

На правах рукописи



ЗАЙКИНА ЭЛЬВИРА ИЛЬДАРОВНА

**ФЕНОТИП ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЗВЁЗДЧАТЫХ
КЛЕТОК ПЕЧЕНИ *IN VITRO* И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ
ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КРЫСАМ, ПЕРЕНЁСШИМ
ЧАСТИЧНУЮ ГЕПАТЭКТОМИЮ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Казань-2019

Работа выполнена на кафедре морфологии и общей патологии Центра медицины и фармации Высшей школы медицины и в НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии» научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: **Киясов Андрей Павлович,**
доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант: **Ризванов Альберт Анатольевич,**
доктор биологических наук, профессор

Официальные
оппоненты: **Ельчанинов Андрей Владимирович,**
доктор медицинских наук, заведующий лабораторией регенеративной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва)

Шурыгина Оксана Викторовна,
доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры гистологии и эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Самара)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. Е. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва)

Защита диссертации состоится «27» ноября 2019г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета КФУ 03.06 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 76, в зале заседания ученого совета (ауд.208).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете

Автореферат разослан «___» _____ 2019г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
д.б.н., профессор



Т.А. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Лечение заболеваний печени различной этиологии – чрезвычайно актуальная проблема современной медицины. Смертность от болезней печени и желчевыводящих путей входит в первую десятку среди всех причин смерти и лидирует по этому показателю в гастроэнтерологии, что свидетельствует о недостаточной изученности процессов, происходящих в печени при этих патологиях. Несмотря на определённые успехи, существующие методы терапии данных заболеваний остаются недостаточно эффективными, что приводит к высокой частоте развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы в их исходе. Единственным методом лечения в таком случае становится трансплантация печени, однако большие листы ожидания ввиду дефицита донорских органов, высокая стоимость трансплантации и необходимость последующей иммуносупрессивной терапии (Lorenzini et al., 2007) делают данный вид лечения не всегда доступным, поэтому очевидна необходимость поиска новых подходов к лечению этой группы заболеваний. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных путей решения этой проблемы является разработка методов генной и клеточной терапии с использованием стволовых клеток.

Поскольку гипотеза о звёздчатых клетках печени (ЗКП) как её стволовых/прогениторных клетках находит всё больше подтверждений в исследованиях различных учёных (Vassy, 1993; Kiassov et al., 1995; Киясов и др., 1997; Гумерова и др., 2007; Kordes et al., 2007; Colletti, 2009; Люндуп и др., 2010; Гумерова, 2010; Liu, 2015), возникает закономерный вопрос о возможности трансплантации этих клеток для восстановления печени после её повреждений различной природы. Известно, что среди четырёх типов синусоидных клеток печени именно ЗКП оказывают важное паракринное влияние на дифференцировку и физиологические функции эпителиальных клеток печени, однако их значение в патологии на сегодняшний день недостаточно изучено. Известно, что ЗКП играют важную роль в процессе дифференцировки гепатоцитов и холангиоцитов в ходе пренатального развития (Vassy, 1993; Kiassov et al., 1995; Киясов и др., 1997; Гумерова, 2007) и участвуют в восстановлении клеток паренхимы в процессе регенерации печени за счёт выработки макромолекул межклеточного матрикса и различных факторов роста (Kim et al., 1997), при этом закономерности течения регенераторного процесса в настоящий момент детально не исследованы. Одними из наиболее изученных факторов, продуцируемых ЗКП, являются фактор роста гепатоцитов (HGF) и фактор роста фибробластов 4 (FGF4). Известно, что в процессе эмбриогенеза печени именно данные факторы роста являются ключевыми для дифференцировки клеток-предшественниц в эпителиальные клетки печени (гепатоциты и холангиоциты). HGF является митогеном для гепатоцитов, активирует синтез ДНК при их повреждении (Gohda et al., 1986, 1988) и необходим для нормального развития эпителиальных клеток печени, их выживания, пролиферации и миграции (Weidner et al., 1991; Birchmeier, 1998; Corson et al., 2003).

В свою очередь, FGF4 играет важную роль в спецификации энтодермы (Corson et al., 2003; Wells et al., 2000; Шафигуллина, 2013). Таким образом, закономерно предположить, что за счёт увеличения концентрации именно этих факторов роста (HGF и FGF4) можно стимулировать регенерацию печени в случае её повреждения. Однако возникает вопрос: как повысить концентрацию данных факторов? Одним из подходов может стать трансплантация в печень клеток, гиперэкспрессирующих факторы роста HGF и FGF4, причём именно тех клеток, которые постоянно присутствуют в печени и способны экспрессировать эти факторы. В частности, в качестве таких клеток могут быть использованы ЗКП. Более того, в работах нашей лаборатории была показана способность самих ЗКП приобретать морфологию и фенотипические характеристики гепатоцитоподобных клеток при их культивировании в среде с добавлением факторов роста HGF, FGF4 (Шафигуллина, 2013), что свидетельствует также о возможности аутокринной регуляции дифференцировки ЗКП.

Одним из наиболее перспективных методов, позволяющих получать генетически модифицированные клетки, экспрессирующие терапевтические факторы, является перенос генов в клетку с помощью вирусных векторов, среди которых наиболее изученным и распространённым является аденовирус 5 серотипа (Ad5). Данный вектор способен эффективно трансдуцировать делящиеся и неделящиеся клетки с последующим высоким уровнем экспрессии трансгенов (Черенкова и др., 2014; Елифанова и др., 2017). На сегодняшний день нет работ, в которых проводилось бы изучение влияния аденовирусной конструкции Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, несущей гены факторов роста HGF и FGF4, на фенотип и свойства самих ЗКП. Также неизвестно, какой эффект будут оказывать такие генетически модифицированные ЗКП на процесс регенерации печени. Будут ли ЗКП дифференцироваться в гепатоциты, способствуя восстановлению печени, или основным направлением их дифференцировки станет трансдифференцировка в миофибробласты с последующим фиброзированием органа?

Исходя из этого, **целью** нашей работы стало изучение фенотипа звёздчатых клеток печени, генетически модифицированных с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, несущего в своём составе гены факторов роста HGF и FGF4, *in vitro* и их влияния на регенерацию печени после трансплантации крысам, перенёвшим частичную гепатэктомию.

Задачи:

1. Оценить эффективность аденовирусной трансдукции звёздчатых клеток печени рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP;
2. Изучить влияние трансдукции звёздчатых клеток печени рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP на их фенотип в условиях *in vitro*;
3. Оценить способность генетически модифицированных с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP звёздчатых клеток печени мигрировать и встраиваться в паренхиму печени после трансплантации крысам, перенёвшим частичную гепатэктомию;

4. Изучить влияние трансдукции звёздчатых клеток печени рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP на их фенотип и пути дифференцировки в условиях *in vivo* после трансплантации крысам, перенёсшим частичную гепатэктомию;
5. Изучить влияние трансплантации звёздчатых клеток печени, генетически модифицированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, на регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии;
6. Установить возможность развития фиброза после трансплантации звёздчатых клеток печени, генетически модифицированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, крысам, перенёсшим частичную гепатэктомию.

