36].

Темпы развития гипертрофии весьма высоки. Так, у крыс уже через 72 часа после частичной гепатэктомии вес регенерирующего остатка составляет около 70% от массы печени до операции. Полное восстановление массы печени после частичной гепатэктомии у грызунов завершается уже через 5-7 дней [19, 36].

Высокая способность печени к регенерации в значительной степени связана с уникальным свойством гепатоцитов сохранять способность к делению на протяжении своей жизни. Согласно современным представлениям, гепатоциты обладают способностью к самоподдержанию на протяжении всей жизни организма, что является одним из признаков тканевых стволовых клеток. Кроме того, в последние годы накопились данные о пластичности гепатоцитов - *in vitro*

показано, что они способны давать начало холангиоцитам, преобразовываться в инсулинпродуцирующие клетки [17,19, 57, 58]. В исследованиях Koenig S. Et al., проведенных *in vitro*, показано, что во время митотического деления гепатоциты начинают экспрессировать маркеры мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток, а также α -фетопротеин, что характерно для клеток эмбриональной печени [254]. Все эти факты позволяют судить о гепатоците, как о коммитированной стволовой клетке с фиксированным фенотипом.

В норме в печени гепатоциты характеризуются низким митотическим индексом, и большая их часть находится в фазе G₀ клеточного цикла. Однако в условиях повреждения наблюдается активация их пролиферации, приводящая к образованию как одноядерных, так и двуядерных клеток [36].

Первые изменения в печени отмечаются уже через 5 минут после повреждения. Запускаются многочисленные сигнальные пути, связанные с действием цитокинов, ростовых и нейроэндокринных факторов, наблюдается индукция более 100 генов, которые не экспрессируются гепатоцитами в норме. Все это напрямую или косвенно способствует подготовке гепатоцитов к делению и в литературе часто называется «праймингом», то есть запуском репаративной регенерации. В первые минуты после частичной гепатэктомии наблюдается увеличение активности урокиназы, что способствует ремоделированию внеклеточного матрикса за счет активации MMP9. Кроме того, MMP9 вызывает высвобождение связанных с гликозаминогликанами и гепарином факторов роста (HGF, TGF β 1). В последующие 5 часов в печени наблюдается транслокация Notch и β -катенина к ядру гепатоцитов, активация рецепторов к HGF и EGF, повышение уровня HGF, норадреналина, IL-6, TNF- α , TGF β и гиалуроновой кислоты в плазме крови, активация NF κ B и STAT3. Таким образом, «прайминг» включает себя как стимуляцию деления гепатоцитов, так и подготовку внеклеточного матрикса к их распространению по печеночной балке [19, 125, 190].

Установлено, что после частичной резекции 2/3 печени пролиферативная реакция затрагивает весь остаток органа, при этом около 95% гепатоцитов делятся уже в течение 48 часов после повреждения и способны проделывать от 1

до 3 митозов. Важно отметить, что волна митозов распространяется от перипортальной области долики к перицентральной [125, 190].

У крыс подъем митотического индекса начинается спустя 24 часа после удаления долей печени, а своего максимума данный показатель достигает через 28-30 часов. Причем у крыс многие исследователи отмечают и второй пик митотического индекса, приходящийся на 40-44 часа после резекции. У мышей временные рамки иные: подъем митотического индекса начинается через 30 часов после операции, достигая максимума лишь 40-44 часа спустя [36].

Рост синтеза ДНК у крыс достигает своего максимума на 20-22 час после частичной резекции 2/3 печени. При этом еще раньше (6-12 часов) наблюдается интенсификация синтеза РНК: увеличивается количество рибосомальной и ядрышковой РНК, формируются рибосомы и полисомы [36].

В ответ на частичную резекцию в печени отмечается не только увеличение количества делящихся гепатоцитов, но и наблюдается снижение продолжительности их интерфазы и митотического цикла – так называемый переход от медленного к быстрому модусу пролиферации. Например, продолжительность S-периода интерфазы уменьшается с 18 часов у интактных животных до 7 часов у частично резецированных, длительность же митоза снижается с 5,5 часов до 1-1,5 часов [36].

В ответ на повреждение для гепатоцитов характерно развитие не только клеточной, но и внутриклеточной регенерации. Гипертрофия гепатоцитов проявляется в увеличении размеров клеток и их ядер, появлении полиплоидных и двуядерных гепатоцитов.

Согласно современным представлениям, образование двуядерных гепатоцитов осуществляется в результате митоза без цитотомии, однако не исключается и вариант amitotического деления или слияния гепатоцитов. Причем увеличение количества двуядерных клеток может сопровождать как развитие некоторых патологических процессов (вирусный гепатит, фиброз печени), так и течение репаративной регенерации. Установлено, что при культивировании гепатоцитов в присутствии факторов роста, у двуядерных

клеток обнаруживается более высокая чувствительность к данному воздействию, по сравнению с одноядерными гепатоцитами. Кроме того, при действии на культуру гепатоцитов ростовых факторов наблюдалось повышение доли двуядерных клеток. Таким образом, в ходе репаративной регенерации появление двуядерных клеток связывают, как правило, с развитием репаративных процессов, а именно, с внутриклеточной регенерацией [17].

Особое внимание ученых привлекает вопрос терминации репаративной регенерации в печени. В настоящее время ведущую роль в этом процессе отводят $TGF\beta_1$, экспрессию которого в звездчатых клетках активируют митогены - HGF и EGF. Показано, что $TGF\beta_1$ блокирует синтез HGF, стимулируя гепатоциты к переходу в фазу G0 клеточного цикла. Кроме того, блокирует синтез урокиназы и стимулирует образование внеклеточного матрикса в печени [125, 190].

Для восстановления печени только пролиферации и гипертрофии гепатоцитов недостаточно. Сами гепатоциты способны к синтезу митогенов для звездчатых (PDGF) и для синусоидальных клеток (VEGF, SCF, $TGF-\alpha$, ангиопоэтины). Кроме того, наблюдается пролиферация холангиоцитов и восстановление пула резидентных макрофагов [125, 190].

Ростовые факторы в регенерации печени

В регуляции репаративной регенерации печени принимает участие большое количество цитокинов, ростовых и нейроэндокринных факторов.

Основным митогеном гепатоцитов считается HGF, который кроме митогенного оказывает еще и мотогенный и антиапоптотический (связывает апоптотический рецептор Fas и препятствует его тримеризации) эффект на гепатоциты [141, 163, 190]. Как установлено в экспериментах Lindoos P.M. et al. уровень HGF в плазме крови после частичной гепатэктомии увеличивается в 10-20 раз [178]. Block G.D. et al. показали, что HGF оказывает сильный пролиферативный эффект на гепатоциты *in vitro*, а в экспериментах Patijn G.A. показан аналогичный эффект *in vivo*: введение HGF мышам запускает пролиферацию гепатоцитов даже в отсутствие повреждения печени [140, 212].

Синтез HGF осуществляется преимущественно в звездчатых и синусоидальных клетках и стимулируется действием норадреналина и IL-6 [141, 190].

Прямым митогеном для гепатоцитов является также синтезируемый Бруннеровыми железами кишечника и перисинусоидальными клетками печени EGF – эпидермальный ростовой фактор. EGF активирует рецептор EGFR, который способен активироваться и под действием TGF- α , также являющегося прямым митогеном для гепатоцитов. TGF- α синтезируется самими гепатоцитами и кроме аутокринного действия способен действовать паракринно, вызывая пролиферацию клеток синусоидов и желчных протоков. Подъем уровня TGF- α отмечается через 2-3 часа после частичной гепатэктомии, достигая максимума к 48 часам [125, 163, 190, 264].

Синтезируемые клетками Купфера TNF- α и IL-6 играют важную роль в восстановлении печени после повреждения. Уровень этих цитокинов значительно увеличивается в крови после частичной гепатэктомии, а блокирование их активности тормозит регенерацию печени [125, 163, 190].

Так, в экспериментах Akerman P. et al. установлено, что при введении мышам антител к TNF- α восстановление печени после частичной гепатэктомии значительно замедляется [84]. Исследователями Yamada Y. et al. в экспериментах на нокаутных мышах, не имеющих рецептора к TNF- α , показано, что репаративная регенерация печени после аналогичной операции протекает медленнее и заканчивается позднее, чем у мышей дикого типа [155].

Долгое время считалось, что TNF- α не оказывает прямого митогенного эффекта на гепатоциты. Webber E.M. et al. показали, что TNF- α лишь увеличивает пролиферативный эффект прямых митогенов гепатоцитов HGF и TGF- α , временно активируя NF κ B и STAT3 пути [268]. Однако в последние 10 лет развитие лабораторных методов исследования позволило более глубоко изучить данный вопрос и все большее количество ученых склоняется к мнению, что и TNF- α способен напрямую стимулировать пролиферацию гепатоцитов, что, в частности, показано на культуре первичных гепатоцитов в экспериментах Юсса H.A. et al. [162].

IL-6 является ключевым индуктором транскрипционных факторов, участвующих в регенерации печени. Однако он не только вызывает подготовку гепатоцитов к ответу на действие прямых митогенов, действуя косвенно, как это считалось ранее, но и способен напрямую активировать их пролиферацию [104, 148]. Zimmers T.A. et al. вводили IL-6 мышам и наблюдали увеличение массы печени за счет пролиферации гепатоцитов даже при отсутствии повреждения органа. При этом отмечается активация STAT3 и MAPK/ERK сигнальных путей, но не наблюдается активации рецепторов к HGF и TGF- α /EGF [185]. Selzner M. et al. предполагают, что при пролиферации гепатоцитов G1 фаза является IL-6-зависимой, тогда как переход из G1 в S фазу уже не зависит от IL-6 [234]. Кроме того, IL-6 действует как митоген на клетки желчных протоков [160].

В последние годы исследование веществ, способных влиять на регенерацию печени продолжается. Показано, что норадреналин, уровень которого резко увеличивается в плазме крови после частичной гепатэктомии, способен усиливать митогенный эффект EGF и HGF, ингибировать действие TGF β 1, стимулировать синтез ДНК в гепатоцитах. Кроме того, Oben J.A. et al. установлено, что норадреналин может стимулировать синтез ДНК и в звездчатых клетках как *in vitro*, так и *in vivo* [190, 200]. Влияние на репарацию печени способен оказывать также инсулин, серотонин, компоненты комплемента [190].

Участие стволовых клеток в регенерации печени

Восстановление паренхимы печени после повреждения, как правило, осуществляется за счет клеточной и внутриклеточной регенерации самих гепатоцитов или же, когда пролиферация гепатоцитов подавлена, за счет бипотентных овальных клеток. Однако, исследования последних лет показали возможность альтернативного способа восстановления печени за счет мигрирующих к органу стволовых клеток костномозгового происхождения [116, 137].

Гемопоэтические стволовые клетки костного мозга давно известны своей уникальной способностью к самообновлению и дифференцировке в клетки крови. Тем не менее, то, что эта «пластичность» ГСК распространяется и на

негемопоэтические линии клеток, такие как овальные клетки печени, гепатоциты, холангиоциты является относительно новым наблюдением и до сих пор не перестает быть предметом дискуссии.

В экспериментах X. Wang et al. показано участие ГСК человека в восстановлении печени иммунодефицитных мышей после воздействия тетрахлорметана. В печени обнаруживаются клетки, экспрессирующие альбумин человека и по морфологии соответствующие гепатоцитам. Кроме того, исследователями были обнаружены и клетки, экспрессирующие маркер холангиоцитов – цитокератин 19 [81]. В аналогичном исследовании Lagasse E. et al., проведенном на FAN2/2 мышях с тирозинемией, наблюдается преобразование ГСК в гепатоциты и их интеграция в паренхиму печени (они могут составлять 30-50% гепатоцитов), что сопровождается восстановлением нормальных уровней сывороточных трансаминаз, билирубина и аминокислот. Исследователи наблюдают также и пролиферацию гепатоцитов, имеющих донорское происхождение [217]. Однако, в экспериментах Kanazawa Y. et al. показана весьма низкая вероятность того, что ГСК способны вносить существенный вклад в восстановление печени после повреждения. Исследования были проведены также на иммунодефицитных мышях, печень которых была повреждена тетрахлорметаном, а также на линейных мышях, не способных синтезировать урокиназу. Ни в одной модели печеночного повреждения в органе не были обнаружены донорские клетки ни по экспрессии GFP (зеленый флуоресцирующий белок), ни по Y-хромосоме [164]. Несмотря на наличие критических статей, подвергающих сомнению сам факт участия ГСК в репаративной регенерации печени, большинство исследователей склоняются к мнению, что замещение поврежденных или погибших гепатоцитов за счет ГСК возможно. Столь существенные различия в результатах экспериментов могут быть объяснены отличиями в используемых методах выделения клеток, их обнаружении и самих экспериментальных моделях [86, 136].

Также весьма широко обсуждается вопрос о способе дифференцировки ГСК в гепатоциты. Рассматривается как возможность слияния клеток, так и трансдифференцировка.

В пользу слияния ГСК и гепатоцитов говорят исследования X. Wang et al., проведенные на мышах, дефицитных по фумарилацетоацетат гидролазе. Предварительно облученным мышам-самцам пересаживали ГСК от самок и наблюдали дифференцировку данных клеток в гепатоциты, что приводило к компенсации недостаточности фермента. При этом цитогенетический анализ показал наличие клеток с кариотипом XXXY, что свидетельствует о слиянии двух диплоидных клеток, и с кариотипом XXXXYU, указывающее на слияние диплоидной и тетраплоидной клеток [95]. О слиянии говорят и результаты Lagasse E. et al., эксперимент которых описан выше, и данные Quintana-Bustamante O. [136, 217].

Тем не менее, некоторые исследователи высказываются в пользу трансдифференцировки ГСК в гепатоциты. Так, в работе Ishikawa F. et al. ГСК из пуповинной крови человека пересаживали новорожденным мышам. Через 4-5 месяцев после трансплантации исследовали гепатоциты на наличие человеческой ДНК, кроме того оценивали экспрессию данными клетками человеческого альбумина, чтобы доказать не только интеграцию стволовых клеток в паренхиму печени, но и их способность функционировать, как гепатоциты. Было показано, что от 21 до 45,9% гепатоцитов были человеческими и экспрессировали альбумин. Слияния же человеческих и мышинных клеток обнаружено не было [266]. В аналогичной работе Newsom P.N. et al., где для пересадки летально облученным мышам с поврежденной печенью использовали ГСК из пуповинной крови человека, показана трансдифференцировка стволовых клеток без каких-либо признаков слияния с клетками реципиента [145]. Обращает на себя внимание тот факт, что в данных работах проведена ксенотрансплантация, что может объяснить различия в результатах и то, что исследователи слияния клеток не обнаружили.

Участие мезенхимальных стволовых клеток в репаративной регенерации печени и их способность дифференцироваться в гепатоциты *in vitro* и *in vivo* также широко обсуждается в литературе. В экспериментах Schwartz R.E. et al. полученные у человека, крысы и мыши МСК инкубировались в пробирке с различными факторами роста, включающими, в частности, EGF и HGF. Уже на 7 день инкубации исследователи наблюдали дифференцировку МСК в эпителиоподобные клетки, экспрессирующие цитokerатин 19 и α -фетопротеин, а к 21 дню большинство клеток положительно окрашивались на цитокератин 18 и альбумин. Около 5% клеток грызунов и 25% клеток человека были бинуклеарными и синтезировали мочевины и альбумин, а также содержали гликоген, что подтверждает их функциональную дифференцировку в гепатоциты [195].

МСК способны дифференцироваться в гепатоциты и *in vivo* [82, 116]. Так, например, в эксперименте Chamberlain J. et al. МСК человека трансплантировались плодам овцы. Через 56-70 дней после пересадки в печени реципиентов около 12,5% гепатоцитов имели донорское происхождение и были широко распространены по всей паренхиме [112].

К интересным выводам приходят в своих экспериментах Kanazawa H. et al. Исследование проводилось на мышах с ишемией/реперфузией и последующей частичной гепатэктомией, с целью моделирования повреждения печени во время операции по её трансплантации. Животным вводили МСК от трансгенных мышей, клетки которых способны к синтезу люциферазы и галактозидазы, используемых для последующей идентификации донорского материала. У мышей, леченных МСК, отмечался низкий уровень трансаминаз в сыворотке крови, меньшее количество клеток, вступивших в апоптоз и некроз. Через 7 дней после операции прирост массы печени достоверно больше, чем у контрольных животных. Однако, клетки, экспрессирующие люциферазу, наблюдались в печени реципиентов лишь в первые дни после операции (наибольшее их количество отмечается в 1 сутки), далее наблюдалось снижение их количества. Эти данные позволяют предположить, что трансплантированные МСК способствуют

восстановлению печени не за счет прямой дифференцировки в гепатоциты, а посредством синтеза различных цитокинов, стимулирующих регенерацию и препятствующих апоптозу клеток [89]. Этот вывод подтверждают и результаты эксперимента Parekkadan V. et al., в котором исследовалось влияние лизата МСК, полученного при обработке стволовых клеток ультразвуком, на восстановление печени и было показано, что введение лизата сопровождается снижением лейкоцитарной инфильтрации органа и уменьшением апоптоза [189].

Тем не менее, некоторые ученые подвергают сомнению положительное влияние МСК на регенерацию печени, аргументируя это тем, что МСК способны дифференцироваться в фибробласты и миофибробласты, тем самым способствуя развитию фиброза в поврежденном органе. В эксперименте Asawa S. et al. мышам после общего облучения пересаживали мышинные же МСК, экспрессирующие GFP. Через 4 недели после трансплантации для моделирования повреждения печени провели перевязку общего желчного протока. Уже на 7 день после операции в печени наблюдалось развитие перидуктального фиброза, причем значительное количество клеток, экспрессировавших маркер фибробластов и α -актин гладких мышц, было позитивно и по GFP [205].

В исследовании Russo F.P. et al. в печени, поврежденной тетрахлорметаном, также обнаруживается значительное количество звёздчатых клеток и миофибробластов, причем около 70% этих клеток имеют донорское происхождение (МСК мышей-самцов пересаживали летально облученным самкам) [252].

Таким образом, участие стволовых клеток костного мозга в восстановлении печени после повреждения до настоящего времени остается изученным не до конца. В литературе широко обсуждается как сам факт того, могут ли стволовые клетки участвовать в репаративной регенерации печени, так и механизмы этого участия. За пределами внимания ученых остается и возможность макрофагальной регуляции миграции стволовых клеток костного мозга к регенерирующей печени.

1.3.2 Макрофагальная регуляция репаративной регенерации печени

Синтез и секреция клетками Купфера цитокинов, способных влиять на регенерацию печени, доказывает их роль в регенерации данного органа [77].

Как это описано выше, синтезируемые макрофагами TNF- α и IL-6 оказывают существенное влияние на пролиферацию гепатоцитов и холангиоцитов [159, 258]. HGF, основной митоген для гепатоцитов, синтезируется наряду с клетками Ито и эндотелиальными клетками, также и макрофагами. В экспериментах с деплецией клеток Купфера у мышей после частичной гепатэктомии экспрессия мРНК HGF длительно снижена, что сопровождается замедлением темпов прироста массы печени [258].

Синтезируемый гепатоцитами белок ALR (augmenter of liver regeneration) является важным регулятором их пролиферации. Однако установлено, что реализация данной функции осуществляется лишь в присутствии в среде клеток Купфера. Предполагают, что стимулирующее влияние ALR на пролиферацию гепатоцитов осуществляется опосредованно через активацию купферовских макрофагов и стимуляцию синтеза TNF- α и IL-6 [85, 130].

Тем не менее, некоторые ученые придерживаются мнения, что активация клеток Купфера и синтез ими биологически активных веществ может вызывать повреждение клеток печени и способствовать развитию фиброза.

Так радикалы кислорода, синтезируемые купферовскими клетками в качестве защиты от бактериальной инвазии способны окислять и мембраны гепатоцитов. Введение экспериментальным животным супероксиддисмутазы (акцептора активных форм кислорода) значительно уменьшает повреждение печени и смертность животных.

Оксид азота увеличивает окислительный стресс клеток при ишемии/реперфузии печени за счет его взаимодействия с активными формами кислорода, приводящего к образованию пероксинитрита. Но при повреждении печени CCl₄ оксид азота, наоборот, выполняет защитную функцию, ингибируя каспазы и препятствуя вступлению клеток в апоптоз [172].

Синтезируемый макрофагами печени TNF- α способен вызывать апоптоз гепатоцитов, как за счет активации TNFR1, содержащего домены смерти, так и запуская нерецепторный апоптоз за счет отрицательного влияния на «оксидантный статус» клетки [216].

Таким образом, резидентные макрофаги печени выполняют не только защитную функцию, фагоцитируя патогены, но и влияют на репаративную регенерацию органа, как напрямую стимулируя пролиферацию клеток печени, так и способствуя активации митогенов. Тем не менее, возможное влияние клеток Купфера на миграцию стволовых клеток из костного мозга к печени, а также на чувствительность гепатоцитов к действию ростовых факторов остается неисследованным.

1.4 SCF/CD117 лиганд/рецепторное взаимодействие: общая характеристика и роль в регенерации почек и печени

Влияние макрофагов на восстановление органов может осуществляться различными способами, наиболее изученный из которых – это синтез фагоцитирующими мононуклеарами митогенов а также других биологически активных веществ, в частности ферментов, расщепляющих неактивные формы митогенов до активных.

Однако за пределами внимания ученых остаются еще, по крайней мере, два возможных механизма влияния макрофагов на репаративную регенерацию.

Во-первых, макрофаги могут изменять чувствительность клеток поврежденного органа к ростовым факторам, влияя на уровень экспрессии рецепторов к ним. Во-вторых, синтезируемые макрофагами вещества могут вызывать миграцию стволовых клеток костного мозга к поврежденному органу, что, в свою очередь, может способствовать его восстановлению.

С этих позиций особое внимание привлекает SCF/CD117 лиганд/рецепторное взаимодействие, так как оно участвует и в регуляции

миграции стволовых клеток костного мозга, а также влияет на пролиферацию дифференцированных клеток в почках и печени.

История изучения рецептора CD117 (*c-kit*) берет свое начало с открытия в 1986 году P. Besmer et al. вирусного онкогена *v-kit*, экспрессируемого вирусом саркомы кошек (Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma virus) [53, 78, 213]. Уже в 1987 году был идентифицирован его клеточный гомолог *c-kit*, являющийся протоонкогеном, белковый продукт которого, как было установлено позднее, представляет собой рецепторную тирозинкиназу, названную аналогично гену **c-kit** или, согласно классификации поверхностных молекул лейкоцитов, **CD117** [53, 147, 201, 213, 229, 239].

CD117 в норме экспрессируется гемопоэтической стволовой клеткой, миелоэритроидными клетками-предшественниками, тучными клетками, клетками Кахаля, овальными клетками печени [96, 166, 214]. Кроме того, в последние годы обнаружена экспрессия данного белка и зрелыми гепатоцитами, а также канальцевыми эпителиоцитами почек [168, 222, 240, 243].

Ген *c-kit* расположен в локусе q11-q12 четвертой хромосомы человека. У мышей он был картирован в W-локусе (dominant white spotting locus) пятой хромосомы. Задолго до открытия его белкового продукта было обнаружено, что у мышей мутации в W-локусе внешне проявляются так же, как и мутации в S1 (Steel) локусе на десятой хромосоме, а именно: у животных развивается макроцитарная анемия, стерильность и наблюдаются дефекты в окраске шерсти [181, 256]. Данный факт натолкнул на мысль о том, что продукты, кодируемые данными генами, по всей видимости, выполняют в клетке общие функции и уже в 1990 году группой Zsebo был выделен SCF – фактор стволовой клетки, являющийся лигандом CD117. Именно этот цитокин кодируется S1 локусом [242].

В настоящее время установлено, что в норме SCF в организме находится в растворимой и мембраносвязанной формах, образование которых идет путем альтернативного сплайсинга мРНК за счет наличия или отсутствия в зрелой молекуле белка сайта протеолитического расщепления [92, 149, 246]. И

растворимая, и мембраносвязанная формы SCF биологически активны. [92, 235, 239]

SCF продуцируется эндотелиоцитами и фибробластами. Эти клетки локализуют трансмембранную форму SCF на своей поверхности, а также синтезируют растворимую SCF. Кератиноциты в коже и эпителиальные клетки в кишке производят SCF, данный белок можно обнаружить в тимусе, а также в других органах [92, 235, 246]. В печени SCF синтезируется гепатоцитами и клетками Купфера, в почках – канальцевыми эпителиоцитами [222, 240].

Взаимодействие CD117 с SCF запускает цепь внутриклеточных реакций – фосфотидилинозитол-3киназный, MAP-киназный и Jak2/STAT-путь клеточной активации [80, 87, 201, 228, 239, 247, 257].

В эмбриогенезе взаимодействие SCF/CD117 обеспечивает миграцию зародышевых клеток в гонады и предшественников кератиноцитов в кожу, кроме того, регулирует гемопоэз в желточном мешке и печени [108, 191, 238, 278].

У взрослых линейных мышей до 7 - 8% от общего числа клеток костного мозга экспрессируют c-kit на своей поверхности [92]. Это не только мультипотентные гемопоэтические стволовые клетки, но и коммитированные предшественники миелоидных и эритроидных линий, предшественники Т- и В-лимфоцитов. По мере созревания большинство гемопоэтических клеток-предшественников утрачивает способность экспрессировать CD117 и среди дифференцированных клеток крови только мастоциты являются CD117 положительными

В постнатальном периоде активация CD117+ стволовых клеток костного мозга способствует увеличению их жизнеспособности и размножению в сочетании с другими факторами, но не влияет на самоподдержание [92].

SCF регулирует миграцию стволовых клеток костного мозга. Введение данного цитокина животным способствует поликлональной активации кроветворения с выходом стволовых клеток на периферию [92, 139, 201, 221, 237].

SCF увеличивает жизнеспособность и стимулирует пролиферацию предшественников тучных клеток. Активация c-kit в зрелых мастоцитах приводит к их дегрануляции, выбросу гистамина, хемотаксису [92, 100, 166, 171, 201, 202, 215].

У мышей, имеющих мутации в W или Sl локусе, наблюдаются серьезные нарушения в развитии клеток эритроидного ростка, например, макроцитарная анемия, что и натолкнуло исследователей на мысль о возможной роли SCF/CD117 лиганд-рецепторного взаимодействия в эритропоэзе. В настоящее время установлено, что ключевым в эритропоэзе является SCF/CD117 и Epo/Epo-R взаимодействия: SCF запускает пролиферацию БОЕ-Э и их дифференцировку в КОЕ-Э [129, 165, 170, 196]. Кроме того, установлено, что рецептор CD117 может сам активировать рецептор к эритропоэтину [129].

Хотя биологические эффекты активации CD117 наиболее полно описаны для стволовых клеток костного мозга, последние данные свидетельствуют о том, что CD117/SCF взаимодействие играет более глобальную роль, принимая участие в регуляции дифференцировки и пролиферации других типов клеток.

1.4.1 CD117+ клетки почек и их участие в восстановление органа после повреждения

Для репаративной регенерации почек большое значение имеет SCF/CD117 лиганд/рецепторное взаимодействие, причем регуляция осуществляется по аутокринному механизму: канальцевые эпителиоциты коэкспрессируют и CD117, и его лиганд. [101, 240].

В норме и CD117, и SCF экспрессируется клетками дистальных нефронов, а после повреждения (ишемия/реперфузия, введение нефротоксической сыворотки) их экспрессия отмечена и в проксимальных канальцах. Клетки почечных клубочков, а также петли Генле и собирательных трубочек взрослых здоровых животных и человека негативны [101, 117, 118, 168, 169, 240, 241].

Иммунопозитивная реакция к CD117 всегда имеет цитоплазматическую локализацию, кроме того, окрашивается и цитоплазматическая мембрана эпителиоцита (преимущественно апикальная часть). Ядро во всех описанных в литературе случаях остается негативным. Иными словами, белок окрашивается в месте своего образования и в месте выполнения своей рецепторной функции [168, 240].

В экспериментах Stokman G. et al. показано, что через 1 сутки после повреждения в гомогенате почек отмечается увеличение уровня SCF, однако к третьим суткам этот показатель уже не отличается от уровня контрольных животных. При блокировании образования SCF в организме путем введения antisenses oligonucleotides (антисмысловых олигонуклеотидов) мышам в первые сутки после ишемического повреждения наблюдается увеличение количества клеток канальцев, вступивших в апоптоз, и снижение количества пролиферирующих эпителиоцитов по сравнению с животными, которым антисмысловые олигонуклеотиды не вводили [240]. Следует отметить, что через 3 суток после ишемии показатели животных обеих групп не отличаются друг от друга: происходило увеличение и количества делящихся эпителиоцитов, и клеток канальцев, вступивших в апоптоз.

Таким образом, SCF/CD117 лиганд/рецепторное взаимодействие играет роль в восстановлении канальцевых эпителиоцитов, оказывая антиапоптотическое действие и стимулируя пролиферацию на ранних сроках после повреждения.

Увеличение уровня растворимого SCF по отношению к трансмембранному за счет его протеолитического расщепления, наблюдающееся в первые сутки после повреждения почек, может способствовать миграции ГСК по градиенту SCF [221, 241].

