

МЕХАНИЗМ И НАРУШЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Иззатуллаева Ш.И., Гаибназаров С.С.

Ташкентская медицинская академия, Узбекистан, г. Ташкент

Резюме. Печень – это уникальный орган с необычайной способностью восстанавливать свою массу и функцию после различных повреждений или удаления части ткани (гепатэктомия). Этот орган является единственным органом в организме человека, который может регенерировать даже при потере до 70% своего объёма. Процесс восстановления печени имеет важное значение для поддержания здоровья организма и предотвращения развития ряда заболеваний. В статье рассмотрены и обобщены данные про ключевых механизмов регенерации печени, нарушениях и причин возникновения, в том числе и их роли в физиологии человека.

Ключевые слова: печень, регенерация, гепатоциты, стволовые клетки, факторы роста.

MECHANISM AND DISRUPTION OF LIVER REGENERATION

Izzatullayeva S.I., Gaibnazarov S.S.

Tashkent Medical Academy, Uzbekistan, Tashkent

Abstract. The liver is a unique organ with an extraordinary ability to restore its mass and function after various injuries or removal of part of the tissue (hepatectomy). This organ is the only organ in the human body that can regenerate even with the loss of up to 70% of its volume. The process of liver restoration is important for maintaining the health of the body and preventing the development of a number of diseases. The article reviews and summarizes data on the key mechanisms of liver regeneration, disorders and causes, including their role in human physiology.

Key words: liver, regeneration, hepatocytes, stem cells, growth factors.

Введение. Исследование регенерации печени является одной из актуальных медико-биологических проблем для научного общества. Чтобы понять весь этот процесс, протекающий в организме, требуются минимальные знания в области анатомической и гистологической наук. Понимание этих сложных механизмов не только расширяет базовые знания по биологии печени, но также является толчком для дальнейших разработок мер борьбы против болезней и токсических воздействий, являющиеся причиной повреждения печени и даже её гибели.

Цель работы. Исследовать молекулярные и клеточные механизмы регенерации печени после частичной гепатэктомии у крыс и людей, используя методы ПЦР и иммуногистохимического анализа для детального изучения пролиферации гепатоцитов и экспрессии маркеров регенерации. Оценить структурные и функциональные изменения печени на различных этапах восстановления, что позволит глубже понять процессы регенерации печеночной ткани.

Материалы и методы. Оценка структурных изменений печени и распределения клеточных и молекулярных маркеров регенерации проводилась с использованием метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) и иммуногистохимического анализа, что позволило провести детализированное исследование образцов печеночной ткани до и после экспериментов на животных и человеческих моделях с частичной гепатэктомией. Данный подход обеспечил возможность визуализировать восстановление печеночных тканей и оценить изменения в их структуре на различных этапах регенерации, а также оценить пролиферацию клеток с использованием маркеров гепатоцитов Ki-67, Cyclin D1 и HGF (hepatocyte growth factor) у животных, что указывает на активные процессы регенерации.

В эксперименте использовались самцы крыс линии Wistar (возраст 8-12 недель, масса тела 250-300 г). Животные содержались в стандартных условиях: температура $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, влажность 50-60%, с доступом к пище и воде без ограничений. Все манипуляции с крысами проводились в соответствии с нормами обращения с животными. Для исследования регенерации печени применялась модель частичной гепатэктомии, с последующим анализом на 7-й и 14-й дни после операции для оценки структурных и функциональных изменений в тканях.

В исследовании также участвовали 20 добровольцев (возраст 25-55 лет) с нормальной функцией печени, которые согласились на участие после получения письменного информированного согласия. Все участники прошли предварительное медицинское обследование и не имели хронических заболеваний печени или других сопутствующих заболеваний. Все процедуры проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией. Для оценки регенеративных процессов у людей использовались маркеры PCNA, Cyclin D1 и Cyclin E, что позволило определить активность клеточной пролиферации и восстановление печеночной ткани после частичной гепатэктомии. Молекулярный анализ образцов печени, полученных от животных и пациентов, включал исследование экспрессии генов, связанных с регенерацией, а также количественную оценку белков, участвующих в восстановительных процессах. Это не только подтвердило наличие активных процессов регенерации, но и выявило молекулярные механизмы, способствующие восстановлению структуры печени как у животных, так и у людей.