Научная новизна

В работе впервые был применён рекомбинантный аденовирус Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, несущий гены факторов роста HGF и FGF4, для генетической модификации ЗКП. Было показано, что применение данного вектора позволяет получить порядка 95 % генетически модифицированных ЗКП, экспрессирующих факторы роста HGF и FGF4.

Новыми следует признать данные о том, что при культивировании ЗКП, генетически модифицированных с помощью рекомбинантного вируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, они начинают экспрессировать маркёры, свойственные гепатобластам (цитокератины (ЦК) 18 и 19 и α -фетопроtein (α -ФП)), на более ранних сроках (14-е сутки) по сравнению с ЗКП, которые культивировали в стандартных условиях (21-е сутки). Это свидетельствует о том, что генетическая модификация ЗКП с помощью рекомбинантного вируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP способствует их более ранней дифференцировке в гепатоцитарном направлении *in vitro*.

Безусловным приоритетом обладают сведения, полученные при проведении трансплантации ЗКП, генетически модифицированных с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, несущего гены факторов роста гепатоцитов (HGF) и фибробластов 4 (FGF4), крысам, перенёсшим частичную гепатэктомию (ЧГ). В ходе которой было выявлено, что такие генетически модифицированные ЗКП способны мигрировать из портальной вены, встраиваться в печень и дифференцироваться в гепатоцитарном направлении *in vivo*.

Безусловной новизной обладают сведения, полученные методами иммуногистохимического анализа, о том, что трансплантированные крысам после ЧГ генетически модифицированные ЗКП способны дифференцироваться в гепатоцитарном направлении без трансдифференцировки в миофибробласты, что указывает на низкий риск развития фиброза. Более того, с помощью морфометрического и иммуногистохимического анализа получены доказательства того, что использованная для генетической модификации комбинация терапевтических генов (*hgf* и *fgf4*) усиливает положительное влияние ЗКП на процесс регенерации печени крыс после ЧГ.

Теоретическая и практическая ценность работы

Проведённое исследование имеет несомненный теоретический интерес, поскольку в работе дана фенотипическая характеристика генетически модифицированных ЗКП при культивировании *in vitro* и в условиях *in vivo* после их трансплантации крысам, перенёвшим ЧГ. Теоретически значимым является установление способности генетически модифицированных ЗКП замещать различные клеточные типы в регенерирующей печени крыс. Также полученные данные позволяют оценить и понять закономерности течения регенераторного процесса в печени крыс после ЧГ и трансплантации генетически модифицированных ЗКП. Результаты работы расширяют и углубляют представления о ходе регенерации печени после ЧГ, а также о роли ЗКП в этом процессе. Проведённые исследования способствуют выявлению новых фактов о роли трансплантированных нативных и генетически модифицированных ЗКП в репаративной регенерации печени. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшего изучения процессов регенерации печени и участия ЗКП в этом процессе, а также могут быть внедрены в учебный процесс при изучении дисциплин «Гистология, цитология, эмбриология», «Анатомия», «Методы исследования в биологии и медицине» и «Регенеративная медицина».

Помимо теоретического интереса, проведённые исследования имеют и практическую ценность. Так, в ходе выполнения работы разработаны методические подходы для генетической модификации ЗКП. Данные результаты могут быть использованы для разработки новых методов получения клеток, экспрессирующих и гиперэкспрессирующих факторы роста, а также методик предтрансплантационной модификации ЗКП и, в дальнейшей перспективе, для разработки новых методов терапии заболеваний печени.

Основное положение, выносимое на защиту

Звёздчатые клетки печени, генетически модифицированные с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, способны дифференцироваться в гепатоцитарном направлении как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* после их трансплантации крысам, перенёвшим частичную гепатэктомию. При этом не происходит повышения риска развития фиброза печени.

Достоверность полученных данных

Достоверность полученных данных достигнута использованием достаточного количества образцов для исследования, а также применением современных гистологических и молекулярно-биологических методов, конкретной постановкой задач и их решением с использованием статистического метода.

Апробация работы

Результаты исследований доложены и обсуждены на VI Ежегодном Международном симпозиуме «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (Москва, 2013), IX Международной (XVIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2014), 88-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и

молодых ученых (Казань, 2014), IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и практической медицине» (Казань, 2014), XXIII, XXIV Объединённой Европейской гастроэнтерологической неделе (UEG) (Барселона, 2015; Вена, 2016), 48-й встрече Европейской ассоциации по изучению печени (EASL) (Амстердам, Нидерланды, 2016), Международной конференции «Трансляционная медицина» (Казань, 2016), 51-й встрече Европейской ассоциации по изучению печени (EASL) (Барселона, Испания, 2016), 19-м Международном симпозиуме по изучению синусоидных клеток печени (Голуэй, Ирландия, 2017); 51-й, 52-й ежегодной встрече Европейского общества клинических исследований (ESCI) (Генуя, 2017; Барселона, 2018).

Личное участие диссертанта

Приведённые в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, постановку задач, выбор методов исследования, проведение экспериментов, забор материала для исследования и его обработку, анализ экспериментальных данных. Автор провёл подбор и обзор литературы, определил и применил наиболее адекватные условия проведения экспериментов, методы, позволяющие решить поставленные задачи. Теоретическое обобщение результатов исследования, их анализ и оформление, публикации результатов исследования, формулирование выводов и рекомендаций также проведены лично диссертантом.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований 12-04-97088-р_поволжье_a «Изучение фундаментальных механизмов пластичности и направленной дифференцировки звёздчатых клеток печени для разработки клеточной биомедицинской технологии восстановления гепатоцитов». Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и субсидии, выделенной Казанскому Федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

Публикации результатов исследования

Материалы диссертации нашли отражение в 23 научных публикациях: 8 статей в рецензируемых журналах, которые входят в базу данных Scopus, из них 6 рекомендованы ВАК для публикации результатов научных исследований и 2 статьи в зарубежных изданиях. По материалам диссертации опубликовано 3 тезиса всероссийских и 12 тезисов международных конференций.

Объём и структура диссертации

Работа изложена на 141 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и библиографии, включающей 313 источников. Диссертация содержит 65 рисунков и 3 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 80 крысах-самцах породы Вистар массой 200-300 г. Животных содержали в виварии на стандартном пищевом рационе при свободном доступе к воде в естественном световом режиме. Все исследования проведены с соблюдением принципов биоэтики и одобрены Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 14 от 08.02.2019).

В настоящей работе использованы методы выделения и культивирования клеток, гистологические, иммуноцито- и гистохимические методы, а также молекулярно-биологические методы (ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)).

Выделение ЗКП было проведено методом коллагеназно-пропазовой перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза (Knook et al., 1982; Шафигуллина, 2013). Морфологию и рост ЗКП оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для исследования фенотипа клетки рассевали на покровные стёкла в 24-луночные планшеты по 100×10^3 клеток на лунку.