В настоящее время нет данных, свидетельствующих о способности макрофагов почек к синтезу SCF. Однако, в экспериментах Bengatta S. et al. установлено, что синтезируемая макрофагами MMP-9 обеспечивает высвобождение растворимой формы SCF из трансмембранной как *in vitro*, так и *in*

vivo, тем самым активируя рецептор, что в свою очередь препятствует апоптозу клеток почечных канальцев. У нокаутных MMP-9 $-/-$ мышей течение процессов восстановления после ишемии/реперфузии замедленно за счет увеличения числа канальцевых эпителиоцитов, вступивших в апоптоз. Введение же им SCF уменьшает тяжесть течения патологического процесса [192, 221, 236]. Кроме того, что макрофаги сами способны синтезировать MMP-9, они еще и активируют синтез данной металлопротеиназы другими клетками за счет выработки TNF α [46, 267, 269].

Таким образом, CD117+ канальцевые эпителиоциты, по всей видимости, представляют собой важное звено в процессе восстановления почек после повреждения, так как именно на эти клетки направлено действие SCF, снижающее их апоптоз и стимулирующее пролиферацию. Сигналом к запуску SCF/CD117 регуляторного пути могут служить синтезируемые макрофагами протеиназы.

1.4.2 CD117+ клетки печени и их участие в восстановление органа после повреждения

SCF/CD117 взаимодействие играет существенную роль в восстановлении печени после повреждения, будь то действие токсического агента или же частичная гепатэктомия.

В экспериментах Ren X. et al. *in vitro* показано, что SCF оказывает митогенный эффект на первичные гепатоциты, а введение в культуру анти-SCF антител приводит к блокированию пролиферации клеток. *In vivo* введение анти-SCF антител мышам, перенесшим 70% частичную гепатэктомию, не блокирует регенерацию, но приводит к задержке сроков её развития [222, 243]. Дополнительное введение SCF животным с токсическим повреждением печени увеличивает число пролиферирующих гепатоцитов и снижает количество клеток,

вступивших в апоптоз за счет активации ингибиторов апоптоза Bcl-2 и Bcl-XL [144].

Кроме того, повышение уровня сывороточного SCF в первые сутки после частичной гепатэктомии по мнению некоторых авторов может служить сигналом для миграции CD117+ клеток из костного мозга к регенерирующей печени [137].

Впервые экспрессия CD117 в печени была обнаружена на **овальных клетках** [134].

Овальные клетки локализованы в каналах Геринга, расположенных в районе порталных трактов периферической зоны долики. Они относятся к коммитированным бипотентным предшественникам, так как могут дать начало гепатоцитам и холангиоцитам [211, 233, 259, 261]. Вследствие чего для овальных клеток характерен «смешанный» фенотип, сочетающий в себе признаки обеих клеточных линий, что проявляется в экспрессии антигенов: альбумина (гепатоцитарный маркер) и цитокератинов 7, 8, 18, 19, одинаковых с холангиоцитами [126, 261]. Овальные клетки экспрессируют и некоторые маркерные белки гемопоэтических стволовых клеток, что может указывать на общность их происхождения [95, 97, 119, 255, 265].

Участие овальных клеток в восстановлении печени после повреждения возможно лишь при исчерпании пролиферативных резервов гепатоцитов и холангиоцитов, в условиях физиологической регенерации органа активация овальных клеток не обнаружена. В связи с чем для изучения данной субпопуляции используются модели сочетанного повреждения, например, частичная гепатэктомия с введением ацетаминофена. При повреждении печени в овальных клетках регистрируется увеличение экспрессии CD117 и его лиганда SCF уже в первые дни после начала воздействия. При этом отмечается их интенсивная пролиферация и распространение от перипортальной зоны в направлении центра долики [102, 103, 122, 123].

В последнее время накоплены данные, убедительно свидетельствующие о том, что **гепатоциты** способны экспрессировать CD117, а, следовательно, и реагировать на действие фактора стволовой клетки.

В экспериментах, проведенных В. Ну и L. Colletti установлено, что CD117 экспрессируется гепатоцитами в норме и при повреждении, причем CD117-позитивные клетки локализованы преимущественно перипортально [144].

После токсического повреждения печени (введение большой дозы ацетаминофена) экспрессия CD117 гепатоцитами резко возрастает уже через 1 сутки, ко вторым суткам достигая своего пика.

Эти данные подтверждены и при оценке количества CD117 мРНК, содержание которой начинает нарастать уже на 6 часов после введения ацетаминофена, становясь максимальным к 48 часам после токсического поражения. Уровень мРНК рецептора на данном сроке в 3 раза превышает значения у здорового животного [144].

Аналогичные изменения экспрессии CD117 наблюдаются у мышей и после частичной гепатэктомии, с тем лишь отличием, что количество CD117+ гепатоцитов становится максимальным уже на 1 сутки после операции, ко 2-м и 3-м суткам снижаясь, но незначительно [222].

В экспериментах X. Ren et al. показано, что печень в норме содержит значительное количество как мембрансвязанного, так и растворимого SCF. Причем сами гепатоциты способны к синтезу данного цитокина, и рост экспрессии SCF гепатоцитами наблюдается уже через 24 часа после повреждения [222, 243]. Наряду с гепатоцитами к синтезу SCF в печени способны эндотелиоциты и клетки Купфера [121, 208].

В последнее время начали появляться сообщения, свидетельствующие о существовании взаимосвязи провоспалительных цитокинов, синтезируемых макрофагами (IL-6, TNF α) и SCF.

В экспериментах *in vitro* показано, что добавление в культуру гепатоцитов IL-6 в значительной степени увеличивает продукцию данными клетками растворимой и мембрансвязанной формы фактора стволовой клетки. Схожие данные получены и *in vivo* на IL-6 нокаутных мышах, которым проводилась частичная гепатэктомия по Хиггинсу и Андерсону. Ren X. et al. показано, что на 2 сутки после операции количество пролиферирующих гепатоцитов у мышей, не

способных к синтезу ИЛ-6, значительно ниже, чем у гепатэктомированных животных дикого типа. Однако этот показатель восстанавливается до значений у мышей без мутации при введении им SCF [243].

В экспериментах *in vitro* с введением в культуру гепатоцитов TNF α было обнаружено увеличение продукции ими как растворимого, так и мембрансвязанного SCF, то есть синтез фактора стволовой клетки в той или иной степени может быть стимулирован действием TNF α . При этом *in vivo* у мышей, нокаутных по TNFR1, после частичной гепатэктомии наблюдалось восстановление пролиферативной активности гепатоцитов в ответ на введение им SCF [222].

Таким образом, не вызывает сомнения тот факт, что популяция CD117+ клеток в печени представлена не только овальными клетками каналов Геринга, но и самими гепатоцитами, которые, кроме того, обнаруживают способность к синтезу SCF. При повреждении клетки Купфера активируют SCF/CD117 лиганд/рецепторную ось как напрямую, синтезируя фактор стволовой клетки, так и косвенно за счет синтеза провоспалительных цитокинов.

Макрофаги оказывают существенное влияние на течение репарации в различных органах, в том числе в почках и печени. Наиболее изученным на настоящий момент является лишь один механизм макрофагальной регуляции регенерации, а именно: синтез макрофагами митогенов и/или других веществ, их активирующих.

Возможное влияние фагоцитирующих мононуклеаров на чувствительность пролиферирующих клеток к действию ростовых факторов за счет изменения уровня экспрессии рецепторов к ним находится вне поля зрения исследователей. Однако это может в значительной степени изменять выраженность восстановительных процессов, приводя к тому, что, например, даже меньшая концентрация ростового фактора вызовет бóльшую ответную реакцию клетки.

Участие стволовых клеток костного мозга в репаративной регенерации почек и печени широко обсуждается. Доказывается как факт

трансдифференцировки стволовых клеток в специализированные клетки органов, так и паракринное воздействие синтезируемых мигрировавшими стволовыми клетками веществ на пролиферацию резидентных клеток. Факт участия макрофагов в регуляции миграции стволовых клеток костного мозга к поврежденному органу остается неисследованным.

Недостаточно охарактеризована и специфика влияния макрофагов на восстановление органов с преобладанием в физиологических условиях клеточной (почки) и внутриклеточной (печень) регенерации.

ГЛАВА 2 МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика лабораторных животных

Опыты проводились на белых беспородных мышах-самцах одного возраста с массой около 20-25 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, где поддерживалась постоянная температура в пределах 22 – 25 °С и естественная смена дня и ночи. В каждой клетке содержалось по 5 мышей. Все животные имели свободный доступ к пище и воде. Ежедневно проводилась очистка клеток, дезинфекция – один раз в неделю.

В экспериментах было использовано 112 мышей. Все манипуляции с животными осуществлялись с соблюдением этических принципов и в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях [29].

2.2 Моделирование повреждения печени и почек

В данной работе оценивалось влияние СФМ на восстановительный рост клеток почек и печени в условиях репаративной регенерации органов. Исследование параметров производилось через 1 сутки после воздействия. Выбор срока исследования соответствует времени, предшествующему пику развития регенераторных процессов в органах [36].

Для активации репаративной регенерации печени и почек были использованы модели частичной гепатэктомии и частичной левосторонней нефрэктомии соответственно.

2.2.1 Методика резекции почек

Репаративная регенерация почек исследовалась на модели частичной левосторонней нефрэктомии. Под эфирным наркозом производили разрез слева на спине длиной 1 – 1,5 см, отсекали нижнюю часть левой почки (около 1/3 массы органа), останавливая кровотечение прижиганием, и затем осуществляли послойное наложение швов на область разреза. Животных забивали передозировкой эфира.

2.2.2 Методика резекции печени

Репаративную регенерацию печени исследовали на модели частичной гепатэктомии, предложенной Higgins G.M. и Anderson R.M. [142]. Для обеспечения доступа к печени проводили разрез кожи и мышц брюшной стенки по средней линии длиной 1 – 1,5 см, после чего выводили 2 большие доли печени, накладывали лигатуры и отсекали доли. Затем осуществляли наложение швов на рану послойно. Масса удаленных долей печени составила около 60 – 70% от массы органа. Операцию проводили под эфирным наркозом, а выведение животных из эксперимента – передозировкой эфира.

2.3 Оценка регенеративных процессов в почках и печени

Для оценки регенеративных процессов в условиях репаративной регенерации были использованы морфологические характеристики регенерирующего органа и ряд гистологических методик, характеризующих клеточную и внутриклеточную регенерацию.

Морфологическое исследование

Для оценки степени выраженности регенеративного процесса использовали следующие морфологические показатели печени/почек:

– Масса регенерирующих почек (оперированной и неоперированной)/ масса регенерирующей печени

– Процентное содержание сухого вещества и жидкости в ткани печени/ левой и правой почек. Для этого кусочки органов высушивались до постоянной массы в термостате при 37°C. Производилось взвешивание кусочков до и после высушивания.

Данные показатели позволяют оценить наличие или отсутствие в органе интерстициального отека (по процентному содержанию в жидкости), а также течение синтетических процессов (по процентному содержанию сухого вещества и приросту массы регенерирующего органа).

Гистологическое исследование

Кусочки почек/ печени оперированных животных фиксировали в 10% формалине и подвергали стандартной гистологической обработке с последующей заливкой в парафин. Парафиновые срезы почек/ печени толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. На гистологических препаратах определяли:

При повреждении левой почки

- Размеры канальцевых эпителиоцитов, их ядер;
- Ядерно-цитоплазматический индекс – отношение диаметра ядра к диаметру цитоплазмы;
- Размеры почечных клубочков;
- Размеры капсулы почечного клубочка.

При повреждении печени

- Размеры гепатоцитов, их ядер;
- Ядерно-цитоплазматический индекс – отношение диаметра ядра к диаметру цитоплазмы;
- Количество двуядерных клеток на площади 1 мм²;
- Количество гепатоцитов на площади 1 мм².

Для оценки параметров клеточной регенерации проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов анти-Ki-67 антителами, как описано ниже.

Анализ изображений проводили на микроскопе марки Leica DM2500 с видеокамерой Leica DFC420. Оценка исследуемых показателей проводилась с

помощью пакета прикладных морфометрических программ ВидеоТест – Морфология 5.0. При исследовании размеров клеток и их ядер оценивали 100 структур на каждом препарате на нескольких (до 20) полях зрения. При оценке размеров капсулы почечного клубочка и самого почечного клубочка измерялось 10 структур на каждом образце ткани. В остальных случаях измерения осуществляли в десяти полях зрения по диагонали гистологического препарата. На основе полученных данных производили подсчет среднеарифметических значений, которые подвергали статистической обработке.

2.4 Иммуногистохимическое исследование срезов почек/печени

Иммуногистохимическое окрашивание применялось для идентификации CD117+ клеток, пролиферирующих клеток (по экспрессии Ki-67) и макрофагов (по экспрессии CD172a) в почках и печени экспериментальных животных. В исследовании использовались антитела, приведенные в таблице (таблица 1).

Таблица 1 – Перечень антител для исследования

Исследуемый антиген	Первичное антитело: клон, разведение, производитель	Вторичное антитело: клон, разведение, производитель
CD117	Anti-CD117, клон ACK2. 1:50 Millipore, USA.	Biotine mouse anti-rat IgG2b 1:50 Millipore, USA.
Ki-67	Purified Mouse Anti-Human Ki-67, клон B56. 1:50 BD Biosciences, USA	Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption). поликлональное 1:50 BD Biosciences, USA.
CD172a (SIRP)	Anti-Macrophages/Granulocytes, клон OX-41. 1:150 Millipore, USA.	

Идентификация антигенных детерминант осуществлялась непрямой пероксидазным методом окрашивания [70].

Кусочки почек/ печени лабораторных животных фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24 часов, после чего проводилась их гистологическая обработка по стандартной методике с последующей заливкой в

парафин и изготовлением гистологических срезов толщиной 3-4 мкм. Срезы выдерживали в течение суток на предметных стеклах, покрытых поли-L-лизинном (POLYSINE, Menzel GmbH&Co, KG), после чего подвергали депарафинизации, регидратации и промывали в TBS-Tween 20 (Трис-буфер, pH =7,5-7,6).

При фиксации в формалине происходит образование метиленовых мостиков (сшивок) между белковыми молекулами, что приводит к маскировке антигенных детерминант в образцах тканей. Известно, что антитела распознают эпитопы преимущественно в стереоструктуре, изменение которой под действием фиксаторов резко снижает антигенные свойства белков. Поэтому при работе с тканями, фиксированными в формалине, до нанесения первичных антител рекомендуется применять демаскировку. В нашем исследовании для демаскировки использовали два подхода, основываясь на рекомендациях производителя антител: термическая демаскировка (при окрашивании на CD117 и Ki-67) и ферментативная (трипсиновая) демаскировка (при окрашивании на CD172a).

Для термической демаскировки использовали коммерческий буферный раствор (Target Retrieval Solution, Novocastra, UK), в котором выдерживали срезы в течение 20 минут при 95°C. После этого срезам давали остыть, для чего их оставляли на 20-30 минут при комнатной температуре в той же емкости, в которой производили кипячение. Далее срезы промывали в TBS-Tween 20.

Для ферментативной демаскировки антигенных детерминант использовали 0,05% раствор трипсина (Sigma-Aldrich, Inc.) в дистиллированной воде с добавлением 1% раствора хлорида кальция. Перед инкубацией с раствором трипсина стекла со срезами нагревали до 37°C в дистиллированной воде в термостате. Далее на срезы наносили раствор трипсина и помещали их во влажную камеру. Инкубацию с трипсином проводили также при 37°C в течение 5 минут, после чего срезы промывали в холодной дистиллированной воде с целью остановить ферментативную реакцию. Затем осуществляли промывку в TBS-Tween 20.

Дальнейшая процедура окрашивания одинакова для всех идентифицируемых антигенов.

При использовании системы детекции, основанной на взаимодействии авидина (стрепавидина) и биотина, необходима процедура блокировки эндогенного авидина/биотина. Особенно блокировка полезна при работе с тканями, содержащими большое количество эндогенного биотина, к которым в частности относятся печень и почки. Блокировка позволяет избежать связывания компонентов системы детекции с эндогенным биотином и тем самым снизить количество фоновой реакции.

Процедура блокировки эндогенного биотина осуществлялась следующим образом:

1. Инкубация срезов в 0,001% растворе авидина (Sigma-Aldrich, Inc) в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH=7.4) в течение 15 минут с последующей промывкой в PBS
2. Инкубация срезов в 0,001% растворе биотина (Sigma-Aldrich, Inc) в PBS в течение 15 минут с последующей промывкой в PBS

Далее срезы инкубировали с соответствующими первичными антителами при температуре 27°C в течение 1 часа во влажной камере, после чего промывали дважды в TBS-Tween 20. Затем производили блокировку эндогенной пероксидазы с использованием коммерческого блокирующего раствора Peroxidase Block (Novocastra, UK) и промывку в двух сменах TBS-Tween 20.

Далее инкубировали срезы с соответствующими вторичными антителами при температуре 27°C в течение 30 минут во влажной камере, после чего промывали дважды в TBS-Tween 20.

Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему Novolink Polymer Detection System (Novocastra, UK). Антигенреактивные клетки контрастировали хромогенным субстратом (3,3-диаминобензидин в буферном растворе). DAB-позитивные клетки почек/ печени идентифицировали по коричневому гранулярному окрашиванию цитоплазмы (при окрашивании на CD117 и CD172a) или по коричневому окрашиванию ядер клеток (при окраске на

Ki-67). Проводили постановку негативного контроля на тех же срезах исследуемой группы.

2.4.1 Анализ срезов, окрашенных анти-Ki-67 антителами

По количеству Ki-67-позитивных клеток в 1 мм² на срезах печени и почек оценивали течение регенеративных процессов в данных органах. Ki-67 - это ядерный антиген, выраженный в клетках на всех стадиях клеточного цикла кроме G₀, что и позволяет использовать его в качестве маркера пролиферации (клеточной регенерации).

При повреждении печени определяли количество Ki-67-позитивных гепатоцитов в единице площади, при повреждении почек - количество Ki-67-позитивных канальцевых эпителиоцитов и клеток почечных телец.

2.4.2 Анализ срезов, окрашенных анти- CD172a антителами

Клетки, позитивные по CD172a, оценивались как макрофаги. Данный антиген представляет собой иммуноглобулин-подобный поверхностный рецептор к CD47. CD172a ингибирует трансдукцию сигналов, опосредованных взаимодействием лигандов и рецепторов, связанных с тирозинкиназой.

Экспрессия CD172a характерна также и для гранулоцитов, поэтому идентификация макрофагов проводилась с использованием морфологических критериев, а клетка учитывалась только в том случае, если ее ядро было отчетливо видно. Использование иммуногистохимического метода идентификации макрофагов с помощью анти-CD172a антител совместно с анализом морфологии клетки и ядра, а также особенностей ее локализации в ткани позволяет утверждать, что иммунопозитивные клетки, обнаруживаемые нами в межканальцевом интерстиции почек и в строме печени, являются макрофагами.

2.4.3 Анализ срезов, окрашенных анти-CD117 антителами

Число антигенных детерминант, локализованных в клетке, определяет количество антител, которые свяжутся с ней при окрашивании, поэтому исследование интенсивности окраски клетки позволяет оценить степень экспрессии ею CD117.

Для этого при помощи программы ВидеоТест – Морфология 5.0. проводилась оценка относительной оптической плотности клеток в срезах почек/печени, окрашенных анти-CD117 антителами. По степени экспрессии CD117+ клетки были разделены на 3 группы: со слабой, средней и выраженной экспрессией антигена.

1. Клетки с относительной оптической плотностью от 0,06 до 0,12 условных единиц оценивались как клетки со слабой экспрессией CD117
2. Клетки с относительной оптической плотностью от 0,12 до 0,18 условных единиц оценивались как клетки со средней экспрессией CD117
3. Клетки с относительной оптической плотностью более 0,18 условных единиц оценивались как клетки с выраженной экспрессией CD117

Клетки, не экспрессировавшие данный антиген, были окрашены в фиолетовый цвет и не имели коричневых гранул в цитоплазме, их относительная оптическая плотность была меньше 0,06 условных единиц.

Во всех случаях подсчет иммунопозитивных клеток проводился в 20 не перекрывающих друг друга полях зрения по диагонали гистологического препарата. Производили измерение площади поля зрения, чтобы рассчитать количество клеток, экспрессирующих исследуемый антиген, в 1 мм² ткани. На основе полученных данных производили подсчет среднеарифметических значений, которые затем подвергали статистической обработке.

Исследования всех иммуногистохимических препаратов осуществлялись на микроскопе марки Leica DM2500, подключенной к видеокамере Leica DFC420. Оценка показателей проводилась с помощью пакета прикладных морфометрических программ ВидеоТест – Морфология 5.0.

2.5. Исследование содержания стволовых гемопоэтических клеток в крови и костном мозге мышей при повреждении почек/печени

Наиболее общим маркером, присущим мышинным ГСК, является CD117. Однако CD117-позитивные клетки костного мозга – это не только мультипотентные гемопоэтические стволовые клетки, но и коммитированные предшественники миелоидных и эритроидных линий, предшественники Т- и В-лимфоцитов. В связи с этим для характеристики ГСК у мышей принято использовать несколько маркеров, среди которых большинство исследователей выделяют CD90 (Thy-1) и CD38, характеризуя CD45^{low}CD117+CD90^{low} ГСК как менее дифференцированные, тогда как CD45^{low}CD117+CD38+ ГСК как более дифференцированные клетки [120, 218, 270].

Оценку содержания стволовых клеток в крови и костном мозге мышей осуществляли через сутки после операции стандартным методом прямого иммунофлюоресцентного окрашивания с использованием моноклональных антител производства BD Biosciences анти CD117-PE, IgG2b; анти CD38-FITC, IgG2a; анти CD90-FITC, IgG2a и соответствующих «изотипических» контролей (крысиные IgG2b-PE, IgG2a-FITC; BD). Лизис эритроцитов осуществляли с помощью коммерческого лизирующего буфера FACS Lysing Solution фирмы BD Biosciences. Для контроля границ лейкоцитарного гейта применяли моноклональные антитела против общелейкоцитарного антигена CD45 (анти CD45-PerCP-Cy5.5, IgG2b; изотипический контроль – крысиный IgG2b- PerCP-Cy5.5; BD). Цитофлюориметрию осуществляли на проточном цитофлюориметре FC500 (Beckman Coulter), при этом регистрировали суммарно не менее 100000 событий.

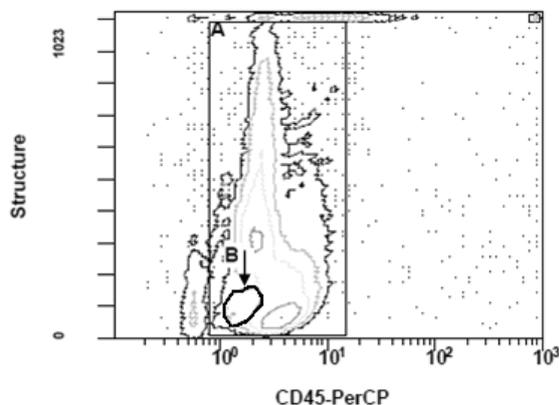


Рисунок 1 – Распределение клеток крови интактного животного по параметру малоуглового светорассеяния и экспрессии CD45.

Примечание: Гейт А: лейкоцитарное облако CD45-позитивных клеток. Гейт В: CD45^{low} клетки, имеющие морфологию малого лимфоцита

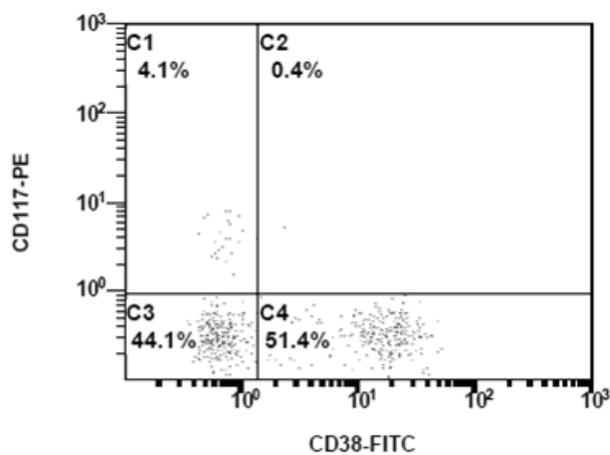


Рисунок 2 – Экспрессия маркеров CD117 и CD38 клетками крови интактного животного.

Примечание: Анализ проводили с использованием гейтирования по CD45^{low} (гейт В). В квадранте C2 расположены CD45^{low} CD117+CD38+ ГСК

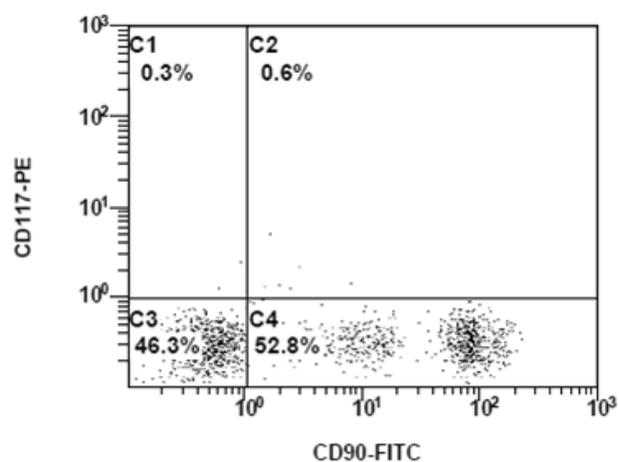


Рисунок 3 – Экспрессия маркеров CD117 и CD90 клетками крови интактной
 МЫШИ.

*Примечание: Анализ проводили с использованием гейтирования по CD45^{low} (гейт B). В
 квадранте C2 расположены CD45^{low}CD117+CD90^{low} ГСК*

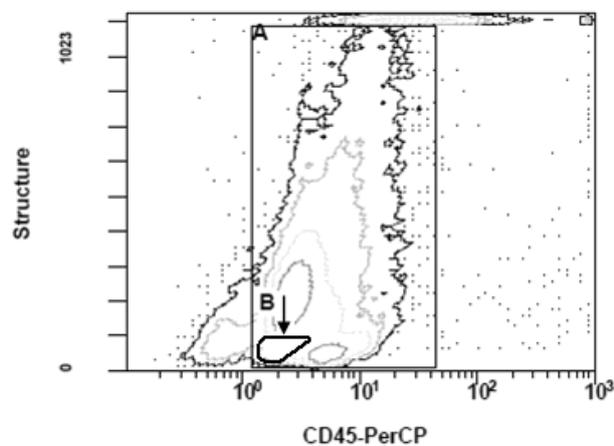


Рисунок 4 – Распределение миелокарицитов костного мозга интактного
 животного по параметру малоуглового светорассеяния и экспрессии CD45.

*Примечание: Гейт A: облако CD45-позитивных клеток. Гейт B: CD45^{low} клетки, имеющие
 морфологию малого лимфоцита*

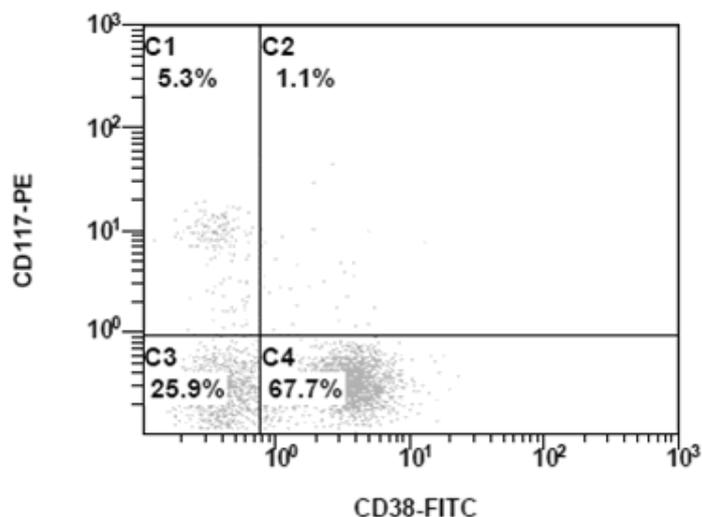


Рисунок 5 – Экспрессия маркеров CD117 и CD38 клетками костного мозга интактной мыши.

Примечание: Анализ проводили с использованием гейтирования по CD45^{low} (гейт В). В квадранте C2 расположены CD45^{low}CD117+CD38+ ГСК

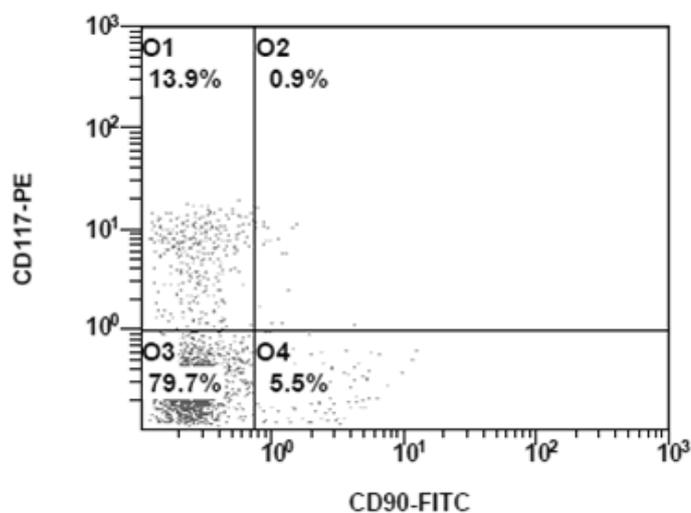


Рисунок 6 – Экспрессия маркеров CD117 и CD90 клетками костного мозга интактной мыши.

