

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kadri Valter

**Hepatotsüütide ja biliaarse süsteemi rakkude vaheline transdiferentseerumine maksa
regeneratsioonis**

Magistritöö

Juhendaja:

PhD Viljar Jaks

TARTU 2014

SISUKORD

| | |
|--|----|
| SISUKORD | 2 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 4 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 7 |
| 1.1. Maksa üldiseloomustus | 7 |
| 1.1.1. Maksa ülesehitus | 7 |
| 1.1.1.1. Maksa rakutüübid | 8 |
| 1.1.2. Maksa organogenees..... | 10 |
| 1.1.3. Maksa postnataalne areng..... | 13 |
| 1.1.4. Maksa funktsioonid | 13 |
| 1.2. Maksa regeneratsioon | 14 |
| 1.2.1. Maksa regeneratsioon normaalingimustes | 14 |
| 1.2.1.1. Maksa täiskasvanud tüvirakud..... | 16 |
| 1.2.2. Maksa regeneratsioon kahjustuse korral..... | 17 |
| 1.2.2.1. Maksa regeneratsioon vastuseks osalisele maksakoe eemaldamisele | 20 |
| 1.2.2.2. Maksa regeneratsioon vastuseks keemilisele kahjustusele..... | 21 |
| 1.2.2.3. Maksa regeneratiivne vastus sapijuha sulgemisele | 22 |
| 1.2.2.4. Maksa regeneratsioon sapiteede kahjustuse korral..... | 22 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 24 |
| 2.1. Töö eesmärgid | 24 |
| 2.2. Materjal ja meetodika..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 2.2.1. Kasutatud hiireliinid, praimerid ja antikehad | 25 |
| 2.2.2. Hiirte genotüpiseerimine | 26 |
| 2.2.3. Eksperimendi läbiviimine..... | 27 |
| 2.2.4. Immunofluorestsentsanalüüs | 29 |
| 2.3. Tulemused | 31 |
| 2.3.1. Sapiteede rakkude järglaskonna jälgimine <i>K19^{cre+}/TOM⁺</i> genotüübiga hiirtel..... | 31 |
| 2.3.1.1. <i>K19^{cre+}/TOM⁺</i> genotüübiga hiirte maksa homöostaas..... | 31 |
| 2.3.1.2. <i>K19^{cre+}/TOM⁺</i> genotüübiga hiirte maksa regeneratsioon kahjustuse korral ... | 34 |
| 2.3.2. Parenhüümirakkude järglaskonna jälgimine <i>TTR^{cre+}/TOM⁺</i> genotüübiga hiirtel... | 38 |
| 2.3.2.1. <i>TTR^{cre+}/TOM⁺</i> genotüübiga hiirte maksa homöostaas | 38 |
| 2.3.2.2. <i>TTR^{cre+}/TOM⁺</i> genotüübiga hiirte maksa regeneratsioon kahjustuse korral ... | 41 |
| 2.4. Arutelu..... | 43 |
| KOKKUVÕTE | 49 |
| SUMMARY | 51 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 53 |
| KASUTATUD VEEBIAADRESSID | 66 |
| TÄNUSÕNAD | 67 |
| LISAD | 68 |
| LIHTLITSENTS..... | 72 |

KASUTATUD LÜHENDID

AAV – *adeno-associated virus*, adeno-assotsieerunud viirus

AFP – *α-fetoprotein*, alfafetoproteiin

BDL – *bile duct ligation*, sapiteede sulgemine

BrdU – *bromodeoxyuridine*, bromodesoksüüridiin

CAR – *constitutive androstane receptor*, konstitutiivne androstaani retseptor

CD – *cluster of differentiation*, diferentseerumise klaster

Cre – *causes recombination*, põhjustab rekombinatsiooni

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*, 4', 6- diamidiino-2-fenüülindool

DDC – *3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine*, 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiin

Dex – *dexamethasone*, deksametasoon

E – *embryonic day*, embrüonaalne päev

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*, etüüleendiamiintetraatseethape

EGF – *epidermal growth factor*, epidermaalne kasvufaktor

EpCAM – *Epithelial Cell Adhesion Molecule*, epiteeliraku adhesioonimolekul

ERT – *estrogen receptor truncated*, lühendatud östrogeeni retseptor

FACS – *fluorescence-activated cell sorting*, fluorestsents-aktiveeritud rakkude sorteerimine

FCAT – *Federative Committee on Anatomical Terminology*, Anatoomilise Terminoloogia Föderatiivne Komitee

FGF – *fibroblast growth factor*, fibroblasti kasvufaktor

Hes-1 – *hairy and enhancer of split-1*, karvane ja split 1 võimendaja

HGF – *hepatocyte growth factor*, hepatotsüüdi kasvufaktor

HNF4α – *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*, hepatotsüüdi tuumafaktor 4 alfa

IL-6 – *interleukin 6*, interleukiin 6

K19 – *keratin 19*, keratiin 19

LPS – *lipopolysaccharide*, lipopolüsahhariid

NF-κB – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, tuumafaktor kappa B

NK – *natural killer*, loomulik tappur

OC1 – inglise keeles Onecut-1

OSM – *Oncostatin M*, onkostatiin M

PBS – *phosphate buffered saline*, fosfaadiga puhverdatud soolalahus

PCR – *polymerase chain reaction*, polümeraasi ahelreaktsioon

PFA – *paraformaldehyde*, paraformaldehüüd

PH – *partial hepatectomy*, osaline hepatektoomia

PXR – *pregnane X receptor*, pregnaan X-retseptor

Sd – *scalloped*, laineline

Sox9 – *SRY (sex determining region Y)-box 9*, sugu määrava regiooniga Y seotud piirkond 9

STAT3 – *signal transducer and activator of transcription 3*, signaali vastuvõtja ja transkriptsiooni aktivaator 3

STM – *septum transversum mesenchyme*, mesenhüümi transversaalne septum

TGFβ – *transforming growth factor beta*, transformeeriv kasvufaktor beeta

TNFα – *tumor necrosis factor alpha*, kasvaja nekroosi faktor alfa

TTR – *transports thyroxine and retinol*, transpordib türoksiini ja retinooli

Wnt – kombinatsioon int ja Wg geeni nimedest, mis on seotud Wingless integratsiooni piirkonnaga

YAP – *Yes-associated proteiin*, Yes-seotud valk

SISSEJUHATUS

Maksa iseloomustab suur regeneratsioonivõime, mida võimaldavaid mehhanisme on pikalt uuritud, kuid regeneratsiooni täieliku protsessi ei ole veel suudetud kirjeldada. Algselt arvati, et maksa uuenemine toimub klassikalise tüvirakkude mudeli alusel, kus koespetsiifilised täiskasvanud tüvirakud jagunevad ja diferentseeruvad spetsialiseerunud rakkudeks. Uuringute tulemusena on aga leitud, et maksa homöostaasi eest vastutavad diferentseerunud ning jagunemisvõimelised hepatotsüüdid ja sapiteede rakud. Samas maksa täiskasvanud tüvirakkude olemasolu pole suudetud veel tuvastada, kuid arvatakse, et potentsiaalsed täiskasvanud tüvirakud võivad paikneda sapiteede piirkonnas. (Alison jt, 1996; Dan ja Yeoh, 2008; Isse jt, 2013; Schmelzer jt, 2006; Theise jt, 1999; Yovchev jt, 2008)

Maksa tüvirakkude tuvastamiseks on kasutatud erinevaid meetodeid, kuid seni ei ole need põhjalikku tulemust andnud ja seetõttu on ka ebaselge tüvirakkude roll maksa regeneratsioonis. Tüvirakkude aktiveerimiseks ja diferentseeruma suunamiseks on kasutatud erinevaid maksakahjustuse meetodeid, mis võimaldavad uurida kahjustatud maksa regeneratsiooni. Samas on erinevate meetoditega saadud tulemused vastuolulised ja võib arvata, et olemasolevad meetodid on puudulikud. Rakkude täpsemaks identifitseerimiseks ja maksa regeneratsioonis osalevate rakkude uurimiseks oleks parem kasutada näiteks täpselt määratud identiteediga rakkude ja nende järglaskonna geneetilist märgistamist (ingl *lineage tracing*) võimaldavaid meetodeid. (Carpentier jt, 2011; Espanol-Suner jt, 2012; Furuyama jt, 2011; Huch jt, 2013; Isse jt, 2013; Iverson jt, 2011; Malato jt, 2011; Tarlow jt, 2014).

Teema põhjalikumaks käsitlemiseks antakse käesoleva töö kirjanduse osas ülevaade maksa ülesehitusest, arengust ja funktsioonidest. Samuti käsitletakse seniseid teadmisi maksa regeneratsioonist normaalingimustel ja ka kahjustuse korral. Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli uurida maksa homöostaasis ja kahjustatud maksa regeneratsioonis osalevaid rakke. Selleks kasutati loomudelina hiiri, kellel oli võimalik sapiteede ja hepatotsüütide järglaskonda jälgida, seda nii ajas kui ka erinevate maksakahjustuste korral. Käesolev töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on uurida maksa tüvirakkude rolli ja regulatsiooni maksa regeneratsioonis ning maksakasvajate tekkel. Regeneratsiooni eest vastutavate rakkude defineerimine aitaks välja töötada uusi meetodeid krooniliste maksahaiguste raviks ja arendada rakupõhist teraapiat erinevatele maksakahjustustele.