Генетическую модификацию ЗКП осуществляли путём трансдукции культуры ЗКП двух экспериментальных групп: первой – с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP (ЗКП с Ad5-optHGF-optFGF4-RFP), второй – с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-RFP (ЗКП с Ad5-RFP)¹. В качестве контроля была взята группа ЗКП, культивированная в стандартных условиях (КГ). Для создания рекомбинантных аденовирусных векторов был применён один из методов усиления экспрессии рекомбинантных генов и биосинтеза терапевтических белков – кодонная оптимизация кодирующей последовательности, основанная на вырожденности генетического кода (Черенкова и др., 2014).

Эффективность генетической модификации оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии на микроскопе DM13000B (Leica). Для изучения фенотипа генетически модифицированных ЗКП *in vitro* проводили иммуноцитохимическое (ИЦХ) окрашивание культуры антителами к десмину (D33, Dako) – маркёру ЗКП крысы, α -ГМА (1A4, Dako) – маркёру миофибробластов, ЦК 18 (DC10, Dako) и ЦК 19 (BA17, Dako) – белкам цитоскелета промежуточных филаментов эпителиальных клеток, α -ФП (ab46799, Abcam) – секреторному протеину гепатобластов, Ki-67 (SP6, Abcam) – маркёру пролиферации, C-kit (K45, Invitrogen) – рецептору фактора стволовых клеток, Thy-1 (SC6071, Santa Cruz) – поверхностному гликопротеину, факторам роста HGF (ab83760, Abcam) и FGF4 (ab65974, Abcam), RFP (ab62341, GeneScript) – красному флуоресцентному белку.

¹ Рекомбинантные аденовирусы, использованные в данной работе, собраны в НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии» научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО КФУ. Автор выражает благодарность г.н.с., д.б.н. Ризванову А.А., к.б.н. Гараниной Е.Е., совместно с которыми был выполнен данный фрагмент работы.

Иммуноцитохимическое окрашивание было выполнено стрептавидин-биотиновым методом с применением амплифицирующей системы CSA для антител к C-kit (CD117) и методом меченых полимеров (Novolink Polymer Detection System) для всех остальных антител с использованием коммерческих визуализационных систем тех же производителей.

Для количественной оценки экспрессии генов *hgf*, *α-гма*, *α-фп* была поставлена ПЦР-РВ² по технологии TaqMan со специально синтезированными праймерами. Статистический анализ был проведён в программе Microsoft Excel 2016 с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Для изучения фенотипа генетически модифицированных ЗКП *in vivo* и их влияния на процесс регенерации печени крыс после ЧГ интраоперационно проводили трансплантацию ЗКП в воротную вену крыс-реципиентов³. Первой группе животных вводили ЗКП, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP (ЧГ+ЗКП+Ad5-optHGF-optFGF4-RFP), второй группе животных – ЗКП, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-RFP (ЧГ+ЗКП+Ad5-RFP). Операцию ЧГ проводили под золетил-медитиновым наркозом по методике Хиггенса и Андерсена с небольшими модификациями (Higgins et al., 1931; Газизов, 2009), в ходе которой удаляли 68 % от массы всей печени. Через 1-е, 2-е, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 14-е сутки после трансплантации ЗКП животных выводили из эксперимента под золетил-медитиновым наркозом с помощью последовательной транскардиальной перфузии фосфатно-солевым буфером (PBS) и раствором 10 % забуференного формалина. После эвтаназии у животных извлекали печень, разрезали на кусочки и помещали в 10 % нейтральный формалин на 24 ч.

Заливку образцов в парафин проводили с помощью системы автоматического гистологического процессора для заливки тканей STP 420 ES (Thermo Scientific). Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм получали на роторном микротоме Microm HM 355S (Thermo Scientific). Полученные срезы окрашивали антителами к десмину (D33, Dako), α-ГМА (1A4, Dako), ЦК 18 (DC10, Dako), ЦК 19 (BA17, Dako), α-ФП (ab46799, Abcam), Ki-67 (SP6, Abcam), C-kit (K45, Invitrogen), HGF (ab83760, Abcam), FGF4 (ab65974, Abcam), RFP (ab62341, GeneScript). Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание было выполнено стрептавидин-биотиновым методом с применением амплифицирующей системы LSAB, CSA (для антител к Ki-67 и C-kit) и методом меченых полимеров (Novolink Polymer Detection System) для всех остальных антител с использованием коммерческих визуализационных систем тех же производителей. Для дополнительной визуализации репортерного белка RFP проводили

² Автор выражает благодарность к.м.н. Шафигуллиной А.К., совместно с которой был выполнен данный фрагмент работы.

³ Автор выражает благодарность Мавликееву М.О., Титовой А.А., совместно с которыми был выполнен данный фрагмент работы.

иммунофлуоресцентное окрашивание. Для выявления элементов соединительной ткани образцы печени окрашивали по Маллори.

Для определения количественных изменений (абсолютных и относительных) клеток в печени крысы после ЧГ и введения ЗКП, генетически модифицированных вирусами Ad5-optHGF-optFGF4-RFP и Ad5-RFP, проводили морфометрическое исследование. Число пролиферирующих гепатоцитов и холангиоцитов выражали в процентах от общего числа просчитанных клеток соответствующего типа. Десмин+ клетки учитывали только в том случае, когда отчетливо было видно ядро и, как минимум один цитоплазматический отросток. Статистический анализ результатов морфометрических исследований проводили с помощью табличного процессора Microsoft Excel 2016 и программного пакета Statistica 12. Для оценки достоверности различий использовали U-критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

На начальном этапе было проведено выделение ЗКП из печени крысы. Подтверждением фенотипа ЗКП служили наличие у 99 % выделенных нами клеток аутофлуоресценции витамина А, характерной морфологии клеток (звёздчатой формы с отростками), а также экспрессии десмина – маркёра, специфичного для ЗКП крысы.

При трансдукции культуры ЗКП первой и второй экспериментальных групп рекомбинантными вирусами Ad5-optHGF-optFGF4-RFP и Ad5-RFP соответственно, мы получили около 95 % генетически модифицированных ЗКП, что было подтверждено флуоресцентной микроскопией. В КГ клеток флуоресценции не было.

Уровень экспрессии HGF в культуре ЗКП с Ad5-optHGF-optFGF4-RFP изменялся несколько раз в течение эксперимента, но всегда оставался выше, чем в культуре ЗКП с Ad5-RFP. Так, уже с 3-х суток эксперимента уровень *hgf* в 1-й культуре ЗКП в 52 раза превышал значения во 2-й культуре ЗКП, которые, в свою очередь, были близки контрольным значениям. Затем мы наблюдали постепенное снижение его уровня к 10-м суткам культивирования, после чего отмечалась вторая волна подъёма, и на 14-е сутки был зафиксирован максимальный уровень экспрессии *hgf*, в 86 раз превышавший значения контрольной группы, что, вероятно, связано с максимальной активностью трансдуцирующего вируса в эти сроки. К 21-м суткам отмечалось постепенное возвращение показателя к исходному уровню, что, по-видимому, обусловлено деградацией вирусной ДНК в клетках (Бухарова и др., 2013) и снижением активности аденовируса, которая, согласно литературным данным (Waehler et al., 1993; Шафигуллина, 2013), сохраняется около 2-3 недель.