Примечание: Анализ проводили с использованием гейтирования по CD45^{low} (гейт В). В квадранте O2 расположены CD45^{low}CD117+CD90^{low} ГСК

В качестве стволовых клеток рассматривались клетки, имевшие морфологию малого лимфоцита (по параметрам переднеуглового и малоуглового

светорассеяния, гейт В, рисунок 1, 4), слабо экспрессировавшие маркер CD45 и являющиеся CD117+CD38+ (рисунок 2, 5) либо CD117+CD90^{low} (рисунок 3, 6). Доля стволовых клеток высчитывалась от общего количества CD45-позитивных клеток (гейт А, рисунок 3, 6).

Определение абсолютного количества стволовых клеток в исследуемых тканях проводилось с использованием двухплатформенного метода. Для подсчета абсолютного количества стволовых клеток в крови использовались данные о количестве лейкоцитов, полученные на гематологическом анализаторе Celly70 Biocode-Hysel. Принималось, что количество лейкоцитов, определенное гематологическим анализатором, соответствует количеству CD45+ клеток, выделенных нами в гейт А.

Для подсчета абсолютного количества миелокариоцитов мы использовали камеру Горяева. Кроме того, проводили подсчет миелограммы, так как в случае с костным мозгом не все миелокариоциты экспрессируют CD45, а следовательно, их необходимо исключить из рассмотрения.

2.6 Методы изменения функционального состояния системы фагоцитирующих мононуклеаров

Изменение функционального состояния СФМ в эксперименте достигалось использованием стимулятора макрофагов 3-аминофталгидразида и ингибитора макрофагов каррагинана.

3-аминофталгидразид (Тамерит) представляет собой лекарственный препарат, относящийся к группе иммуномодуляторов. Способен стимулировать функционально-метаболическую активность макрофагов, восстанавливать их антиген-презентирующую и секреторную функции [1; 2]. 3-аминофталгидразид вводился мышам внутримышечно в дозе 2 мг/кг.

Каррагинан представляет собой полимер галактозы, получаемый из морских водорослей. Используется в пищевой промышленности в качестве загустителя и при употреблении в пищу характеризуется малой токсичностью.

Однако при внутрибрюшинном введении захватывается макрофагами и подавляет процессы фагоцитоза и активность лизосомальных гидролаз мононуклеарных фагоцитов, приводя к гибели клетки. Препарат вводился внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг [93; 110; 260].

Препараты вводились донорам однократно за час до воздействия, контрольным животным производилась инъекция физиологического раствора.

2.7 Статистические методы, используемые для обработки экспериментального материала

Статистический анализ данных проводили с помощью программы StatSoft Statistica 6.0. Для проверки гипотезы об однородности двух независимых выборок использовался непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, статистически достоверные различия принимали при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЧЕК И РЕАКЦИИ CD117+ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ НЕФРЭКТОМИИ

Отличительной особенностью репаративной регенерации почек является то, что она осуществляется не путем образования новых нефронов, а путем гипертрофии и пролиферации клеток в пределах тех нефронов, которые сохранились после повреждения органа. В канальцевом аппарате почек преобладает клеточная регенерация, тогда как в клубочках – внутриклеточная [91, 128, 210].

3.1 Оценка регенеративных показателей почек у животных, перенесших лапаротомию

В процессе проведенных исследований установлено, что лапаротомия у мышей не вызывает изменений массы почек, а также содержания в них сухого вещества и жидкости (таблица 2).

Морфометрическое исследование свидетельствует о снижении площади капсулы сосудистого клубочка, а также площади мочевого пространства по сравнению со значениями в группе интактных животных (таблица 3). При этом отмечается увеличение площади просвета канальца до $436,9 \pm 9,6$ мкм², тогда как в интактной группе данный показатель составляет $341 \pm 5,9$ мкм² ($P=0,0001$). По всей видимости, реакцией на лапаротомию является перераспределение жидкости в пределах нефрона между мочевым пространством капсулы и просветом канальца.

Размеры эпителиоцитов и их ядер не меняются. Количество пролиферирующих клеток канальцев и почечных телец остается на уровне таковых значений у интактных животных (таблица 3,4).

Таким образом, реакция почек на лапаротомию проявляется в функциональной перестройке нефрона – уменьшении площади мочевого пространства без существенных изменений со стороны показателей клеточной и внутриклеточной регенерации.

3.2 Репаративная регенерация почек после частичной нефрэктомии

При анализе показателей животных, перенесших частичную нефрэктомию, установлено, что через сутки после операции наблюдается прирост массы органа и в оперированной, и в контрлатеральной почке, обусловленный увеличением не только массы жидкости, но и ростом массы сухого вещества, что указывает на развитие регенераторных процессов в органе (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели регенеративных процессов в почках мышей после частичной нефрэктомии

В относительных величинах

		Масса почек после операции, %	Сухая масса, %	Вода, %
Расчетный остаток (0 часов)	Оперированная почка	100	25,24±0,65	74,76±0,65
	Неоперированная почка	100	25,24±0,65	74,76±0,65
Лапаротомия (1 сутки)	Правая почка	97,05±3,57	26,47±0,13	73,53±0,13
Частичная нефрэктомия (1 сутки)	Оперированная почка	107,99±0,78*	24,11±0,33	75,89±0,33
	Неоперированная почка	110,17±0,44*	24,75±0,66	75,25±0,66

В абсолютных величинах

		Масса почек после операции, мг	Сухая масса, мг	Вода, мг
Расчетный остаток (0 часов)	Оперированная почка	150,07±1,99	37,87±0,12	112,20±0,08
	Неоперированная почка	192,1±2,7	48,49±0,09	143,63±1,2
Лапаротомия (1 сутки)	Правая почка	187,5±6,78	49,7±1,97	137,3±0,19
Частичная нефрэктомия (1 сутки)	Оперированная почка	162,07±0,96*	39,18±0,05*	122,79±0,45*
	Неоперированная почка	211,64±1,21*	52,48±0,11*	159,26±0,19*

Примечание: *- достоверные отличия от расчетного остатка (P<0,05)

3.2.1 Реакция гломерулярного аппарата на частичную нефрэктомия

Исследование гистологических срезов оперированной почки свидетельствует об уменьшении площади сосудистого клубочка и площади капсулы, как и при ложной операции. Кроме того, в тельцах обнаружено снижение количества Ki-67+ клеток по сравнению с интактными и лапаротомированными животными, что указывает на замедление пролиферативных процессов, протекающих в данной структуре (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели внутриклеточной и клеточной регенерации клубочкового аппарата почек мышей после частичной нефрэктомии

Показатели	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	
			Оперированная почка	Неоперированная почка
Площадь сосудистого клубочка, мкм ²	3049,8±130,6	3005,1±215,8	2410,1±48,3*	2599,2±176,8
Площадь капсулы сосудистого клубочка, мкм ²	4661,5±103,6	3821,1±155,7*	3639,2±183,5*	4125,9±228,8
Площадь мочевого пространства, мкм ²	1611,7±189,5	816±123,6*	1229,1±158,7	1526,7±99,1**
Ki-67+ клетки почечного тельца, кл./мм ²	190,47±1,82	184,95±4,38	147,19±1,75 ***#	190,48±2,52 #

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками достоверны (P<0,05)

По всей видимости, именно с этим фактом связано наблюдающееся уменьшение размеров сосудистых клубочков, а размер капсулы, вероятно, уменьшается уже компенсаторно. При этом площадь мочевого пространства остается постоянной, что может иметь большое значение для клубочковой фильтрации (таблица 3).

В не оперированной же почке площадь сосудистого клубочка и его капсулы не меняется, а число Ki-67+ клеток почечных телец остается на уровне интактных значений (таблица 3).

3.2.2 Реакция канальцевого аппарата на частичную нефрэктомия

В оперированной почке размеры канальцевых эпителиоцитов и их ядер не отличаются от показателей в группах интактных и лапаротомированных животных. Однако в ответ на повреждение в почке увеличивается количество Ki-67+ канальцевых эпителиоцитов, что свидетельствует об активации процессов клеточной регенерации (таблица 4).

В неповрежденной почке размеры канальцевых эпителиоцитов и их ядер не отличаются от таковых показателей у интактных и лапаротомированных животных (таблица 4).

Таблица 4 – Показатели внутриклеточной и клеточной регенерации канальцевых эпителиоцитов почек мышей после частичной нефрэктомии

Группа	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	
			Оперированная почка	Неоперированная почка
Площадь ядер канальцевых эпителиоцитов, мкм ²	27,99±1,59	32,42±2,59	29,11±0,67	27,27±0,89
Площадь канальцевых эпителиоцитов, мкм ²	76,12±7,15	65,12±3,42	69,71±3,05	67,38±2,26
ЯЦИ канальцевых эпителиоцитов	0,59±0,04	1,17±0,38	0,73±0,05	0,69±0,06
Ki-67+ канальцевые эпителиоциты, кл./мм ²	102,16±1,53	79,09±11,65	134,20±1,88 ***#	124,09±1,99 ***#

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками достоверны (P<0,05)

При окраске на маркер пролиферации выявлено увеличение числа Ki-67+ клеток канальцев, свидетельствующее о развитии процессов гиперплазии в канальцевом аппарате симметричной почки, однако выражены они в меньшей степени, чем в частично резецированном органе (таблица 4).

Таким образом, через сутки после операции и в поврежденной, и в симметричной почке запускаются процессы клеточной регенерации. Прирост массы органа обеспечивается именно за счет увеличения числа канальцевых эпителиоцитов.

3.3 Оценка экспрессии CD117 в почках

Экспрессия клеткой CD117 является не просто ее фенотипической, но и функциональной характеристикой, а именно свидетельствует о ее способности связываться с SCF. Данное рецептор-лигандное взаимодействие, как известно, запускает клеточную пролиферацию [240, 241]. Таким образом, в почках мышей встречаются канальцевые клетки, находящиеся в двух функциональных состояниях, а анализ их специфической локализации в канальцах наталкивает на мысль о том, что именно эти клетки образуют ростковые зоны в почке.

3.3.1 Оценка экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами почек интактных и лапаротомированных мышей

При окраске срезов почек интактных мышей анти-CD117 антителами выявлена положительная реакция в виде умеренного мелкогранулярного окрашивания цитоплазмы эпителия канальцев преимущественно коркового слоя. Клетки почечных телец и клетки стромы на всех срезах остаются иммунонегативными.

Обращает на себя внимание характер расположения CD117+ клеток в пределах канальца, а именно: либо вся эпителиальная выстилка канальца, видимая на срезе, образована CD117+ клетками, либо все канальцевые эпителиоциты остаются иммунонегативными (рисунок 7). При этом канальцы, выстланные CD117+ клетками, обнаруживают очаговый характер распределения в пределах коркового вещества почек.

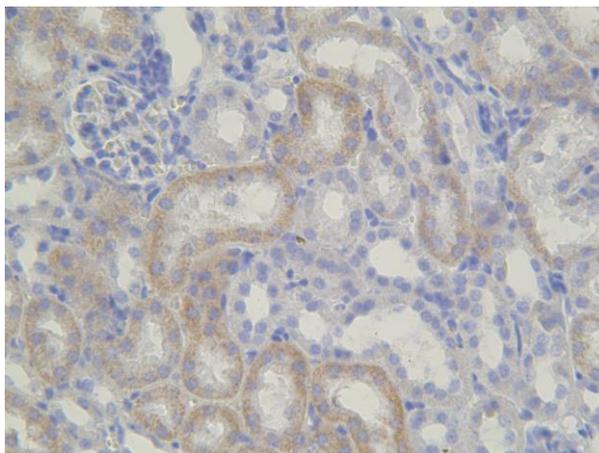


Рисунок 7 – Локализация CD117+ клеток в интактной почке мыши.

Примечание: Увеличение x 400. CD117+ клетки окрашены коричневым

У интактных животных канальцевые эпителиоциты являются преимущественно иммунонегативными – их оптическая плотность не превышает 0,06 усл.ед. Однако, идентифицированы клетки, показатели оптической плотности которых были выше данного значения, а следовательно, эти клетки экспрессировали CD117 (таблица 5). Тем не менее, у интактных животных в почках не были обнаружены клетки с выраженной экспрессией исследуемого антигена – эпителиоциты с уровнем оптической плотности более 0,18. Аналогичная ситуация наблюдалась и на срезах почек лапаротомированных животных, что свидетельствует об отсутствии влияния ложной операции на экспрессию CD117 в почках (таблица 6).

3.3.2 Оценка экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами после частичной нефрэктомии

После частичной нефрэктомии как в оперированной, так и в неповрежденной почке наблюдается резкое изменение уровня экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами, осуществляющееся вследствие развития двух процессов.

Таблица 5 – Количество CD117-негативных/позитивных канальцевых эпителиоцитов и общее количество данных клеток у мышей после частичной нефрэктомии, кл./мм²

		CD117-негативные эпителиоциты	CD117-позитивные эпителиоциты	Общее количество эпителиоцитов
Интактные		1944,6±186	744,5±52,6	2687,9±84,3
Лапаротомия		2165,5±106,5	630,9±88,6	2792,7±54,4
Частичная нефрэктомия	Оперированная почка	917,25±66,5 *,**	1335,2±65,6 *,**	2253,7±62,6 *,**
	Неоперированная почка	1008,5±86,5 *,**	1022,7±40 *,**,#	2031,9±73,7 *,**

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками достоверны (P<0,05)

Во-первых, увеличивается количество иммунопозитивных клеток как в оперированной, так и в симметричной почке, то есть большее количество канальцевых эпителиоцитов начинает экспрессировать CD117 (таблица 5). По всей видимости, это связано с их пролиферацией.

Во-вторых, данные изменения сопровождаются появлением значительного количества клеток канальцев с выраженной экспрессией CD117. Возрастает и число клеток с оптической плотностью 0,12-0,18 усл. ед., то есть со средним уровнем экспрессии исследуемого антигена. Количество эпителиоцитов с уровнем оптической плотности порядка 0,06-0,12 усл. ед. не отличается от таковых значений в группе интактных и ложнооперированных животных, что позволяет рассматривать их как некий резервный пул (таблица 6).

Таблица 6 – Количество канальцевых эпителиоцитов с различным уровнем экспрессии CD117 у мышей после частичной нефрэктомии, кл./мм²

		0,06-0,12	0,12-0,18	>0,18
Интактные		680,7±139,8	62,55±27,9	0
Лапаротомия		517,9±81,5	109,9±41,4	0
Частичная нефрэктомия	Оперированная почка	621,2±39	547,35±92,1 *,**	164,9±14,4 *,**
	Неоперированная почка	646,8±36,8	331,4±90,9 *,**	43,7±2,3 *,**,#

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками достоверны (P<0,05)

Интересным представляется тот факт, что изменение экспрессии CD117 как в оперированной, так и в контрлатеральной почке аналогичны с той лишь разницей, что в поврежденном органе достоверно выше количество канальцевых эпителиоцитов с уровнем оптической плотности более 0,18 усл. ед.

Таким образом, в ответ на частичную нефрэктомии в почках увеличивается количество CD117+ канальцевых эпителиоцитов. Кроме того, клетки, образующие ростковую зону, характеризуются интенсификацией синтеза белка CD117, на что указывает рост оптической плотности данных клеток.

3.4 Оценка количества CD117+ стволовых клеток в крови и костном мозге после частичной нефрэктомии

В настоящее время внимание исследователей привлекает проблема миграции стволовых клеток костномозгового происхождения к поврежденному органу. Многими авторами экспрессирующие CD117 клетки, локализованные в костном мозге, рассматриваются как стволовые [92, 197]. Накоплено достаточное количество экспериментального материала, подтверждающего тот факт, что выход стволовых клеток и клеток-предшественников в кровь может быть стимулирован действием SCF [139, 221, 237].

Явление мобилизации CD117+ клеток, по мнению ряда авторов, может иметь большое значение для восстановления поврежденного органа, так как они могут дифференцироваться в клетки органа-реципиента, тем самым, способствуя структурному и функциональному восстановлению почек [138, 193, 271].

Таким образом, представляется интересным изучить реакцию CD117+ клеток костномозгового происхождения на частичную нефрэктомии.

3.4.1 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге лапаротомированных мышей

При исследовании содержания клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD90^{low} у лапаротомированных животных не обнаружено изменения этого показателя ни в крови, ни в костном мозге. Однако, что касается более дифференцированных клеток-предшественников с фенотипом CD45^{low}CD117+CD38⁺, количество их снижается в крови, оставаясь при этом неизменным в костном мозге, что, по всей видимости, указывает на усиление их миграции из периферической крови, вероятно, к месту повреждения. Однако активации их пролиферации в костном мозге не происходит.

Таким образом, ложная операция вызывает уменьшение пула CD45^{low}CD117+CD38⁺ клеток, циркулирующих в периферической крови, не влияя при этом на пул этих клеток, локализованных в костном мозге. Влияния лапаротомии на CD45^{low}CD117+CD90^{low} клетки не обнаружено (таблица 7).

Таблица 7 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в крови мышей после частичной нефрэктомии, кл./1 мкл

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия
CD45 ^{low} CD117+CD38 ⁺	0,596±0,101	0,123±0,044*	3,09±0,85* **
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	0,799±0,248	0,306±0,044	2,49±0,22* **

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

3.4.2 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге мышей после частичной нефрэктомии

После частичной нефрэктомии наблюдается изменение количества CD117+ клеток обоих исследуемых фенотипов в крови и костном мозге. В крови отмечен рост содержания данных клеток, как по сравнению с интактными, так и по сравнению с лапаротомированными животными, что указывает на

интенсификацию миграции ГСК из костного мозга в периферическую кровь в ответ на повреждение (таблица 7).

Миграция клеток с фенотипом $CD45^{low}CD117+CD90^{low}$ в кровь сопровождается увеличением их количества в костном мозге по сравнению с группой лапаротомированных животных. Однако содержание более дифференцированных $CD117+$ клеток в данной ткани снижается (таблица 8).

Таблица 8 – Содержание $CD117+$ клеток с различным фенотипом в костном мозге мышей после частичной нефрэктомии, кл. $\cdot 10^3$ /бедренная кость

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия
$CD45^{low}CD117+CD38+$	$5,93 \pm 1,75$	$9,87 \pm 2,71$	$2,29 \pm 0,53^{**}$
$CD45^{low}CD117+CD90^{low}$	$1,32 \pm 0,51$	$0,520 \pm 0,087$	$2,25 \pm 0,64^{**}$

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны ($P < 0,05$)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны ($P < 0,05$)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что обе субпопуляции $CD117+$ клеток отвечают на повреждение почки выходом в циркуляцию. При этом количество $CD45^{low}CD117+CD90^{low}$ клеток растет и в костном мозге, тогда как численность пула $CD45^{low}CD117+CD38+$ клеток снижается, по всей видимости, в результате их более интенсивной миграции в периферическую кровь или же торможения процесса дифференцировки $CD45^{low}CD117+CD90^{low}$ клеток (таблица 8).

3.5 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге мышей

Моноцитарно-макрофагальную инфильтрацию почек в ответ на повреждение отмечают многие исследователи. Согласно современным представлениям, макрофаги, мигрировавшие в почку, могут синтезировать не только провоспалительные цитокины, что, по мнению ряда авторов, приводит к апоптозу клеток и, как следствие, нарушает структурную архитектуру органа и

его функции, но и противовоспалительные цитокины. В этом случае макрофаги могут способствовать усилению пролиферации, уменьшению апоптоза и стимуляции ангиогенеза [184, 225, 275].

3.5.1 Содержание моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге интактных и лапаротомированных мышей

У интактных и лапаротомированных животных характерной особенностью локализации макрофагов в строме почки, является то, что их количество в межканальцевом интерстиции коркового вещества, то есть в месте расположения ростковой зоны органа, значительно больше, чем в мозговом. Данный факт позволяет высказать предположение о возможном влиянии фагоцитирующих мононуклеаров на реакцию клеток ростковой зоны.

Исследование содержания макрофагов по экспрессии антигена CD172a у животных с ложной операцией свидетельствует об уменьшении количества данных клеток в мозговом веществе почек, по сравнению с показателем у интактных животных, в то время как численность макрофагов в корковом веществе и почечных клубочках не изменяется (таблица 9).

В костном мозге отличий по количеству клеток моноцитарного ряда у животных, перенесших лапаротомию, также не обнаружено (таблица 10).

3.5.2 Содержание моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге нефрэктомированных мышей

У нефрэктомированных мышей в межканальцевом интерстиции оперированной почки отмечается резкое увеличение количества макрофагов (таблица 9), причем накопление данных клеток одновременно наблюдается и в корковом, и в мозговом веществе. Обращает на себя внимание тот факт, что рост числа данных клеток происходит не только периваскулярно и в зоне,

непосредственно прилегающей к месту повреждения, но и в пространстве между канальцами, удаленными от нее.

Таблица 9 – Содержание макрофагов (CD172a+ клеток) в почках нефрэктомизированных мышей, кл./мм²

Показатель		Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	
				Оперированная почка	Неоперированная почка
Межканальцевый интерстиций	Корковое вещество	44,7±2,08	37,25±4,47	101,9±15,3 ***#	64,5±7,2 ***#
	Мозговое вещество	14,7±3,9	3,1±1,3*	81,5±24,8 ***#	8,49±3,7#
	Среднее	29,71±2,93	20,18±2,82*	91,68±13,53 ***#	36,5±5,54**#
Почечные тельца		1,31±0,69	0,94±0,59	9,3±5,3	4,53±1,92

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками достоверны (P<0,05)

В неповрежденной почке при исследовании количества CD172a+ клеток обнаружено увеличение данного показателя в межканальцевом интерстиции коркового вещества, однако, менее выраженное, чем в поврежденной почке. Содержание данных клеток в мозговом веществе остается на уровне интактных значений.

Ни в оперированной, ни в контрлатеральной почке не выявлено макрофагальной инфильтрации почечных телец (таблица 9).

Согласно имеющимся в литературе данным изменение содержания макрофагов в почках после частичной нефрэктомии происходит преимущественно вследствие миграции моноцитов из костного мозга [105; 167], поэтому представляется необходимым оценить содержание клеток моноцитарного ряда в костном мозге. Одновременная оценка содержания фагоцитирующих мононуклеаров в костном мозге и почках позволяет получить представление о состоянии СФМ в условиях повреждения.

Таблица 10 – Содержание моноцитов-макрофагов в костном мозге нефрэктомированных мышей, кл.*10⁶/10 г массы тела

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия
Моноциты/макрофаги	0,028±0,002	0,026±0,003	0,066±0,003***

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

Количество клеток моноцитарного ряда в костном мозге мышей, перенесших частичную нефрэктомию, возрастает по сравнению с таковым показателем у интактных и лапаротомированных животных. Данный факт свидетельствует об интенсификации моноцитопозза в ответ на повреждение почки.

3.6 Заключение

При частичной нефрэктомии восстановление поврежденной почки осуществляется за счет клеточной регенерации, развивающейся в канальцевом аппарате нефрона. Контрлатеральная почка также отвечает на повреждение пролиферацией клеток канальцев, хотя и менее выраженной, чем в оперированном органе. Активации процессов внутриклеточной регенерации после нефрэктомии ни в той, ни в другой почке обнаружено не было.

Установлено, что при частичной нефрэктомии в почках резко увеличивается процентное содержание клеток канальцев, экспрессирующих CD117, причем данное изменение хоть и наблюдается в обеих почках, все же в большей степени проявляется в оперированном органе.

Учитывая тот факт, что в обеих почках через сутки после частичной нефрэктомии процент Ki-67+ канальцевых эпителиоцитов также значительно возрастает, можно предположить, что повреждение приводит к усилению пролиферации клеток, опосредованной через активацию рецептора CD117.

Изменение количества макрофагов в почках, выявленное при повреждении, подтверждает роль данных клеток в репаративных процессах. При этом

макрофаги мигрируют в межканальцевый интерстиций, не задерживаясь в почечных тельцах (накопления фагоцитирующих мононуклеаров в гломерулярном аппарате не наблюдается). Увеличение же содержания макрофагов в корковом веществе как оперированной, так и контрлатеральной почек может свидетельствовать об их регулирующем действии на CD117+ клетки, составляющие ростковую зону, так как она также локализована в корковом веществе почек.

Таким образом, контроль макрофагами клеточной пролиферации может быть опосредован через активацию рецептора CD117, локализованного на мембране некоторых канальцевых эпителиоцитов коркового вещества.

При повреждении почки имеет место реакция не только со стороны CD117+ клеток оперированного и контрлатерального органов, но и со стороны CD117+ стволовых клеток костномозгового происхождения.

При частичной нефрэктомии отмечается выход в кровь как менее дифференцированных клеток с фенотипом $CD45^{low}CD117+CD90^{low}$, так и более зрелой популяции – $CD45^{low}CD117+CD38+$ клеток. Кроме того, менее дифференцированные CD117+ клетки отвечают на повреждение почек увеличением своего пула в костном мозге. Таким образом, имеет место мобилизация CD117+ клеток различной степени зрелости из костного мозга в кровь, что позволяет высказать предположение об их миграции к поврежденному органу и участии в регенерации.

ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЧЕК И СОСТОЯНИЯ CD117+ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ НЕФРЭКТОМИИ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СФМ

Для доказательства роли системы фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ) в регуляции репаративных процессов в почке представляется целесообразным изучить регенерацию органа после частичной нефрэктомии в условиях ингибирования СФМ.

4.1 Оценка показателей репаративной регенерации после частичной нефрэктомии в условиях ингибирования функционального состояния СФМ

Ингибирование функционального состояния макрофагов каррагинаном существенно тормозит прирост массы как оперированной, так и симметричной почек, что, вероятно, указывает на задержку репаративных процессов в органе при блокировании регуляторного влияния макрофагов (таблица 11).

4.1.1 Реакция гломерулярного аппарата на частичную нефрэктомию при ингибировании функционального состояния СФМ

В оперированной почке животных данной группы площадь сосудистого клубочка не отличается от показателя как у мышей с чистой нефрэктомией, так и у интактных животных.

Размеры же капсулы снижаются в той же степени, что и у нефрэктомированных животных, не получавших препарат (таблица 12). Иными словами, уменьшение размеров капсулы в поврежденной почке связано с самой операцией, а блокада СФМ на данный показатель не влияет.

Количество вступивших в пролиферацию клеток почечного тельца в оперированном органе у животных с введением препарата существенно меньше, чем только при нефрэктомии, что свидетельствует о замедлении процессов клеточной регенерации (таблица 12).

Таблица 11 – Показатели регенераторных процессов в почках мышей после частичной нефрэктомии на фоне ингибирования СФМ

В относительных величинах

		Масса почек после операции, %	Сухая масса, %	Вода, %
Расчетный остаток (0 часов)	Оперированная почка	100	25,24±0,65	74,76±0,65
	Неоперированная почка	100	25,24±0,65	74,76±0,65
Лапаротомия (1 сутки)	Правая почка	97,05±3,57	26,47±0,13	73,53±0,13
Частичная нефрэктомия (1 сутки)	Оперированная почка	107,99±0,78*	24,11±0,33	75,89±0,33
	Неоперированная почка	110,17±0,44*	24,75±0,66	75,25±0,66
Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ (1 сутки)	Оперированная почка	63,78±3,06*.&	27,69±0,33*.&	72,3±0,33*.&
	Неоперированная почка	72,19±2,52*.&	28,89±0,31*.&	71,11±0,31*.&

В абсолютных величинах

		Масса почек после операции, мг	Сухая масса, мг	Вода, мг
Расчетный остаток (0 часов)	Оперированная почка	150,07±1,99	37,87±0,12	112,20±0,08
	Неоперированная почка	192,1±2,7	48,49±0,09	143,63±1,2
Лапаротомия (1 сутки)	Правая почка	187,5±6,78	49,7±1,97	137,3±0,19
Частичная нефрэктомия (1 сутки)	Оперированная почка	162,07±0,96*	39,18±0,05*	122,79±0,45*
	Неоперированная почка	211,64±1,21*	52,48±0,11*	159,26±0,19*
Частичная нефрэктомия+ ингибирование СФМ (1 сутки)	Оперированная почка	95,67±4,58*.&	25,76±0,31*.&	69,23±3,49*.&
	Неоперированная почка	137,17±4,8*.&	39,53±1,07*.&	97,63±3,78*.&

Примечание: *- достоверные отличия от расчетного остатка (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

В контрлатеральной почке в отличие от животных с чистой нефрэктомией наблюдается снижение количества пролиферирующих клеток, хотя и менее

выраженное, чем в поврежденном органе (таблица 12). Таким образом, если при чистой нефрэктомии уменьшение числа Ki-67+ клеток в гломерулярном аппарате наблюдалось только в оперированной почке, то при введении каррагинана этот феномен отмечается в обеих почках.