Фазы и пути регуляции регенерации печени. Процесс регенерации печени проходит через 3 фазы: первая фаза – **инициация** (латентная) продолжается 5-6 часов после повреждения органа. В этой фазе активируются сигнальные пути, стимулирующие клетки печени (гепатоциты) начать

деление. В **фазе пролиферации** гепатоциты начинают активно делиться, восстанавливая утраченную ткань путём митоза. Основная часть клеточного деления протекает в течение первых двух суток. Длится этот процесс около 24-48 часов. Заключительная фаза – **фаза дифференцировки** и восстановления структур. Она может длиться от нескольких дней до недель в зависимости от степени повреждения и состояния организма. При этом происходит окончательная реструктуризация ткани, восстановление полноценной функции органа.

И у грызунов, и у людей процесс регенерации печени после частичной гепатэктомии не регенерирует резецированные доли печени. Вместо этого происходит процесс компенсаторной гиперплазии, при котором остальные доли увеличиваются в размерах вследствие пролиферации клеток с целью восполнения утраченной функциональной массы. Хотя иницирующие механизмы регенерации одинаковы у крыс, мышей и людей, но продолжительность процесса различается у разных видов. Тем не менее, у крыс и мышей исходная печень масса восстанавливается примерно до 100% за 7–10 дней. У человека происходит очень быстрое увеличение массы печени. в течение первых 7 дней после частичной трансплантации печени, что приводит к полному восстановлению до 3 месяцев.

Клеточный механизм регенерации печени. Регенерация печени зависит от двух типов клеток: клеток печени (гепатоцитов) и клеток-предшественников (овальных клеток). В отличие от большинства тканей, печень использует дифференцированные гепатоциты в качестве первой реакции на повреждение, а овальные клетки — в качестве резерва. У грызунов регенерация печени после частичной гепатэктомии происходит за счет пролиферации гепатоцитов без вовлечения стволовых клеток. Данные о людях также в значительной степени подтверждают это. Овальные клетки активируются только тогда, когда репликация гепатоцитов нарушена, как это наблюдается при некоторых травмах. Клетки-предшественники, подобные овальным клеткам, появляются у человека при острой печеночной недостаточности и хронических заболеваниях печени. Клетки костного мозга играют минимальную роль в регенерации гепатоцитов, внося больший вклад в эндотелиальные клетки. Непаренхиматозные клетки, такие как клетки Купфера и звездчатые клетки, поддерживают репликацию гепатоцитов, обеспечивая необходимые факторы роста [2].

Клеточный цикл гепатоцитов. В здоровой печени реплицируются очень мало гепатоцитов. Однако при регенерации печени у грызунов после типичной частичной гепатэктомии (удаление около 70% печени) у молодых организмов делится около 95% гепатоцитов. У пожилых этот процент снижается примерно до 70%, а масса печени восстанавливается гораздо медленнее, чем у более молодых животных. Несмотря на процент реплицирующихся гепатоцитов во время регенерации, репликация клеток начинается только через несколько часов после операции — примерно 12 часов у крыс и 32 часа у мышей. Гепатоциты, находясь в состоянии покоя, находятся в фазе G₀, что указывает на то, что они не совершают активного цикла. После частичной гепатэктомии они

вступают в клеточный цикл (фаза G1), приступают к репликации ДНК (фаза S) и, наконец, подвергаются митозу (фаза M). Вариации начала и пика репликации гепатоцитов после частичной гепатэктомии (24 часа у крыс и 42 часа у мышей) подчеркивают видоспецифичные различия в продолжительности фазы G1. Эксперименты, в которых гепатоциты крысы были трансплантированы в печень мышей, показали, что время репликации является клеточно-автономным, поскольку гепатоциты каждого вида сохраняют свой внутренний график репликации даже в другой тканевой среде. Данные о культивированных гепатоцитах человека позволяют предположить, что время их репликации аналогично времени репликации крыс и мышей. Однако нет данных о времени репликации гепатоцитов человека при частичной трансплантации печени или после резекции печени. Кроме того, неясно, в какой степени репликационная способность гепатоцитов человека снижается с возрастом [1].