При изучении фенотипа культуры ЗКП с Ad5-optHGF-optFGF4-RFP *in vitro* с помощью ИЦХ окрашивания было установлено, что, начиная с 3-х суток эксперимента, они стабильно экспрессировали ЦК 18 и ЦК 19, а с 14-х суток – α -ФП. В то время как в культуре ЗКП с Ad5-RFP, также, как и в КГ, экспрессия данных маркёров была выявлена позже – на 21-й день культивирования.

Более раннее появление в фенотипе ЗКП 1-й группы α -ФП было подтверждено и с помощью ПЦР-РВ, согласно результатам которой максимальный уровень

экспрессии данного гена был зафиксирован также на 14-е сутки эксперимента, при этом он в 256 раз превышал значения 2-й культуры ЗКП, которые показали идентичные контрольным значения (Рисунок 1).

Таким образом, можно заключить, что генетическая модификация ЗКП с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP способствовала их более ранней дифференцировке в гепатоцитарном направлении *in vitro* по сравнению с ЗКП, трансдуцированными рекомбинантным вирусом Ad5-RFP, несущим только ген *rfp*.

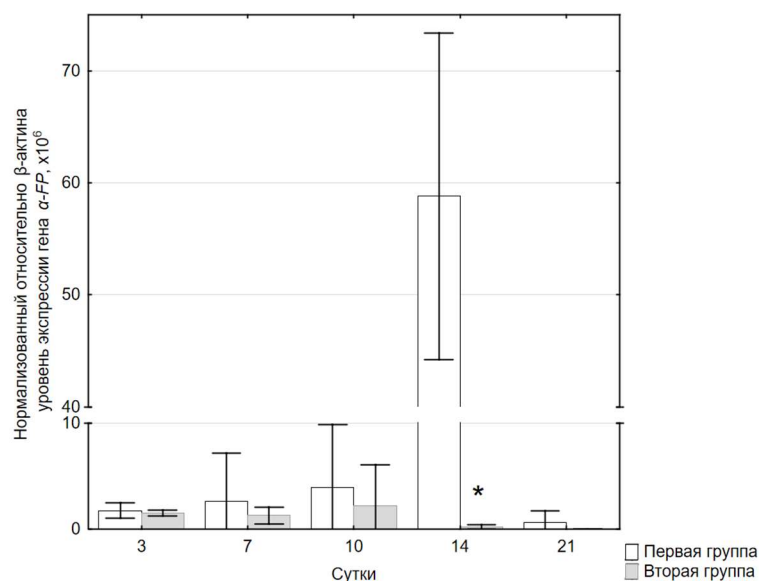


Рисунок 1 – Результат ПЦР-РВ. Динамика изменения уровня экспрессии гена α -fp в культуре ЗКП: 1-я группа – ЗКП, модифицированные рекомбинантным вирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP; 2-я группа – ЗКП, трансдуцированные рекомбинантным вирусом Ad5-RFP

* – статистически значимые различия между первой и второй группами ($p < 0,05$)

О наличии сократительной способности 1-й и 2-й культур ЗКП свидетельствовало их позитивное окрашивание антителами к α -ГМА. Экспрессия данного маркёра появлялась с 1-х суток эксперимента и была стабильной в течение всего срока культивирования в обеих экспериментальных и КГ ЗКП, что можно объяснить необходимостью адгезии клеток в условиях *in vitro*. Наличие стабильной экспрессии α -ГМА одновременно с появлением эпителиальных маркёров в фенотипе ЗКП, вероятно объясняется тем, что в процессе мезенхимно-эпителиальной трансдифференцировки клетки приобретают промежуточный фенотип. Это предположение согласуется с данными литературы (Zeisberg et al., 2007; Онищенко и др., 2011; Brenner et al., 2012; Liu et al., 2015).

Экспрессия звёздчатыми клетками α -ГМА указывает на сходство их фенотипа с фенотипом миофибробластов печени. Именно поэтому долгое время ЗКП рассматривали в качестве основных «виновников» развития фиброза в печени (Burt et al., 1993; Collier et al., 1993; Friedman, 2008). Однако в последнее время появляется

всё больше исследований, ставящих под сомнение эту точку зрения. В работе Dudas и соавт. в экспериментальных моделях животных, а также в биопсийном материале от больных циррозом печени было показано наличие большого количества Thy-1+ клеток в зоне фиброза (Dudas et al., 2009). Данный маркёр, как фенотипический признак, был описан у миофибробластов печени и портальных фибробластов (Dudas et al., 2009; Миянович, 2014; Shafigullina, 2018). Кроме того, авторы подчёркивают тот факт, что ни активированные ЗКП, ни покоящиеся ЗКП не экспрессируют Thy-1. В нашей работе при проведении ИЦХ окрашивания культур ЗКП антителами к Thy-1 ни в одной группе ни на одном из изучаемых сроков мы не обнаружили экспрессию данного маркёра. Из этого следует, что генетически модифицированные с помощью аденовирусов Ad5-RFP и Ad5-optHGF-optFGF4-RFP ЗКП не трансдифференцируются в миофибробласты печени *in vitro*.

Таким образом, мы можем утверждать, что генетическая модификация культуры ЗКП с помощью рекомбинантных аденовирусов Ad5-RFP и Ad5-optHGF-optFGF4-RFP ЗКП не повышает их фиброгенный потенциал *in vitro*, и, в связи с этим, мы предполагаем, что такие генетически модифицированные ЗКП могут быть трансплантированы животным без риска развития фиброза.

Для проверки данного предположения мы провели трансплантацию генетически модифицированных ЗКП в воротную вену крыс, перенёсших операцию ЧГ, которая является классической моделью для изучения регенерации печени. Первой группе крыс вводили ЗКП, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, второй – рекомбинантным вирусом Ad5-RFP. При помощи ИГХ окрашивания антителами к RFP было показано, что трансплантированные ЗКП обеих групп сохраняют свою жизнеспособность, мигрируют с портальным кровотоком и встраиваются в паренхиму печени крыс-реципиентов. Более того, было выявлено, что уже с первых суток часть трансплантированных ЗКП обеих групп приобретали морфологию гепатоцитов, что говорит о способности ЗКП дифференцироваться в гепатоцитарном направлении в условиях *in vivo*. С помощью морфометрического анализа было показано, что в 1-й группе RFP+гепатоцитов было больше, чем во 2-й на протяжении всего эксперимента (Рисунок 2).