Изменений же размеров сосудистого клубочка и его капсулы по сравнению с нефрэктомированными животными, не получавшими препарат, в неоперированной почке нет (таблица 12).

Таблица 12 – Показатели внутриклеточной и клеточной регенерации клубочкового аппарата почек мышей после частичной нефрэктомии на фоне ингибирования СФМ

Показатели	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия		Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ	
			Оперированная почка	Неоперированная почка	Оперированная почка	Неоперированная почка
Площадь сосудистого клубочка, мкм ²	3049,8	3005,1	2410,1	2599,2	2734,5	2867,2
	± 130,6	± 215,8	± 48,3*	± 176,8	± 209,7	± 105,3
Площадь капсулы сосудистого клубочка, мкм ²	4661,5	3821,1	3639,2	4125,9	3670,2	3901
	± 103,6	± 155,7*	± 183,5*	± 228,8	± 253,9*	± 116,7*
Площадь мочевого пространства, мкм ²	1611,7	816	1229,1	1526,7	935,7	1033,8
	± 189,5	± 123,6*	± 158,7	± 129,1**	± 68,8*	± 154,6*
Ki-67+ клетки почечного тельца, кл./мм ²	190,47	184,95	147,19	190,48	43,29	80,81
	± 1,82	± 4,38	± 1,75 ***#	± 2,52 #	± 1,15 ***.#&	± 1,5 ***.#&

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Анализ показателей регенерации гломерулярного аппарата почек, прежде всего, указывает на то, что в условиях ингибирования СФМ активность пролиферативных процессов резко тормозится.

4.1.2 Реакция канальцевого аппарата на частичную нефрэктомия при ингибировании функционального состояния СФМ

Размер канальцевых эпителиоцитов и их ядер в оперированной почке при ингибировании СФМ не отличается от показателей у интактных, лапаротомированных, и у нефрэктомированных животных, не получавших препарат (таблица 13).

Таблица 13 – Показатели внутриклеточной и клеточной регенерации канальцевых эпителиоцитов почек мышей после частичной нефрэктомии на фоне ингибирования системы фагоцитирующих мононуклеаров

Группа	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия		Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ	
			Оперированная почка	Неоперированная почка	Оперированная почка	Неоперированная почка
Площадь ядер канальцевых эпителиоцитов, мкм ²	27,99 ± 1,59	32,42 ± 2,59	29,11 ± 0,67	27,27 ± 0,89	32,14 ± 2,99	33,43 ± 3,86
Площадь канальцевых эпителиоцитов, мкм ²	76,12 ± 7,15	65,12 ± 3,42	69,71 ± 3,05	67,38 ± 2,26	66,73 ± 3,64	79,59 ± 6,00
ЯЦИ канальцевых эпителиоцитов	0,59 ± 0,04	1,17 ± 0,38*	0,73 ± 0,05	0,69 ± 0,06	1,05 ± 0,31	0,77 ± 0,07
Ki-67+ канальцевые эпителиоциты, кл./мм ²	102,16 ± 1,53	79,09 ± 11,65	134,20 ± 1,88 ***.#	124,09 ± 1,99 ***.#	38,96 ± 1,23 ***.#,&	107,24 ± 1,57 ***.#,&

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Наряду с этим, при сравнении с мышами, перенесшими чистую нефрэктомия, выявлено существенное замедление пролиферативных процессов в клетках канальцев, о чем свидетельствует снижение количества Ki-67+ эпителиальных клеток (таблица 13).

При анализе морфометрических показателей неоперированной почки выявлено, что ингибирование функциональной активности СФМ сопровождается в ней, как и в оперированной почке, замедлением пролиферации клеток канальцев (таблица 13).

4.2. Оценка экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами после частичной нефрэктомии при ингибировании СФМ

В оперированной почке при блокировании СФМ количество CD117+ клеток по сравнению с чистой нефрэктомией увеличивается (таблица 14).

Таблица 14 – Количество CD117-негативных/позитивных канальцевых эпителиоцитов и общее количество данных клеток у мышей после частичной нефрэктомии при ингибировании СФМ, кл./мм²

		CD117- негативные эпителиоциты	CD117- позитивные эпителиоциты	Общее количество эпителиоцитов
Интактные		1944,6±186	744,5±52,6	2687,9±84,3
Лапаротомия		2165,5±106,5	630,9±88,6	2792,7±54,4
Частичная нефрэктомия	Оперированная почка	917,25±66,5 *,**	1335,2±65,6 *,**	2253,7±62,6 *,**
	Неоперированная почка	1008,5±86,5 *,**	1022,7±40 *,**, #	2031,9±73,7 *,**
Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ	Оперированная почка	781,5±42,15 *,**	1858,3±42,3 *,**, #, &	2638,6±39,2 #, &
	Неоперированная почка	746,6±61,2 *,**, &	1504,5±46,7 *,**, #, &	2251±47,5 *,**, #, &

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Кроме того, наблюдается изменение соотношения CD117+ канальцевых эпителиоцитов по уровню оптической плотности - увеличивается количество клеток со средней (оптическая плотность 0,12-0,18 усл. ед.) и выраженной (оптическая плотность >0,18 усл. ед.) экспрессией антигена.

В тоже время численность клеток с низкой оптической плотностью (от 0,06 до 0,12 усл. ед.) не отличается от значений у животных, перенесших нефрэктомия без введения препарата (таблица 15).

Таблица 15 – Количество канальцевых эпителиоцитов с различным уровнем экспрессии CD117 у мышей после частичной нефрэктомии при ингибировании СФМ, кл./мм²

		0,06-0,12	0,12-0,18	>0,18
Интактные		680,7±139,8	62,55±27,9	0
Лапаротомия		517,9±81,5	109,9±41,4	0
Частичная нефрэктомия	Оперированная почка	621,2±39	547,35±92,1 *,**	164,9±14,4 *,**
	Неоперированная почка	646,8±36,8	331,4±90,9 *,**	43,7±2,3 *,**, #
Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ	Оперированная почка	633,9±45,6 #	871,2±50,4 ***, #, &	352,4±33,5 ***, #, &
	Неоперированная почка	923,7±77,9 **, #, &	500,4±63,8 *, **, #	79,8±2,86 ***, #, &

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

В симметричной же почке отмечается рост количества канальцевых эпителиоцитов со слабой и выраженной экспрессией антигена. Увеличение же количества клеток со средним уровнем экспрессии CD117 (оптическая плотность 0,12-0,18 усл. ед.) не отличается от увеличения данного показателя у животных с чистой нефрэктомией.

Таким образом, увеличивается не только количество клеток, способных реагировать на действие SCF, но возрастает и число молекул рецептора, способных связываться с лигандом, а значит, растет чувствительность клеток к данному ростовому фактору.

4.3 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге мышей после частичной нефрэктомии при ингибировании СФМ

В условиях ингибирования функциональной активности макрофагов численность обеих исследуемых субпопуляций CD117+ клеток в крови существенно ниже, чем у нефрэктомированных животных, не получавших препарат (таблица 16).

Таблица 16 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в крови мышей после частичной нефрэктомии на фоне ингибирования СФМ, кл./1 мкл

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ
CD45 ^{low} CD117+CD38+	0,596±0,101	0,123±0,044*	3,09±0,85* **	0,36±0,08 ^{&}
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	0,799±0,248	0,306±0,044	2,49±0,22* **	0,306±0,094 ^{&}

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

В костном мозге нефрэктомированных мышей в условиях ингибирования СФМ отмечено разнонаправленное изменение их количества, а именно: содержание клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD90^{low} снижается, тогда как численность более дифференцированной субпопуляции существенно возрастает, то есть наблюдается ускорение дифференцировки клеток-предшественников.

Таблица 17 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в костном мозге мышей после частичной нефрэктомии на фоне ингибирования СФМ, кл.*10³/бедренная кость

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ
CD45 ^{low} CD117+CD38+	5,93±1,75	9,87±2,71	2,29±0,53**	17,22±1,8 ***.&
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	1,32±0,51	0,520±0,087	2,25±0,64**	0,128±0,043***.&

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях ингибирования функциональной активности макрофагов происходит интенсификация дифференцировки $CD45^{low}CD117+CD90^{low}$. Снижение же содержания обеих исследуемых субпопуляций $CD117+$ клеток в крови указывает на замедление их выхода в кровь и миграции к поврежденному органу.

4.4 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге мышей после частичной нефрэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ

В оперированной почке при ингибировании СФМ в значительной степени замедляется накопление макрофагов в межканальцевом интерстиции мозгового вещества по сравнению с показателем у нефрэктомированных мышей без введения препарата. При этом в корковом веществе ингибирование СФМ не влияет на изменение количества фагоцитирующих мононуклеаров (таблица 18).

Таблица 18 – Содержание макрофагов ($CD172a+$ клеток) в почках нефрэктомированных мышей на фоне ингибирования СФМ, кл./мм²

Показатель		Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия		Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ	
				Оперированная почка	Неоперированная почка	Оперированная почка	Неоперированная почка
Межканальцевый интерстиций	Корковое вещество	44,7 ± 2,08	37,25±4,5	101,9±15,3 ***#	64,5±7,2 ***#	66,5±1,9 ***#	102,6±9,7 ***#&
	Мозговое вещество	14,7 ± 3,9	3,1±1,3*	81,5±24,8 ***#	8,49±3,7 #	13,1±9,1 #&	96,8±19,7 ***#&
	Среднее	29,71 ± 2,93	20,2±2,8*	91,68±13,53 ***#	36,5±5,54 **#	39,8±8,6 #&	99,7±14,6 ***#&
Почечные тельца		1,31±0,69	0,94±0,59	9,3±5,3	4,53±1,92	2,83±1,6	3,97±1,96

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

В контрлатеральной почке в ответ на ингибирование СФМ наблюдается активное накопление CD172a+ клеток в межканальцевом интерстиции как коркового, так и мозгового вещества. Вероятно, данное явление носит компенсаторный характер, так как подавление функций макрофагов может быть компенсировано ростом их количества в органе (таблица 18).

В условиях ингибирования СФМ в костном мозге нефрэктомизированных животных наблюдается активация моноцитопоэза, о чем свидетельствует рост количества клеток моноцитарного ряда (таблица 19).

Таблица 19 – Содержание моноцитов-макрофагов в костном мозге нефрэктомизированных мышей при ингибировании СФМ, кл. $\cdot 10^6/10$ г массы тела

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	Частичная нефрэктомия + ингибирование СФМ
Моноциты/макрофаги	0,028±0,002	0,026±0,003	0,066±0,003*.*.*	0,092±0,005*.*.*.&

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Таким образом, подавление функциональной активности СФМ одновременно с активацией моноцитопоэза изменяет направление миграции CD172a+ клеток, а именно: замедляется накопление макрофагов в мозговом веществе поврежденной почки, однако, интенсифицируется приток фагоцитирующих мононуклеаров к контрлатеральному органу.

4.5 Заключение

Подавление функциональной активности СФМ, вызванное введением каррагинана, существенно влияет на течение репарации и в оперированной, и в неповрежденной почках.

Ингибирование СФМ сопровождается значительным торможением клеточной регенерации и в канальцевом, и в гломерулярном аппарате нефрона, что в наибольшей степени проявляется в оперированной почке.

Наблюдаемые изменения течения репаративных процессов обнаруживают корреляцию с изменением количества макрофагов в почках, а именно: более значительное снижение пролиферативной активности эпителиоцитов в поврежденной почке сопровождается резким падением числа макрофагов, тогда как в симметричном органе активное накопление CD172a+ клеток способствует поддержанию пролиферативных процессов на относительно высоком уровне.

Все эти изменения сопровождаются увеличением экспрессии рецептора к SCF в ростковой зоне канальца. В условиях ингибирования функциональной активности макрофагов процент CD117+ клеток увеличивается в той же степени, что и у нефрэктомированных животных, не получавших препарат. Однако, этот рост обеспечивается, по всей видимости, не пролиферацией CD117+ клеток, так как количество Ki-67+ эпителиоцитов в данной группе животных резко падает. Вероятно, большее количество уже имеющихся в почках канальцевых эпителиоцитов начинает экспрессировать этот рецептор на своей поверхности. Данный факт подтверждается тем, что наблюдается изменение соотношения CD117+ канальцевых эпителиоцитов по уровню оптической плотности - увеличивается абсолютное количество клеток со средней и выраженной экспрессией антигена.

При ингибировании СФМ происходит интенсификация дифференцировки CD45^{low}CD117+CD90^{low} клеток с увеличением пула более дифференцированных стволовых клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD38+. Однако выход этих клеток в кровь замедляется.

Таким образом, и CD117+ стволовые клетки костномозгового происхождения реагируют на изменение функциональной активности СФМ, что свидетельствует о генерализованном характере реакции данных клеток на повреждение почек. Кроме того, этот факт указывает также и на то, что реакция стволовых клеток регулируется в той или иной степени макрофагами.

ГЛАВА 5 ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЧЕК И СОСТОЯНИЯ CD117+ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ НЕФРЭКТОМИИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СФМ

Данные о том, что ингибирование СФМ приводит к изменению репаративных процессов в поврежденной почке и содержания в ней CD117+ клеток, подтверждают предположение о возможном влиянии функционального состояния фагоцитирующих мононуклеаров на течение регенерации после частичной нефрэктомии. Однако для подтверждения этого заключения необходимо провести исследование и при стимуляции системы фагоцитирующих мононуклеаров.

5.1 Оценка показателей репаративной регенерации после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ

При стимуляции функциональной активности макрофагального звена иммунной системы 3-аминофталгидразидом выявлено более значительное увеличение массы как оперированной, так и симметричной почек по сравнению со значениями в группе нефрэктомированных животных без введения препарата, причем за счет увеличения, как сухого вещества, так и жидкости, что указывает на развитие гипертрофии обеих почек (Таблица 20).

Таблица 20 – Показатели регенераторных процессов в почках мышей после частичной нефрэктомии на фоне стимуляции СФМ

В относительных величинах

		Масса почек после операции, %	Сухая масса, %	Вода, %
Расчетный остаток (0 часов)	Оперированная почка	100	25,24±0,65	74,76±0,65
	Неоперированная почка	100	25,24±0,65	74,76±0,65
Лапаротомия (1 сутки)	Правая почка	97,05±3,57	26,47±0,13	73,53±0,13
Частичная нефрэктомия (1 сутки)	Оперированная почка	107,99±0,78*	24,11±0,33	75,89±0,33
	Неоперированная почка	110,17±0,44*	24,75±0,66	75,25±0,66
Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ, (1 сутки)	Оперированная почка	114,09±1,5* .&	25,34±0,43**	74,66±0,43
	Неоперированная почка	118,56±1,12* .&	24,92±0,51	74,08±0,51

В абсолютных величинах

		Масса почек после операции, мг	Сухая масса, мг	Вода, мг
Расчетный остаток (0 часов)	Оперированная почка	150,07±1,99	37,87±0,12	112,20±0,08
	Неоперированная почка	192,1±2,7	48,49±0,09	143,63±1,2
Лапаротомия (1 сутки)	Правая почка	187,5±6,78	49,7±1,97	137,3±0,19
Частичная нефрэктомия (1 сутки)	Оперированная почка	162,07±0,96*	39,18±0,05*	122,79±0,45*
	Неоперированная почка	211,64±1,21*	52,48±0,11*	159,26±0,19*
Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ, (1 сутки)	Оперированная почка	171,0±1,54* .&	43,31±0,11 * .&	127,66±0,16 * .&
	Неоперированная почка	227,57±0,35* .&	56,72±0,06 * .&	168,55±0,23 * .&

Примечание: *- достоверные отличия от расчетного остатка (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

5.1.1 Реакция гломерулярного аппарата на частичную нефрэктомию при стимуляции функционального состояния СФМ

При повреждении в оперированной почке наблюдается снижение размеров сосудистых клубочков, которое, однако, при стимуляции СФМ выражено в меньшей степени, чем при чистой нефрэктомии.

Кроме того, в оперированном органе уменьшение числа Ki-67+ клеток при введении 3-аминофталгидразида также менее выражено, чем при нефрэктомии без введения препарата (таблица 21).

Если при чистой нефрэктомии в неповрежденной почке изменения количества пролиферирующих клеток не обнаружено, то при стимуляции СФМ число Ki-67+ клеток снижается, как по сравнению с интактными и лапаротомированными животными, так и животными с чистой нефрэктомией (таблица 21).

Таблица 21 – Показатели внутриклеточной и клеточной регенерации клубочкового аппарата почек мышей после частичной нефрэктомии при стимуляции СФМ

Показатели	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия		Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ	
			Оперированная почка	Неоперированная почка	Оперированная почка	Неоперированная почка
Площадь сосудистого клубочка, мкм ²	3049,8	3005,1	2410,1	2599,2	2656,9	2660,2
	± 130	± 215,8	± 48,3*	± 176,8	± 86,1*.&	± 217,9
Площадь капсулы сосудистого клубочка, мкм ²	4661,5	3821,1	3639,2	4125,9	3895,7	3936,03
	± 103	± 155,7*	± 183,5*	± 228,8	± 103,9*	± 238,2*
Площадь мочевого пространства, мкм ²	1611,7	816	1229,1	1526,7	1238,8	1275,8
	± 189,5	± 123,6*	± 158,7	± 99,1**	± 91,6**	± 172,5
Ki-67+ клетки почечного тельца, кл./мм ²	190,47	184,95	147,19	190,48	161,04	167,39
	± 1,82	± 4,38	± 1,75 ***#	± 2,52 #	± 1,47 ***, #, &	± 1,43 ***, #, &

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

5.1.2 Реакция канальцевого аппарата на частичную нефрэктомию при стимуляции функционального состояния СФМ

На размеры канальцевых эпителиоцитов и их ядер в оперированной почке ни сама операция, ни стимуляция СФМ влияния не оказывают (таблица 22).

Количество Ki-67+ эпителиоцитов в канальце при стимуляции фагоцитирующих моноклеаров 3-аминофталгидразидом увеличивается, но в меньшей степени, чем у мышей, которым препарат не вводили (таблица 22).

Увеличение количества Ki-67+ эпителиоцитов в контрлатеральном органе, выявленное у животных с чистой нефрэктомией, при стимуляции СФМ выражено в меньшей степени (таблица 22).

Таблица 22 – Показатели внутриклеточной и клеточной регенерации канальцевых эпителиоцитов почек мышей после частичной нефрэктомии при стимуляции СФМ

Группа	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия		Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ	
			Оперированная почка	Неоперированная почка	Оперированная почка	Неоперированная почка
Площадь ядер канальцевых эпителиоцитов, мкм ²	27,99 ± 1,59	32,42 ± 2,59	29,11 ± 0,67	27,27 ± 0,89	26,78 ± 1,07	27,88 ± 1,03
Площадь канальцевых эпителиоцитов, мкм ²	76,12 ± 7,15	65,12 ± 3,42	69,71 ± 3,05	67,38 ± 2,26	61,42 ± 4,00	64,73 ± 3,28
ЯЦИ канальцевых эпителиоцитов	0,59 ± 0,04	1,17 ± 0,38*	0,73 ± 0,05	0,69 ± 0,06	0,78 ± 0,14	0,76 ± 0,02
Ki-67+ канальцевые эпителиоциты, кл./мм ²	102,16 ± 1,53	79,09 ± 11,65	134,20 ± 1,88 ***#	124,09 ± 1,99 ***#	122,94 ± 1,79 ***, #, &	108,23 ± 1,62 ***, #, &

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

5.2 Оценка экспрессии CD117 канальцевыми эпителиоцитами после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ

На фоне активации СФМ в поврежденной почке количество CD117+ канальцевых эпителиоцитов увеличивается в той же степени, что и при чистой нефрэктомии (таблица 23).

При анализе распределения CD117+ канальцевых эпителиоцитов по величине оптической плотности выявлено, что количество клеток со средней и выраженной экспрессией антигена увеличивается в той же степени, что и при чистой нефрэктомии. Однако отмечается снижение числа клеток с оптической плотностью 0,06-0,12 усл. ед., соответствующей слабой экспрессии антигена (таблица 24).

Таблица 23 – Количество CD117-негативных/позитивных канальцевых эпителиоцитов и общее количество данных клеток у мышей после частичной нефрэктомии на фоне стимуляции СФМ, кл./мм²

		CD117- негативные эпителиоциты	CD117- позитивные эпителиоциты	Общее количество эпителиоцитов
Интактные		1944,6±186	744,5±52,6	2687,9±84,3
Лапаротомия		2165,5±106,5	630,9±88,6	2792,7±54,4
Частичная нефрэктомия	Оперированная почка	917,25±66,5 *,**	1335,2±65,6 *,**	2253,7±62,6 *,**
	Неоперированная почка	1008,5±86,5 *,**	1022,7±40 *,**, #	2031,9±73,7 *,**
Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ	Оперированная почка	428,25±37,5 *,**, #, &	1216,6±33,2 *,**, #	1643,3±25,5 *,**, #, &
	Неоперированная почка	888±18 *,**, #	1651,3±20,2 *,**, #, &	2539,7±39,7 #, &

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Таблица 24 – Количество канальцевых эпителиоцитов с различным уровнем экспрессии CD117 у мышей после частичной нефрэктомии на фоне стимуляции СФМ, кл./мм²

		0,06-0,12	0,12-0,18	>0,18
Интактные		680,7±139,8	62,55±27,9	0
Лапаротомия		517,9±81,5	109,9±41,4	0
Частичная нефрэктомия	Оперированная почка	621,2±39	547,35±92,1 *,**	164,9±14,4 *,**
	Неоперированная почка	646,8±36,8	331,4±90,9 *,**	43,7±2,3 *,**, #
Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ	Оперированная почка	401,3±31,4 #,&	621,2±0,3 *,**, #	192,9±43,4 *,**, #
	Неоперированная почка	873,2±37,5 **, #, &	694,5±24,7 *,**, #, &	84±3,9 *,**, #, &

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

В контрлатеральной почке при стимуляции СФМ отмечен рост числа CD117+ клеток, более выраженный, чем при чистой нефрэктомии. При анализе их распределения по величине оптической плотности установлено, что возрастает количество клеток как с низкой и средней, так и с выраженной экспрессией рецептора (таблица 23, 24).

Таким образом, стимуляция СФМ сопровождается ростом чувствительности канальцевых эпителиоцитов неоперированной почки с фактору стволовой клетки.

5.3. Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ

В условиях стимулированной функциональной активности СФМ в костном мозге и крови численность более зрелой субпопуляции CD117+ клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD38+ не отличается от показателей в группе животных с чистой нефрэктомией (таблица 25, 26).

Таблица 25 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в крови мышей после частичной нефрэктомии на фоне стимуляции СФМ, кл./1 мкл

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ
CD45 ^{low} CD117+CD38+	0,596±0,101	0,123±0,044*	3,09±0,85 * .**	1,12±0,34 **
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	0,799±0,248	0,306±0,044	2,49±0,22 * .**	0,415±0,12 &

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Численность же клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD90^{low} в крови резко уменьшается по сравнению с нефрэктомизированными животными, не получавшими препарат. В костном мозге количество клеток данного фенотипа не изменяется (таблица 25, 26).

Таблица 26 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в костном мозге мышей после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ, кл. *10³/бедренная кость

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ
CD45 ^{low} CD117+CD38+	5,93±1,75	9,87±2,71	2,29±0,53**	1,27±0,396**
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	1,32±0,51	0,520±0,087	2,25±0,64**	1,01±0,28

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Наблюдаемое снижение численности субпопуляции CD45^{low}CD117+CD90^{low} клеток в крови, по всей видимости, свидетельствуют о том, что стимуляция СФМ вызывает замедление выхода данных клеток в циркуляцию.

5.4 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в почках и костном мозге после частичной нефрэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ

При активации СФМ, как и при чистой нефрэктомии, в межканальцевом интерстиции поврежденной почки наблюдается накопление макрофагов (таблица 27). На количество макрофагов, локализованных в гломерулярном аппарате оперированного органа, введение 3-аминофталгидразида не влияет.

Стимуляция СФМ на численность фагоцитирующих мононуклеаров в контрлатеральной почке не влияет (таблица 27).

При исследовании содержания клеток моноцитарного ряда в костном мозге нефрэктомированных мышей в условиях активации функционального состояния СФМ обнаружено увеличение количества моноцитов-макрофагов, как по сравнению с животными, перенесшими чистую нефрэктомия, так и по сравнению с интактной и лапаротомированной группами (таблица 28).

Таблица 27 – Содержание макрофагов (CD172a+ клеток) в почках нефрэктомированных мышей при активации СФМ, кл./мм²

Показатель		Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия		Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ	
				Оперированная почка	Неоперированная почка	Оперированная почка	Неоперированная почка
Межканальцевый интерстиций	Корковое вещество	44,7±2,08	37,25±4,5	101,9±15,3 ***.#	64,5±7,2 ***.#	147,1±27,3 ***.#	66,8±15,2#
	Мозговое вещество	14,7±3,9	3,1±1,3 *	81,5±24,8 ***.#	8,49±3,7#	40,8±18,9	15,8±7,6
	Среднее	29,71±2,93	20,2±2,8 *	91,68±13,5 ***.#	36,5±5,5 **.#	93,94±4,74 ***.#	37,61±11,4#
Почечные тельца		1,31±0,69	0,94±0,59	9,3±5,3	4,53±1,92	3,39±2,6	1,7±1,1

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия между оперированной и неоперированной почками в пределах одной группы достоверны (P<0,05)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны (P<0,05)

Таблица 28 – Содержание моноцитов-макрофагов в костном мозге нефрэктомированных мышей на фоне стимуляции СФМ, кл.* $10^6/10$ г массы тела

	Интактные	Лапаротомия	Частичная нефрэктомия	Частичная нефрэктомия + стимуляция СФМ
Моноциты/макрофаги	0,028±0,002	0,026±0,003	0,066±0,003***	0,081±0,004***.&

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны ($P < 0,05$)

** - отличия от группы «лапаротомия» достоверны ($P < 0,05$)

& - отличия от группы «частичная нефрэктомия» достоверны ($P < 0,05$)

Вероятно, препарат практически не оказывает влияния на миграцию моноцитов, а действует на резидентные клетки, вызывая в костном мозге интенсификацию пролиферации клеток моноцитарного ростка, а в почках – активацию функционального состояния макрофагов.

5.5 Заключение

Таким образом, стимуляция СФМ у животных с частичной нефрэктомией изменяет выраженность регенеративных процессов, как в оперированной, так и в неповрежденной почке. В обеих почках наблюдается падение пролиферативной активности клеток гломерулярного аппарата и замедление пролиферации канальцевых эпителиоцитов.

При введении 3-аминофталгидразида количество CD117+ канальцевых эпителиоцитов растет лишь в неоперированной почке.

При стимулировании СФМ наблюдается снижение миграции CD45^{low}CD117+CD90^{low} клеток из костного мозга к поврежденному органу.

Интенсификация моноцитопоза, наблюдающаяся у животных при стимуляции функциональной активности макрофагов, не приводит к росту числа данных клеток в почках по сравнению с нефрэктомированными мышами, но обеспечивает, по всей видимости, стабильное поддержание пула фагоцитирующих мононуклеаров, требующееся не только через сутки после повреждения, но и на более отдаленных сроках.

ГЛАВА 6 ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ И СОСТОЯНИЯ CD117+ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

В настоящее время установлено, что при частичной гепатэктомии удаленная доля не восстанавливается, а регенерация осуществляется за счет увеличения массы оставшихся долей. Кроме того, показано, что для гепатоцитов в ответ на частичную резекцию характерно развитие как внутриклеточной (образование двуядерных или/и полиплоидных гепатоцитов), так и клеточной регенерации, причем, как было установлено, постепенно все клетки паренхимы остатка органа вступают в интерфазу и прорывают митоз [57, 58, 126, 190].

6.1 Оценка регенеративных показателей печени у животных, перенесших лапаротомию

Активация физиологической регенерации наблюдается уже при лапаротомии, то есть без повреждения непосредственно самого органа. Отмечается повышение внутриклеточной регенерации, о чем свидетельствует рост размеров ядер гепатоцитов и, как следствие, увеличение их ядерно-цитоплазматического индекса (таблица 30).

В тоже время количество клеток, экспрессирующих Ki-67, остается на уровне значений у интактных животных (таблица 30).

6.2 Оценка регенеративных показателей печени у животных после частичной гепатэктомии

При частичной резекции печени в оставшейся части органа отчетливо выражены признаки повреждения, а именно: нарушено правильное балочное

строение, отмечается лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация стромы в области портальных трактов (рисунок 8).

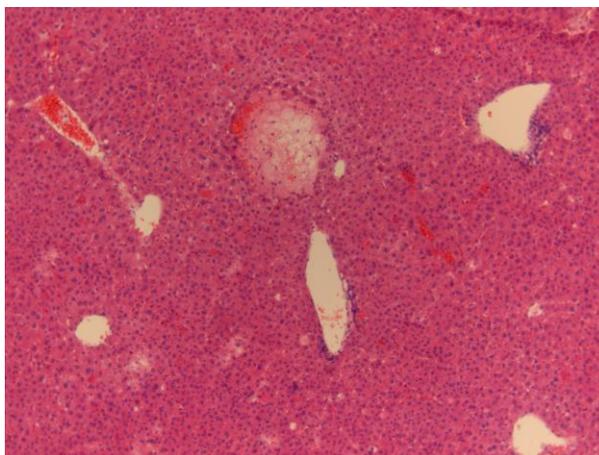


Рисунок 8 – Печень мыши после частичной гепатэктомии, 1 сутки.