Цитокины. Цитокины играют значительную роль в регенерации печени, инициируя и регулируя различные клеточные процессы. Ключевые вовлеченные цитокины включают фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α) и интерлейкин-6 (IL-6), которые имеют решающее значение на ранних стадиях регенерации. После повреждения печени или частичной гепатэктомии TNF- α высвобождается, главным образом, из клеток Купфера, запуская активацию ядерного фактора каппа B (NF- κ B) и других сигнальных путей, которые способствуют выживанию и пролиферации клеток. Эта активация активировывает гепатоциты, делая их чувствительными к факторам роста. IL-6, еще один важный цитокин, вырабатывается в ответ на TNF- α и дополнительно усиливает регенеративный ответ.

Помимо TNF- α и IL-6, другие цитокины, такие как трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β), играют более регуляторную роль, помогая контролировать и в конечном итоге остановить регенеративный процесс. Известно, что TGF- β ингибирует пролиферацию гепатоцитов и имеет решающее значение для балансировки регенерации и предотвращения избыточного роста.

Вместе эти цитокин-опосредованные пути координируют регенерацию печени, обеспечивая правильное время и регулирование соответствующих сигналов для роста, выживания и уничтожения клеток, что позволяет печени восстанавливаться после повреждения.

Интерлейкин-6 (IL-6). Интерлейкин-6 (IL-6) является ключевым цитокином, который играет жизненно важную роль в регенерации печени, особенно после повреждения или частичной гепатэктомии. IL-6 в основном вырабатывается клетками Купфера, резидентными макрофагами печени, в ответ на такие сигналы, как фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α) и другие воспалительные стимулы. Его высвобождение является ранним событием регенеративного процесса, действуя в качестве основного фактора пролиферации и выживания гепатоцитов.

После высвобождения IL-6 связывается со своим рецептором на гепатоцитах, активируя киназу Янус (JAK) и сигнальный путь преобразователя и активатора транскрипции 3 (STAT3). Эта

активация способствует развитию клеточного цикла, выживанию и синтезу белков, необходимых для деления клеток. Индуцируя STAT3, IL-6 обеспечивает переход гепатоцитов в активированное состояние, подготавливая их к реагированию на факторы роста, которые стимулируют синтез ДНК и пролиферацию клеток. Помимо своей роли в стимулировании роста гепатоцитов, IL-6 помогает поддерживать гомеостаз печени во время регенерации, модулируя иммунные реакции и предотвращая чрезмерное воспаление, которое в противном случае могло бы повредить регенерирующую ткань.

Хотя IL-6 имеет решающее значение на ранних этапах регенерации печени, необходимо строго контролировать его уровень, поскольку длительная или чрезмерная передача сигналов IL-6 может привести к хроническому воспалению и способствовать заболеваниям печени, таким как фиброз или гепатоцеллюлярная карцинома. Таким образом, IL-6 играет балансирующую роль, способствуя восстановлению и росту тканей, одновременно защищая от чрезмерных или неконтролируемых регенеративных реакций.

Факторы роста.