Очевидно, что основным стимулом, усиливающим образование гепатоцитоподобных клеток из трансплантированных ЗКП, служит дефицит паренхиматозных клеток, вызванный удалением 2/3 печени при операции ЧГ. В то же время механизм появления таких гепатоцитов при трансплантации клеток вызывает споры: некоторые учёные отрицают возможность трансдифференцировки ЗКП в гепатоциты, полагая, что в основе гепатоцитарной дифференцировки ЗКП в печени лежит феномен слияния (*fusion*) гепатоцитов и трансплантированных клеток. В опровержении этой теории можно привести результаты работы Kordes, в которой с помощью метода *in situ* гибридизации хромосом с флуоресцентной меткой (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) было показано, что при трансплантации крысам-самкам, перенёсшим операцию ЧГ, ЗКП, несущих половую хромосому

самца, они встраивались в паренхиму печени и приобретали фенотип и функции гепатоцитов, причём происходило это именно благодаря дифференцировке трансплантированных ЗКП, а не за счёт их слияния с гепатоцитами (Kordes, 2014).

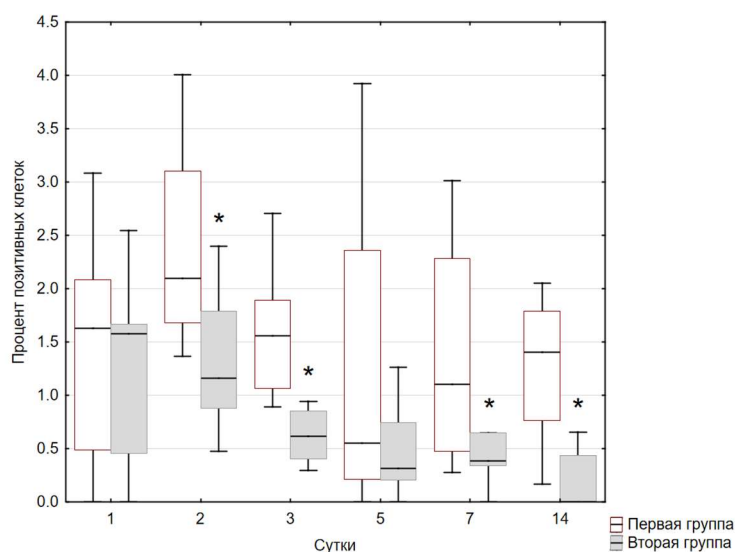


Рисунок 2 – Результаты морфометрии. Количество RFP+ клеток с морфологией гепатоцитов в печени крыс по отношению к общему количеству гепатоцитов в поле зрения: 1-я группа – ЧГ+ЗКП+Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, 2-я группа – ЧГ+ЗКП+Ad5-RFP

* – статистически значимые различия между первой и второй группами ($p < 0,05$)

Таким образом, можно сделать вывод, что трансплантированные ЗКП, трансдуцированные рекомбинантными вирусами Ad5-optHGF-optFGF4-RFP и Ad5-RFP, способны мигрировать в печень и встраиваться в паренхиму печени-реципиента. При этом количество RFP+ гепатоцитов в 1-й группе значительно больше, что связано с дополнительным стимулирующим влиянием встроенных генов факторов роста HGF и FGF4 на процесс дифференцировки ЗКП в гепатоцитарном направлении и на клеточные процессы регенерации печени.

Для выявления в печени крыс-реципиентов клеток-предшественников гепатоцитов мы провели ИГХ окрашивание срезов антителами к α -ФП – основному секреторному белку гепатобластов. В обеих группах на всём протяжении эксперимента были обнаружены единичные α -ФП+ клетки с округлым ядром и узким ободком цитоплазмы, которые, очевидно, являются гепатобластами, а также α -ФП+ синусоидные клетки, что подтверждает гипотезу о возможной локализации региональных прогениторных клеток в синусоидах печени (Газизов, 2009; Sawitza et al., 2009; Гумерова, 2012). Кроме того, в обеих группах были обнаружены α -ФП+ гепатоциты. Однако, начиная уже с первых суток эксперимента, в группе ЧГ+ЗКП+Ad5-optHGF-optFGF4-RFP таких клеток было статистически значимо больше ($8,76 \pm 6,56\%$) по сравнению с группой ЧГ+ЗКП+ Ad5-RFP ($1,54 \pm 1,56\%$). При этом в 1-й группе дифференцировка гепатоцитов носила более массовый характер и была более продолжительной (Рисунок 3). Кроме того, этот процесс происходил

волнообразно: первый подъём количества α -ФП+ гепатоцитов мы наблюдали в первые дни после операции и введения клеток, второй – в конце второй недели. Данный феномен установлен нами впервые и требует дополнительного более детального изучения. Мы предполагаем, что такая динамика может быть связана с влиянием генетически модифицированных ЗКП, которые благодаря гиперэкспрессии встроенных факторов роста HGF и FGF4 приводят к активации различных клеточных типов (гепатоцитов, гепатобластов, звёздчатых клеток) и экспрессии ими α -ФП в разное время. В то же время мы не исключаем вероятность дифференцировки самих трансплантированных ЗКП в гепатоцитарном направлении за счёт аутокринной регуляции процессов дифференцировки.

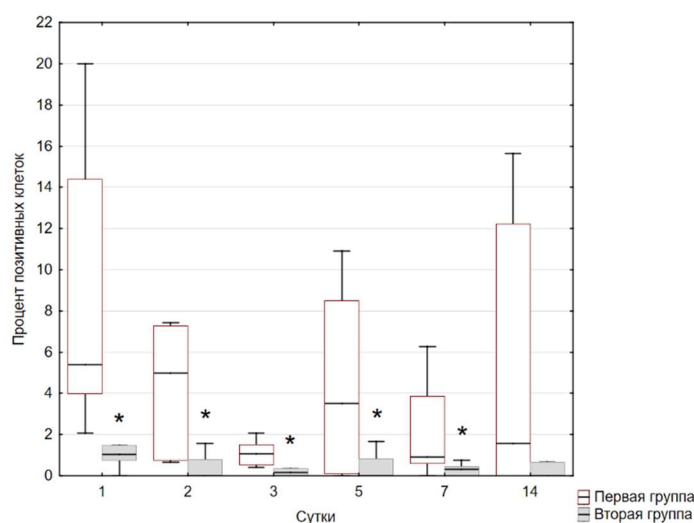


Рисунок 3 – Результаты морфометрии. Количество α -ФП+ клеток с морфологией гепатоцитов в печени крыс по отношению к общему количеству гепатоцитов в поле зрения: 1-я группа – ЧГ+ЗКП+Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, 2-я группа – ЧГ+ЗКП+Ad5-RFP

* – статистически значимые различия между первой и второй группами ($p < 0,05$).

Таким образом, ЗКП, модифицированные рекомбинантным вирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, за счёт дополнительно встроенных генов *hgf* и *fgf4* индуцируют секрецию α -ФП бóльшим числом клеток печени реципиента (по сравнению с ЗКП+Ad5-RFP), что косвенно свидетельствует об интенсивности течения регенераторного процесса в печени крыс данной группы.

Для оценки пролиферативной активности клеток (G1-, S-, G2- и M-фазы) печени мы провели ИГХ окрашивание срезов печени антителами к Ki-67. Известно, что в норме в здоровой печени крысы отмечается минимальная пролиферативная активность клеток и могут встречаться лишь единичные Ki-67+ окрашенные гепатоциты (Газизов, 2009). Проведённый нами морфометрический анализ Ki-67+ гепатоцитов показал, что в 1-й и 2-й группах была схожая динамика (Рисунок 4), и она в целом повторяла кинетику пролиферативного ответа у крыс после ЧГ без трансплантации клеток (Газизов, 2009), но количество пролиферирующих клеток в 1-й и 2-й группах было больше.