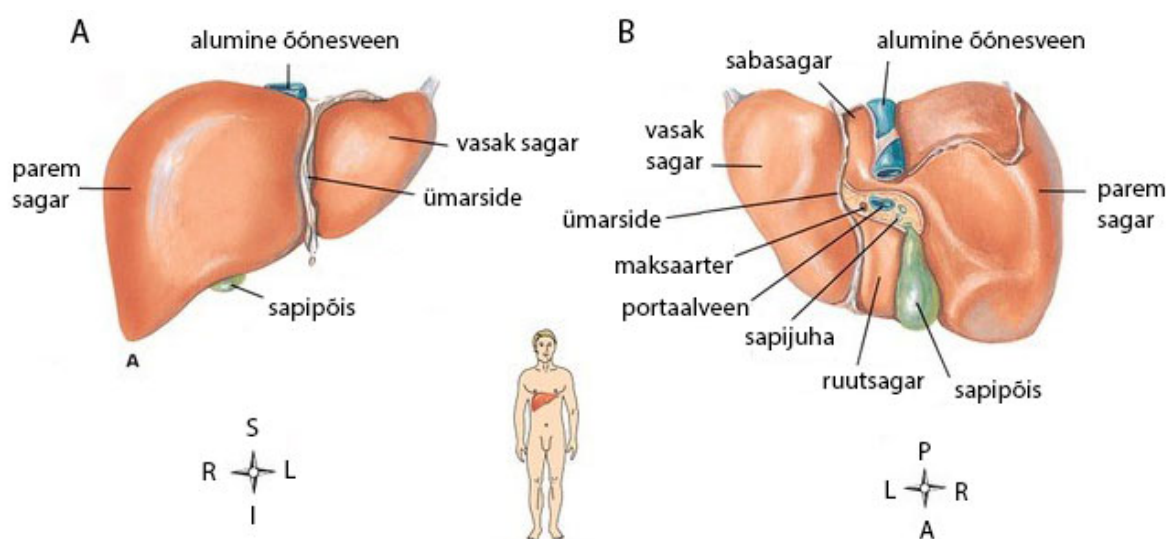
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Maksa üldiseloostus

1.1.1. Maksa ülesehitus

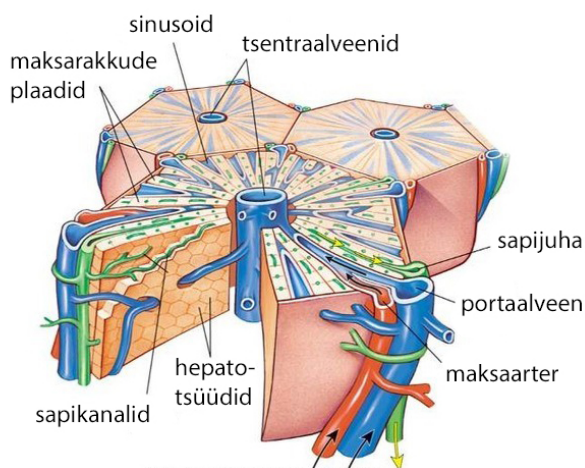
Maks on selgroogsete loomade suurim siseorgan, mis paikneb kõhuõõne ülemises paremas neljandikus diafragma all. Antud organ on punakaspruuni värvusega ja koosneb neljast eri suuruse ja kujuga sagarast, mida nimetatakse parem-, vasak-, ruut- ja sabasagaraks. Maksa on võimalik kirjeldada, lähtudes morfoloogilisest-, funktsionaalsest- või individuaalsest anatoomiast. Morfoloogiline anatoomia põhineb maksa välisel ehitusel ja ei arvesta maksa sisemisi veresooni, sapiteede kanaleid ega nende asetust. Funktsionaalse anatoomia alusel jaguneb maks aga arengult, funktsioonilt ja kirurgiliselt eraldatavatesse segmentidesse, mis põhinevad portaalveeni, maksaarterite ja sapijuhade paiknemisel. Funktsionaalset anatoomiat kirjeldav FCAT (ingl *Federative Committee on Anatomical Terminology*) terminoloogia on kasutusel alates 1998. aastast, kuid alguse sai see juba 1898. aastal J. Cantlie eeskujul. Individuaalse anatoomia korral võetakse arvesse konkreetse organismi eripärasid. (Abdalla jt, 2002; Strasberg, 1997; Whitmore, 1999)

Maksa morfoloogilisest anatoomiast lähtudes jaotab eesmiselt asetsev ümarside selle paremaks ja vasakuks sagaraks, mis on ühtlasi ka kõige suuremad sagarad. Kaks lisasagarat, saba- ja ruutsagar, on palju väiksemad ja paiknevad maksa sisemisel pinnal. Sabasagar ulatub üle parema sagara tagumise külje ja ümbritseb alumist õnesveeni ning ruutsagar on parema sagara tagumisel küljel sapipõie ümber. (Joonis 1) (Bismuth jt, 1992)



Joonis 1. Maksa väline morfoloogia. R – parem, L – vasak, S – peapoolne, I – sabapoolne, P – tagumine, A – eesmine. (A) Maksa eesmise poole morfoloogia. (B) Maksa sisemise poole morfoloogia. Modifitseeritud (Patton ja Thibodeau, 2009).

Funktsionaalse anatoomia korral on maksasagara väikseimaks üksuseks sagarik, mille moodustavad keskel paiknev tsentraalveen ning selle ümber kuusnurkselt paiknevad portaalveenide ja maksaarterite paarid (Joonis 2). Portaalveenid kannavad põrnast ja seedetraktist pärit venoosset verd ja maksaarterid aordist lähtuvat arteriaalset verd. Veresooni ja tsentraalveeni ühendavad omakorda rohked sinusoidid, mis tagavad sagarikes ainevahetuse. Pärast kapillaaride läbimist koondub veri tsentraalveenidesse, mis lõpuks liituvad ühtseks maksaveeniks ning veri suunatakse maksast välja. (Bioulac-Sage jt, 1992). Eelpool kirjeldatud maksa anotoomiline ülesehitus on iseloomulik nii inimesele kui ka teistele selgroogsetele, kuid võib liigiti veidi varieeruda (Strasberg, 1997; Whitmore, 1999).

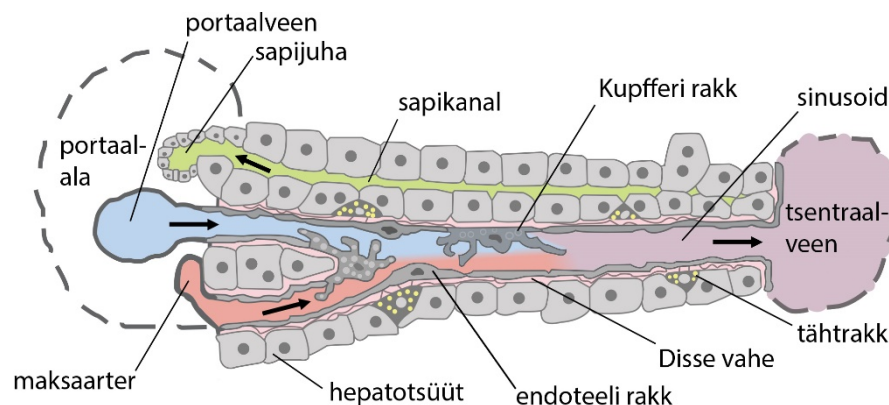


Joonis 2. Maksasagariku ehitus. Mustad nooled kujutavad vere liikumise suunda ja kollased sapi liikumise suunda. Modifitseeritud (Patton ja Thibodeau, 2009).

1.1.1.1. Maksa rakutüübid

Maksasagariku moodustavad rakutüübid jagatakse kaheks: parenhüümi ja mitteparenhüümi rakud. Parenhüümi rakud on peamised maksa ehituslikud rakud ehk hepatotsüüdid ning mitteparenhüümi rakud on Kupfferi, täht-, sapiteid ning sinusoidide moodustavad rakud. (Mall, 1906). Parenhüümi hepatotsüüdid on kõrgelt diferentseerunud ja vähejagunevad peamisi maksa funktsioone täitvad rakud. Rakkude suuruseks on 30 µm x 20 µm ning morfoloogiliselt on tegemist hulknurksete epiteelirakkudega. Hepatotsüütide tuum on ümar ja varieeruva suurusega ning leidub ka kahetuumalisi rakke. Maksarakkudele on iseloomulik ka üherakukihiliste ja sinusoididega eraldatud maksaplaatide moodustamine (Joonis 2). (Bioulac-Sage jt, 1992; Celton-Morizur jt, 2010; Fausto, 2000; Steer, 1995)

Maksarakkude plasmamembraani ja vere vahelist ainevahetust vahendab perisinusoidaalne vereplasmast sisaldav ala ehk Disse vahe, mis võimaldab hepatotsüütide basaalpinnal paiknevatel mikrohattudel absorbeerida vereplasmast metaboliite ja toksine (Joonis 3). Lisaks vereplasmale on perisinusoidaalses piirkonnas ka maksa tähtrakud ehk Ito rakud, mis sisaldavad rasva ja rasvlahustuvaid vitamiine (nt vitamiin A) ning toodavad ekstratsellulaarset maatriksit ja kollageeni (Joonis 3). (Bioulac-Sage jt, 1992). Sinusoide moodustavad omakorda endoteeli rakud, mis on õhukesed ja sisaldavad palju pinotsütootilisi vesiikuleid (Gendrault jt, 1988). Endoteeli rakkude vahel ja sinusoidses luumenis paiknevad Kupfferi rakud (Joonis 3), mis on oma olemuselt makrofaagid. Nende ülesandeks on ära tunda ja lagundada sinusoide läbivaid vanu erütrotsüüte ja seega on Kupfferi rakud ka osa retikuloendoteliaalsüsteemist. (Bioulac-Sage jt, 1992; Gendrault jt, 1988; Jones ja Summerfield, 1988)



Joonis 3. Maksas rakutüübid ja nende paiknemine. Mustad nooled kujutavad vere ja sapi liikumise suunda. Modifitseeritud (Frevrt jt, 2005).