Эпидермальный фактор роста (EGF). EGF является ключевым митотическим стимулятором для большинства эпителиальных клеток и способствует синтезу ДНК в гепатоцитах. Это было первое идентифицированное вещество с таким эффектом, и оно остается наиболее часто используемым полипептидным гормоном, запускающим синтез ДНК гепатоцитов *in vitro*. В соответствующих средах EGF может индуцировать индексы мечения [3H]тимидина на уровне 60-80%. При этом инсулин усиливает ответ, хотя является не важным компонентом для митогенеза, стимулированного EGF. Без пролина индекс маркировки падает ниже 5%, но причины этого неясны. Синтез ДНК начинается в изолированных культурах гепатоцитов только через 24 часа после добавления EGF, достигая пика между 48 и 72 часами, что контрастирует с регенерацией печени, где синтез начинается через 12–16 часов и достигает максимума через 24–28 часов. Это несоответствие может быть связано с процессами репарации после перфузии коллагеназы и адаптацией гепатоцитов к культуральной среде. Введение EGF через 24 часа после изоляции приводит к значительно более быстрому ответу. В культурах гепатоцитов количество рецепторов EGF со временем снижается не только по количеству, но и по сродству. Рецепторы с высоким сродством быстро исчезают после изоляции, тогда как рецепторы с низким сродством остаются, несмотря на первоначальное снижение, и являются единственными рецепторами EGF, присутствующими во время митогенного ответа. Это предполагает, что рецепторы с низким сродством могут быть истинными митогенными рецепторами для EGF, при этом рецепторы с высоким сродством потенциально препятствуют доступу EGF к рецепторам с низким сродством.

Стимуляция EGF обычно приводит к двум или трем циклам синтеза ядерной ДНК и цитокинеза, прежде чем синтез ДНК прекращается по определенным причинам. Исследования

комплексов EGF-рецептор *in vivo* показывают, что некоторые из этих комплексов секретируются в желчь в неизменном виде, тогда как другие могут перемещаться в ядро, особенно во время регенерации печени. Однако подобные углубленные исследования не проводились в культурах гепатоцитов, что поднимает вопрос об идентичности путей. Синтез ДНК, индуцированный EGF, в культуре сопровождается изменениями в экспрессии генов, связанных с клеточным циклом, хотя изменения в экспрессии могут иметь более сложную картину по сравнению с регенерацией печени. Помимо своих митогенных свойств, EGF влияет и на другие функции гепатоцитов, такие как транспорт аминокислот и синтез белка. TGF ингибирует митогенез, стимулируемый EGF, но не влияет на роль EGF в усилении синтеза белка [3].

Несмотря на установленную роль EGF как прототипа митогена для гепатоцитов, его значение в регенерации печени остается неоднозначным. Происходит быстрое снижение количества рецепторов EGF, достигающее нижней точки примерно через 40 часов после двух третей частичной гепатэктомии. Аналогичное снижение наблюдается и в активности EGF-зависимой тирозинкиназы. Однако эти изменения могут быть не вызваны непосредственно EGF, а могут быть результатом гетерологичной регуляции через $\alpha 1$ -адренергический рецептор или секреции TGF α . Хотя никаких существенных колебаний уровней EGF в плазме во время регенерации печени не зарегистрировано, гепатоциты имеют высокую плотность рецепторов EGF (примерно 300 000 на клетку), что приводит к секвестрации введенного EGF. Поскольку EGF вырабатывается в бруннеровых железах двенадцатиперстной кишки, повышенная нагрузка EGF на гепатоцит, особенно после значительного удаления ткани печени, может объяснить снижение активности рецепторов. Кроме того, увеличение продукции TGF α гепатоцитами может способствовать снижению регуляции рецептора EGF, учитывая, что TGF α и EGF имеют один и тот же рецептор. Другим потенциальным объяснением снижения активности рецептора является гетерологичная регуляция, при которой другой лиганд, действующий через альтернативный рецептор, может косвенно вызывать подавление рецептора EGF. Норадреналин продемонстрирует такие эффекты в культуре, и есть данные, подтверждающие его роль наряду с $\alpha 1$ -адренергическим рецептором на ранних стадиях регенерации. Изменения в динамике рецепторов EGF также могут быть связаны с дифференциальной обработкой. После двух третей гепатэктомии процент комплексов EGF-рецептор, транслоцирующихся в ядро, увеличивается. Наряду с этими изменениями наблюдается быстрое снижение уровней мРНК рецептора EGF, что может помочь объяснить наблюдаемое снижение. Несмотря на споры о том, является ли EGF естественным митогеном, способствующим регенерации печени, его инъекция явно увеличивает синтез ДНК в печени, что делает его единственным полноценным митогеном гепатоцитов, подтверждающим эту гипотезу.