Количество Ki-67+ гепатоцитов было повышено уже с первых суток в обеих группах и составляла $42,89 \pm 18,57\%$ в группе ЧГ+ЗКП+Ad5-HGF-FGF4-RFP и $10,18 \pm 8,19\%$ – в группе ЧГ+ЗКП+Ad5-RFP. Также, как и у крыс после ЧГ без трансплантации клеток (Газизов, 2009), максимум пролиферативной активности был отмечен на 2-е сутки эксперимента. При этом пролиферация имела место в $53,86 \pm 25,27\%$ гепатоцитов 1-й группы и $31,35 \pm 22,77\%$ 2-й группы, после чего количество делящихся гепатоцитов постепенно снижалось, и на 5-е сутки составляло $11,28 \pm 8,25\%$ и $6,27 \pm 4,49\%$ в 1-й и 2-й группах соответственно. Важно отметить, что на протяжении этого времени количество пролиферирующих гепатоцитов в 1-й группе было больше, чем во 2-й группе, что подтверждалось статистическим анализом с использованием U-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$). Позже, к 7-м суткам эксперимента, количество делящихся гепатоцитов в обеих группах постепенно уменьшалось до практически одинаковых значений $5,0 \pm 6,0\%$ в первой группе и $5,93 \pm 6,04\%$ – во второй. На 14-е сутки их число составило всего $3,03 \pm 2,69\%$ в 1-й группе и $2,19 \pm 2,94\%$ во 2-й группе. Через 2 недели количество делящихся гепатоцитов приближалось к дооперационным значениям.

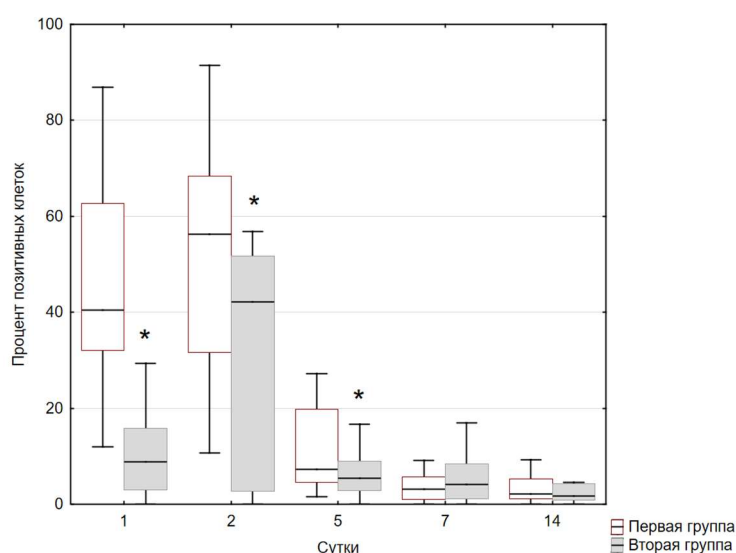


Рисунок 4 – Результаты морфометрии. Количество пролиферирующих гепатоцитов, экспрессирующих Ki-67, в печени крыс по отношению к общему количеству гепатоцитов в поле зрения: 1-я группа – ЧГ+ЗКП+Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, 2-я группа – ЧГ+ЗКП+Ad5-RFP

* – статистически значимые различия между первой и второй группами ($p < 0,05$).

Таким образом, более высокая степень пролиферативной активности в регенерирующей печени при трансплантации ЗКП, трансдуцированных с помощью Ad5-optHGF-optFGF4-RFP обусловлена влиянием факторов роста HGF и FGF4, которые оказывают митогенный эффект на гепатоциты, а также способствуют дифференцировке самих ЗКП в гепатоцитарном направлении.

Для изучения пролиферативного ответа клеток внутрипечёночных желчных протоков мы провели морфометрический анализ Ki-67+ холангиоцитов, который показал схожесть динамики пролиферации у обеих групп с таковой при ЧГ без

введения клеток (Газизов, 2009). Мы наблюдали увеличение числа делящихся холангиоцитов с первых суток эксперимента в обеих группах, однако максимум их пролиферативной активности был отмечен через 5 суток в 1-й группе ($40,53 \pm 8,53\%$) и через 7 суток во 2-й группе ($35,47 \pm 26,18\%$). Далее пролиферативная активность снижалась, и через 14 суток мы отмечаем пролиферацию лишь $32,69 \pm 15,73\%$ холангиоцитов 1-й группы и $22,98 \pm 7,94\%$ 2-й группы. Интересно, что пролиферативная активность холангиоцитов через две недели после ЧГ оставалась значительно выше, чем в гепатоцитах, что, по-видимому, связано с тем, что восстановление внутрипечёночных желчных протоков ещё продолжается, несмотря на завершенность пролиферации гепатоцитов, и деление холангиоцитов в большей мере является вторичной реакцией в ответ на функциональную недостаточность желчевыведения, возникающую при увеличении числа пролиферирующих гепатоцитов (Steer, 1995; Lesage et al., 1996). При сравнении показателей пролиферативной активности холангиоцитов двух групп разница в значениях оказывалась статистически недостоверной, что говорит о том, что генетическая модификация ЗКП не влияет на пролиферацию холангиоцитов.

В обеих группах после операции ЧГ и трансплантации ЗКП в печени крыс-реципиентов с первых суток происходило увеличение десмин⁺ клеток ($6,47 \pm 0,9\%$ в 1-й группе и $4,67 \pm 0,79\%$ во 2-й группе), которые располагались в синусоидах и имели выраженные отростки (Рисунок 5).

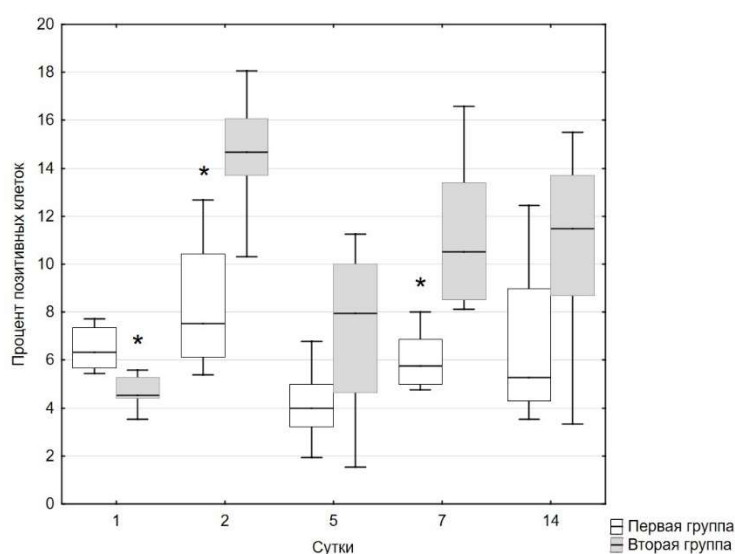


Рисунок 5 – Результаты морфометрии. Количество десмин⁺ клеток по отношению к общему количеству клеток в поле зрения: 1-я группа – ЧГ+ЗКП+Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, 2-я группа – ЧГ+ЗКП+Ad5-RFP

* – статистически значимые различия между первой и второй группами ($p < 0,05$).