Примечание: Окраска гематоксилином-эозином, х 100.

Наблюдается диффузная белковая и жировая дистрофии гепатоцитов, кровоизлияния в строме дольки, полнокровие синусоидальных капилляров и очаговые некрозы. Выявляются гепатоциты с признаками анизоцитоза и анизонуклеоза (рисунок 8).

Наряду с этим имеют место и процессы активации регенерации.

У животных, перенесших частичную гепатэктомию, наблюдается достоверное увеличение регенерирующего остатка органа (таблица 29).

Прирост сопровождался увеличением процентного содержания сухого вещества в печени. Данный факт свидетельствует о том, что рост массы остатка печени после частичной гепатэктомии происходит за счет развития регенеративных процессов и не связан с отеком органа (процентное содержание жидкости достоверно меньше значения в интактной группе) (таблица 29).

Таблица 29 – Показатели регенеративных процессов в печени мышей после частичной гепатэктомии

В относительных величинах

	Масса регенерата печени, %	Сухая масса, %	Вода, %
Расчетный остаток печени (0 час)	100	28,54±0,39	71,46±0,39
Лапаротомия (1 сутки)	93,35±4,31	32,06±3,4	67,94±3,4
Частичная гепатэктомия (1 сутки)	181,18±12*	30,14±0,19*	69,86±0,19*

В абсолютных величинах

Группа	Масса регенерата печени, мг	Сухая масса, мг	Вода, мг
Интактные	1437,22±97,32	410,18±27,78	1027,04±69,55
Лапаротомия (1 сутки)	1342±61,92	429,1±16,73	912,9±45,44
Расчетный остаток печени (0 час)	501,39±43,19	143,1±12,33	358,29±30,86
Частичная гепатэктомия (1 сутки)	908,40±58,43*	273,79±17,61*	634,61±40,82*

Примечание: * - отличия от расчетного остатка печени достоверны ($P < 0,05$)

При исследовании гистологических срезов выявлены как процессы гипертрофии, так и гиперплазии паренхиматозных элементов органа.

Увеличение размеров гепатоцитов, их ядер и ЯЦИ, а также числа двуядерных гепатоцитов свидетельствует о развитии процессов внутриклеточной регенерации (таблица 30).

Таблица 30 – Показатели внутриклеточной и клеточной регенерации печени мышей после частичной гепатэктомии

Показатель	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия
Количество гепатоцитов кл./мм ²	1392,0± 51,9	1232,0± 23,1*	1301,2±32,5 [!]
Размер одноядерных гепатоцитов, мкм	22,85±0,39	23,28±0,27	25,13±0,52* ^{!'}
Размер ядер одноядерных гепатоцитов, мкм	6,28±0,12	7,10±0,32*	8,75±0,28* ^{!'}
ЯЦИ одноядерных гепатоцитов	0,270±0,006	0,305±0,005*	0,349±0,008* ^{!'}
Количество Ki-67+ одноядерных гепатоцитов, кл./мм ²	1,08±0,46	0,68±0,24	3,10±0,24* ^{!'}
Количество двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	243,0±33,1	147,8±17,7*	343,1±14,2* ^{!'}

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны ($P < 0,05$)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны ($P < 0,05$)

Кроме процессов внутриклеточной регенерации в печени мышей после частичной гепатэктомии наблюдается развитие клеточной регенерации. На это указывает увеличение количества пролиферирующих клеток в единице площади, выявляемое путем специфического иммуногистохимического окрашивания ядер делящихся клеток. У гепатэктомированных животных отмечается рост данного показателя в 2,8 раз (таблица 30).

6.3 Оценка экспрессии CD117 в печени

В последние годы начали появляться публикации, указывающие на способность зрелых гепатоцитов к экспрессии CD117 - рецептора к фактору стволовой клетки, тогда как ранее эта способность приписывалась исключительно овальным клеткам печени, что служило одним из доказательств их «стволовости». Считается, что взаимодействие CD117 с его лигандом приводит к запуску пролиферации клетки и/или тормозит апоптоз [233, 259].

Гепатоциты, экспрессирующие CD117, характеризуются специфической локализацией (они сосредоточены в зоне, прилегающей к портальному тракту и являющейся ростковой зоной) и их количество растет в ответ на повреждение печени [122, 144, 222, 243].

Ранее установлено, что даже в интактной печени имеет место градиент пролиферативной активности гепатоцитов в пределах долики: первыми в пролиферацию вступают перипортальные, затем среднедольковые и позже перицентральные гепатоциты [57, 58, 125, 126, 190].

Эти данные указывают на существование в печени ростковой зоны, имеющей перипортальную локализацию и состоящую из CD117+ гепатоцитов, пролиферация которых и обеспечивает начало регенеративного ответа после повреждения. В связи с этим в нашем исследовании мы провели изучение экспрессии CD117 в печени мышей.

6.3.1 Оценка экспрессии CD117 гепатоцитами у интактных и лапаротомированных мышей

При иммуногистохимическом исследовании CD117 в печени интактных мышей выявлено мелкогранулярное DAB-позитивное окрашивание цитоплазмы небольшого количества гепатоцитов, локализованных преимущественно перипортально (рисунок 9). Бóльшая же часть гепатоцитов остается иммунонегативной (таблица 31).

При этом 93,8% гепатоцитов, экспрессирующих CD117, имеют низкую оптическую плотность (от 0,06 до 0,12 усл. ед.) и лишь 6,2% CD117+ клеток характеризуется средним уровнем экспрессии (от 0,12 до 0,18 усл. ед.) (таблица 32).

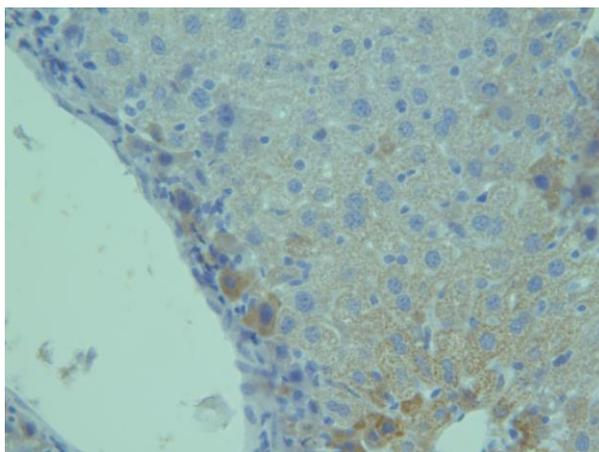


Рисунок 9 – Локализация CD117+ клеток в интактной печени мыши.

Примечание: CD117+ клетки окрашены коричневым, увеличение x400

Клетки, расположенные в непосредственной близости к портальному тракту, имеют более выраженную экспрессию CD117, чем клетки, расположенные дальше по печеночной балке. Таким образом, складывается впечатление, что гепатоциты в процессе своего созревания и продвижения вдоль печеночной балки теряют способность к экспрессии CD117 и становятся менее чувствительными к SCF.

При оценке экспрессии CD117 одноядерными и двуядерными гепатоцитами установлено, что данный рецептор экспрессируют оба типа клеток, причем в одинаковой степени: у интактных мышей около трети двуядерных гепатоцитов и трети одноядерных гепатоцитов являются CD117-позитивными (таблица 33).

Таблица 31 – Количество CD117-негативных/позитивных гепатоцитов и общее количество данных клеток у мышей после частичной гепатэктомии, кл./мм²

	CD117-негативные гепатоциты	CD117-позитивные гепатоциты	Общее количество гепатоцитов
Интактные	986,65±29,8	403,4±5,1	1392±51,9
Лапаротомия	1098,45±13,43*	133,6±9,5*	1232±23*
Частичная гепатэктомия	411,64±34,37* [!]	888,4±13,4* [!]	1301,2±32,5 [!]

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

В группе лапаротомированных животных выявлено снижение абсолютного количества CD117+ гепатоцитов причем именно за счет клеток со слабой экспрессией, тогда как абсолютное количество клеток со средней экспрессией CD117 не отличается от показателя в группе интактных мышей. Тем не менее, обнаружено увеличение процентного содержания клеток со средним уровнем экспрессии рецептора по отношению к общему количеству CD117+ клеток (таблица 32). Данные факты свидетельствуют о том, что лапаротомия сопровождается ускорением созревания гепатоцитов.

Кроме того, наблюдается уменьшение процентного содержания экспрессирующих CD117 двуядерных и одноядерных гепатоцитов в печени лапаротомированных животных по сравнению с интактными мышами, то есть ускорение созревания затрагивает и одноядерные, и двуядерные клетки, причем в равной степени (таблица 33).

6.3.2 Оценка экспрессии CD117 гепатоцитами после частичной гепатэктомии

В ответ на частичную гепатэктомию количество CD117+ гепатоцитов в печени резко возрастает (таблица 31).

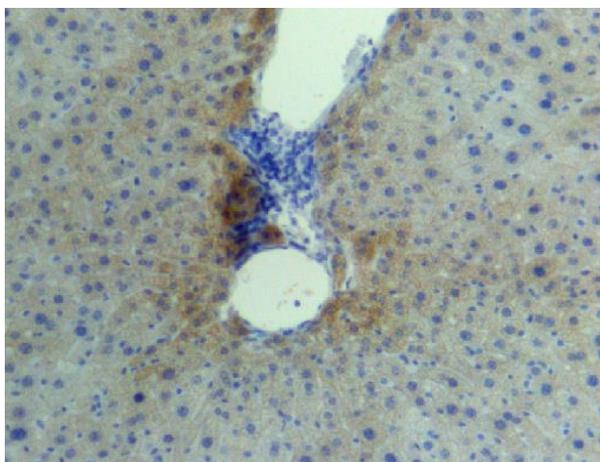


Рисунок 10 – Локализация CD117+ клеток в печени гепатэктомированной мыши.

Примечание: CD117+ клетки окрашены коричневым, увеличение x100

При этом сохраняется перипортальная локализация CD117+ гепатоцитов и наблюдается их продвижение по печеночной балке по направлению к перицентральной зоне (рисунок 10). Это подтверждается увеличением расстояния, измеренного в направлении к центральной вене от портального тракта до последнего гепатоцита, экспрессирующего CD117. Если у интактных мышей этот показатель составляет $64,86 \pm 2,43$ мкм, то при частичной гепатэктомии уже $130,58 \pm 9,68$ мкм ($P < 0,05$).

Иными словами, повышение количества CD117+ клеток приводит к тому, что созревающие гепатоциты теряют данный рецептор позднее, в результате чего расстояние увеличивается вдвое.

При этом гепатоциты, экспрессирующие большее количество антигена (средний уровень экспрессии $0,2 \pm 0,02$ усл.ед.), локализованы ближе к портальному тракту, тогда как клетки с меньшим уровнем экспрессии (в среднем $0,086 \pm 0,004$ усл.ед) расположены ближе к центру дольки.

Таблица 32 – Количество гепатоцитов с различным уровнем экспрессии CD117 у мышей после частичной гепатэктомии.

	Оптическая плотность					
	0,06-0,12		0,12-0,18		>0,18	
	кл./мм ²	%	кл./мм ²	%	кл./мм ²	%
Интактные	380,99 ±3,44	93,8 ±2,7	22,37 ±0,55	6,2 ±0,8	0	0
Лапаротомия	106,69 ±10,37*	80,7 ±3,4*	26,86 ±7,79	19,3 ±1,65*	0	0
Частичная гепатэктомия	521,89 ±4,91* [!]	59,45 ±1,5* [!]	340,61 ±35,1* [!]	37,7 ±5,1* [!]	25,85 ±2,76* [!]	2,85±0,7* [!]

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

Отмечается и изменение уровня экспрессии CD117 гепатоцитами в ответ на частичную гепатэктомию (таблица 32).

Во-первых, наблюдается рост абсолютного количества клеток со слабой и средней степенью экспрессии CD117 по сравнению с показателями в группе интактных и лапаротомированных животных. При этом относительное содержание клеток со слабой экспрессией снижается.

Во-вторых, отмечается появление клеток с выраженной экспрессией CD117 (оптическая плотность более 0,18 усл. ед.), составляющих около 3% от общего числа иммунопозитивных клеток.

Наблюдается увеличение относительного содержания двуядерных и одноядерных гепатоцитов, экспрессирующих CD117, что сопровождается и увеличением количества пролиферирующих Ki-67+ гепатоцитов (таблица 33). Данный факт указывает на то, что при повреждении активация CD117 приводит к интенсификации пролиферативных процессов в целом, как приводящих к образованию одноядерных гепатоцитов, так и двуядерных гепатоцитов (митоз без цитокинеза). Тем самым активируется процесс клеточной и внутриклеточной регенерации.

Тем не менее, наблюдается отчетливое различие в реакции одно- и двуядерных клеток. Так, со стороны одноядерных гепатоцитов увеличение абсолютного числа CD117+ клеток сопровождается резким падением количества CD117-отрицательных, более зрелых, клеток, что, вероятно, связано с

повышением апоптоза последних. В то время как рост числа CD117+ двуядерных гепатоцитов идет на фоне сохранения постоянного количества CD117-отрицательных клеток (таблица 33).

Таблица 33 – Содержание одноядерных и двуядерных CD117+ гепатоцитов

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия
Относительное содержание CD117+ одноядерных гепатоцитов от общего количества однойдерных гепатоцитов, %	30,82±3,6	12,94±2,7*	74,1±2,56* [!]
Абсолютное содержание CD117 позитивных однойдерных гепатоцитов, кл./мм ²	331,2±25,3	118,6±14,5*	729,1±31,3* [!]
Абсолютное содержание CD117 негативных однойдерных гепатоцитов, кл./мм ²	817,8±21,8	965,4±18,7*	228,9±28,6* [!]
Относительное содержание CD117+ двуядерных гепатоцитов от общего количества двуядерных гепатоцитов, %	28,71±2,3	10,12±1,5*	51,37±3,4* [!]
Абсолютное содержание CD117 позитивных двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	72,2±12,8	14,96±3,9*	173,5±11,4* [!]
Абсолютное содержание CD117 негативных двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	170,8±8,5	132,84±6,7*	169,6±5,7 [!]

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

Таким образом, в ответ на частичную резекцию печени обнаружен рост числа как одно-, так и двуядерных гепатоцитов, экспрессирующих рецептор к фактору стволовой клетки, то есть способных реагировать на действие данного цитокина. Как и у лапаротомированных мышей, при частичной гепатэктомии в печени наблюдается увеличение доли клеток со средней экспрессией CD117 и снижение доли гепатоцитов, слабо экспрессирующих данный антиген. Однако данные изменения выражены в большей степени при повреждении печени и именно после частичной гепатэктомии в печени появляются гепатоциты с выраженной экспрессией CD117.

Рост количества молекул CD117, локализованных в иммунопозитивном гепатоците, свидетельствует об увеличении чувствительности клеток к лиганду.

6.4 Оценка количества CD117+ стволовых клеток в крови и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии

В литературе имеются указания, что наряду с резидентными стволовыми клетками в регенерацию печени может вносить вклад и миграция стволовых клеток костномозгового происхождения [86, 116, 217]. Факт миграции CD117+ стволовых клеток костного мозга по градиенту концентрации его лиганда при повреждении печени также описан в литературе [137].

Оценка количества двух субпопуляций CD117+ стволовых клеток (CD45^{low}CD117+CD38+ и CD45^{low}CD117+CD90^{low}) позволяет сделать вывод не только о миграции, но и об их дифференцировке.

Таблица 34 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в крови мышей после частичной гепатэктомии, кл./1 мкл

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия
CD45 ^{low} CD117+CD38+	0,596±0,101	0,123±0,044*	0,504±0,077 [!]
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	0,799±0,248	0,306±0,044	0,898±0,307

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

После частичной гепатэктомии количество менее дифференцированных клеток-предшественников с фенотипом CD45^{low}CD117+CD90^{low} не меняется ни в костном мозге, ни в крови (таблица 34,35). Численность же более зрелой субпопуляции CD117+ клеток в костном мозге резко возрастает, а в крови – восстанавливается до уровня значений у интактных мышей (таблица 34, 35).

Таблица 35 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в костном мозге мышей после частичной гепатэктомии, кл.*10³/бедренная кость

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия
CD45 ^{low} CD117+CD38+	5,93±1,75	9,87±2,71	31,02±7,3 * [!]
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	1,32±0,51	0,520±0,087	1,37±0,52

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

Таким образом, после частичной гепатэктомии CD45^{low}CD117+CD38+ клетки начинают пролиферировать в костном мозге и более интенсивно, чем после лапаротомии, выходить в циркуляцию, тогда как клетки с фенотипом CD45^{low}CD117+CD90^{low} не реагируют на повреждение печени.

6.5 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в печени и костном мозге гепатэктомированных мышей

Согласно полученным данным, в ответ на частичную резекцию в регенерирующем остатке печени развивается макрофагальная инфильтрация стромы, причем преимущественно портальных трактов (то есть ростковой зоны печени), чем и объясняется увеличение содержания клеток Купфера (таблица 36).

Таблица 36 – Содержание макрофагов (CD172a+ клеток) в печени гепатэктомированных мышей, кл./мм²

Показатель	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия
Макрофаги	97,37±4,47 (40,3±2,5 в перипортальной зоне)	101,5±2,9 (41,6±1,8 в перипортальной зоне)	115,71±3,94*. [!] (51,2±2,3 в перипортальной зоне) *. [!]

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

Наряду с этим в костном мозге наблюдается активация моноцитопоэза, что проявляется в росте количества клеток моноцитарного ряда у гепатэктомированных мышей (таблица 37).

Таблица 37 – Содержание моноцитов-макрофагов в костном мозге гепатэктомированных мышей, кл.*10⁶/10 г массы тела

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия
Моноциты/макрофаги	0,028±0,002	0,026±0,003	0,056±0,005*. [!]

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

Таким образом, при повреждении печени наблюдается активация образования моноцитов в костном мозге и активное накопление клеток Купфера преимущественно в ростковой зоне печени.

6.5 Заключение

У животных, перенесших частичную гепатэктомию, через сутки после операции наряду с процессами, свидетельствующими о повреждении оставшихся долей, наблюдается и развитие репаративной регенерации.

Репарация печени осуществляется как за счет внутриклеточной регенерации, что проявляется в увеличении размеров гепатоцитов, их ядер и росте числа двуядерных клеток, так и за счет клеточной регенерации, на что указывает увеличение количества Ki-67+ гепатоцитов.

Увеличение численности делящихся одноядерных гепатоцитов и рост количества двуядерных гепатоцитов (образующихся, по мнению большинства исследователей, в результате митоза без цитокинеза) коррелирует с увеличением количества CD117+ клеток.

Кроме того, направление распространения экспрессирующих CD117 клеток соответствует характеру их пролиферативной реакции на частичную гепатэктомию.

Можно предположить, что CD117+ гепатоциты образуют ростковую зону и в той или иной степени обеспечивают восстановление печени после повреждения, а их способность реагировать на действие фактора стволовой клетки определяет их митотическую активность. Таким образом, в печени наблюдается активация резидентных CD117+ клеток.

Кроме того, в ответ на повреждение наблюдается интенсивная пролиферация и выход в циркуляцию CD117+ клеток костного мозга, что позволяет высказать предположение об их миграции к поврежденному органу и участии в регенерации.

Регуляция репаративной регенерации печени и реакции CD117+ клеток может осуществляться при участии макрофагов, так как в ответ на частичную гепатэктомию наблюдается накопление клеток Купфера преимущественно в ростковой зоне печени, сопровождающееся также и активацией моноцитопозза.

ГЛАВА 7 ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ И СОСТОЯНИЯ CD117+ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СФМ

Согласно данным, полученным по регенерации почек, существенное влияние на восстановление данного органа оказывает функциональное состояние СФМ, в связи с чем представляет интерес оценить роль макрофагов и в репаративной регенерации печени.

7.1 Оценка показателей репаративной регенерации печени после частичной гепатэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ

При введении каррагинана гепатэктомированным мышам повреждение гепатоцитов более обширное, но менее глубокое, о чем свидетельствует более выраженная, чем у животных с чистой гепатэктомией, белковая дистрофия, однако некротические изменения гепатоцитов отсутствуют. Кроме того, гепатоциты более однородны по размерам, их ядра мономорфны (рисунок 11).



Рисунок 11 – Печень мыши после частичной гепатэктомии на фоне ингибирования СФМ, 1 сутки.

Примечание: Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение x100

Тем не менее, при ингибировании СФМ реакция органа на повреждение проявляется слабее, так как отсутствует и острая воспалительная реакция и нарушение кровообращения, свойственные мышам, которым препарат не вводили (рисунок 11).

Таблица 38 – Показатели регенераторных процессов в печени мышей после частичной гепатэктомии на фоне ингибирования СФМ

В относительных величинах

	Масса регенерата печени, %	Сухая масса, %	Вода, %
Расчетный остаток печени (0 час)	100	28,54±0,39	71,46±0,39
Лапаротомия (1 сутки)	93,35±4,31	32,06±3,4	67,94±3,4
Гепатэктомия (1 сутки)	181,18±12*	30,14±0,19*	69,86±0,19*
Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ (1 сутки)	179,8±3,68*	26,95±0,16* [#]	73,05±0,16* [#]

В абсолютных величинах

Группа	Масса регенерата печени, мг	Сухая масса, мг	Вода, мг
Интактные	1437,22±97,32	410,18±27,78	1027,04±69,5
Лапаротомия(1 сутки)	1342±61,92	429,1±16,73	912,9±45,44
Расчетный остаток печени (0 час)	501,39±43,19	143,1±12,33	358,29±30,86
Гепатэктомия (1 сутки)	908,40±58,43*	273,79±17,61*	634,61±40,8*
Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ (1 сутки)	901,4±33,2*	243,73±13,4*	657,67±30,3*

Примечание: * - отличия от расчетного остатка печени достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Наряду с этим при ингибировании функционального состояния СФМ отмечаются и изменения, свидетельствующие о замедлении восстановления печени после повреждения.

Хотя прирост массы печени при введении каррагинана гепатэктомизированным животным такой же, как и при чистой гепатэктомии, но достигается он преимущественно за счет увеличения процентного содержания жидкости, тогда как доля сухого вещества в печени снижается (таблица 38).

Развивающимся в печени отеком объясняется уменьшение количества гепатоцитов в единице площади (таблица 39).

Кроме того, при ингибировании СФМ отмечается резкое снижение числа двуядерных гепатоцитов в печени как по сравнению с показателем у мышей с чистой гепатэктомией, так и по сравнению с интактными животными (таблица 39).

Таблица 39 – Показатели внутриклеточной и клеточной регенерации печени мышей после частичной гепатэктомии на фоне ингибирования СФМ

Показатель	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ
Количество гепатоцитов, кл./мм ²	1392,0± 51,9	1232,0± 23,1*	1301,2±32,5 [!]	990,2±23* ^{!.} #
Размеры одноядерных гепатоцитов, мкм	22,85±0,39	23,28±0,27	25,13±0,52* ^{!.}	21,31±1,36 [#]
Размеры ядер одноядерных гепатоцитов, мкм	6,28±0,12	7,10±0,32*	8,75±0,28* ^{!.}	7,10±0,38* ^{!.} #
ЯЦИ одноядерных гепатоцитов	0,270±0,006	0,305±0,005*	0,349±0,008* ^{!.}	0,335±0,008* ^{!.}
Количество Ki-67+ одноядерных гепатоцитов, кл./мм ²	1,08±0,46	0,68±0,24	3,10±0,24* ^{!.}	3,10±1,55
Количество двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	243,0±33,1	147,8±17,7*	343,1±14,2* ^{!.}	116,4±14,6* ^{!.} #

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Что касается одноядерных гепатоцитов, отмечается рост размеров их ядер, однако менее выраженный, чем при гепатэктомии без введения препарата.

В то же время ингибирование СФМ не влияет на количество пролиферирующих Ki-67+ гепатоцитов у гепатэктомированных мышей (таблица 39).

Итак, подавление функциональной активности макрофагов приводит к замедлению репаративных процессов в печени, причем в большей степени это затрагивает внутриклеточную регенерацию.

7.2 Оценка экспрессии CD117 гепатоцитами после частичной гепатэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ

При подавлении функциональной активности макрофагов в печени снижается чувствительность гепатоцитов к регуляторным ростовым факторам, о чем свидетельствует уменьшение количества CD117+ гепатоцитов по сравнению с показателем интактных и гепатэктомированных животных (таблица 40). Аналогичное уменьшение наблюдается и у лапаротомированных мышей.

Таблица 40 – Количество CD117-негативных/позитивных гепатоцитов и общее количество данных клеток у мышей после частичной гепатэктомии на фоне ингибирования СФМ, кл./мм²

	CD117-негативные гепатоциты	CD117-позитивные гепатоциты	Общее количество гепатоцитов
Интактные	1008,65±29,8	403,4±5,1	1392±51,9
Лапаротомия	1098,45±13,43*	133,6±9,5*	1232±23*
Частичная гепатэктомия	411,64±34,37* [!]	888,4±13,4* [!]	1301,2±32,5* [!]
Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ	852,45±14,02* ^{! #}	137,5±5,04* [#]	990,2±23* ^{! #}

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

При этом отмечается снижение доли и одноядерных, и двуядерных гепатоцитов, экспрессирующих CD117, как по сравнению с интактными мышами, так и по сравнению с гепатэктомированными животными, не получавшими препарат (таблица 41). Доля одноядерных и двуядерных CD117-позитивных гепатоцитов у животных, леченных каррагинаном, соответствует показателям у лапаротомированных мышей.

Таблица 41 – Соотношение одноядерных и двуядерных CD117+ клеток в печени после частичной гепатэктомии на фоне ингибирования СФМ

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ
Относительное содержание CD117+ одноядерных гепатоцитов от общего количества одноядерных гепатоцитов, %	30,82±3,6	12,94±2,7*	74,1±2,56* ^{!'}	14,3±3,3* ^{.#}
Абсолютное содержание CD117 позитивных одноядерных гепатоцитов, кл./мм ²	331,2±25,3	118,6±14,5*	729,1±31,3* ^{!'}	124,8±5,9* ^{.#}
Абсолютное содержание CD117 негативных одноядерных гепатоцитов, кл./мм ²	817,8±21,8	965,4±18,7*	228,9±28,6* ^{!'}	749±15,6* ^{!'.#}
Относительное содержание CD117+ двуядерных гепатоцитов от общего количества двуядерных гепатоцитов, %	28,71±2,3	10,12±1,5*	51,37±3,4* ^{!'}	10,9±2,4* ^{.#}
Абсолютное содержание CD117 позитивных двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	72,2±12,8	14,96±3,9*	173,5±11,4* ^{!'}	12,7±1,8* ^{.#}
Абсолютное содержание CD117 негативных двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	170,8±8,5	132,84±6,7*	169,6±5,7 [!]	103,7±4,3* ^{!'.#}

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

При введении каррагинана у гепатэктомизированных мышей снижается и уровень экспрессии рецептора.

Уменьшается количество CD117+ клеток со слабой экспрессией антигена (то есть с оптической плотностью от 0,06 до 0,12 усл. ед.) по сравнению как с интактными животными, так и мышами с чистой гепатэктомией (таблица 42).

Абсолютное количество гепатоцитов со средней экспрессией CD117 не изменяется, тогда как при чистой гепатэктомии это значение существенно увеличивается.

Таблица 42 – Количество гепатоцитов с различным уровнем экспрессии CD117 у мышей после частичной гепатэктомии на фоне ингибирования СФМ

	Оптическая плотность					
	0,06-0,12		0,12-0,18		>0,18	
	кл./мм ²	%	кл./мм ²	%	кл./мм ²	%
Интактные	380,99 ±3,44	93,8 ±2,7	22,37 ±0,55	6,2 ±0,8	0	0
Лапаротомия	106,69 ±10,37*	80,7 ±3,4*	26,86 ±7,79	19,3 ±1,65*	0	0
Частичная гепатэктомия	521,89 ±4,91* [!]	59,45 ±1,5* [!]	340,61 ±35,1* [!]	37,7 ±5,1* [!]	25,85 ±2,76* [!]	2,85 ±0,7* [!]
Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ	117,11 ±11,86* ^{#,}	85,7 ±4,6 [#]	18,75 ±4,16 [#]	13,8 ±2,1* ^{#,}	1,68 ±0,11* ^{!,#}	1,3 ±0,3* [!]

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Количество гепатоцитов с выраженной экспрессией при подавлении функциональной активности макрофагов хотя и увеличивается, но в меньшей степени, чем у гепатэктомизированных животных, не получавших препарат (таблица 42).

7.3 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии при ингибировании СФМ

Блокада СФМ оказывает влияние на CD117+ клетки не только в печени, но и в крови и костном мозге.