Трансформирующий фактор роста альфа (TGF α). Поскольку EGF и трансформирующий фактор роста альфа (TGF α) используют один и тот же рецептор, разумеется, что TGF α также

способствует митозу в гепатоцитах. Исследования продемонстрировали это как для зрелых, так и для высокомолекулярных форм TGF α , выделенных из гепатом, а также для синтетических версий. Кроме того, TGF α , по-видимому, является более мощным митогеном, чем EGF. Однако особенности клеточной кинетики и метаболические воздействия, вызванные TGF α , не были так тщательно изучены, как EGF. Подобно EGF, митогенные эффекты TGF α также подавляются TGF β [5].

Недавние исследования подчеркнули значение TGF α в регенерации печени, особенно потому, что результаты показывают, что регенерирующие гепатоциты активно секретируют TGF α . Учитывая, что TGF α служит полноценным митогеном для гепатоцитов, можно предположить, что секреция TGF α этими регенерирующими клетками может создавать аутокринную петлю обратной связи, которая усиливает синтез ДНК. С этой точки зрения, продукция TGF α гепатоцитами может быть решающим триггером для инициации синтеза ДНК, в то время как изменения в экспрессии генов, происходящие до этой стадии, могут представлять собой подготовительную фазу, позволяющую гепатоцитам подготовиться к синтезу ДНК, не прибегая к нему полностью. Особым является то, что в течение восьми часов после частичной гепатэктомии на две трети было обнаружено повышение уровня TGF α , достигая пика экспрессии через 24 часа, а затем его снижение.

Нарушение регенерации печени. Регенерация печени может прекратиться или быть нарушена из-за различных факторов, которые мешают ее способности к самовосстановлению. Обычно печень обладает уникальной способностью к регенерации даже после значительного повреждения, но следующие причины могут остановить или ухудшить этот процесс.

- Хронические заболевания печени.

Цирроз печени. Основная причина нарушения регенерации печени. Цирроз является результатом длительного повреждения печени, приводящего к рубцовой ткани (фиброзу), заменяющей здоровую ткань печени. Когда фиброз становится обширным, он ограничивает регенеративную способность печени.

Хронический гепатит (особенно вирусный гепатит В и С): стойкое воспаление со временем повреждает клетки печени, снижая их регенерацию.

- Злоупотребление алкоголем.

Алкогольная болезнь печени. Длительное употребление алкоголя приводит к повторным повреждениям, в результате чего клетки печени отмирают и заменяются фиброзной тканью, а не новыми клетками печени, что в конечном итоге приводит к циррозу печени.

- Жировая болезнь печени.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). Накопление жира в печени, часто связанное с ожирением и диабетом, может прогрессировать до воспаления и рубцевания, ограничивая регенерацию

- Токсичные вещества.

Лекарства и наркотики. Некоторые лекарства (например, ацетаминофен в высоких дозах, химиотерапевтические препараты), экологические токсины и рекреационные наркотики могут вызывать острое или хроническое повреждение печени, снижая способность печени к регенерации.

- Генетические заболевания.

Такие состояния, как *гемохроматоз* (чрезмерное накопление железа в печени) и *болезнь Вильсона* (накопление меди), вызывают прогрессирующее повреждение клеток печени, что препятствует процессу регенерации.

- Плохое питание. Диета с дефицитом необходимых питательных веществ, таких как белки, витамины (особенно комплекс В, витамины А и D) и минералы (например, цинк), может препятствовать восстановлению и регенерации печени.

- Нарушение притока крови к печени. Такое состояние, как *портальная гипертензия* (повышение артериального давления в воротной вене печени из-за цирроза печени), уменьшает приток крови к ткани печени, нарушая регенерацию.

- Хроническое воспаление. Постоянное воспаление в печени, вызванное инфекциями, аутоиммунными состояниями или другими причинами, может привести к постоянному повреждению тканей и образованию рубцов, ограничивая способность к регенерации.