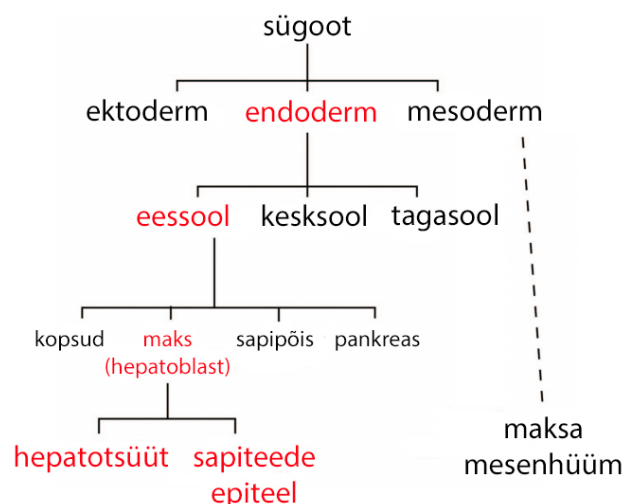
Väikeseid sinusoididega paralleelselt paiknevaid ja sappi koguvaid juhasid nimetatakse sapikanaliteks (Joonis 2; Joonis 3). Hepatotsüütide apikaalselt pinnalt kanalitesse sekreteeritava sapi liikumise suund on aga vastupidine sinusoidides liikuva vere suunale. Eritatud sapp suunatakse läbi sapiteede epiteeli- ja maksarakkudest koosneva Heringi kanali ning seejärel liigub see sapiteede epiteeli rakkudest moodustunud sapijuhasse. Sagariku äärealal paiknev sapijuha on omakorda paralleelne portaalveeni ja maksaarteriga ning vastav veresoonte paar koos sapijuhaga moodustab portaalala ehk maksatriaadi (Joonis 3). Kuna väikesed sappi koguvad kanalid ühinevad sapijuhadeks ja need omakorda suureks maksajuhaks, siis moodustub sapiteedest haruline puud meenutav struktuur. (Bioulac-Sage jt, 1992; Saxena ja Theise, 2004)

Üheks maksa sapiteede epiteeli rakke iseloomustavaks markeriks on 40 kDa molekulmassiga keratiin 19 (K19, ingl *keratin 19*), mis on epiteelirakkude struktuurse terviklikkuse eest vastutav intermediaalne filament. K19 on happelistest valkudest koosnev tüüp I keratiin, mis moodustub heterotüüpilistest tüüp I ja tüüp II keratiini paaride ahelatest. (Moll jt, 2008; Moll jt, 1982; Zatloukal jt, 2004; Van Eyken ja Desmet, 1993). Võrreldes teiste sapiteede markeritega, mis leiduvad ainult sapiteede epiteeli rakkudes, on K19 ekspressiooni tuvastatud ka väiksemate sapiteede harude ja ka Heringi kanali rakkudes. Samuti on selle ekspressiooni leitud loote maksa hepatoblastidest, kuid mitte täiskasvanud organismi maksarakkudest. Nende iseloomulike omaduste tõttu arvatakse, et K19 ekspresseerivad rakud võivad olla ka maksa tüvirakud. (Paku jt, 2005; Van Eyken jt, 1988)

Täiskasvanud ja ka loote maksarakkudele on iseloomulik verre sekreteeritava 55 kDa molekulmassiga homotetrameeri transtüretiini (TTR, ingl *transports thyroxine and retinol*) süntees. Tetrameeri monomeerid koosnevad 127 aminohappest ja moodustavad palju beeta-leht struktuure. Verre sekreteerituna seondub homotetrameer retinooli (vitamiin A) siduvate valkude ja kilpnäärme hormooni türoksiiniga (T4). TTRi on kutsutud ka prealbumiiniks, sest elektroforeesigeelil liigub transtüretiin kiiremini kui vereseerumi valk albumiin. (Blake ja Oatley, 1977; Dickson jt, 1982; Foss jt, 2005; Ingbar, 1963; Kanai jt, 1968; Raz ja Goodman, 1969; Soprano jt, 1986). Hepatotsüütidele iseloomulik TTR valgu süntees on tagatud maksale ainuomaste transkriptsioonifaktoritega (nt HNF, ingl *hepatocyte nuclear factor*), mis puuduvad pea kõigis teistes loote või täiskasvanud organismi rakutüüpides (Costa ja Grayson, 1991; Soprano jt, 1986).

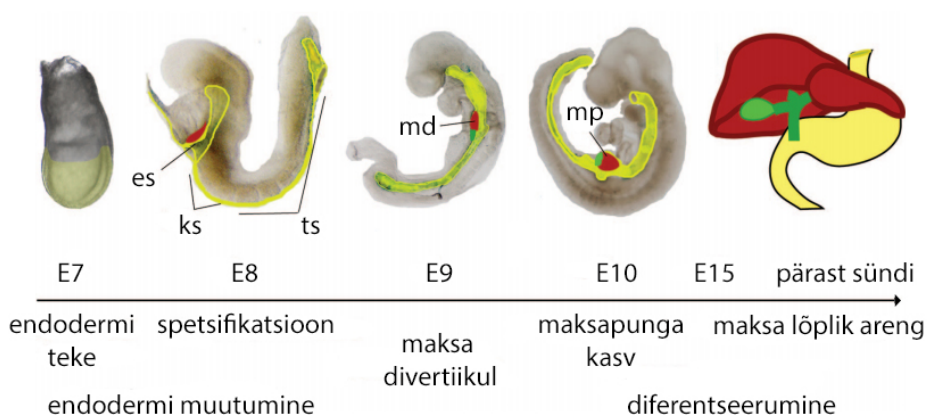
1.1.2. Maksa organogenees

Loomudelite uuringutes on tuvastatud, et hepatogenees on evolutsiooniliselt kõrgelt konserveerunud ning sõltub embrüonaalse endodermi ja mesodermi vastastikustest interaktsioonidest. Selle tulemusena arenevad embrüonaalsest mesodermist tähtrakud, Kupfferi rakud ja veresooned. Endodermist saavad aga alguse maksa peamise rakumassi moodustavad hepatotsüüdid ja sapiteede rakud. Embrüo gastrulatsioonis tekib endodermaalne looteleht, millest moodustub ürgsool, mis jaotatakse omakorda ees-, kesk- ja tagasoole piirkonnaks. Embrüonaalse maksa areng algab eessoole epiteeli väljasopistusest ehk divertikulist, mille eesmisest osast areneb maks ja sapiteed ning tagumisest osast sapipõis ja maksavälised sapijuhavad. (Joonis 4) (Zaret, 2008; Zhao ja Duncan, 2005; Zorn, 2008; Tremblay ja Zaret, 2005)



Joonis 4. Maksa rakutüüpide põlvnemine embrüonaalse arengu käigus. Punase tekstiga on välja toodud maksa ja sapiteede rakkude areng alates endodermist kuni funktsionaalsete rakkudeni. Modifitseeritud (Zorn, 2008).

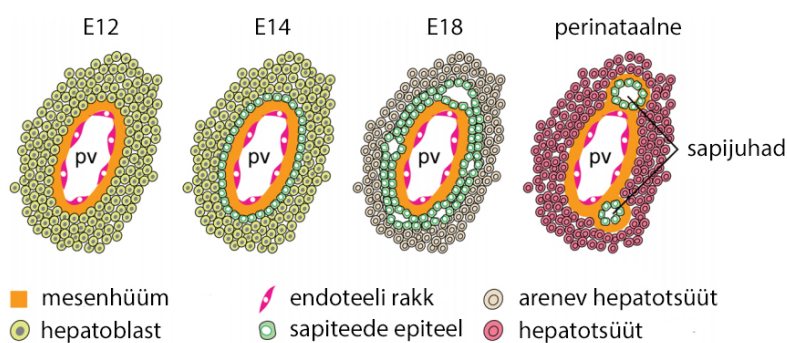
Väljasopistunud ja paksenenud ventraalse eessoole rakke, ehk tulevasi maksa ja sapiteede rakke, nimetatakse hepatoblastideks. Antud rakud tungivad STMi (ld *septum transversum mesenchyme*) ja moodustavad kiirelt kasvava maksapunga, mille vaskulariseerivad ning koloniseerivad hematopoeetilised rakud. Maksapunga hepatoblastid on bipotentsiaalsed ehk parenhüümis paiknevatest rakkudest saavad hepatotsüüdid ja portaalveenide läheduses paiknevad rakud diferentseeruvad sapiteede epiteeli rakkudeks. (Joonis 5) (Houssaint, 1980; Lemaigre, 2003; Shiojiri, 1984; Zorn, 2008)



Joonis 5. Hiire (ld *mus musculus*) maksa arenguetapid. Kollane tähistab endodermi, punane maksa, roheline sapipõit ja E embrüonaalset päeva. Gastrulatsioonis moodustub endoderm (E7), millest areneb ürgsool ees- (es), kesk- (ks) ja tagasooles (ts) piirkonnaga (E8). Seejärel toimub eessoole endodermi väljasopistumine (md) (E9) ja tekib maksapung (mp) (E10). Sellele järgneb maksa kasvamine ning hepatoblastide diferentseerumine hepatotsüütideks ja sapiteede rakkudeks. Maksa täielik areng lõppeb alles pärast sündi. Modifitseeritud (Zorn, 2008).