Это можно объяснить тем, что ЗКП, модифицированные с помощью Ad5-optHGF-optFGF4-RFP благодаря вырабатываемым ими факторам роста, оказывают не только аутостимулирующее действие, но и ведут к более интенсивной стимуляции ЗКП реципиента, что приводит к большему увеличению числа десмин⁺

клеток в этой группе. Однако на всех последующих сроках эксперимента мы наблюдали обратную картину: во 2-й группе десмин⁺ клеток становилось больше, чем в 1-й группе. Принимая во внимание эти данные и тот факт, что трансплантация ЗКП, трансдуцированных с помощью Ad5-optHGF-optFGF4-RFP приводит к большей репопуляции гепатоцитов, можно предположить, что в этом случае благодаря вырабатываемым факторам роста HGF и FGF4, генетически модифицированные ЗКП ведут к более ранней дифференцировке клеток-предшественников в гепатоцитарном направлении, в связи с чем не возникает необходимости в активации большого количества собственных ЗКП реципиента в последующие дни. Уменьшение количества десмин⁺ клеток на 5-е сутки происходит, по-видимому, вследствие постепенного восстановления целостности печёночной паренхимы, причём в качестве одного из возможных механизмов уменьшения числа десмин⁺ клеток некоторые авторы указывают апоптоз (Газизов и др., 2015). Сохранение высокой функциональной активности десмин⁺ ЗКП спустя 7 суток после операции может быть обусловлено сохраняющейся потребностью в них для участия в продолжающихся процессах восстановления микроструктуры печени и нормального состава внеклеточного матрикса. Также активированное состояние ЗКП может косвенно подтверждать наше предположение о необходимости их участия в процессах восстановления внутрипечёночных желчных протоков, клетки которых на этих сроках ещё продолжают свою пролиферацию.

Для выявления риска перехода ЗКП в миофибробласты мы провели ИГХ окрашивание срезов печени крыс-реципиентов обеих групп антителами к маркеру миофибробластов – α -ГМА. Экспрессия α -ГМА была выявлена только в гладкомышечных клетках стенки сосудов, что служило внутренним позитивным контролем. При этом ни на одном из изученных сроков эксперимента ни в одной группе не было обнаружено α -ГМА⁺ клеток в паренхиме печени. Отсутствие фиброзных изменений было подтверждено также окраской образцов печени обеих групп по Маллори. Таким образом, можно сделать вывод о том, что трансплантация ЗКП, трансдуцированных рекомбинантными вирусами Ad5-optHGF-optFGF4-RFP и Ad5-RFP, не ведёт к повышению риска развития фиброза печени.

Подводя итог, можно заключить, что генетическая модификация ЗКП с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP способствует их дифференцировке в гепатоцитарном направлении *in vitro*. Трансплантация таких клеток крысам после ЧГ способствует лучшей репопуляции гепатоцитов по сравнению с трансплантацией ЗКП, несущих только ген репортерного красного флуоресцентного белка *rfp*. Таким образом, генетически модифицированные с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP ЗКП оказывают положительное влияние на процесс регенерации печени у крыс после ЧГ без риска развития фиброза. Данные факты подтверждают перспективность применения генов *hgf* и *fgf4* в составе рекомбинантного вируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP для разработки методов генно-клеточной терапии заболеваний печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведено исследование фенотипа ЗКП и его изменений при генетической модификации рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, несущим гены *hgf* и *fgf4* в условиях *in vitro*. Было установлено, что генетическая модификация ЗКП данным вирусом способствует их направленной дифференцировке в гепатоцитарном направлении *in vitro*. Во второй части работы была проведена трансплантация ЗКП, генетически модифицированных с помощью рекомбинантного вируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP крысам после ЧГ. Было показано, что генетически модифицированные ЗКП способствуют репопуляции гепатоцитов и оказывают положительное влияние на регенерацию печени у крыс после ЧГ. Важно, что при этом не происходит увеличения риска развития фиброза.

Выводы

1. Трансдукция рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP является эффективным методом генетической модификации и позволяет получать около 95 % генетически модифицированных звёздчатых клеток печени, экспрессирующих гены факторов роста HGF и FGF4.
2. Аденовирусная трансдукция звёздчатых клеток печени рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP способствует дифференцировке этих клеток в гепатоцитарном направлении, о чём свидетельствует появление на 3-и сутки в их фенотипе эпителиальных маркёров ЦК 18, ЦК 19 и на 14-е сутки маркёра гепатобластов α -ФП.
3. Генетически модифицированные с помощью рекомбинантного аденовируса Ad5-optHGF-optFGF4-RFP звёздчатые клетки печени способны мигрировать в печень и встраиваться в её паренхиму при их введении в воротную вену крысам, перенёвшим частичную гепатэктомию.
4. Генетически модифицированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP звёздчатые клетки печени при трансплантации крысам, перенёвшим частичную гепатэктомию, могут дифференцироваться в гепатоцитарном направлении, о чём свидетельствует появление типичной для гепатоцитов морфологии и маркёра, характерного для гепатобластов α -ФП.
5. Генетически модифицированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP звёздчатые клетки печени способствуют лучшей репопуляции гепатоцитов у крыс-реципиентов с частичной гепатэктомией по сравнению со звёздчатыми клетками печени, не содержащими дополнительно встроенных факторов роста HGF и FGF4.
6. Трансплантация звёздчатых клеток печени, генетически модифицированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-optHGF-optFGF4-RFP, крысам, перенёвшим частичную гепатэктомию, не сопровождается повышением риска развития фиброза печени.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы диссертации нашли отражение в 23 научных публикациях: 8 статей в рецензируемых журналах, которые входят в базу данных Scopus, из них 6 рекомендованы ВАК для публикации результатов научных исследований и 2 статьи в зарубежных изданиях. По материалам диссертации опубликовано 3 тезиса всероссийских и 12 тезисов международных конференций.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Влияние трансдукции звёздчатых клеток печени аденовирусным вектором Ad5-optHGF-optFGF-4-RFP на их фенотип *in vitro* и *in vivo* / **Э.И. Шарипова**, А.А. Титова, А.К. Шафигуллина и др. // Гены и клетки. – 2015. – Т.10, № 4. – С.114-117.
2. **Шарипова Э.И.** Перибилиарные железы жёлчных протоков как ниша мультипотентных стволовых клеток / Э.И. Шарипова, И.М. Газизов, А.А. Гумерова, А.П. Киясов // Гены и Клетки. 2014. – Т.9, №3. – С.29-33
3. Влияние трансплантации перисинусоидальных клеток печени на регенерацию печени крыс после повреждения четырёххлористым углеродом и 2-ацетиламинофлуореном / Г.Р. Бурганова, А.А. Титова, **Э.И. Шарипова** и др. // Гены и Клетки. – 2014. – Т.9, №3. – С. 53-58.
4. Звёздчатые клетки печени стимулируют регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии на фоне подавления пролиферации гепатоцитов / А.А. Титова, Г.Р. Бурганова, **Э.И. Шарипова** и др. // Гены и Клетки. – 2014. – Т.9, №3. – С. 131-135.
5. Сравнение различных методов выделения, мечения и трансплантации звёздчатых клеток печени крысы / А.К. Шафигуллина, А.А. Трондин, Г.Р. Бурганова и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т.8, №3. – С.147-151.
6. Активация C-kit-позитивных прогениторных клеток в поджелудочной железе крысы после частичной гепатэктомии / М.С. Калигин, А.С. Плюшкина, И.М. Газизов и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Том 7, № 3. – С.77-79.