Таблица 43 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в крови мышей после частичной гепатэктомии на фоне ингибирования СФМ, кл./1 мкл

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ
CD45 ^{low} CD117+CD38+	0,596±0,101	0,123±0,044*	0,504±0,077 [!]	0,092±0,045* ^{#,}
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	0,799±0,248	0,306±0,044	0,898±0,307	0,548±0,187

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Содержание CD45^{low}CD117+CD38+ стволовых клеток в крови снижается, как по сравнению с интактными животными, так и с гепатэктомизированными мышами, не получавшими препарат (таблица 43).

При этом в костном мозге количество клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD38+ не отличается от значений в интактной и лапаротомизированной группе, тогда как при чистой гепатэктомии этот показатель возрастает приблизительно в 4 раза (таблица 44).

Таблица 44 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в костном мозге мышей после частичной гепатэктомии на фоне ингибирования СФМ, *10³/бедренная кость

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ
CD45 ^{low} CD117+CD38+	5,93±1,75	9,87±2,71	31,02±7,3 *.!	8,09±1,54 #
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	1,32±0,51	0,520±0,087	1,37±0,52	0,860±0,398

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

При введении каррагинана, как и при чистой гепатэктомии, количество клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD90^{low} ни в крови, ни в костном мозге не изменяется (таблица 43,44).

Таким образом, при введении ингибитора макрофагов у гепатэктомизированных мышей, в отличие от животных, не получавших препарат, не наблюдается активации образования CD45^{low}CD117+CD38+ стволовых клеток в костном мозге. Снижение же их содержания в крови, по всей видимости, можно объяснить замедлением их выхода из костного мозга.

7.4 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в печени и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии при ингибировании функционального состояния СФМ

При ингибировании функциональной активности СФМ отмечается активация моноцитопоза в костном мозге, выраженная в той же степени, что и при чистой гепатэктомии. Об этом свидетельствует рост клеток моноцитарного ряда (таблица 46).

Таблица 45 – Содержание макрофагов (CD172a+ клеток) в печени гепатэктомированных мышей на фоне ингибирования СФМ, кл./мм²

Показатель	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ
Макрофаги	97,37±4,47	101,5±2,9	115,71±3,94*;!	70,92±7,27*;!.#

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Таблица 46 – Содержание моноцитов-макрофагов в костном мозге гепатэктомированных мышей на фоне стимуляции СФМ, кл.*10⁶/10 г массы тела

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + ингибирование СФМ
Моноциты/макрофаги	0,028±0,002	0,026±0,003	0,056±0,005*;!	0,052±0,004*;!

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Вместе с тем поступление макрофагов в поврежденный орган замедляется, о чем свидетельствует значительное уменьшение содержания макрофагов в регенерирующем остатке печени как по сравнению с интактной и лапаротомированной группой, так и по сравнению с гепатэктомированными животными, не получавшими препарат (таблица 45).

7.5 Заключение.

При ингибировании функциональной активности СФМ в регенерирующей печени отмечается уменьшение степени повреждающего действия операции.

При этом репаративные процессы проявляются лишь в гипертрофии ядер одноядерных гепатоцитов, тогда как количество пролиферирующих клеток не растет, а число двуядерных клеток значительно снижается.

Снижение активности регенеративных процессов сопровождается уменьшением количества CD117+ гепатоцитов, причем снижение в равной степени затрагивает как одноядерные, так и двуядерные клетки. Таким образом, в печени не наблюдается активации резидентных CD117+ гепатоцитов ростковой зоны.

Замедление образования стволовых CD117+ клеток в костном мозге сопровождается и уменьшением активности их выхода в периферическую кровь.

Ингибирование функциональной активности СФМ приводит к уменьшению количества клеток Купфера, чем может объясняться и замедление регенеративных процессов в печени, и снижение выраженности реакции со стороны CD117+ клеток различной локализации.

ГЛАВА 8 ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ И СОСТОЯНИЯ CD117+ КЛЕТОК РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СФМ

Учитывая тот факт, что ингибирование функциональной активности СФМ существенно сказывается на течении репарации, развивающейся в печени в ответ на ее повреждение, представляется необходимым оценить и состояние регенеративных процессов в печени при стимуляции макрофагов.

8.1 Оценка показателей репаративной регенерации печени после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ

Полученные данные свидетельствуют о том, что изменение функционального состояния макрофагов существенно влияет на репаративные процессы в печени.

Стимуляция макрофагов 3-аминофталгидразидом приводит в регенерирующей печени к развитию двух типов реакций.

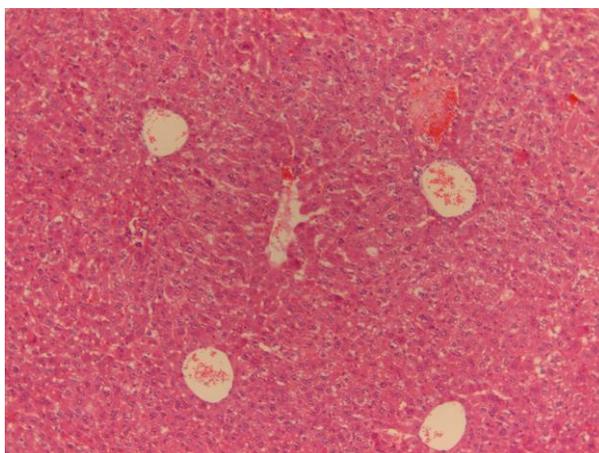


Рисунок 12 – Печень мыши после частичной гепатэктомии при стимуляции СФМ

Примечание: Окраска гематоксилином-эозином, увеличение x100

Во-первых, наблюдается снижение (по сравнению с чистой гепатэктомией) повреждающего действия операции на орган. Это находит свое отражение в уменьшении количества воспалительных элементов и очаговых некрозов как в портальной, так и во внутридольковой строме (рисунок 12). Слабее выражен анизоцитоз и анизонуклеоз, наблюдается очаговая белковая дистрофия гепатоцитов, при этом жировой дистрофии не выявлено. Отмечается равномерное кровенаполнение синусоидных капилляров.

Во-вторых, наблюдается активация репаративных процессов.

Отмечается увеличение массы регенерирующего остатка по сравнению с расчетным остатком печени. Прирост массы органа обусловлен увеличением содержания сухого вещества в нем (таблица 47).

Таблица 47 – Показатели регенеративных процессов в печени мышей после частичной гепатэктомии на фоне стимуляции СФМ

В относительных величинах

	Масса регенерата печени, %	Сухая масса, %	Вода, %
Расчетный остаток печени (0 часов)	100	28,54±0,39	71,46±0,39
Лапаротомия (1 сутки)	93,35±4,31	32,06±3,4	67,94±3,4
Гепатэктомия (1 сутки)	181,18±12*	30,14±0,19*	69,86±0,19*
Частичная гепатэктомия + стимуляция СФМ(1 сутки)	212,09±6,03*.#	33,11±0,6*.#	66,90±0,69*.#

В абсолютных величинах

Группа	Масса регенерата печени, мг	Сухая масса, мг	Вода, мг
Интактные	1437,22±97,32	410,18±27,78	1027,04±69,55
Лапаротомия (1 сутки)	1342±61,92	429,1±16,73	912,9±45,44
Расчетный остаток печени (0 час)	501,39±43,19	143,1±12,33	358,29±30,86
Гепатэктомия (1 сутки)	908,40±58,43*	273,79±17,61*	634,61±40,82*
Частичная гепатэктомия + стимуляция СФМ(1 сутки)	1220,00±34,67*.#	403,94±11,48*.#	852,29±24,22*.#

Примечание: * - отличия от расчетного остатка печени достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

При стимуляции СФМ у животных после частичной гепатэктомии показатели сухой массы (в абсолютных величинах) приближаются к значению у интактных животных, что указывает на активацию репаративной регенерации в данной экспериментальной группе. Увеличение массы регенерирующего остатка печени наблюдается при сравнении данного показателя с таковым в группе животных с чистой гепатэктомией (таблица 47).

Стимуляция СФМ у мышей, перенесших частичную гепатэктомию, приводит к активации внутриклеточной регенерации, что проявляется в увеличении количества двуядерных гепатоцитов (таблица 48).

Таблица 48 – Показатели клеточной и внутриклеточной регенерации печени мышей после частичной гепатэктомии при стимуляции СФМ

Показатель	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомию	Частичная гепатэктомию + стимуляция СФМ
Количество гепатоцитов, кл./мм ²	1392,0± 51,9	1232,0± 23,1*	1301,2±32,5 [!]	1245,1±44,2
Размеры одноядерных гепатоцитов, мкм	22,85±0,39	23,28±0,27	25,13±0,52* [!]	23,75±1,40
Размеры ядер одноядерных гепатоцитов, мкм	6,28±0,12	7,10±0,32*	8,75±0,28* [!]	7,67±0,28* ^{#,}
ЯЦИ одноядерных гепатоцитов	0,270±0,006	0,305±0,005*	0,349±0,008* [!]	0,324±0,006* ^{!,#}
Количество Ki-67+ одноядерных гепатоцитов, кл./мм ²	1,08±0,46	0,68±0,24	3,10±0,24* [!]	2,48±0,45 [!]
Количество двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	243,0±33,1	147,8±17,7*	343,1±14,2* [!]	413,9±12,4* ^{!,#}

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомию» достоверны (P<0,05)

Что касается одноядерных клеток, то прирост количества Ki-67+ клеток, размеров ядер и ЯЦИ выражен менее значительно, чем у животных, не получавших препарат

Таким образом, стимуляция СФМ приводит к активации преимущественно процессов внутриклеточной регенерации.

8.2 Оценка экспрессии CD117 гепатоцитами после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ

При стимуляции СФМ характер локализации CD117+ гепатоцитов в пределах печеночной долики соответствует таковому у мышей с чистой гепатэктомией, а именно: гепатоциты с большей оптической плотностью преимущественно локализованы вблизи портального тракта, тогда как клетки менее интенсивно окрашенные – ближе к середине долики (рисунок 13).

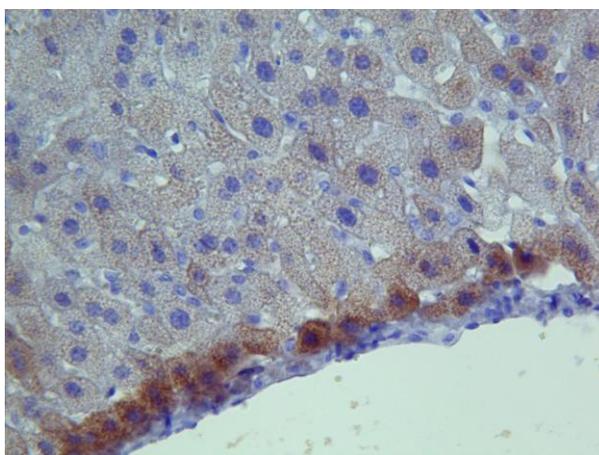


Рисунок 13 – Локализация CD117+ клеток в печени гепатэктомированной мыши на фоне стимуляции СФМ

Примечание: CD117+ клетки окрашены коричневым. Увеличение x400

При стимуляции СФМ 3-аминофталгидразидом наблюдается увеличение количества экспрессирующих CD117 гепатоцитов по сравнению с показателем у гепатэктомированных мышей, которым препарат не вводили (таблица 49).

Кроме того, отмечается распространение CD117+ гепатоцитов от перипортальной зоны к перицентральной. Об этом свидетельствует увеличение расстояния (со $130 \pm 9,68$ мкм у мышей с чистой гепатэктомией до $186,4 \pm 11,1$ мкм у гепатэктомированных мышей с введением 3-аминофталгидразида ($P < 0,05$)), измеренного в направлении к центральной вене от портального тракта до последнего гепатоцита, экспрессирующего CD117.

Таблица 49 – Количество CD117-негативных/позитивных гепатоцитов и общее количество данных клеток у мышей после частичной гепатэктомии на фоне стимуляции СФМ, кл./мм²

	CD117-негативные гепатоциты	CD117-позитивные гепатоциты	Общее количество гепатоцитов
Интактные	986,65±29,8	403,4±5,1	1392±51,9
Лапаротомия	1098,45±13,43*	133,6±9,5*	1232±23*
Частичная гепатэктомия	411,64±34,37* [!]	888,4±13,4* [!]	1301,2±32,5* [!]
Частичная гепатэктомия + стимуляция СФМ	248,6±4,36* ^{!.#}	996,9±32,3* ^{!.#}	1245,1±44,2

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Таблица 50 – Соотношение одноядерных и двуядерных CD117+ клеток в печени после частичной гепатэктомии на фоне стимуляции СФМ

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + стимуляция СФМ
Относительное содержание CD117+ одноядерных гепатоцитов от общего количества одноядерных гепатоцитов, %	30,82±3,6	12,94±2,7*	74,1±2,56* [?] !	88,4±4,2* ^{!.#}
Абсолютное содержание CD117 позитивных одноядерных гепатоцитов, кл./мм ²	331,2±25,3	118,6±14,5*	729,1±31,3* [?] !	734,5±8,5* [?] !
Абсолютное содержание CD117 негативных одноядерных гепатоцитов, кл./мм ²	817,8±21,8	965,4±18,7*	228,9±28,6* [?] !	96,8±15,6* ^{!.#}
Относительное содержание CD117+ двуядерных гепатоцитов от общего количества двуядерных гепатоцитов, %	28,71±2,3	10,12±1,5*	51,37±3,4* [?] !	63,3±2,8* ^{!.#}
Абсолютное содержание CD117 позитивных двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	72,2±12,8	14,96±3,9*	173,5±11,4* [?] !	262,2±5,9* ^{!.#}
Абсолютное содержание CD117 негативных двуядерных гепатоцитов, кл./мм ²	170,8±8,5	132,84±6,7*	169,6±5,7 [!]	151,7±6,9* [?] !

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

В ответ на введение 3-аминофталгидразида животным с частичной резекцией печени наблюдается значительное увеличение доли CD117+ одноядерных и двуядерных клеток (таблица 50).

Таблица 51 – Количество гепатоцитов с различным уровнем экспрессии CD117 у мышей после частичной гепатэктомии при стимуляции СФМ

	Оптическая плотность					
	0,06-0,12		0,12-0,18		>0,18	
	кл./мм ²	%	кл./мм ²	%	кл./мм ²	%
Интактные	380,99 ±3,44	93,8 ±2,7	22,37 ±0,55	6,2 ±0,8	0	0
Лапаротомия	106,69 ±10,37*	80,7 ±3,4*	26,86 ±7,79	19,3 ±1,65*	0	0
Частичная гепатэктомия	521,89 ±4,91*’!	59,45 ±1,5*’!	340,61 ±35,1*’!	37,7 ±5,1*’!	25,85 ±2,76*’!	2,85 ±0,7*’!
Частичная гепатэктомия + стимуляция СФМ	400,78 ±37,53!#	40,2 ±3,8*!#	499,12 ±40,58*!#	50,1 ±3,3*!#	96,99 ±25,2*!#	9,7 ±2,6*!#

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Анализ интенсивности экспрессии рецептора к фактору стволовой клетки свидетельствует об ее увеличении. На это указывает снижение количества гепатоцитов с оптической плотностью от 0,06 до 0,12 усл. ед., в то время как число CD117+ клеток со средней и выраженной экспрессией антигена растет по сравнению с показателями у животных с чистой гепатэктомией (таблица 51).

Таким образом, в ответ на стимуляцию СФМ в регенерирующем остатке печени отмечается, во-первых, увеличение количества гепатоцитов, экспрессирующих CD117 как среди одноядерных, так и двуядерных клеток, а во-вторых, отмечается значительный рост числа молекул рецептора к SCF, локализованных на гепатоците.

8.3 Оценка количества CD117+ клеток с различным фенотипом в крови и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ

В ответ на стимуляцию макрофагальной активности 3-аминофталгидразидом наблюдается изменение численности популяции стволовых клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD38+ в крови, а именно количество данных клеток возрастает, причем как по сравнению с интактными и лапаротомированными мышами, так и по сравнению с животными, перенесшими чистую гепатэктомию (таблица 51).

Таблица 51 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в крови мышей после частичной гепатэктомии на фоне стимуляции СФМ, кл./1 мкл

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомию	Частичная гепатэктомию + стимуляция СФМ
CD45 ^{low} CD117+CD38+	0,596±0,101	0,123±0,044*	0,504±0,077 [!]	1,899±0,344 * ^{!#}
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	0,799±0,248	0,306±0,044	0,898±0,307	1,03±0,33 [!]

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомию» достоверны (P<0,05)

Таблица 52 – Содержание CD117+ клеток с различным фенотипом в костном мозге мышей после частичной гепатэктомии на фоне стимуляции СФМ, кл.*10³/бедренная кость

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомию	Частичная гепатэктомию + стимуляция СФМ
CD45 ^{low} CD117+CD38+	5,93±1,75	9,87±2,71	31,02±7,3 * [!]	2,74±0,89 ^{!#}
CD45 ^{low} CD117+CD90 ^{low}	1,32±0,51	0,520±0,087	1,37±0,52	0,82±0,26

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомию» достоверны (P<0,05)

В костном мозге количество клеток с фенотипом CD45^{low}CD117+CD38+ остается на уровне значений интактных и лапаротомированных мышей (таблица 52).

Данные факты могут свидетельствовать об интенсификации выхода CD45^{low}CD117+CD38+ стволовых клеток из костного мозга в кровь с дальнейшей миграцией в том числе и к поврежденному органу.

Выраженной реакции со стороны CD45^{low}CD117+CD90^{low} клеток не отмечено (таблица 51, 52).

8.4 Оценка содержания моноцитов-макрофагов в печени и костном мозге мышей после частичной гепатэктомии при стимуляции функционального состояния СФМ

Введение гепатэктомированным мышам 3-аминофталгидрида приводит к активации накопления макрофагов в печени, о чем свидетельствует рост количества данных клеток в синусоидных капиллярах (таблица 53).

Таблица 53 – Содержание макрофагов (CD172a+ клеток) в печени гепатэктомированных мышей на фоне активации СФМ, кл./мм²

Показатель	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + стимуляция СФМ
Макрофаги	97,37±4,47	101,5±2,9	115,71±3,94*! [!]	130,94±3,61*! ^{!#}

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Таблица 54 – Содержание моноцитов-макрофагов в костном мозге гепатэктомированных мышей на фоне стимуляции СФМ, кл.*10⁶/10 г массы тела

	Интактные	Лапаротомия	Частичная гепатэктомия	Частичная гепатэктомия + стимуляция СФМ
Моноциты/макрофаги	0,028±0,002	0,026±0,003	0,056±0,005*! [!]	0,138±0,031*! ^{!#}

Примечание: * - отличия от интактной группы достоверны (P<0,05)

! - отличия от группы «лапаротомия» достоверны (P<0,05)

- отличия от группы «частичная гепатэктомия» достоверны (P<0,05)

Активация функционального состояния СФМ приводит и к интенсификации моноцитопоза, подтверждающейся ростом числа клеток моноцитарного ряда в костном мозге животных данной группы по сравнению с мышами, перенесшими чистую гепатэктомию, а также с группами контроля (таблица 54).

8.5 Заключение

Стимуляция макрофагов 3-аминофталгидразидом оказывает, с одной стороны, протекторное действие, а именно способствует снижению выраженности признаков повреждения клеток (очаговые некрозы, анизоцитоз, анизонуклеоз) регенерирующего остатка органа. В тоже время в большей степени проявляются восстановительные процессы, о чем свидетельствует увеличение прироста массы органа и активация внутриклеточной регенерации гепатоцитов. Кроме того, увеличивается численность клеток Купфера в синусоидных капиллярах и активируется моноцитопоз.

Интенсификация репаративных процессов сопровождается ростом экспрессии CD117 как одноядерными, так и двуядерными гепатоцитами.

При стимуляции СФМ у гепатэктомированных мышей наблюдается реакция не только со стороны резидентных, но и костномозговых CD117+ клеток, имеющих фенотип CD45^{low}CD117+CD38+. Отмечается активация выхода данных клеток из костного мозга в периферическую кровь, что, вероятно, может свидетельствовать об их миграции к поврежденной печени и участию в регенерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние несколько десятилетий активно исследуются вопросы, касающиеся иммунной регуляции физиологических функций организма. Накоплено достаточное количество данных, убедительно свидетельствующих о том, что кроме нервной и эндокринной систем, в регуляции неиммунных функций организма может принимать участие и иммунная система [5, 7, 20, 21, 28, 47].

Показано, что клетки иммунной системы участвуют в регуляции обмена органических и минеральных веществ, в регуляции кроветворения, в работе пищеварительной, дыхательной и других систем [16, 24, 31, 32, 33, 40, 45, 54, 56, 72].

Особое внимание исследователей привлекает возможность участия клеток иммунной системы в регенерации органов, так как это дает возможность корректировать течение репарации и создавать новые терапевтические подходы для лечения различных заболеваний.

Среди клеток иммунной системы значительная роль в регуляции регенерации органов отводится макрофагам. Благодаря своим уникальным свойствам, а именно: способности синтезировать большое количество биологически активных веществ, а также пластичности (способности изменять морфофункциональный статус в зависимости от воздействия) фагоцитирующие мононуклеары рассматриваются как клетки-регуляторы, обеспечивающие восстановление органов после повреждения [28, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 183, 225].

Макрофаги почек при повреждении органа, синтезируют HGF, который оказывает митогенный эффект как на канальцевые эпителиоциты, так и на эндотелиальные клетки, тем самым стимулируя тубуло- и ангиогенез [186, 275].

Резидентные макрофаги печени также способны синтезировать данный ростовой фактор, являющийся митогеном для гепатоцитов [77, 141, 258]. Клетками Купфера в ответ на повреждение печени синтезируются TNF- α и IL-6,

которые являются важными компонентами ранних сигнальных путей, запускающих пролиферацию гепатоцитов [84, 104, 125, 148, 155, 159, 162].

Кроме того, макрофаги способны переводить неактивные формы ростовых факторов в активные за счет их протеолитического расщепления [85, 130, 183, 192].

Полученные данные свидетельствуют, что макрофаги локализованы в почках и печени неравномерно: они сосредоточены в ростковых зонах органов.

В почках мышей макрофаги в норме сосредоточены в межканальцевом интерстиции коркового вещества. Кроме того, они расположены также в мозговом веществе и почечных тельцах (мезангиальные клетки). Именно корковое вещество почек принято считать ростковой зоной данного органа. Преобладание макрофагов в этой области косвенно свидетельствует об их регуляторном влиянии на физиологическую регенерацию.

В печени интактных мышей макрофаги расположены по всей строме органа, но бóльшая их часть локализована в синусоидах вблизи портального тракта – ростковой зоне печени.

При повреждении органов количество макрофагов в них значительно увеличивается.

При частичной нефрэктомии в поврежденной почке отмечается макрофагальная инфильтрация коркового и мозгового вещества. В контрлатеральной почке количество фагоцитирующих мононуклеаров увеличивается только в корковом веществе. Данные изменения сопровождаются активацией пролиферации канальцевых эпителиоцитов в бóльшей степени в оперированном органе.

При репаративной регенерации печени после частичной гепатэктомии наблюдается накопление клеток Купфера в печени и активация моноцитопоэза в костном мозге. Признаки повреждения (кровоизлияния в строме дольки, полнокровие синусоидных капилляров, очаговые некрозы гепатоцитов), сочетаются с увеличением количества как пролиферирующих Ki-67+ гепатоцитов

(клеточная регенерация), так и двуядерных (внутриклеточная регенерация) клеток.

Таким образом, повреждение органа сопровождается увеличением количества макрофагов в нем.

Однако, можно предположить, что при повреждении меняется не только количество макрофагов, но и их функциональная активность, что также может влиять на регенерацию.

При исследовании с использованием ингибитора (каррагинан) или стимулятора (тамерит) функциональной активности макрофагов показано, что препараты меняют и реакцию макрофагов на повреждение органов.

Ингибирование функциональной активности СФМ на фоне частичной нефрэктомии приводит к перераспределению макрофагов в канальцах: количество фагоцитирующих мононуклеаров в межканальцевом интерстиции оперированной почки снижается (в мозговом веществе), в то время как в неоперированном органе идет их активное накопление. Это сказывается на пролиферативной реакции эпителиоцитов канальцев: в оперированном органе наблюдается ингибирование пролиферации клеток канальцев, тогда как в контрлатеральном отмечается только отмена реакции (количество Ki-67+ клеток сохраняется на уровне интактных значений).

Стимуляция функционального состояния СФМ, не влияя на количество макрофагов в органе (их количество растет также, как и при чистой нефрэктомии), существенно тормозит пролиферацию эпителиальных клеток канальцев в обеих почках.

В почечных тельцах количество макрофагов не меняется в ответ на повреждение органа ни при ингибировании, ни при стимуляции СФМ. В то время как пролиферация клеток зависит от функционального состояния макрофагов. Изменение функциональной активности макрофагов как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения вызывает падение количества пролиферирующих клеток, данный эффект более выражен при ингибировании СФМ.

Ингибирование функционального состояния СФМ при повреждении печени приводит к резкому сокращению количества макрофагов по сравнению с интактными животными. При этом внутриклеточная регенерация также значительно подавляется, о чем свидетельствует резкое сокращение числа двуядерных гепатоцитов. На клеточную регенерацию ингибирование СФМ влияния не оказывает.

Стимуляция функциональной активности СФМ на фоне частичной гепатэктомии сопровождается накоплением макрофагов в строме регенерирующего органа. Более значительный, чем при чистой гепатэктомии, прирост массы печени объясняется резким увеличением количества двуядерных гепатоцитов, что свидетельствует об усилении внутриклеточной регенерации. Увеличение функциональной активности СФМ, так же как и её снижение, на клеточную регенерацию не влияет.

Таким образом, очевидно, что введение ингибитора или стимулятора СФМ изменяет функциональное состояние данной системы, что меняет и характер развития процессов репарации.

Что касается механизмов действия макрофагов на репаративные процессы, то это влияние может осуществляться несколькими способами.

Во-первых, макрофаги сами способны синтезировать ростовые факторы, напрямую стимулирующие регенерацию органов.

Во-вторых, вероятно, что макрофаги могут изменять чувствительность клеток к ростовым факторам.

В-третьих, синтезируемые макрофагами вещества могут вызывать миграцию стволовых клеток костного мозга к поврежденному органу, что, в свою очередь, может способствовать его восстановлению.

В последние годы в литературе появляются отдельные сообщения, свидетельствующие о возможном участии SCF/CD117 лиганд/рецепторной оси в регуляции регенерации органов [144, 192, 222]. Активация данного взаимодействия, как правило, связана с пролиферацией клеток.

Этот феномен выявлен, прежде всего, для гемопоэтических стволовых клеток. Более того, CD117 рассматривается как маркер ГСК, а его активация связана не только с регуляцией их клеточного цикла, но и с миграцией из костного мозга в кровь [53, 111, 197, 221, 229, 237].

Однако, CD117 экспрессируется не только стволовыми, но и зрелыми не гемопоэтическими клетками. В печени данный рецептор экспрессируют гепатоциты и овальные клетки, в почках – канальцевые эпителиоциты [168, 169, 222, 240, 243]. Взаимодействие CD117 с его лигандом в данных органах запускает пролиферацию клеток. В печени SCF синтезируется клетками Купфера и самими гепатоцитами, то есть действует аутокринно и паракринно [222, 243].

Макрофаги почек сами не способны синтезировать SCF (он вырабатывается канальцевыми эпителиоцитами и действует аутокринно), зато они вырабатывают протеиназу (MMP-9), расщепляющую мембрансвязанную форму SCF до активной растворимой, то есть также способны влиять на CD117+ канальцевые эпителиоциты [192].

Еще одним механизмом влияния макрофагов может быть их способность изменять экспрессию рецептора CD117, тем самым увеличивая или уменьшая чувствительность CD117+ клеток к лиганду, и приводя к тому, что, например, даже меньшая концентрация SCF вызовет бóльшую ответную реакцию клетки.

Проведенное исследование показало, что CD117 в почках интактных мышей экспрессируется некоторыми канальцевыми эпителиоцитами коркового вещества, клетки почечных телец и стромы органа остаются иммунонегативными. Лишь небольшое количество CD117+ канальцевых эпителиоцитов характеризуется средней степенью экспрессии антигена, бóльшая же их часть слабо экспрессирует данный антиген.

В печени интактных мышей также большинство гепатоцитов иммунонегативны. CD117+ клетки, среди которых есть как одно-, так и двудерные, локализованы вблизи портальных трактов. Как и в почках, при отсутствии повреждения не обнаружены клетки с выраженной экспрессией CD117, подавляющее большинство CD117+гепатоцитов экспрессируют данный

антиген слабо. Гепатоциты, несущие больше молекул антигена, локализованы ближе к портальному тракту, а в процессе своего созревания и продвижения вдоль печеночной балки теряют способность экспрессировать CD117.

Таким образом, в обоих исследуемых органах по наличию CD117 можно выделить два типа клеток: CD117-позитивные, то есть чувствительные к фактору стволовой клетки, и CD117-негативные. Особенности же локализации CD117+ клеток в почках и печени свидетельствуют о том, что именно эти клетки формируют ростковую зону в органах.

При повреждении органов наблюдается увеличение количества CD117+ клеток (то есть расширение ростковой зоны), возрастает их чувствительность к действию лиганда.