Algselt ekspresseerivad hepatoblastid markereid, mis on iseloomulikud nii täiskasvanud hepatotsüütidele (albumiin; HNF4 α), sapiteede epiteelile (K19) kui ka vähediferentseerunud rakkudele (AFP, ingl *α -fetoprotein*). Periportaalses mesenhüümis sünteesitavate TGF β (ingl *transforming growth factor beta*) ja Wnt signaalide toimel hakkavad aga külgnevates hepatoblastides ekspresseeruma transkriptsioonifaktorid OC1 (ingl *Onecut-1*), OC2 ja HNF1 β , mis suunavad rakke arenema sapiteede epiteeli rakkudeks. Mesenhümaalsed signaalid on ka represserivad, takistades hepatoblastides maksarakkudele omaste transkriptsioonifaktorite (HNF) sünteesi, et seeläbi takistada rakkude diferentseerumist hepatotsüütideks. Nende mesenhümaalsete signaalide tulemusena tekib periportaalsetest hepatoblastidest kõigepealt ühe- ja seejärel kahekihiline sapiteede eellasrakkude kiht (Joonis 6). Kahekihilise epiteelirakkude kihi lõhenemisel moodustuvad sapijuhade meenutavad torujad struktuurid. Seejärel liigub mesenhüüm tekkinud sapijuhade ümber ning ülejäänud sapiteede eellasrakud regresseeruvad apoptootiliselt. (Joonis 6) (Clotman jt, 2005; Houssaint, 1980; Hussain jt, 2004; Lemaigre, 2003; Medlock ja Haar, 1983; Sergi jt, 2000; Shiojiri, 1984; Shiojiri jt, 2004; Zorn, 2008)

Samal ajal aga suureneb hepatoblastides, mis ei puutu kokku sapiteede epiteeli arengut toetavate signaalidega, hepatogeensete faktorite ekspressioon. Maksarakkude arengut toetavad ka hematopoeetilistest rakkudest ja mesenhüümist pärit OSM (ingl *Oncostatin M*), Dex (ingl *dexamethasone*), HGF (ingl *hepatocyte growth factor*) ja Wnt signaalid. Nende koostoimel tekib rakkudel hepatotsüütidele iseloomulik epiteeliline morfoloogia ning paiknemine. (Joonis 6). Maksarakkude funktsionaalne küpsemine ja sapiteede võrgustiku ühendamine maksaväliste sapiteedega on aga järkjärguline protsess, mis lõppeb alles pärast sündi (Joonis 5). (Houssaint, 1980; Kamiya jt, 2001; Lemaigre, 2003; Medlock ja Haar, 1983; Michalopoulos jt, 2003; Sergi jt, 2000; Shiojiri, 1984; Zorn, 2008; Tan jt, 2008)



Joonis 6. Sapijuha moodustumine hiire maksas. E tähistab embrüonaalset päeva ja pv portaalveeni. Alates E13 hakkavad portaalveeniga kontaktis olevad hepatoblastid diferentseeruma sapiteede epiteeli rakkude suunas (E14). Seejärel toimub rakkude kihi duplikatsioon ja lõhenemine, millele järgneb juhade moodustumine (E18). Parenhüümis paiknevad hepatoblastid diferentseeruvad aga hepatotsüütideks. Modifitseeritud (Zorn, 2008).

1.1.3. Maksa postnataalne areng

Enne sündi on maks peamiselt hematopoeetiline organ, millel on vähene metaboliseerimise võime. Alles postnataalselt saavutab maks oma täisfunktsionaalsuse, mis hiirtel võtab aega kuni 30 päeva ja inimestel kuni 5 aastat (Walthall jt, 2005). Esimeste sünnijärgsete nädalate jooksul toimub ulatuslik hepatotsüütide proliferatsioon ja diferentseerumine, mis põhjustab maksa mitmekordset suurenemist. Sellele järgneb aga järsk rakkude jagunemise aktiivsuse vähenemine, kui on saavutatud täiskasvanule iseloomulik maksa ja kehamassi suhe (1:25). Sünnijärgse arengu käigus omandab maks täiskasvanule iseloomuliku geeniekspressiooni ning algab metaboliseerivate ensüümide ja teiste maksale omaste valkude süntees. (Apte jt, 2007; Behrens jt, 2002; Dalu ja Mehendale, 1996; Hart jt, 2009; Klaassen ja Aleksunes, 2010; Limaye jt, 2006)

Postnataalsele maksale spetsiifiliste geenide ekspressiooni eest vastutavad mitu tuumaretseptorit, nagu näiteks HNF4 α , CAR (ingl *constitutive androstane receptor*) ja PXR (ingl *pregnane X receptor*) (Duncan jt, 1998; Gonzalez, 2008; Hart jt, 2009; Raz ja Goodman, 1969). Maksa suurust reguleerib Hippo kinaasi signaalirada, mis on liigiti kõrgelt konserveerunud ja seotud üldiselt organi suuruse määratlemisega (Dong jt, 2007; Pan, 2010; Zhao jt, 2008). Üheks antud signaaliraja transkriptsiooniliseks koaktivaatoriks on näiteks allavoolu paiknev YAP (ingl *Yes-associated protein*) valk, mis seondub Sd (ingl *scalloped*) transkriptsioonifaktoriga ja initsieerib mitogeenset geeniekspressiooni ning seeläbi ka rakkude jagunemist (Dong jt, 2007). Koaktivaator YAP vastutab ka maksarakkude diferentseerumise eest ning mõjutab maksa homöostaasi eest vastutavaid geene (Septer jt, 2012). Lisaks Hippo kinaasi signaalirajale võib maksa kasvu ja suurust mõjutada ka Wnt/ β -kateniin signaalirada, kuid selle reguleeriv mehhanism pole veel teada (Apte jt, 2007).

1.1.4. Maksa funktsioonid

Maks vastutab paljude eluliste metaboolsete, ekso- ja endokriinsete funktsioonide eest. Metaboolset funktsiooni iseloomustab seedesüsteemist imendunud toitainete liikumine läbi maksa portaalveresüsteemi ja nende töötlemine vastavalt organismi vajadusele. Maksale on omane nii toitainete talletamine kui ka neist kehale vajalike ühendite tootmine. Näiteks organismis energiaallikana kasutatav, kuid mingil hetkel üle jääv monosahhariidne glükoos varundatakse hepatotsüütides polüsahhariidse glükogeenina. Vajadusel on võimalik seda taas glükoosiks muuta ja kasutada energia tootmiseks. (Bjorntorp ja Sjostrom, 1978; Michael jt, 2000; Nordlie jt, 1999; Pilkis ja Granner, 1992)

Maksarakud absorbeerivad ka veres leiduvaid rasvhappeid, mida metaboliseeritakse energia ehk ATP tootmiseks. Samuti imendavad ja hoiustavad hepatotsüüdid mineraale, nagu vask ja raud, ning rasvlahustuvaid vitamiine (A, D, E, K, vitamiin B12) (Anderson jt, 2007; Phillips jt, 2001; Roberts ja Sarkar, 2008; Schadinger jt, 2005). Lisaks varundamisele on üheks maksa funktsiooniks ka kahjulike ainete (ammoniaak, toksiinid, ravimid), valkude ja vanade hormoonide eemaldamine, lagundamine või detoksifitseerimine (Grant, 1991). Näiteks ravimid võidakse maksas aktiveerida või inaktiveerida enne, kui need jõuavad organismi teistesse kudedesse.

Maksal on ka palju sünteesi funktsioone, nagu sappi, transportvalkude, verehüübe faktorite ja kolesterooli tootmine. Neist esimene on paks rohekaskollane vedelik, mis sisaldab kolesterooli, fosfolipiide, bilirubiini ja sapisoolasid. Sappi sünteesitakse maksas, kuid kogutakse sapipõide, mis rasvase toidu korral tühjendatakse peensoolde, et hõlbustada toidu seedimist. Sapp on vajalik rasvade lagundamiseks ja ettevalmistamiseks edasiseks seedimiseks ja imendumiseks, kuna selle toimel emulgeeruv rasv on organismile paremini omastatav. (Chiang, 2009; Hofmann, 1999; Hofmann jt, 2010; Russell, 2003)

Maks sünteesib ka peaaegu kõiki veres leiduvaid valke (va antikehad), millest kõige olulisemad on albumiin (Schreiber jt, 1970; van den Akker jt, 2008) ja verehüübefaktorid (protrombiin, fibrinogeen) (Cohen jt, 1997; Tennent jt, 2007). Albumiin hoiab vere isotoonilist keskkonda ning verehüübefaktorid vastutavad vigastuse korral vere koagulatsiooni eest. Maksas sünteesitakse ka kolesterooli, mida transporditakse koos lipoproteiinidega ning vajadusel sekreteeritakse sappi (Cohen, 2008; Jeske ja Dietschy, 1980; Turley jt, 1995). Seega reguleerivad maksarakud nii vere kolesterooli kui ka glükoosi taset ja aitavad seeläbi hoida organismi homöostaasi.