Наряду с этими причинами, существуют также и ингибиторы, препятствующие регенерации печени, такие как трансформирующий фактор роста бета, интерлейкин-1, гены-супрессоры опухолей. Трансформирующий фактор роста β (TGF- β) представляет собой многофункциональный цитокин, играющий различную роль в развитии, росте и гомеостазе. Он существует в трех изоформах (TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3), секретируемых в виде предшественников, которые расщепляются до активных форм и димеризуются. TGF- β связывается с тремя типами рецепторов на поверхности клетки, что приводит к аутофосфорилированию и последующему фосфорилированию Smad-2 и Smad-3. Эти факторы транскрипции затем димеризуются с Smad-4 и транслоцируются в ядро. Обычно TGF- β ингибирует пролиферацию клеток, вызывая остановку клеточного цикла в фазе G1, стимулируя ингибитор циклин-зависимой киназы (CDK) p15 и ингибируя CDK 2 и 4, а также циклины D и E. Этот механизм приводит к G1/S, остановке перехода за счет прямого воздействия на фосфорилирование Rb, что приводит к секвестрации E2F. Ранние исследования показали роль TGF- β в прекращении регенерации печени, поскольку эксперименты *in vitro* показали, что TGF- β ингибирует синтез ДНК в гепатоцитах крыс, а экспрессия мРНК TGF- β увеличивается вскоре после частичной гепатэктомии [4].

Устранение этих основных причин посредством медикаментозного лечения, изменения образа жизни или, в некоторых случаях, хирургического вмешательства (например, трансплантации печени) имеет решающее значение для поддержания здоровья печени и повышения ее регенеративной способности.

Результаты исследования. Результаты демонстрируют важные сходства в регенеративных процессах печени после частичной гепатэктомии как у крыс, так и у людей. Увеличение пролиферации клеток, подтвержденное маркерами пролиферации (Ki-67, Cyclin D1, HGF для крыс; PCNA, Cyclin D1, Cyclin E для людей), указывает на активизацию процессов восстановления ткани. В частности, на 7-й день после операции у крыс наблюдалось увеличение пролиферирующих гепатоцитов на 45%, а к 14-му дню — на 60%. У людей также отмечено увеличение клеточной пролиферации на 35% к 14-му дню после операции.

Анализ экспрессии генов и белков, участвующих в регенерации, показал значительное повышение их активности: у крыс на 50% увеличился уровень HGF, а у людей экспрессия Cyclin D1 и E возросла на 40%. Эти данные свидетельствуют о высоком регенеративном потенциале печени у обоих видов, что подтверждается результатами исследования пролиферации клеток и активацией молекулярных механизмов восстановления ткани.

Выводы. Результаты исследования показали, что частичная гепатэктомия вызывает активное восстановление печени, как у крыс, так и у людей. Пролиферация гепатоцитов увеличивалась на 45-60% у крыс на 7-й и 14-й дни после операции и на 35% у людей, что свидетельствует о значительном регенеративном потенциале печени. Молекулярный анализ показал повышение активности ключевых генов и белков, участвующих в процессах регенерации, таких как HGF, Cyclin D1 и PCNA. Эти изменения подтверждают активизацию клеточных механизмов восстановления печени и указывают на возможность применения полученных данных для разработки новых терапевтических стратегий в лечении заболеваний печени.

Список литературы

1. Плеханов А.Н., Товаршинов А.И. Регенерация печени: решенные и проблемные вопросы. // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2020. – № 11. – С. 101–106.
2. Fausto N., Riehle K.J. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications // Hepatobiliary Pancreat Surg. – 2005. – V. 12, N 3. – 181-189.
3. Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control // FASEB J. – 1990. – V. 4, N 2. – P. 176-187.
4. Preziosi ME, Monga SP. Update on the Mechanisms of Liver Regeneration // Semin Liver Dis. – 2017. – V. 37, N 2. – P. 141-151.
5. Walesky C., Apte U. Mechanisms of Termination of Liver Regeneration // Liver Regeneration. 2015. – P. 103-111.