При повреждении одной из почек отмечается реакция со стороны CD117+ клеток как оперированного, так и неповрежденного органа, что проявляется, во-первых, в увеличении количества CD117+ канальцевых эпителиоцитов, то есть в расширении ростковой зоны почек, а во-вторых, в появлении клеток с сильной экспрессией антигена. При этом более выраженная реакция наблюдается в оперированной почке. Количество пролиферирующих Ki-67+ канальцевых эпителиоцитов увеличивается в ответ на частичную нефрэктомия, причем также в большей степени это проявляется в поврежденном органе. Возрастает и количество макрофагов в корковом веществе.

Аналогичные изменения наблюдаются и в печени после частичной гепатэктомии. Растет число CD117+ гепатоцитов, перипортальная локализация которых сохраняется, однако наблюдается и увеличение расстояния, на котором обнаруживаются CD117+ клетки, что обусловлено их миграцией вдоль печеночной балки. Растет чувствительность отдельной клетки к лиганду, так как появляются гепатоциты с выраженной степенью экспрессии антигена, а созревающие гепатоциты теряют CD117 позднее. Данная реакция затрагивает и одноядерные, и двуядерные гепатоциты. В печени при повреждении отмечается также рост числа пролиферирующих Ki-67+ гепатоцитов и двуядерных гепатоцитов, а также и макрофагальная инфильтрация стромы.

Таким образом, макрофаги, вероятно, способны изменять чувствительность пролиферирующих клеток к SCF, меняя интенсивность экспрессии его специфического рецептора, что приводит к активации процессов репарации.

Изменение функционального состояния макрофагов может влиять на экспрессию CD117.

В почках при ингибировании СФМ и в оперированном, и в контрлатеральном органах растет количество CD117+канальцевых эпителиоцитов в большей степени, чем у животных, не получавших препарат, причем в основном за счет клеток со средней и сильной экспрессией антигена. Данный процесс более выражен именно в поврежденной почке, где пролиферативная реакция клеток канальцев максимально снижена.

Стимуляция СФМ не влияет на экспрессию CD117+ канальцевыми эпителиоцитами оперированной почки. Однако, количество данных клеток в неповрежденной почке возрастает. Эти процессы сопряжены с уменьшением числа Ki-67+ клеток канальцев.

Действие макрофагов на экспрессию CD117 канальцевыми эпителиоцитами почек весьма противоречиво, ведь изменение функциональной активности СФМ, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения вызывает однонаправленные реакции со стороны CD117+ клеток канальцев. Можно предположить, что в почках имеются дополнительные пути, активирующие экспрессию CD117.

Изменение функционального состояния макрофагов существенно влияет на реакцию со стороны CD117+ клеток печени.

Ингибирование СФМ, сопровождающееся резким падением количества клеток Купфера, приводит к уменьшению ростковой зоны: количество гепатоцитов, экспрессирующих CD117, снижается. При этом резко подавляются и регенеративные процессы, что проявляется в уменьшении количества двуядерных гепатоцитов.

Стимуляция же макрофагов, наоборот, приводит к росту количества CD117+ гепатоцитов и, следовательно, их распространению от перипортальной

области к перицентральной. Возрастает число клеток со средней и выраженной экспрессией антигена. Данный процесс протекает на фоне макрофагальной инфильтрации стромы органа и сопровождается активацией регенеративных процессов, что проявляется в увеличении количества двуядерных гепатоцитов.

Таким образом, в печени реакция CD117+ гепатоцитов ростковой зоны является макрофаг-зависимым процессом. От функционального состояния СФМ зависит стимуляция или же ингибирование регенеративных процессов, что опосредованно через действие на CD117+ гепатоциты. Следует отметить, что активация CD117+ клеток сопряжена в основном с увеличением количества двуядерных гепатоцитов, то есть влияет на внутриклеточную регенерацию.

Третьим механизмом может быть действие макрофагов на CD117+ гемопоэтические стволовые клетки.

Принято считать, что CD117 является ключевым, маркерным рецептором мышинных гемопоэтических стволовых клеток, по экспрессии которого судят об их пролиферации, дифференцировке и миграции [53, 111, 230]. Выброс в кровь SCF при повреждении почек и печени может вызывать их миграцию к регенерирующему органу, что способствует его репарации [82, 139, 193, 237, 240].

При оценке реакции CD117+ клеток костномозгового происхождения, исследовали ГСК двух субпопуляций: клетки с фенотипом CD45^{low}CD117+CD90^{low} являются менее дифференцированными, а клетки с фенотипом CD45^{low}CD117+CD38+ - более дифференцированными.

В ответ на частичную нефрэктомию наблюдается реакция со стороны ГСК, причем обоих исследуемых фенотипов, что проявляется в мобилизации данных клеток из костного мозга в кровь и увеличении количества менее дифференцированных ГСК в костном мозге.

При повреждении печени реакция наблюдается только со стороны более дифференцированной субпопуляции ГСК, тогда как количество CD45^{low}CD117+CD90^{low} клеток остается постоянным во всех исследуемых группах. После частичной гепатэктомии CD45^{low}CD117+CD38+ начинают

активно пролиферировать и более интенсивно, чем при лапаротомии, выходить в циркуляцию, о чем свидетельствует увеличение их количества в костном мозге и крови.

Введение препаратов, действующих на функциональную активность макрофагов, меняет и характер реакции CD117+ клеток костномозгового происхождения на повреждение органов.

Изменение функционального состояния СФМ на фоне повреждения почек приводит к торможению выхода ГСК в циркуляцию, как при ингибировании, так и при стимуляции макрофагов, то есть вновь реакция CD117+ клеток противоречива и имеет одно направление, несмотря на противоположно направленное действие препаратов.

Ингибирование СФМ при частичной гепатэктомии сопровождается блокированием пролиферации и миграции ГСК, тогда как стимуляция макрофагов приводит к увеличению темпов выхода CD45^{low}CD117+CD38+ ГСК в кровь в ответ на повреждение печени.

Таким образом, согласно полученным данным макрофаги можно рассматривать как клетки-регуляторы репаративной регенерации почек и печени. В реализации макрофагами морфогенетической функции большое значение имеет SCF/CD117 лиганд/рецепторное взаимодействие.

ВЫВОДЫ

1. Регуляция макрофагами физиологической и репаративной регенерации осуществляется с одной стороны путем изменения экспрессии рецепторов к ростовым факторам и чувствительности к ним клеток регенерирующего органа, а с другой – путем влияния на миграцию из костного мозга в место повреждения стволовых клеток.
2. Макрофаги по-разному влияют на клеточную и внутриклеточную регенерацию: если снижение функциональной активности системы фагоцитирующих мононуклеаров сопровождается торможением как клеточной (в почках), так и внутриклеточной (в печени) регенерации, то её повышение, снижая клеточную регенерацию, активирует внутриклеточную.
3. Регуляторный эффект макрофагов зависит от преобладающего в органе типа регенерации: в почках, где более выражена клеточная регенерация, фагоцитирующие мононуклеары контролируют пролиферацию канальцевых эпителиоцитов и клеток почечных телец; в печени, где преобладает внутриклеточная регенерация, макрофаги регулируют образование двуядерных гепатоцитов.
4. Дифференцированные клетки ростковой зоны разных органов (печень, почка) экспрессируют рецептор к фактору стволовой клетки, при этом, в ответ на повреждение увеличивается как количество CD117-позитивных клеток, так и степень экспрессии ими рецептора, что позволяет рассматривать SCF в качестве универсального ростового фактора, регулирующего регенерацию.
5. Экспрессия рецептора к SCF дифференцированными клетками является макрофаг-зависимой и имеет выраженные органно-специфические особенности: стимуляция функциональной активности СФМ приводит к увеличению количества CD117+ дифференцированных клеток и росту чувствительности отдельной клетки к лиганду и в почках, и в печени; ингибирование функциональной активности СФМ в почках сопровождается ростом количества CD117+канальцевых эпителиоцитов

и чувствительности их к лиганду, тогда как в печени наблюдается уменьшение количества CD117+ гепатоцитов и уровня экспрессии ими рецептора.

6. Для пополнения пула клеток-предшественников при повреждении разных органов из костного мозга мигрируют различные субпопуляции CD117-позитивных стволовых клеток: повреждение почки вызывает мобилизацию и CD45^{low}CD117+CD90^{low}, и CD45^{low}CD117+CD38+ ГСК; при повреждении печени отмечается выход в циркуляцию только клеток CD45^{low}CD117+CD38+ субпопуляции.

7. Миграция стволовых клеток из костного мозга является макрофаг-зависимым процессом: при повреждении почек и стимуляция, и ингибирование функционального состояния макрофагов приводят к торможению выхода ГСК в циркуляцию; при повреждении печени ингибирование функциональной активности СФМ замедляет миграцию ГСК из костного мозга в кровь, а стимуляция, наоборот, её повышает.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
M1 – классически-активируемые макрофаги
M2 – альтернативно-активируемые макрофаги
MЗР – макрофаги заживающих ран
M-КСФ – колоние-стимулирующий фактор макрофагов
МСК – мезенхимальная стромальная клетка
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
СФМ – система фагоцитирующих мононуклеаров
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс
ALR – augmenter of liver regeneration
CD – кластеры дифференцировки
CSF-1 – колоние-стимулирующий фактор 1
EGF – эпидермальный фактор роста
HGF – фактор роста гепатоцитов
IFN – интерферон
IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1
IL – интерлейкин
MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9
MSP – белок, стимулирующий макрофаги
PDGF – тромбоцитарный фактор роста
SCF – фактор стволовой клетки
SDF-1 – фактор стромальных клеток-1
TGF α , b – трансформирующий фактор роста α , b
TNF α – фактор некроза опухоли
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
Wnt7b – белок, активирующий сигнальный путь Wnt

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абидов М.Т. Токсический синдром при инфекционном воспалении. Патогенез, обоснование методов коррекции: автореф. дис. ...д-ра мед. наук / М.Т. Абидов / Академия постдипломного образования. – СПб., 1994. – 35 с.
2. Абидов М.Т. О новых деталях патогенеза токсико-септических состояний / М.Т. Абидов, А.В. Караулов // Тамерит в эксперименте и клинике – Екатеринбург, 2002. – С. 22-23.
3. Бабаева А.Г. Изменение характера дифференцировки эритроидного ростка костного мозга у мышей под влиянием перитонеальных клеток доноров, подвергнутых кровопусканию / А.Г. Бабаева, Е.И. Белан // Онтогенез. –1988. – Т.19. – С. 125-131.
4. Бабаева А.Г. Единство и противоположность цитогенетической активности лимфоцитов и их антителообразующей функции при восстановительных процессах в органах / А.Г. Бабаева // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1999. – Т.128, № 11.– С. 484-490.
5. Бабаева А.Г. Иммунологические механизмы регуляции восстановительных процессов / А.Г. Бабаева. – М.: Медицина, 1972. – 158 с.
6. Бабаева А.Г. Прошлое, настоящее и будущее проблемы лимфоидной регуляции пролиферации нелимфоидных клеток / А.Г. Бабаева // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1995. – № 5. – С. 230-234.
7. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза / А.Г. Бабаева – М.: Медицина, 1985. – 255 с.
8. Бабаева А.Г. Репаративные процессы и иммунитет / А.Г. Бабаева // Изв. АН. - Сер. биол. – 1999. – № 6. – С. 261-269.
9. Бабаева А.Г. Вариабельность иммунного ответа у мышей, иммунизированных в разные сроки после полного и частичного удаления ткани органов с неодинаковой восстановительной способностью / А.Г. Бабаева, В.В. Арсентьева // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1991. –Т.112, № 8. – С. 169 -170.

10. Бабаева А.Г. Подавление пролиферации эпителиальных клеток у мышей спленоцитами односторонне сиалденэктомированных сингенных доноров / А.Г. Бабаева, В.В. Арсентьева // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1991. –Т.113, № 9. – С. 328-330.

11. Бабаева А.Г. Цитогенетические свойства лимфоидных клеток селезенки мышей в ранние сроки после двусторонней нефрэктомии / А.Г. Бабаева, Е.И. Гиммельфарб // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1997. – Т.124, № 7. – С. 109-110.

12. Бабаева А.Г. Влияние лимфоидных клеток односторонне нефрэктомированных мышей на пролиферативную активность почек и печени неоперированных реципиентов / А.Г. Бабаева, Н.А. Краскина, Л.Д. Лиознер // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1973. –Т.75, № 2.– С. 78-80.

13. Бабаева А.Г. Стимуляция митотической активности гепатоцитов и купферовских клеток печени неоперированных мышей под влиянием Т- и В - лимфоцитов частично гепатэктомированных сингенных доноров / А.Г. Бабаева, Н.А. Краскина, Н.В. Юдина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1980. – №1. – С. 69-70.

14. Бабаева А.Г. Морфологическая характеристика лимфоцито-гепатоцитарных контактов в различные сроки регенерации печени у мышей / А.Г. Бабаева, В.А. Шахламов, Н.В. Юдина // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1994. – № 2. – С. 176-179.

15. Бабаева А.Г. Влияние клеток селезенки частично спленэктомированных и частично гепатэктомированных мышей на пролиферацию гепатоцитов в регенерирующей печени сингенных реципиентов / А.Г. Бабаева, Н.В. Юдина, Т.А. Дружкова // Онтогенез. – 1988. –Т.19, № 6. – С. 573-581.

16. Базарный В.В. К вопросу о лимфоидной регуляции кроветворения / В.В. Базарный // Очерки экспериментальной патофизиологии. – Екатеринбург, 1999. – С.116-121.

17. Биология стволовых клеток и клеточные технологии / под ред. М.А. Пальцева. – М. : Медицина, Шико, 2009. – С. 728.
18. Богомолец, А.А. Продление жизни / А.А. Богомолец. – Киев : Изд-во АН УССР, 1940. – 144 с.
19. Гарбузенко Д.В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при ее повреждении и их практическое значение / Д.В. Гарбузенко // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – № 6. – С. 14-21.
20. Гольдберг Е.Д. Роль лимфоцитов в регуляции гемопоэза / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, Г.В. Карпова. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1983. – 160 с.
21. Гольдберг Е.Д. Об участии лимфоцитов в регуляции кроветворения в условиях локального облучения организма / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1982. – № 3. – С. 97-99.
22. Гольдберг Е.Д. Механизмы цитостатического повреждения и регенерации кроветворной системы / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.В. Жданов // Вестник РАМН. – 1998. – № 10. – С.6 - 10.
23. Гольдберг Е.Д. Роль гемопоэзиндуцирующего микроокружения в регуляции кроветворения при цитостатических миелосупрессиях / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.В. Жданов. – Томск: СТТ, 1999. – 114 с.
24. Гольдберг Е.Д. Механизмы локальной регуляции кроветворения / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, Е.Ю. Шерстобоев. – Томск: СТТ, 2000. – 148 с.
25. Горизонтов П.Д. Стресс и система крови / П.Д. Горизонтов, О.И. Белоусова, М.И. Федотова. – М.: Медицина, 1983. – 240 с.
26. Горлина Н.К. Иммунорегуляция функций фибробластов / Н.К. Горлина, Е.А. Баличева, Н.В. Кушнир // Тезисы докладов I Съезда иммунологов России. – Новосибирск, 1992. – С. 32
27. Громыхина Н.Ю. Роль макрофагов в процессе формирования регуляторных связей между иммунной, нервной и эндокринной системами в ходе

иммунного ответа / Н.Ю. Громыкина, Л.Г. Крымская, В.А. Козлов // Успехи физиол. наук. – 1993. – Т.24, № 1. – С. 59-79.

28. Данилова И.Г. Влияние системы фагоцитирующих мононуклеаров на регенерацию тканей с разной восстановительной способностью (экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.13 / Данилова Ирина Георгиевна. - Екатеринбург, 2006. – 50 с.

29. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях: офиц. текст. – СПб., 2012. – 48с.

30. Дыгай А.М. Воспаление и гемопоэз / А.М. Дыгай, Н.А. Клименко. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1992. – 297 с.

31. Дыгай А.М. Роль межклеточных взаимодействий в регуляции гемопоэза / А.М. Дыгай, В.П. Шахов. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1989. – 224 с.

32. Иммунная система и регуляция физиологических функций / Б.Г. Юшков [и др.]. – Екатеринбург: УрО РАН, 2001. – 74 с.

33. Иммунофизиология / В.А. Черешнев [и др.]. – Екатеринбург: УрО РАН, 2002. – 259 с.

34. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – М. : Фолиант, 2008. – С. 552.

35. Кетлинский С.А. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции воспаления и иммунитета / С.А. Кетлинский, Н.М. Калинина // Иммунология. – 1995. – № 3. – С. 30-44.

36. Лиознер Л.Д. Условия регенерации органов у млекопитающих / Л.Д. Лиознер. – М.: Наука, 1972. – 241с.

37. Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский. – Новосибирск: Наука, 1983. – 256 с.

38. Маянский А.Н. Клинические аспекты фагоцитоза / А.Н. Маянский, О.И. Пикуза. – Казань: Магариф, 1993. – 192 с.

39. Маянский Д.Н. Клетка Купфера и система мононуклеарных фагоцитов. – Новосибирск: Наука, 1981. – 172 с.

40. Маянский А.Н. Проблемы управления фагоцитарными механизмами иммунитета / А.Н. Маянский, А.Л. Невмятуллин, Н.А. Маянский // Микробиология. – 1995. – № 3. – С. 21-26.

41. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление / Д.Н. Маянский. – М.: Медицина, 1991. – 272 с.

42. Медведев В.В. Клиническая лабораторная диагностика: справочник для врачей / В.В. Медведев, Ю.З. Волчек; под ред. В.А. Яковлева. – СПб.: Гиппократ, 2006. – С. 21.

43. Медведева С.Ю. Влияние макрофагов на репаративную регенерацию островкового аппарата поджелудочной железы при аллоксановом диабете / С.Ю. Медведева, Т.С. Булавинцева, И.Г. Данилова // Вестн. урал. мед. акад. науки. — 2011. – №2/1 (35). – С.46–47.

44. Морфологические эквиваленты лимфоцитарно-эпителиального взаимодействия при восстановительных процессах в почке и печени / А.Г. Бабаева, В.А. Шахламов, В.И.Алтухова, Е.И. Гиммельфарб // Архив патологии. – 1998. –Т.60, № 5. – С. 58-61.

45. Неиммунологические функции макрофагов / Б.Г. Юшков, М.Т. Абидов, И.Г. Данилова, С.Ю. Медведева. – Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 246 с.

46. Омеляненко, Н.П. Соединительная ткань (гистология и биохимия): в 2-х тт., т.1 / Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий; под ред. С. П. Миронова. – М.: Известия, 2009. – 380 с.

47. Осипенко А.В., Черешнев В.А. Иммунобиологические механизмы регенерации тканей / А.В Осипенко, В.А. Черешнев. – Екатеринбург: УрО РАН, 1997. – 130 с.

48. Подавление регенерации печени у мышей интерфероном человека / А.Л. Лиознер [и др.] // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 1982. – № 6. – С. 96-98.

49. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств: ежегод. сб.: вып. 9 / под ред. Г.Л. Вышковского. – М.: ООО «РЛС», 2002. – 1504 с.

50. Регуляторная роль стромальных механоцитов, макрофагов, системы Т-клеток и глюкокортикоидов в развитии адаптивных реакций костномозгового кроветворения при стрессе / Е.Д. Гольдберг [и др.] // Механизмы патологических реакций: сб. науч.тр. – Томск, 1988. – С. 6-8.

51. Романова Л.К. Регуляция восстановительных процессов / Л.К. Романова. – М.: Изд-во МГУ, 1984. – 209 с.

52. Руководство по гистологии : в 2 т., т. 1 / отв. ред. Р.К. Данилов. – СПб. : СпецЛит, 2001. – 495 с.

53. Рулина А.В. Активированные лейкозные онкогены AML1-ETO и c-kit: роль в развитии острого миелоидного лейкоза и современные подходы к их ингибированию / А.В. Рулина, П.В. Спиринов, В.С. Прасолов // Успехи биологической химии. – 2010. – Т.50. – С. 349–386.

54. Северин М.В. Регенерация тканей при экстремальных воздействиях на организм / М.В. Северин, Б.Г. Юшков, А.П. Ястребов. – Екатеринбург: УрГМИ, 1993. – 186 с.

55. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т.3, № 2. – С. 16–22.

56. Улитко М.В. Роль моноцитов-макрофагов в адаптивных реакциях кроветворной ткани при действии на организм экстремальных факторов : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.13 / Улитко Мария Валерьевна. – Екатеринбург, 2008. – 25 с.

57. Урываева И.В. Репликативный потенциал гепатоцитов и стволовые клетки печени // Изв. акад. наук. - Сер. биол. – 2001. – № 6. – С. 728–737.

58. Фактор В.М. Стволовой резерв печени / В.М. Фактор, С.А. Радаева // Онтогенез. - 1991. – Т. 22, № 2. – С.181–189.

59. Фаллер Дж.М. Молекулярная биология клетки: руководство для врачей / Дж.М. Фаллер, Д. Шилдс; пер. с англ. И.Б. Збарского. – М.: БИНОМ, 2003. – 268 с.

60. Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы: т. 2 / И.С. Фрейдлин, А.А. Тотолян. – СПб.: Наука, 2000. – С. 131–231.

61. Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы: т. 4 / И.С. Фрейдлин, А.А. Тоголян. – СПб.: Наука, 2001. – С. 202–308.
62. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы / Р.М. Хаитов. – М., 2001. – 223с.
63. Хаитов Р.М. Некоторые избранные проблемы функциональной активности макрофагов / Р.М. Хаитов, В.М. Земсков // Журнал микробиологии. - 1995. – № 3. – С. 27-32.
64. Хаитов Р.М. Основные задачи клинической иммунологии по изучению функциональной активности фагоцитирующих клеток / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 1995. – № 3. – С. 6-10.
65. Характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов, принимающих участие в регуляции миелопоэза при стресс-реакции / Е.Д. Гольдберг [и др.] // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1988. – № 4. – С. 29-32.
66. Храмцова Ю.С. Роль иммунной системы в регуляции регенерации тканей с разной восстановительной способностью / Ю.С. Храмцова: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Челябинский гос. пед. университет. – Челябинск, 2005. – 22 с.
67. Храмцова Ю.С. Репаративная регенерация семенника при различных функциональных состояниях иммунной системы / Ю.С. Храмцова, Н.В. Тюменцева, С.В. Янович // Вест. Урал. мед. акад. науки. – 2011. – Т.35, № 2/1. – С. 71-72.
68. Черешнев В.А. Патофизиология / В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков. – М.: Вече, 2001. – 703 с.
69. Экспрессия рецептора фактора стволовых клеток С-kit в регенерирующей печени после частичной гепатэктомии / И.М. Газизов [и др.] // Морфологические ведомости. – 2008. – № 1-2. – С. 23–27.
70. Эллиниди В.Н. Практическая иммуногистохимия: мет. рек. / В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникиева, Н.А. Максимова. – СПб., 2002. – 36 с.
71. Эндокринная регуляция физиологических функций: избранные разделы физиологии: учеб. пособие / В.Г. Климин [и др.]. – Екатеринбург : УрО РАН, 2001. – 103 с.

72. Юшков Б.Г. Система крови и экстремальные воздействия на организм / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин, М.В. Северин. – Екатеринбург: УрО РАН, 1999. – 200 с.

73. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии / А.А. Ярилин // Иммунология. – 1997. – № 5. – С. 7-14.

74. Ястребов А.П. Об участии лимфатических клеток в регуляции эритропоэза при воздействии на организм экстремальных факторов / А.П. Ястребов, М.В. Попугайло // Механизмы регуляции в системе крови: сб. науч. тр. – Красноярск, 1978. – С. 224-226.

75. Ястребов А.П. Регуляция гемопоэза при воздействии на организм экстремальных факторов / А.П. Ястребов, Б.Г. Юшков, В.Н. Большаков. – Свердловск : УрО РАН СССР, 1988. – 152 с.

76. 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies / S. Paku, P. Nagy, L. Kopper, S.S. Thorgeirsson // Journal of Hepatology. – 2004. – V. 39, № 5. – P. 1353–1361.

77. A molecular view of liver regeneration / M.R. Tarlá [et al.] // Acta Cir Bras. – 2006. – V. 21, № 1. – P. 58–62.

78. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family / P. Besmer [et al.] // Nature. – 1986. – V. 320. – P. 415–421.

79. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure / S. Gupta [et al.] // Kidney Int. – 2002. – V. 62, № 4. – P. 1285–1290.

80. Activation of the MAP kinase pathway by c-kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines / E. Wandzioch [et al.] // Blood. – 2004. – V. 104, № 1. – P. 51–57.

81. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells / X. Wang [et al.] // Blood. – 2003. – V. 101, № 10. – P. 4201–4208.

82. Almeida-Porada, G. Bone marrow stem cells and liver regeneration / G. Almeida-Porada, E.D. Zanjani, C.D. Porada // *Exp Hematol.* – 2010. – V. 38, № 7. – P. 574–580.
83. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4⁺ T cells to be sustained during chronic infection / P. Loke [et al.] // *J Immunol.* – 2007. – V. 179, № 6. – P. 3926–3936.
84. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy / P. Akerman [et al.] // *Am J Physiol.* – 1992. – V. 263. – P. 579–585.
85. Augmenter of liver regeneration promotes hepatocyte proliferation induced by Kupffer cells / C.P. Wang [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12, № 30. – P. 4859–4865.
86. Austin T.W. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells / T.W. Austin, E. Lagasse // *Mech Dev.* – 2003. – V. 120, № 1. – P. 131–135.
87. Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region / P.M. Chan [et al.] // *Molecular and cellular biology.* – 2003. – V. 23, №9. – P. 3067–3078.
88. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations / J.P. Edwards, X. Zhang, K.A. Frauwirth, D.M. Mosser // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – V. 80, № 6. – P. 1298–1307.
89. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model / H. Kanazawa [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – V. 6, № 4. – P. 1–8.
90. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule / S. Kale [et al.] // *J Clin Invest.* – 2003. – V. 112, № 1. – P. 42–49.
91. Bonventre J.V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure / J.V. Bonventre // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – V. 14, № 1. – P. 55–61.
92. Broudy V. Stem cell factor and hematopoiesis / V. Broudy // *Blood* – 1997. – V. 90, № 4. – P. 1345–1364.

93. Catanzaro P.J. Spectrum and possible mechanism of carrageenan cytotoxicity / P.J. Catanzaro, H.J. Schwartz, R.C. Jr. Graham // *Am J Pathol.* – 1971. – V.64, № 2. – P.387–404.
94. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells / B. Smedsrød [et al.] // *Gut.* - 1994. – V. 35, № 11. – P. 1509–1516.
95. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes / X. Wang [et al.] // *Nature.* – 2003. – V. 422, № 6934. – P. 897–901.
96. Characterization and enrichment of hepatic progenitor cells in adult rat liver / A. Qin [et al.] // *World journal of gastroenterology.* – 2004. – V. 10, № 10. – P. 1480–1486.
97. Characterization of two distinct liver progenitor cell subpopulations of hematopoietic and hepatic origins / V. Corcelle [et al.] // *Experimental cell research* – 2006. – V. 312. – P. 2826–2836.
98. Characterizations of and interactions between bile ductule cells and hepatocytes in early stages of rat hepatocarcinogenesis induced by ethionine / P.M. Novikoff, T. Ikeda, D.C. Hixson, A. Yam // *American Journal of Pathology* – 1991. – V. 139. – P. 1351–1368.
99. Chinetti-Gbaguidi, G. Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation / G. Chinetti-Gbaguidi, B. Staels // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2011. – V. 22, № 5. – P. 365–372.
100. C-Kit and c-kit mutations in mastocytosis and other hematological diseases / M. Boissan, F. Feger, J.J. Guillosson, M. Arock // *J. Leukoc. Biol.* – 2000. – V. 67, № 2. –P. 135–148.
101. C-kit delineates a distinct domain of progenitors in the developing kidney / K.M. Schmidt-Ott [et al.] // *Dev. Biol.* – 2006. – V. 299, № 1. –P. 238–249.
102. Coexpression of flt-3 ligand /flt-3 and SCF/ c-kit signal transduction system in bileduct- ligated SI and W mice / M. Omori [et al.] // *American Journal of pathology.* – 1997. – V. 150, №4. – P. 1179–87.
103. Coexpression of stem cell factor and c-kit in embryonic and adult liver / K. Fujio // *Experimental cell research* – 1996. – V. 224, № 2. – P. 243–250.