1.2. Maksa regeneratsioon

1.2.1. Maksa regeneratsioon normaaltingimustes

Maksa suure regeneratsioonivõime tõttu on oletatud, et maksa uuenemine toimub klassikalise tüvirakkude mudeli alusel, kus koespetsiifilised täiskasvanud tüvirakud jagunevad ja diferentseeruvad spetsialiseerunud rakkudeks ning seeläbi tagatakse koe uuenemine. Maksa koespetsiifiliste tüvirakkude teooria kohaselt kujutab maksaplaat diferentseerumise rada, kus hepatotsüütide migreerumisel maksaplaadi periportaalsest piirkonnast perivenoossesse väheneb rakkude replikatiivne võimekus. Seega perivenoossesse piirkonda jõudnud maksarakud on lõpetanud jagunemise ja hukuvad. Seda rakkude spetsialiseerumise ja

liikumise hüpoteesi nimetatakse voolava maksa mudeliks (ingl *streaming liver/flowing liver model*). (Duncan jt, 2009; Sigal jt, 1992; Susick jt, 2001; Zajicek jt, 1985). Selle mudeli tõestuseks leiti periportaalsed mitokondriaalsete mutatsioonidega hepatotsüüdid, mis kлонаalse jagunemise korral on leitavad ka peritsentraalses piirkonnas. Seega mutatsioonide kлонаalne paiknemine ja liikumine viitab võimalikule maksarakkude diferentseerumise ja liikumise mustrile. (Fellous jt, 2009)

Voolava maksa hüpoteesi ümberlukkavaid tulemusi on aga tunduvalt rohkem. Näiteks eeldab antud mudel, et periportaalsed rakud on eellasrakud ehk ekspresseerivad hepatoblastidele omaseid gene. Samas on leitud, et periportaalsedel rakkudel on diferentseerunud hepatotsüütidele omased funktsioonid ja puudub ka hepatoblaste iseloomustav *AFP* geeni ekspressioon. (Petropoulos jt, 1985; Poliard jt, 1986). Seega võib arvata, et periportaalselt paiknevad rakud on sama diferentseerunud nagu perivenoosselt paiknevad rakud. Maksarakkude migreerumise ja diferentseerumise hüpoteesi lükkab ümber ka hepatotsüütide geeniekspressiooni mustri sõltuvus vere liikumise suunast, sest selle muutmisel tekib rakkudes ka teistsugune ekspressioonimuster. Seega on sagarike tsoonid pigem metaboliitsõltuva geeniregulatsiooniga ning ei sõltu rakkude progressioonist. (Duncan jt, 2009; Thurman ja Kauffman, 1985). Täiskasvanud hepatotsüütide migratsiooni puudumisele viitavad ka retroviirusega märgitud hepatotsüütide ja emaste hiirte X-inaktivatsiooni mustrite uuringud, kus transplanteeritud maksarakud ei muutnud 15 kuu jooksul oma asukohta (Bralet jt, 1994; Shiojiri jt, 2000).

Kuna voolava maksa hüpoteesi ei ole suudetud eksperimentaalselt tõestada, siis ei ole ka antud mudelile kindlaks jäänud. Arvatakse, et maksa uuenemine võib tegelikult toimuda kogu sagariku ulatuses ning selle eest vastutavad diferentseerunud hepatotsüüdid. Näiteks on jagunevaid maksarakke tuvastatud nii periportaalaladelt kui ka sagariku keskelt. Samuti on kõigist täiskasvanud maksa sagarike segmentidest leitud S-faasi hepatotsüüte. Diferentseerunud hepatotsüütide jagunemist kinnitavad ka uuringud mosaiiksete kimäärsete maksadega, kus replitseeruvad maksarakud paiknesid kogu sagariku ulatuses juhuslikult. (Grisham, 1969; Ng ja Iannaccone, 1992; Wright ja Alison, 1984). Antud tulemuste põhjal arvatakse, et maksa uuenemise eest vastutavad tüvirakkude asemel hoopis spetsialiseerunud, kuid jagunemisvõimelised hepatotsüüdid.

Lisaks diferentseerunud maksarakkude jagunemisele on sapiteede rakkude põlvnemise uuringutega näidatud, et hiire elu jooksul toimub ka hepatotsüütide asendamine sapiteede epiteeli rakkudest pärinevate transdiferentseerunud maksarakkudega (Furuyama jt, 2011).

Samas on ka palju vastupidiseid väiteid, kus sarnast meetodit kasutades tuvastati ainult väga üksikuid oletatavalt sapiteedest pärit rakke. (Carpentier jt, 2011; Malato jt, 2011; Tarlow jt, 2014). Kuna nende meetodite korral sisestatakse hiire genoomi uus geneetiline element, siis võib transgeeni naabruses paiknevate geenide funktsioon muutuda. Näiteks Furuyama katse korral võis olla tavapärase hepatotsüütide proliferatsioon häiritud ja seega aktiveerunud regeneratsiooni korral sapiteede rakud, mis hakkasid aeglaselt hepatotsüüte asendama. Samuti võivad tulemust mõjutada geeni ekspresseerimiseks kasutatavad erinevad hepatotsüütidele või sapiteedele iseloomulikud promootorid, mis muudavad tulemuste omavahelise võrdlemise ja kooskõlastamise veelgi keerulisemaks. (Michalopoulos, 2014)

Olenemata vastuolulistest eksperimentaalsetest tulemustest, võivad potentsiaalsed rakkudevahelised transdiferentseerumised olla küllaltki tõenäolised, sest nii maksa- kui ka sapiteede rakud on arenenud embrüonaalsetest hepatoblastidest (Carpentier jt, 2011). Rakkude muutumist on nähtud näiteks hepatotsüütide (*in vitro*) primaarkultuuris, kus kahe kuni kolme päeva jooksul hakkavad maksarakud ekspresseerima sapiteede epiteeli rakkudele iseloomulikke biomarkereid (Sirica jt, 1979). Samuti on koekultuuri selektiivtingimustega identifitseeritud kasvufaktoreid ja tsütokiine (HGF ja EGF, ingl *epidermal growth factor*), mis soodustavad hepatotsüüdi muutumist sapiteede rakuks. Samas ei ole eksperimentaalsed *in vivo* katsed koekultuuris toimuvat transdiferentseerumist kinnitanud. (Michalopoulos, 2014; Tarlow jt, 2014)

1.2.1.1. Maksa täiskasvanud tüvirakud

Maksa suure regeneratsioonivõime tagavad diferentseerunud ning jagunemisvõimelised maksa ja sapiteede rakud. Normaalse maksakoe asendumine on küll väga aeglane, kuid spetsialiseerunud hepatotsüütide jagunemine võimaldab kuni 70% maksa eemaldamisel taastada selle algupärase massi. Seega maksarakkude jagunemine tagab maksa uuenemise normaaltingimustel, kuid see ei välista täiskasvanud tüvirakkude osalemist antud protsessis või maksakahjustuse korral. Samas ei ole suudetud maksa täiskasvanud tüvirakke veel tuvastada ning seetõttu ka kaheldakse endiselt nende olemasolust. (Fausto jt, 2006; Malato jt, 2011; Michalopoulos, 2007, 2013; Novikoff ja Yam, 1998; Santoni-Rugiu jt, 2005; Sell, 1990; Stocker jt, 1973)

Koespetsiifilised tüvirakud jagunevad kas uueks tüvirakuks või eellasrakuks ning seetõttu on maksa tüvirakkude tuvastamiseks kasutatud sünteesitavasse DNAsse lülituvat tümidiinile analoogset bromodesoksüüridiin (BrdU, ingl *bromodeoxyuridine*) nukleosiidi. Rakkude jagunemisel BrdU hulk väheneb ehk kõige rohkem leidub antud molekuli vähejagunevates

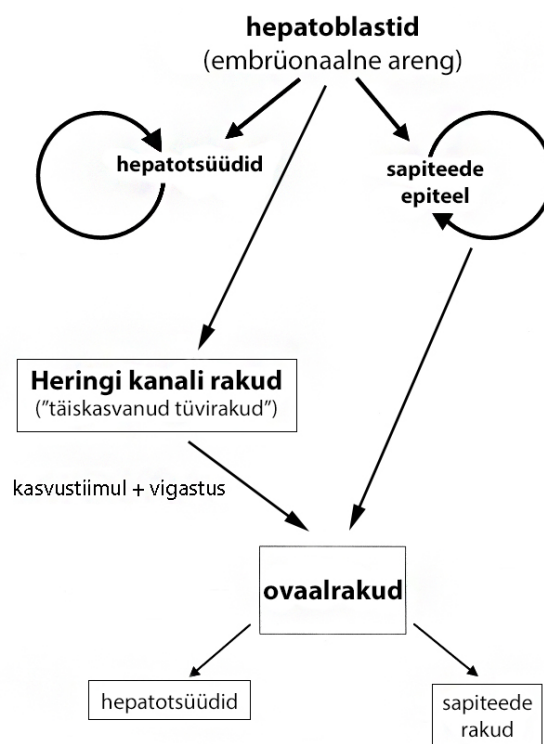
rakkudes ning jagunevates eellasrakkudes on selle hulk vähenenud. Antud meetodit kasutades osutusid kõige vähem jagunevateks sapijuhade rakud ja nende vahetus läheduses paiknevad periportaalsed hepatotsüüdid. Samas ei saa leitud rakke nimetada tüvirakkudeks, sest nad täidavad ka diferentseerunud rakkudele omaseid funktsioone. (Kee jt, 2002; Kuwahara jt, 2008)

Maksa tüvirakkude tuvastamiseks on kasutatud ka pankreases, neerus ja hematopoeetilistes tüvirakkudes leiduvat markerit Prominin-1/CD133 (CD, ingl *cluster of differentiation*), mille bioloogiline roll pole küll teada, kuid on leitud selle võimalik seos raua omastamise ja endotsütoosiga (Bourseau-Guilmain jt, 2011; Oshima jt, 2007; Richardson jt, 2004; Sagrinati jt, 2006; Yin jt, 1997). Samuti saab tüvirakke eristada sapiteede epiteelile iseloomulike adhesioonimolekulide abil. Üheks võimaluseks on näiteks sapiepiteelis ekspresseeritava EpCAM (ingl *Epithelial Cell Adhesion Molecule*) tuvastamine koos albumiini ja K19 valkudega (Okabe jt, 2009; Schmelzer jt, 2007).