В прочих изданиях:

1. Native and Activated Hepatic Stellate Cells Stimulate Liver Regeneration in Rats After Partial Hepatectomy and 2-Acetylaminofluorene Injection / **E.I. Zaikina**, A.K. Shafigullina, A.A. Titova et al. // BioNanoScience. – 2017. – Vol.7. – P.246-250.
2. Effect of Adenoviral Transduction of Hepatic Stellate Cells with Adv5-optHGF-RFP on their Phenotype / A.K. Shafigullina, **E.I. Zaikina**, E.E. Garanina et al. // BioNanoScience. – 2016. – Vol. 6. – P. 419-422.

В сборниках тезисов и материалов конференций:

1. Effect of host liver cell proliferation on homing and phenotype of transplanted hepatic stellate cells after partial hepatectomy in rats / A. Shafigullina, **E. Zaikina**,

- E. Garanina et al. // 52nd Annual Scientific Meeting of ESCI. – Barcelona, Spain, 2018. – European Journal of Clinical Investigation – May, 2018 – Vol.48 (Suppl.1) – P.65.
2. Influence of adenoviral transduction with Adv5-optHGF-RFP on phenotype of hepatic stellate cells / A. Shafigullina, **E. Zaikina**, E. Garanina et al. // European Journal of Clinical Investigation. – 2017. – Vol. 47, Issue Supplement S1. – P. 88-89.
 3. Genetically Modified with HGF and FGF-4 Genes Hepatic Stellate Cells Enhances Transplanted Cells Repopulation In Rat Liver After Acute Liver Damage / **E.I. Zaikina**, A.K. Shafigullina, A.A. Titova et al. // 51th ESCI 2017 Conference, 17-19 May 2017, Genoa, Italy. – P. 92.
 4. The hepatic stellate cells as potential regional hepatic progenitor cells / Gumerova A., Shafigullina A., Titova A. et al. // 19th International symposium on cells of the hepatic sinusoid, 14-17 june 2017, Galway, Ireland.
 5. Нативные и активированные звёздчатые клетки печени стимулируют регенерацию печени у крыс после частичной гепатэктомии и введения 2-ацетиламинофлуорена / **Э. И. Заикина**, А. К. Шафигуллина, А. А. Титова и др. // Трансляционная медицина 2016: сборник тезисов междунар. конф. – Казань, 2016. - С. 43
 6. Transduction of hepatic stellate cells with genes of HGF and FGF4 before transplantation enhances repopulation of transplanted cells in damaged rat liver / A. Gumerova, A. Titova, **E. Sharipova** et al. // Journal of Hepatology, 2016 – Vol. 64, S704 (SAT 383).
 7. The role of genetically modified HSCs in liver regeneration after acute liver damage / **E. Sharipova**, A. Titova, A. Shafigullina et al. // United European Gastroenterology Journal. – Austria, Vienna, 2016. – Vol. 4. – P. A161-A162.
 8. Contribution of native and activated hepatic stellate cells in liver regeneration after partial hepatectomy and 2-acetylaminofluoren injection / **E. I. Sharipova**, G. Pevnev, A. Shafigullina et al. // United European Gastroenterology Journal 3 (5S). - 2015. - P. A108-A109.
 9. Transplanted hepatic stellate cells stimulate rat liver regeneration after partial hepatectomy and 2-acetylaminofluorene injection / A. Titova, M. Mavlikeev, G. Pevnev et al. // Federation United European Gastroenterology Journal 3 (5S). - 2015. - P. A150.
 10. **Шарипова Э. И.**, Мавликеев М. О., Титова А. А. Влияние трансплантации активированных *in vivo* звёздчатых клеток печени на регенерацию печени после повреждения четырёххлористым углеродом и 2-ацетиламинофлуореном. // Сборник тезисов 88-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых учёных и 17-й Всероссийской медико-исторической конференции, посвящённых 200-летию Казанского государственного медицинского университета. Казань, 26-27 марта 2014 г. Казань., 2014. – С. 274.

11. Влияние трансплантированных звёздчатых клеток печени на регенерацию печени после частичной гепатэктомии и введения 2-ацетиламинофлуорена / **Шарипова Э.И.**, Мухамедов А.Р., Мавликеев М.О. и др. // Тезисы докладов IX Международной (XVIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. Вестник РГМУ. Периодическое медицинское издание. – М.: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. – 2014, №2. – С.228
12. Влияние трансплантации звёздчатых клеток печени на экспрессию C-kit в печени крыс, регенерирующей после острого повреждения / К.Н.Сайфуллина, **Э.И.Шарипова**, Г.Р.Бурганова и др. // Тезисы докладов IX Международной (XVIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных. Вестник РГМУ. Периодическое медицинское издание. – М.: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. – 2014, №2. – С.189.
13. Hepatocyte differentiation of freshly isolated and in vivo activated hepatic stellate cells transplanted into rats after carbon tetrachloride damage / A. Gumerova, A. Shafigullina, G. Burganova et al. // Abstract book of 48th annual meeting of the EASL. Journal of Hepatology. – Vol.58, Suppl.1. – 2013 – P.127.
14. Пути дифференцировки нативных и активированных *in vivo* звёздчатых клеток печени после трансплантации крысам, перенёвшим частичную гепатэктомию или повреждение печени четырёххлористым углеродом / А.А. Гумерова, А.К. Шафигуллина, Г.Р. Бурганова и др. // Материалы VI Ежегодного Международного симпозиума Актуальные вопросы генных и клеточных технологий. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т.8, №3. – С.17-18.
15. Создание рекомбинантного аденовируса, одновременно кодирующего кодон-оптимизированные последовательности фактора роста гепатоцитов и фактора роста фибробластов / Е.Е. Черенкова, **Э.И. Шарипова**, А.А. Ризванов, А.П. Киясов // Сборник трудов IV международной научно-практической конференции Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине. – Казань, 2014. – С.153.

E-mail автора: Elwish@mail.ru

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлёвская, 18, Казанский федеральный университет, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета КФУ 03.06 Аникиной Татьяне Андреевне, факс: (843)238-76-01, e-mail: tania57vg1@rambler.ru.