104. Combined interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor accelerates murine liver regeneration / M. Peters [et al.] // *Gastroenterology*. – 2000. – V. 119, № 6. – P. 1663–1671.
105. CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice / J. Menke [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2009. – V. 119, № 8. – P. 2330–2342.
106. Dale D.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes / D.C. Dale, L. Boxer, W.C. Liles // *Blood* – 2008. – V. 112, № 4. – P. 935–945.
107. De Felici M. Regulation of primordial germ cell development in the mouse / M. De Felici // *International journal of developmental biology*. – 2000. – V.44, № 6. – P. 575–580.
108. Delassus S. Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo / S. Delassus, I. Titley, T. Enver // *Blood*. – 1999. – V. 94, № 5. – P. 1495–1503.
109. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells / F. Geissmann [et al.] // *Science*. – 2010. – V. 327, № 5966. – P. 656–661.
110. Di Rosa M. Biological properties of carrageenan / M. Di Rosa // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1972. – V. 24, № 2. – P. 89–102.
111. Edling C.E. C-kit – a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase / C.E. Edling, B. Hallberg // *The international journal of biochemistry and cell biology*. – 2007. – V. 39, №11. – P. 1995–1998.
112. Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep / J. Chamberlain [et al.] // *Hepatology*. – 2007. – V. 46, № 6. – P. 1935–1945.
113. El Sabbahy, M. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair / M. El Sabbahy, V.S. Vaidya // *Wiley Interdiscip Rev. Syst. Biol. Med.* – 2011. – V. 3, № 5. – P. 606–618.
114. Endocytic internalization of adenovirus, nonspecific phagocytosis, and cytoskeletal organization are coordinately regulated in alveolar macrophages by GM-CSF and PU.1 / P.Y. Berclaz [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – V. 169, № 11. – P.6332–6342.

115. Enhanced mobilization of bone marrow cells does not ameliorate renal fibrosis / G. Stokman [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2008. – V. 23, № 2. – P. 483–491.

116. Esrefoglu, M. Role of stem cells in repair of liver injury: experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure / M. Esrefoglu // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – V. 19, № 40. – P. 6757–6773.

117. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues / A. Lammie [et al.] // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* – 1994. – V. 42, № 11. – P. 1417–1425.

118. Expression of c-kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues / P.G. Natali [et al.] // *Cancer Research.* – 1992. – V. 52, № 22. – P. 6139–6143.

119. Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver / N. Tanimizu [et al.] // *Gene Expression Patterns.* – 2004. – V. 5, № 2. – P. 209–218.

120. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells / T.D. Randall, F.E. Lund, M.C. Howard, I.L. Weissman // *Blood.* – 1996. – V. 87 – P. 4057 – 4067.

121. Expression of stem cell factor and its receptor c-Kit during the development of intrahepatic cholangiocarcinoma / T. Mansuroglu [et al.] // *Lab. Invest.* – 2009. – V. 89, № 5. – P. 562–574.

122. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat / K. Fujio [et al.] // *Lab. Invest.* – 1994. – V. 70, № 4. – P. 511–516.

123. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell / U. Baumann [et al.] // *Hepatology.* – 1999. – V. 30, №1. – P. 112–117.

124. Factor, V.M. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse / V.M. Factor, S.A. Radaeva, S.S. Thorgeirsson // *American Journal of Pathology.* – 1994. – V. 145, № 2. – P. 409–422.

125. Fausto, N. Liver regeneration / N. Fausto // *J. Hepatol.* – 2000. – V. 32, № 1. – P. 19–31.
126. Fausto, N. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation / N. Fausto, J.S. Cambell // *Mechanisms of Development.* – 2003. – V. 120, № 1. – P.117–130.
127. Flaquer, M. Growth factors and renal regeneration / M. Flaquer, P. Romagnani, J.M. Cruzado // *Nefrologia.* – 2010. – V. 30, № 4. – P. 385–393.
128. Fujigaki, Y. Different modes of renal proximal tubule regeneration in health and disease / Y. Fujigaki // *World J. Nephrol.* – 2012. – V. 1, № 4. – P. 92–99.
129. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation / H. Wu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94, № 5. – P. 1806–1810.
130. Gandhi, C.R. Augmenter of liver regeneration / C.R. Gandhi // *Fibrogenesis Tissue Repair.* – 2012. – V. 5, № 1. – P. 1–11.
131. Geissmann, F. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties / F. Geissmann, S. Jung, D.R. Littman // *Immunity.* – 2003. – V. 19, № 1. – P. 71–82.
132. Gordon, S. Alternative activation of macrophages / S. Gordon // *Nat Rev Immunol.* – 2003. – V. 3, № 1. – P. 23–35.
133. Grage-Griebenow, E. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets / E. Grage-Griebenow, H.D. Flad, M. Ernst // *J. Leukoc. Biol.* – 2001. – V. 69, № 1. – P. 11–20.
134. Grisham, J.W. Morphologic identification by electron microscopy of «oval» cells in experimental hepatic degeneration / J.W. Grisham, W.S. Hartroft // *Laboratory Investigation.* – 1961. – V. 10. – P. 317–332.
135. Hanna, R.N. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes / R.N. Hanna, L.M. Carlin, H.G. Hubbeling // *Nat. Immunol.* – 2011. – V. 12, № 8. – P. 778–785.

136. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion / O. Quintana-Bustamante [et al.] // *Hepatology*. – 2006. – V. 43, № 1. – P. 108–116.

137. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury / E. Dalakas, P.N. Newsome, D.J. Harrison, J.N. Plevris // *FASEB J.* – 2005. – V. 19, № 10. – P. 1225–1231.

138. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice / F. Lin [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – V. 14, № 5. – P. 1188–1199.

139. Hepatocyte growth factor mobilizes and recruits hematopoietic progenitor cells into liver through a stem cell factor-mediated mechanism / F. Tajima [et al.] // *Hepatology research*. – 2010. – V. 40, № 7. – P. 711–719.

140. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice / G.A. Patijn [et al.] // *Hepatology*. – 1998. – V. 28, № 3. – P. 707–716.

141. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor / T. Nakamura, K. Sakai, T. Nakamura, K. Matsumoto // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011. – V. 26, № 1. – P. 188–202.

142. Higgins, G.M., Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver following partial surgical removal / G.M. Higgins, R.M. Anderson // *Arch. Path.* – 1931. – V. 272. – P. 186–202.

143. Hilgendorf, I. Making a difference: monocyte heterogeneity in cardiovascular disease / I. Hilgendorf, F.K. Swirski // *Curr. Atheroscler. Rep.* – 2012. – V. 14, № 5. – P. 450–459.

144. Hu, B. Stem cell factor and c-kit are involved in hepatic recovery after acetaminophen-induced liver injury in mice / B. Hu, L.M. Colletti // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2008. – V. 295, № 1. – P. 45–53.

145. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion / P.N. Newsome [et al.] // *Gastroenterology*. – 2003. – V. 124, № 7. – P. 1891–1900.

146. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria / F.A. Verreck [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101, № 13. – P. 4560–4565.

147. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand / Y. Yarden [et al.] // EMBO Journal. – 1987. – № 6. – P. 3341–3351.

148. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice / N. Selzner [et al.] // Gastroenterol. – 2003. – V. 124, № 3. – P. 692–700.

149. Identification of a ligand for the c-kit protooncogene / D.E. Williams [et al.] // Cell. – 1990. – V. 63, №1. – P. 167–174.

150. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+)/CD16(+) blood monocytes / E. Grage-Griebenow [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2001. – V. 31, № 1. – P. 48–56.

151. Ikuta, K Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation / K. Ikuta, I.L. Weissman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – V. 89, № 4. – P. 1502–1506.

152. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils / E. Brandt [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2000. – V. 68, № 1. – P. 125-130.

153. Impaired steel factor responsiveness differentially affects the detection and longterm maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells in vivo / C.L. Miller [et al.] // Blood. – 1997. – V. 89, № 4. – P. 1214–1223.

154. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease / O. Grip, A. Bredberg, S. Lindgren, G. Henriksson // Inflamm. Bowel. Dis. – 2007. – V. 13, № 5. – P. 566–572.

155. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: Deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor / Y. Yamada, I. Kirillova, J.J. Peschon, N. Fausto // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94, № 4. - P. 1441–1446.

156. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat / S.B. Miller, D.R. Martin, J. Kissane, M.R. Hammerman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – V. 89, № 24. – P. 11876–11880.

157. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair / B. Imberti [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2007. – V. 18, № 11. – P. 2921–2928.

158. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation / M. Stein, S. Keshav, N. Harris, S. Gordon // *J. Exp. Med.* – 1992. – V. 176, № 1. – P. 287–292.

159. Interleukin 6 and liver regeneration / K.L. Streetz, T. Luedde, M.P. Manns, C. Trautwein // *Gut.* – 2000. – V. 47, № 2. – P. 309–312.

160. Interleukin-6, hepatocyte growth factor, and their receptors in biliary epithelial cells during a type I ductular reaction in mice: Interactions between the periductal inflammatory and stromal cells and the biliary epithelium / Z. Liu [et al.] // *Hepatology.* – 1998. – V. 28, № 5. – P. 1260–1268.

161. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury / B.D. Humphreys [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2008. – V. 2, № 3. – P. 284–291.

162. Iocca, H.A. Tumor necrosis factor-alpha acts as a complete mitogen for primary rat hepatocytes / H.A. Iocca, H.C. Ison // *Am. J. Pathol.* – 2003. – V. 163, № 2. – P. 465–476.

163. Jia C. Advances in the regulation of liver regeneration / C. Jia // *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011. – V. 5, № 1. – P. 105–121.

164. Kanazawa, Y. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver / Y. Kanazawa, I.M. Verma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – P. 11850–11853.

165. Kapur R. A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin / R. Kapur, L. Zhang // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276, № 2. – P. 1099–1106.

166. Kim M.S. The multiple roles of phosphoinositide 3-kinase in mast cell biology / M.S. Kim, M. Radinger, A.M. Gilfillan // *Trends in immunology*. – 2008. – V. 29, № 10. – P. 493–501.
167. Kipari T. Macrophage-mediated renal cell death / T. Kipari, J. Hughes // *Kidney Int.* – 2002. – V. 61, № 2. – P. 760–761.
168. KIT expression in fetal, normal adult, and neoplastic renal tissues / D. Miliaras, F. Karasavvidou, A. Papanikolaou, D. Sioutopoulou // *Journal of clinical pathology*. – 2004. – V. 57. – P. 463–466.
169. KIT expression in normal and neoplastic renal tissues: immunohistochemical and molecular genetic analysis / N. Kato [et al.] // *Pathology International*. – 2005. – V. 55, № 8. – P. 479–483.
170. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells / L.A. Thorén [et al.] // *J. Immunol.* – 2008. – V. 180, № 4. – P. 2045–2053.
171. Kitamura Y. Decreased production of mast cells in SI/SI^d anemic mice / Y. Kitamura, S. Go // *Blood*. – 1979. – V. 53, № 3. – P. 492–497.
172. Kolios G. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease / G. Kolios, V. Valatas, E. Kouroumalis // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12, № 46. – P. 7413–7420.
173. Landsman L. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung / L. Landsman, C. Varol, S. Jung // *J. Immunol.* – 2012. – V. 178, № 4. – P. 2000–2007.
174. Lasagni L. Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly / L. Lasagni, P. Romagnani // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – V. 21, № 10. – P. 1612–1619.
175. Laskin D.L. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages / D.L. Laskin, B. Weinberger, J.D. Laskin // *J. Leukoc. Biol.* – 2001. – V. 70, № 2. – P. 163–170.
176. Li C.L. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization / C.L. Li, G.R. Johnson // *Blood*. – 1995. – V. 85, № 6. – P. 1472–1479.

177. Lindoso R.S. Renal recovery after injury: the role of Pax-2 / R.S. Lindoso, K.S. Verdoorn, M. Einicker-Lamas // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2009. – V. 24, № 9. – P. 2628–2633.

178. Lindroos P.M. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration / P.M. Lindroos, R. Zarnegar, G.K. Michalopoulos // *Hepatology.* – 1991. – V. 13, № 4. – P. 743–750.

179. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action / Y. Liu // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2004. – V. 287, № 1. – P. F7–F16.

180. Liu Y. Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms / Y. Liu // *Am. J. Physiol.* – 1999. – V. 277. – P. F624–F633.

181. Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4 / L. d'Auriol, M.G. Mattei, C. Andre, F. Galibert // *Human genetics.* – 1988. – V. 78, № 4. – P. 374–376.

182. Macrophage matrix metalloproteinase-9 mediates epithelial-mesenchymal transition in vitro in murine renal tubular cells / T.K. Tan [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2010. – V. 176, № 3. – P. 1256–1270.

183. Macrophage stimulating protein may promote tubular regeneration after acute injury / V. Cantaluppi [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – V. 19, № 10. – P. 1904–1918.

184. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration / S.L. Lin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107, № 9. – P. 4194–4199.

185. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin-6 administration / T.A. Zimmers [et al.] // *Hepatology.* – 2003. – V. 38, № 2. – P. 326–334.

186. Matsumoto, K. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases / K. Matsumoto, T. Nakamura // *Kidney Int.* – 2001. – V. 59, № 6. – P. 2023–2038.

187. McCampbell, K.K. Renal stem cells: fact or science fiction? / K.K. McCampbell, R.A. Wingert // *Biochem J.* – 2012. – V. 444, № 2. – P. 153–168.
188. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites / R.M. Anthony [et al.] // *Nature Med.* – 2006. – V. 12, № 8. – P. 955–960.
189. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure / B. Parekkadan [et al.] // *PLoS One.* – 2007. – V. 2, № 9. – P.1–6.
190. Michalopoulos G.K. Liver regeneration / G.K. Michalopoulos // *J. Cell Physiol.* – 2007. – V. 213, № 2. – P. 286–300.
191. Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-kit expression / E.M. Peters [et al.] // *Journal of histochemistry and cytochemistry.* – 2012. – V. 50, № 6. – P. 751–766.
192. MMP9 and SCF protect from apoptosis in acute kidney injury / S. Bengatta [et al.] // *Journal of the American Society of Nephrology.* – 2009. – V. 20, № 4. – P. 787–797.
193. Mobilized human hematopoietic stem/progenitor cells promote kidney repair after ischemia/reperfusion injury / B. Li [et al.] // *Circulation.* – 2010. – V. 121, № 20. – P. 2211–2220.
194. Mosser D.M. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D.M. Mosser, J.P. Edwards // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V. 8, № 12. – P. 958–969.
195. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells / R.E. Schwartz [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 109, № 10. – P. 1291–1302.
196. Munugalavadla V. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis / V. Munugalavadla, R. Kapur // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2005. – V. 54, № 1. – P. 63–75.
197. Murine hematopoietic stem cells and multipotent progenitors express truncated intracellular form of c-kit receptor / J. Zayas, D.S. Spassov, R.G. Nachtman, R. Jurecic // *Stem cells and development.* – 2008. – V. 17, № 2. – P. 343–353.

198. New insights into functional aspects of liver morphology / D.E. Malarkey [et al.] // *Toxicol. Pathol.* – 2005. – V. 33, № 1. – P. 27–34.
199. Nishida, M. Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy / M. Nishida, K. Hamaoka // *Nephron. Exp. Nephrol.* – 2008. – V. 110, № 1. – P. 31–36.
200. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells / J.A. Oben [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V. 302, № 4. – P. 685–690.
201. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase Kit / J. Lennartsson, T. Jelacic, D. Linnekin, R. Shivakrupa // *Stem cells.* – 2005. – № 23. – P. 16–43.
202. Okayama, Y. Development, migration and survival of mast cells / Y. Okayama, T. Kawakami // *Immunologic research.* – 2006. – V. 34, №2. – P. 97–115.
203. O'Shea J.J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses / J.J. O'Shea, P.J. Murray // *Immunity.* – 2011. – V. 28, № 4. – P. 477–487.
204. Parker G.A. Immune functioning in non lymphoid organs: the liver / G.A. Parker, C.A. Picut // *Toxicol. Pathol.* – 2012. – V. 40, № 2. – P. 237–247.
205. Participation of bone marrow cells in biliary fibrosis after bile duct ligation / S. Asawa [et al.] // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2007. – V. 22, № 11. – P. 2001–2008.
206. Passlick B. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood / B. Passlick, D. Flieger, H.W. Ziegler-Heitbrock // *Blood.* – 1989. – V. 74, № 7. – P. 2527–2534.
207. Phenotype and function of a CD56(+) peripheral blood monocyte / G. Sconocchia [et al.] // *Leukemia.* – 2005. – V. 19, № 1. – P. 69–76.
208. Physiological variations of stem cell factor and stromal-derived factor-1 in murine models of liver injury and regeneration / E.S. Swenson, R. Kuwahara, D.S. Krause, N.D. Theise // *Liver Int.* – 2008. – V. 28, № 3. – P. 308–318.
209. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair / G. Ramadori, F. Moriconi, I. Malik, J. Dudas // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2011. – V. 59, № 1. – P. 107–117.

210. Podocyte mitosis - a catastrophe / L. Lasagni [et al.] // *Curr. Mol. Med.* – 2013. – V. 13, № 1. – P. 13–23.
211. Popper H. Ductular cell reaction in the liver in hepatic injury / H. Popper, G. Kent, R. Stein // *Journal of the Mount Sinai Hospital, New York.* – 1957. – V. 24, №5. – P. 551–556.
212. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium / G.D. Block [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1996. – V. 132, № 6. – P. 1133–1149.
213. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family – oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus / F.H. Qiu [et al.] // *EMBO Journal.* – 1988. – №7. – P. 1003-1011.
214. Progenitors of Interstitial cells of Cajal in the postnatal murin stomach / A. Lorincz [et al.] // *Gastroenterology.* – 2008. – V. 134, №4. – P. 1083–1093.
215. Proliferation and differentiation in culture of mast cell progenitors derived from mast cell-deficient mice of genotype W/W^v / T. Suda, J. Suda, S.S. Spicer, M. Ogawa // *J. Cell Physiol.* – 1985. – V. 122, № 2. – P. 187–192.
216. Prosser C.C. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? / C.C. Prosser, R.D. Yen, J. Wu // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 12, № 4. – P. 509–515.
217. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo / E. Lagasse [et al.] // *Nat. Med.* – 2011. – V 6, № 11. – P. 1229–1234.
218. Randall T.D. Characterization of a population of cells in the bone marrow that phenotypically mimics hematopoietic stem cells: resting stem cells or mystery population? / T.D. Randall, I.L. Weissman // *Stem Cells.* – 1998. – V. 16. – P. 38–48.
219. Rathmell J.C. The central effectors of cell death in the immune system / J.C. Rathmell, C.B. Thompson // *Annu. Rev. Immunol.* – 1999. – № 17. – P. 781–828.
220. Recombinant human insulin-like growth factor-I accelerates recovery and reduces catabolism in rats with ischemic acute renal failure / H. Ding, J.D. Kopple, A. Cohen, R. Hirschberg // *J. Clin. Invest.* – 1993. – V. 91, № 5. – P. 2281–2287.

221. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niches require MMP-9 mediated release of kit-ligand / B. Heissing [et al.] // *Cell*. – 2002. – V. 109, № 5. – P. 625–637.
222. Ren X. Stem cell factor and its receptor, c-kit, are important for hepatocyte proliferation in wild-type and tumor necrosis factor receptor-1 knockout mice after 70% hepatectomy / X. Ren, B. Hu, L. Colletti // *Surgery*. – 2008. – V. 143, №6. – P. 790–802.
223. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bonemarrow-derived stem cells / J.S. Duffield [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – V. 115, № 7. – P. 1743–1755.
224. Reule, S. Kidney regeneration and resident stem cells / S. Reule, S. Gupta // *Organogenesis*. – 2011. – V. 7, № 2. – P. 135–139.
225. Ricardo, S.D. Macrophage diversity in renal injury and repair / S.D. Ricardo, H. van Goor, A.A. Eddy // *J. Clin. Invest.* – 2008. – V. 118, № 11. – P. 3522–3530.
226. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases / B. Rodríguez-Iturbe, H. Pons, J. Herrera-Acosta, R.J. Johnson // *Kidney Int.* – 2001. – V. 59, № 5. – P. 1626–1640.
227. Romagnani P. Possible mechanisms of kidney repair / P. Romagnani, R. Kalluri // *Fibrogenesis Tissue Repair*. – 2009. – V. 2, № 1. – P. 1–10.
228. Rönnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-kit / L. Rönnstrand // *Cellular and molecular life sciences*. – 2004. – V. 61, №19-20. – P. 2535–2548.
229. Roskoski R. Jr. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase – the stem cell factor receptor / R.Jr. Roskoski // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2005. – V. 338, № 3. – P. 1307–1315.
230. Scheijen B. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease / B. Scheijen, J.D. Griffin // *Oncogene*. – 2002. – V. 21, № 21. – P. 3314–3333.

231. SDF-1 provides morphological and functional protection against renal ischaemia/reperfusion injury / G. Stokman [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2010. – V. 25, № 12. – P. 3852–3859.

232. Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice / B. Lange-Sperandio, F. Cachat, B.A. Thornhill, R.L. Chevalier // *Kidney Int.* – 2012. – V. 61. – P. 516–524.

233. Sell, S. The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation / S. Sell // *Wound Repair and Regeneration.* – 2001. – V. 9, № 6. – P.467–482.

234. Selzner, M. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway / M. Selzner, P.A. Clavien // *Hepatology.* - 2000. – V. 31, № 1. – P. 35–42.

235. Smith, M.A. Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice / M.A. Smith, C.J. Pallister, J.G. Smith // *Acta haematologica.* – 2001. – V. 105, № 3. – P. 143–150.

236. Smith M.A. Stem cell factor: laboratory and clinical aspects / M.A Smith, E.L. Court, G.J. Smith // *Blood Reviews.* – 2001. – V. 15, №4. – P. 191–197.

237. Soluble c-kit receptor mobilizes hematopoietic stem cells to peripheral blood in mice / Y. Nakamura [et al.] // *Experimental hematology.* – 2004. – V. 32, № 4. – P.390–396.

238. Spatial and temporal mapping of c-kit and its ligand, stem cell factor expression during human embryonic haemopoiesis / M. Teyssier-Le, Discorde, S. Prost, E. Nandrot, M. Kirszenbaum // *Br. J. Haematol.* – 1999. – V. 107, № 2. –P. 247–253.

239. Src family kinases are involved in the differential signaling from two splice forms of c-Kit / O. Voytyuk [et al.] // *Journal of biological chemistry.* – 2003. – V. 278, № 11. – P. 9159–9166.

240. Stem cell factor expression after renal ischemia promotes tubular epithelial survival / G. Stokman [et al.] // *PLoS.* – 2010. – V. 5, № 12. – P. 1–14.

241. Stem cell factor in a rat model of serum nephrotoxic nephritis / M.M. El Kossi, J.L. Haylor, T.S. Johnson, A.M. El Nahas // *Nephron Exp Nephrol.* – 2008. – V. 108, № 1. – P. e1–e10.
242. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor / K.M. Zsebo [et al.] // *Cell.* – 1990. – V. 63, № 1. – P. 213–224.
243. Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy / X. Ren, C. Hogaboam, A. Carpenter, L. Colletti // *The journal of clinical investigation.* – 2003. – V. 112, № 9. – P. 1407–1418.
244. Sternberg E.M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens / E.M. Sternberg // *Nature Rev. Immunol.* – 2006. – V. 6, № 4. – P. 318–328.
245. Strauss-Ayali D. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection / D. Strauss-Ayali, S.M. Conrad, D.M. Mosser // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – V. 82, № 2. – P. 244–252.
246. Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases / H. Liu, X. Chen, P.J. Focia, X. He // *EMBO Journal.* – 2007. – V. 26, № 3. – P. 891–901.
247. Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-kit tyrosine kinase / C.D. Mol [et al.] // *The journal of biological chemistry.* – 2004. – V. 279, № 30. – P. 31655–31663.
248. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver / E. Wisse [et al.] // *Toxicol. Pathol.* – 1996. – V. 24, № 1. – P. 100–111.
249. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response / C. Sunderkotter [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – V. 172, № 1. – P. 4410–4417.
250. Tacke F. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets / F. Tacke, G.J. Randolph // *Immunobiology.* – 2006. – V. 211, № 6-8. – P. 609–618.

251. Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages / A. Zhao [et al.] // *Gastroenterology*. – 2008. – V. 135, № 1. – P. 217–225.
252. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis / F.P. Russo [et al.] // *Gastroenterology*. – 2006. – V. 130, № 6. – P. 1807–1821.
253. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting / G.J. Randolph, G. Sanchez-Schmitz, R.M. Liebman, K. Schäkel // *J. Exp. Med.* – 2002. – V. 196, № 4. – P. 517–527.
254. The expression of mesenchymal, neural and haematopoietic stem cell markers in adult hepatocytes proliferating in vitro / S. Koenig [et al.] // *J. Hepatol.* – 2006. – V. 44, № 6. – P. 1115–1124.
255. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells / X. Wang [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*. – 2003. – V. 100, № 1. – P. 11881–11888.
256. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus / B. Chabot [et al.] // *Nature*. – 1988. – V. 335. – P. 88–89.
257. The radioresistance biological function of the SCF/kit signaling pathway is mediated by the zinc-finger transcription factor Slug / J. Perez-Losada [et al.] // *Oncogene*. – 2003. – V. 22, № 27. – P. 4205–4211.
258. The role of Kupffer cells in liver regeneration / T. Takeishi [et al.] // *Arch. Histol. Cytol.* – 1999. – V. 62, № 5. – P. 413–422.
259. The role of stem cells in physiology, pathophysiology, and therapy of the liver / A.D. Sharma, T. Cantz, M.P. Manns, M. Ott // *Stem Cell Reviews*. – 2006. – V.2, № 1. – P. 51–58.
260. Thomson A.W. Immunopharmacology of the macrophage-toxic agent carrageenan / A.W. Thomson, E.F. Fowler, R.G. Pugh-Humphreys // *Int. J. Immunopharmacol.* – 1979. – V. 1, № 4. – P. 247–261.

261. Thorgeirsson S.S. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence / S.S. Thorgeirsson, J.W. Grisham // *Journal of Hepatology*. – 2006. – V. 43, № 1. – P. 2–8.
262. Thorgeirsson S.S. Hepatic stem cells in liver regeneration / S.S. Thorgeirsson // *The FASEB Journal*. – 1996. – V. 10, № 11. – P. 1249–1256.
263. Tissue LyC6- Macrophages Are Generated in the Absence of Circulating LyC6- Monocytes and Nur77 in a Model of Muscle Regeneration / T. Varga [et al.] // *J. Immunol.* – 2013. – V. 191, № 11. – P. 5695–5701.
264. Transforming growth factor alpha (TGF alpha) concentrations increase in regenerating rat liver: Evidence for a delayed accumulation of mature TGF alpha / W.E. Russell [et al.] // *Endocrinology*. – 1993. – V. 133, № 4. – P. 1731–1738.
265. Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen 1 / C.H. Jensen [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 2004. – V. 164, № 4. – P. 1347–1359.
266. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice / F. Ishikawa // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2003. – V. 996. – P. 174–185.
267. Tumor necrosis factor induces matrix metalloproteinases in cardiomyocytes and cardiofibroblasts differentially via superoxide production in a PI3Kgamma-dependent manner / A.E. Awad [et al.] // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. – 2010. – V. 298, № 3. – P. 679–692.
268. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat / E.M. Webber, J. Bruix, R.H. Pierce, N. Fausto // *Hepatology*. – 1998. – V. 28, № 5. – P. 1226–1234.
269. Tumor necrosis factor stimulates matrix metalloproteinase 9 secretion from cultured human chorionic trophoblast cells through TNF receptor 1 signaling to IKBKB-NFKB and MAPK1/3 pathway / W. Li, H. Li, A.D. Bocking, J.R. Challis // *Biology of Reproduction*. – 2010. – V. 83, № 3. – P. 481–487.

270. Uchida N. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1low Lin- Sea-1 + cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow / N. Uchida, I.L. Weissman // *J. Exp. Med.* – 1992. – Vol. 175. – P. 175 – 184.
271. Use of mouse hematopoietic stem and progenitor cells to treat acute kidney injury / L. Li [et al.] // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2012. – V. 302, № 1. – P. 9–19.
272. Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells / J. Kanellis, S. Fraser, M. Katerelos, D.A. Power // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2000. – V. 278, № 6. – P. F905–F915.
273. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury / F. Tögel [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2007. – V. 292, № 5. – P. 1626–1635.
274. Vrba J. Oxidative burst of Kupffer cells: target for liver injury treatment / J. Vrba, M. Modrianský // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* – 2002. – V. 146, № 2. – P. 15–20.
275. Wang Y. Macrophages in renal disease / Y. Wang, D.C. Harris // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2011. – V. 22, № 1. – P. 21–27.
276. Yokote S. De novo kidney regeneration with stem cells / S. Yokote, S. Yamanaka, T. Yokoo // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2012.
277. Yoshida M. Regeneration of injured renal tubules / M. Yoshida, S. Honma // *J. Pharmacol. Sci.* – 2014. – V. 124, № 2. – P. 117–122.
278. Zhang Z.J. Essential role of stem cell factor signaling in primary sensory neuron development / Z.J.Zhang, M. Sieber-Blum // *Developmental neuroscience.* – 2011. – V. 31, № 3. – P. 202–211.
279. Zhuang, S. Requirement of the epidermal growth factor receptor in renal epithelial cell proliferation and migration / S. Zhuang, Y. Dang, R.G. Schnellmann // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2004. – V. 287, № 3. – P. F365–F372.
280. Ziegler-Heitbrock, H.W. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood / H.W. Ziegler-Heitbrock, B. Passlick, D. Flieger // *Hybridoma.* – 1988. – V. 7, № 6. – P. 521–527.