Potentsiaalsed tüvirakud võivad paikneda ka Heringi kanalites, mis on sapiteede ja maksarakkude ühinemiskohaks. Heringi kanalitest on leitud nii hepatotsüütidele kui ka sapiteede rakkudele iseloomulikke transkriptsioonifaktoreid ja biomarkereid ekspresseerivaid rakke (Isse jt, 2013). Antud rakud võivad põlvneda loote maksa hepatoblastidest, mis on tüviraku nišis säilinud diferentseerumatuna. (Alison jt, 1996; Dan ja Yeoh, 2008; Schmelzer jt, 2006; Zorn, 2008; Theise jt, 1999; Yovchev jt, 2008). Võimalikule tüvirakulisele vaheetapile viitab ka paljude embrüo hepatogeneesi reguleerivate signaaliradade, nagu HGF, FGF (ingl *fibroblast growth factor*), OSM, TNF α (ingl *tumor necrosis factor alpha*) ja Wnt, osalemine regeneratiivse maksa hepatotsüütide proliferatsioonis ja bipotentsiaalsete ovaalrakkude aktivatsioonis. (Joonis 7) (Apte jt, 2007; Bird jt, 2008; Hu jt, 2007; Michalopoulos, 2007; Zorn, 2008)

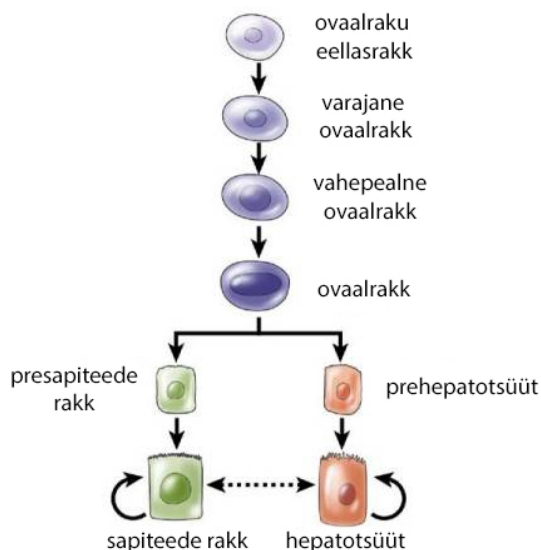
1.2.2. Maksa regeneratsioon kahjustuse korral

Ovaal- ehk eellasrakud on bipotentsiaalsed ovaalse tuumaga rakud, mis suudavad diferentseeruda nii maksa kui ka sapiteede rakkudeks. Inimesel tekivad ovaalrakud kroonilise ja tsirrootilise maksahaiguse korral, võimaldades maksa regeneratsiooni hepatotsüütide jagunemise häirete korral. Sõltuvalt maksakahjustusest tekivad ovaalrakud sagariku erinevates piirkondades ehk on võimalik, et peritsentraalsed eellasrakud tekivad Heringi kanalis paiknevatest rakkudest ja periportaalsed ovaalrakud on pärit sapiteede rakkudest (Joonis 7). (Bird jt, 2008; Fausto ja Campbell, 2003; Itoh ja Miyajima, 2013; Michalopoulos, 2014; Roskams jt, 1998; Sekiya ja Suzuki, 2014)



Joonis 7. Täiskasvanud maksa rakutüüpide põlvnemine. Täiskasvanud maksa hepatotsüüdid ja sapiteede epiteeli rakud saavad alguse hepatoblastidest. Heringi kanalis võivad paikneda hepatoblastidest alguse saanud maksa täiskasvanud tüvirakud. Maksakahjustuse tagajärjel tekivad Heringi kanalis paiknevatest rakkudest ovaalrakud, mis võivad diferentseeruda nii maksa- kui ka sapiteede rakkudeks. Modifitseeritud (Fausto ja Campbell, 2003).

Ovaalrakkude osalemise maksakahjustuse parandamises saab jagada neljaks: aktivatsioon, proliferatsioon, migratsioon ja diferentseerumine (Erker ja Grompe, 2007). Kahjustuse tagajärjel ovaalrakud suurenevad, jagunevad, migreeruvad sagarikku ja diferentseeruvad väikesteks hepatotsüütideks, mis seejärel muutuvad funktsionaalseteks maksarakkudeks (Joonis 8) (Evarts jt, 1996; Hu jt, 1995; Isse jt, 2013; Michalopoulos, 2013; Nagy jt, 1994). Kuigi nimetus „ovaalrakud“ on maksa eellasrakkude kirjeldamisel laialdaselt kasutusel, ei ole suudetud kokku leppida nende fenotüübilistes ja/või molekulaarsetes omadustes. Terminit „ovaalrakk“ kasutatakse tegelikult ovaalrakkude aktivatsiooni korral tekkiva heterogeense rakupopulatsiooni kirjeldamiseks, mis võib tähendada nii aktiveeritud fibroblaste kui ka sapijuhade, täht- ja eellasrakke. Samuti on ebaselge, kas erinevates liikides ja erinevate kahjustuste toimetel tekkivad ovaalrakud on võrreldavad. (Duncan jt, 2009). Siiski ollakse ühel meelel, et eellasrakud ei teki täiskasvanud hepatotsüütidest (Wang jt, 2003).



Joonis 8. Ovaalrakkude heterogeensuse mudel. Ovaalrakkude erinevad proliferatiivse aktiivsuse ja diferentseerumise etapid. Bipotentsiaalsest ovaalrakust arenevad prehepatotsüüdid ja presapijuhade rakud, mis omakorda spetsialiseeruvad vastavalt maksarakkudeks ja sapiteede rakkudeks. Modifitseeritud (Duncan jt, 2009).

Sapiteede epiteelist tekkivates ovaalrakkudes on algselt ekspresseeritud nii sapiteede epiteeli biomarkerid kui ka hepatoblastidele omased albumiin ja AFP. Eellasrakkude diferentseerumiseks hepatotsüütideks aitavad kaasa maksa mittepahrenüümi rakud, muutused ekstratsellulaarses maatriksis, tsütokiinid ja kasvufaktorid, nagu TGF α , HGF ja EGF. Näiteks tähtrakkud sekreteerivad kasvufaktoreid ja tsütokiine ning mõjutavad ovaalrakkude arengut ka rakk-rakk interaktsioonide kaudu. Samas mõjutavad hepatotsüüte ja eellasrakke sarnased tsütokiinid ja kasvufaktorid ning mõlemad rakud on seotud mittepahrenüümi rakkudega. Seega on võimalik, et Kupfferi ja tähtrakkudest tulevad signaalid määravad, kas regeneratsioon tagatakse maksarakkude või ovaalrakkude proliferatsiooni abil. (Barker jt, 2007; Evarts jt, 1996; Fausto ja Campbell, 2003; Hu jt, 1995; Huch jt, 2013; Michalopoulos, 2014; Nagy jt, 1994; Okabe jt, 2009; Paku jt, 2001)

Ovaalrakkude aktivatsiooni põhjustavad ka erinevad mürgistused ja haigused. Näiteks hepatotsüütide nekroosi tekitavate haiguste korral ekspresseeruvad sapiteede rakkudes maksarakkudega seotud transkriptsioonifaktorid ning inimese sapiteede haiguste korral on hepatotsüütides sapiteede transkriptsioonifaktorid. Inimese maksapuudulikkuse korral on leitud ka regeneratiivsete rakkude klastreid, millel on nii hepatotsüütidele kui ka sapiteede omaste biomarkerite ekspressioon. Antud leiud viitavad taas võimalikule kahjustusest sõltuvale mõlemapoolsele transdiferentseerumisele. (Fausto ja Campbell, 2003; Isse jt, 2013; Limaye jt, 2008; Michalopoulos, 2014; Petersen jt, 1997)

1.2.2.1. Maksa regeneratsioon vastuseks osalise maksakoe eemaldamisele

Enim kasutatud ja uuritud maksa regeneratsiooni mudeliks on osaline hepatektoomia (PH, ingl *partial hepatectomy*), mille käigus eemaldatakse kuni 70% maksa massist. Osalist hepatektoomiat kasutatakse inimestel maksa hea- ja pahaloomuliste kasvujate, sapikivide ja tsüstide eemaldamiseks. Hiirtel uuritakse aga PH abil maksa regeneratsioonimehhanismi. Osalise hepatektoomia korral ei kasva eemaldatud maksakude tagasi, vaid allesjäänud rakud hakkavad aktiivselt jagunema, põhjustades koe suurenemist ja seeläbi kaotuse kompenseerimist. Nii taastub regeneratsiooni tulemusena maksa algne mass, kuid mitte anatoomiline kuju. Seega võib eeldada, et kompensatoorne kasv on kindlalt kontrollitud protsess, mis on seotud maksa funktsiooni taastamisega, kuid ei sõltu selle anatoomilisest vormist. (Bucher, 1963; Fausto, 2000; Fausto ja Campbell, 2003)

Maksa regeneratsiooni protsessi juhivad tsütokiinid, kasvufaktorid ja hormoonid. Regeneratsiooni eest vastutavateks tsütokiinideks on näiteks TNF α ja IL-6 (ingl *interleukin 6*), mis on osa kaasasündinud immuunsusest. Pärast PHd väheneb maksa endotoksiini (LPS, ingl *lipopolysaccharide*) detoksifikatsioonivõime ja sellega kaasneb lipopolüsahhariidi kontsentratsiooni tõus, mis omakorda stimuleerib Kupfferi rakke produtseerima regeneratsiooni eest vastutavaid tsütokiine TNF α ja IL-6. Tsütokiin TNF α ja selle signaalmolekul NF- κ B (ingl *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) indutseerivad IL-6 ekspressiooni, mis seondub hepatotsüütide retseptorkompleksiga. Seejärel aktiveerub STAT3 (ingl *signal transducer and activator of transcription 3*) ning hepatotsüütid suunatakse prolifereeruma. (Apte jt, 2009; Campbell jt, 2001; Cornell, 1985; Cressman jt, 1996; Fausto, 2004; Fausto jt, 2006; Gao, 2005; Haga jt, 2009; Koniaris jt, 2003; Li jt, 2002; Michalopoulos, 2007, 2010; Taub, 2004; Wang jt, 2010; Xu jt, 2007; Yamada jt, 1997; Yin jt, 2011)

Hepatotsüütide prolifereerumist stimuleerivad ka maksarakkude parakriinseid signaalid, mis suunavad mitteparenhüümi rakke tootma kasvufaktoreid ja tsütokiine. Rakkudevaheliste signaalide tulemusena väljuvad 95% hepatotsüütidest G0 faasist ja sisenevad G1 faasi. Samas on põletikuline vastus ja tsütokiinide tootmine aktiivsed esimese 24 tunni jooksul pärast PHd, kuid maksa regeneratsiooni regulatsioon pikema aja vältel ei ole veel täpselt teada. Rakkude jagunemine peatub aga maksa algse suuruse ja ruumala taastumisel, mis hiirtel kestab seitse kuni kümme päeva ja inimesel kolm kuni neli kuud. (Fausto, 2004; Grisham, 1962; Michalopoulos, 2010; Taub, 2004; Yin jt, 2011)

1.2.2.2. Maksa regeneratsioon vastuseks keemilisele kahjustusele

Süsiniktetrakloriid (CCl_4) on toksiline ühend, mida kasutatakse maksakahjustuse tekkimise ja paranemise uurimiseks (Parola jt, 1992; Weber jt, 2003). CCl_4 tekitab oksüdatiivset stressi ja aktiveerib põletikku tekitavaid rakke, mis seejärel põhjustavad maksa ehitusliku ja funktsionaalse kahjustuse. Antud toksiini tagajärjel tekkiv kahjustus imiteerib inimese maksarakkude kahjustust, maksafibroosi ja -tsirroosi. Seeläbi on võimalik hiirte peal uurida inimese maksafibroosi ja -tsirroosi võimalikke tekkemehhanisme ja maksa regeneratsiooni. (Johnson jt, 1992; Kalinichenko jt, 2003; Poli, 1993)

Toksiini lagundamine algab endoplasmaatilises retiikulumis ja mitokondrites, kus oksügenaasi tsütokroom P450 metaboliseerib CCl_4 molekulid triklorometüülks (CCl_3), mis on väga reaktiivne vaba radikaal (McCay jt, 1984; Recknagel jt, 1989; Stoyanovsky ja Cederbaum, 1999; Tomasi jt, 1987). Triklorometüül reageerib hepatotsüütide plasmamembraani, lüsoosoomide ja mitokondrite membraanidega, muudab seeläbi nende läbitavust ja kahjustab rakke. Kahjustuse tagajärjel hukub 50- 60% hepatotsüütidest ja niivõrd massiivne nekroos kutsub esile põletikulise reaktsiooni ning infiltreeruvate neutrofiilide, makrofaagide, Kupfferi rakkude, lümfotsüütide ja NK (ingl *natural killer*) rakkude arv suureneb märgatavalt. (Canbay jt, 2004; Czaja, 1998; Manibusan jt, 2007; Ramadori ja Saile, 2004; Saile ja Ramadori, 2007; Shi jt, 1998; Weber jt, 2003)

CCl_4 indutseeritud mürgistuse tõsidus sõltub ka doosi suuruselt ja kahjustuse kestvusest. Madalate dooside juures tekivad mööduvad nähtused, nagu probleemid Ca^{2+} homöostaasis, tsütokiinide vabanemine, nekroos ja steatoos, millele järgneb toksiini elimineerimisel maksa regeneratsioon ning kahjustuse kõrvaldamine (Kim jt, 2006; Muriel ja Mourelle, 1990). Suuremate dooside korral ja/või pikema kahjustuse korral on tagajärjed tõsisemad, sest tekib lipiidide degeneratsioon, fibroos, tsirroos ja isegi maksarakuline kartsinoom (Junnila jt, 2000; Karakus jt, 2011; Weber jt, 2003). Akuutse ja suure doosiga intoksikatsiooni korral ületab hepatotsellulaarne nekroos maksa regeneratsioonivõime ehk maks ei suuda taastuda ning tekib tõsine maksapuudulikkus. Äärmiselt kõrgete ja ekstreemsete dooside korral põhjustab CCl_4 kesknärvisüsteemi depressiooni ja hingamisprobleeme, mis päädivad organismi hukkumisega (Berger jt, 1986).

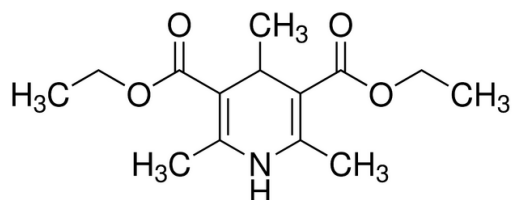
1.2.2.3. Maksa regeneratiivne vastus sapijuha sulgemisele

Hiirte sapijuha sulgemisel (BDL, ingl *bile duct ligation*) saadakse kombineeritud mudel inimese sapiteede ummistusest sapikiviga, parenhümaalsest maksahaigusest ja koleemiast ehk sappveresusest. Tekkiva kahjustuse ja komplikatsioonide tõsidus sõltub sapiteede obstruktsiooni pikkusest, kuid peamiseks kahjustuseks on maksafibroos. Sapijuha ajutine sulgemine tekitab sapiteede epiteelile biokeemilist stressi, mis põhjustab rakkude kompensatoorset proliferatsiooni ja obstruktiivse kolangiopaatia nähtuseid, mis sapijuha ligatsiooni eemaldamisel kaovad pea täielikult. (Ezure jt, 2000; Li ja Chung, 2001; Lunz jt, 2001; Matsumoto jt, 2002; Milani jt, 1991; Roulot jt, 1999). Krooniline BDL põhjustab aga tõsist sapivoolu häiret, koleemiat, vähenenud retikuloendoteliaalsüsteemi funktsioneerimist ja massiivset müofibroblastide aktivatsiooni, mis kõik viivad sapiteede fibroosi/tsirroosini (Assimakopoulos ja Vagianos, 2009; Xia jt, 2006).

Uusi sapijuharakke moodustavad peamiselt jagunevad sapiteede epiteeli rakud, kuid sapiteede kroonilise või autoimmuunse kahjustuse korral võivad kahjustuse parandamises osaleda ka hepatotsüüdid. Näiteks BDLi korral diferentseerub osa hepatotsüüte sapiteede epiteeli rakkudeks. Seega suudab normaaltingimustes sapiteede epiteel kahjutusi ise parandada ja hepatotsüütide transdiferentseerumine sapiteede rakkudeks on harv. Samas tõsisema kahjustuse korral on muutused rakkude spetsialiseerumises palju tõenäolisemad ning tekkinud rakud võtavad osa sapiteede epiteeli parandamisest. (Michalopoulos, 2014; Michalopoulos jt, 2005)

1.2.2.4. Maksa regeneratsioon sapiteede kahjustuse korral

Hiirte 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiini (DDC, ingl *3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine*) dieeti kasutatakse, et uurida maksa vastust sapiteede kahjustusele ja oksüdatiivsele stressile (Joonis 9). Näiteks indutseerib see sapijuhade atüüpilist proliferatsiooni koos periportaalse põletiku ja sapijuhade porfüriini kristallide ummistumisega. Juhade ummistumine põhjustab omakorda sapipaisu, mis suurendab seerumis leiduva bilirubiini kogust. DDC on ka hepatotsüütidele toksiline ja põhjustab rakkude surma, kuid samas soodustab tähtrakkude aktivatsiooni ja ovaalrakkude jagunemist. Toksiin indutseerib rakkude proliferatsiooni, millega on seotud tuumaretseptor CAR aktivatsioon, kuid rakkude surma ja jagunemist põhjustav mehhanism ei ole teada. (Hanada jt, 2010; Magnus jt, 1969; Matunis jt, 1996; Preisegger jt, 1999; Wang jt, 2003; Yamazaki jt, 2011)



Joonis 9. 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiini struktuur.

Erinevate sapiteede haiguste korral ekspresseeruvad hepatotsüütides ka sapiteede markerid ja vastupidi. Näiteks epiteelirakkudele toksilise DDC dieedi korral on leitud sapiteede markereid ekspresseerivaid hepatotsüüte, millest tekivad uued sapijuhad. Antud mudeli korral on rakkude transdiferentseerumisega seotud signaalmolekulid Notch ja Hes-1 (ingl *hairy and enhancer of split-1*) ning osa sapiteede rakkudest areneb just hepatotsüütidest. Kui aga DDC kahjustus eemaldatakse, siis väheneb hepatotsüütidest tekkinud sapiteede rakkude arv märgatavalt. Sapiteede rakkude transdiferentseerumist maksarakkudeks ei ole aga DDC dieedi korral täheldatud. (Limaye jt, 2008; Sekiya ja Suzuki, 2014; Sparks jt, 2010; Tarlow jt, 2014; Yanger jt, 2013)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesolev töö on osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on uurida maksa tüvirakkude rolli ja regulatsiooni maksa regeneratsioonis ning maksakasvajate tekkel. Antud magistritöö eesmärgiks oli uurida, kuidas osalevad erinevad maksa rakulised komponendid normaalse ja kahjustatud maksa regeneratsioonis. Saadud teadmised aitavad paremini kirjeldada maksa uuenemise protsesse. Töö eesmärkide täitmiseks kasutati mudelorganismina hiireliine, mis võimaldasid uurida potentsiaalsete maksa tüvirakkude ja parenhüümirakkude osalemist hiire maksa regeneratsioonis.

Täpsemad töö eesmärgid olid järgmised:

- luua *in vivo* süsteem maksa sapiteede ja parenhüümirakkude järglaskonna jälgimiseks;
- jälgida hiire maksa sapiteede ja parenhüümirakkude jagunemist erinevatel ajapunktidel ning seeläbi tuvastada võimalikku transdiferentseerumist maksa erinevate rakuliste komponentide vahel;
- tekitada täiskasvanud hiire maksas sapiteede ja parenhüümikahjustusi ning seeläbi uurida rakkude võimalikku transdiferentseerumist maksa erinevate rakuliste komponentide vahel.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud hiireliinid, praimerid ja antikehad

Käesoleva magistr töö eksperimentaalosa läbiviimiseks kasutati CreERT rekombinaasi (Cre, ingl *causes recombination*; ERT, ingl *estrogen receptor truncated*) ekspresseerivaid CK19^{CreERT} ja TTR-cre ind hiireliine ning Cre rekombinaasi aktiivsuse korral tdTomatot ekspresseerivat Rosa26-tdTomato hiireliini (edaspidi vastavalt *K19^{cre+}*, *TTR^{cre+}*, *TOM⁺*) (Tabel 1) (Madisen jt, 2010; Means jt, 2008; Tannour-Louet jt, 2002).

Tabel 1. Kasutatud hiireliinid

| Hiireliin | Kirjeldus | Saamise meetod | Päritolu |
|---------------------------|---|---------------------|---|
| <i>K19^{cre+}</i> | CreERT rekombinaasi ekspressioon sapiteedes | <i>knock-in</i> | Blanpain, Brüsseli Ülikool, Belgia |
| <i>TTR^{cre+}</i> | CreERT rekombinaasi ekspressioon maksa parenhüümirakkudes | transgenees | Tannour-Louet, Cochin'i Institut, Prantsusmaa |
| <i>TOM⁺</i> | tdTomato ekspressioon Cre rekombinaasi mõjul | suunatud mutagenees | Jackson Laboratories, USA |

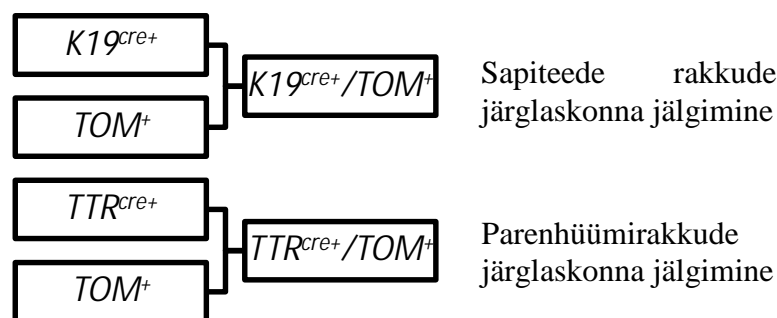
K19^{cre+}, *TTR^{cre+}* ja *TOM⁺* genotüüpide kindlakstegemiseks kasutati vastavaid praimerite komplekte (Tabel 2) (*InvitrogenTM*, USA) (Madisen jt, 2010; Means jt, 2008; Tannour-Louet jt, 2002). Immunofluorestsentsanalüüsiks kasutati hiire K19 spetsiifilist monoklonaalset jänese antikeha (*Epitomics[®]*, USA) lahjendusega 1:8000. Sekundaarse antikehana kasutati eeslis toodetud jänese spetsiifilist Alexa Fluor[®] 647 (*Life TechnologiesTM*, USA) konjugeeritud polükloonaalset antikeha, mille tootjapoolne kontsentratsioon oli 2 mg/ml ning lõppkontsentratsioon lahuses 2 µg/ml.

Tabel 2. Kasutatud praimerid. F – pärisuunaline; R – vastassuunaline; wt – metsiktüüp/positiivne kontroll.

| Praimerite kompleks | Praimeri järjestus | Produkti pikkus | Tuvastab |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| K19 | F 5'-AATCGCCAGGAATTGACCAATGGG-3' | 369 bp | K19 cre mutant |
| | R 5'-CGGCAAACGGACAGAAGCATTTTCC-3' | | |
| | F 5'-AATCGCCAGGAATTGACCAATGGG-3' | 265 bp | wt |
| | R 5'-CGCCCGTACCCCAAAGGAAGACAT-3' | | |
| TTR | F 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3' | 400 bp | TTR-cre mutant |
| | R 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3' | | |
| TOM | F 5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3' | 297 bp | tdTomato mutant |
| | R 5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3' | | |
| | F 5'-CTGTTCTGTACGGCATGG-3' | 196 bp | wt |
| | R 5'-GGCATTAAGCAGCGTATCC-3' | | |

2.2.2. Hiirte genotüpiseerimine

Kõiki eksperimendis kasutatud hiiri hooldati ja koheldi vastavalt Euroopa Liidus kehtivatele nõuetele. Eksperimentaalse osa läbiviimiseks oli loomkatsete luba (LISA 1) ja hiirte igapäevase hooldamise eest vastutasid Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaariumi spetsialistid. Sapiteede rakkude järglaskonna jälgimiseks ristati omavahel $K19^{cre+}$ ja TTR^{cre+} , ning parenhüümirakkude jälgimiseks TTR^{cre+} ja TOM^+ hiiri (Joonis 10). Igale järglasele pandi iseloomulik kood, mis koosnes antud hiire pesakonna- ja järjekorranumbrist. Hiirte genotüübi määramiseks kasutati saba tükist eraldatud DNAd. Selleks lisati koeproovile 75 μ l lüüsipuhvrit, mis koosnes 25 mM NaOH (*AppliChem GmbH*, Saksamaa) ja 0,2 mM EDTA (etüüleendiamiintetraatseethape) (pH 8.0) (*Sigma-Aldrich*[®], USA) lahusest ning inkubeeriti 95 °C juures 45 minutit. Seejärel lisati proovidele 75 μ l 40 mM Tris·HCl (pH~5) (*Reahim*, Venemaa) neutraliseerivat puhvrit, millele järgnes 30- 60 sekundit segamist *vortexil*. Saadud DNA lahuseid hoiustati -20 °C juures.



Joonis 10. Hiireliinide ristamisskeem.

Hiirte genotüpiseerimiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR, ingl *polymerase chain reaction*), mille reaktsioonisegu sisaldas 5x *FIREPol*[®] *Master Mix* (*Solis BioDyne*, Eesti) reaktsioonipuhvrit, kuhu oli lisatud $K19^{cre+}$ tuvastamiseks 50 pg ning TTR^{cre+} ja TOM^+ tuvastamiseks 75 pg praimereid (Tabel 2). Kõikidele proovidele lisati 2 μ l uuritava DNA lahust ning lõplikuks reaktsioonimahuks oli 20 μ l. PCRi läbiviimiseks kasutati *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* (*Life Technologies*[™], USA) masinat ning antud praimerite puhul kirjeldatud, kuid modifitseeritud programme (Tabel 3) (Madisen jt, 2010; Means jt, 2008; Tannour-Louet jt, 2002). Seejärel analüüsiti proove geelelektroforeesiga, milleks kasutati 1,5% agarosgeeli, mis sisaldas etiidumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,1 μ g/ml. Amplifitseeritud proovide pikkuste tuvastamiseks kasutati 50 aluspaari pikkust DNA markerit (*50 bp DNA ladder*, *Thermo Scientific*, USA).

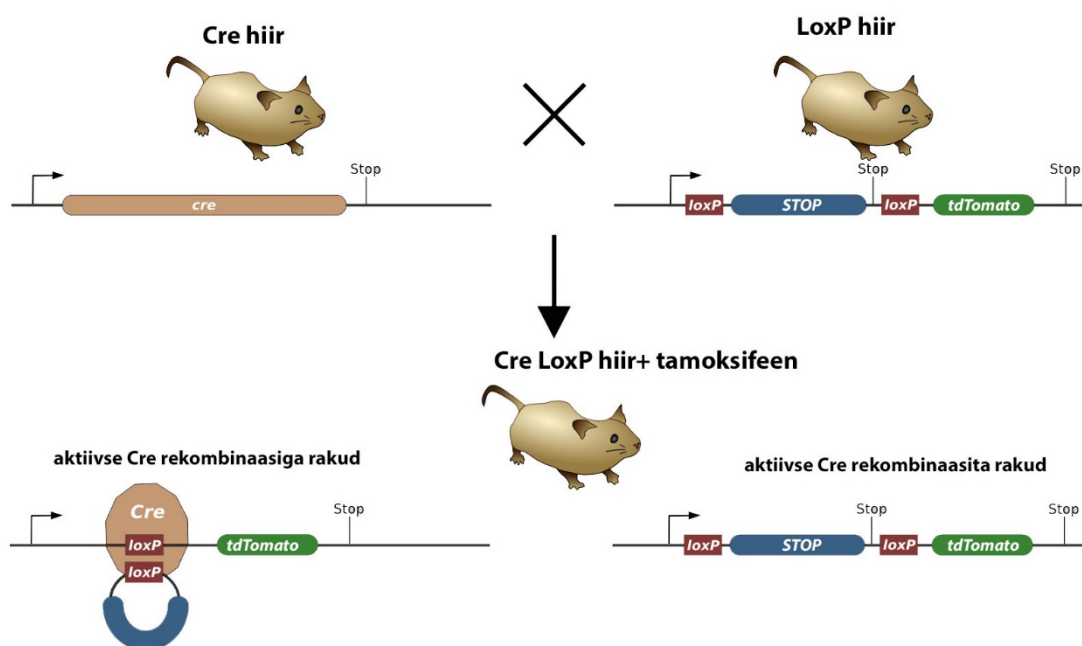
Tabel 3. Polümeraasi ahelreaktsiooni läbiviimiseks kasutatud programmid.

| Programm | Temperatuur | Kestvus | Praimerite komplekt |
|------------------------------|-------------|--------------|---------------------|
| Algne denaturatsioon | 94 °C | 180 sekundit | K19, TTR, TOM |
| Denaturatsioon | 94 °C | 30 sekundit | K19, TTR, TOM |
| Praimerite seondumine | 61 °C | 30 sekundit | TOM |
| | 65 °C | 30 sekundit | K19 |
| | 65 °C | 60 sekundit | TTR |
| Elongatsioon | 72 °C | 30 sekundit | K19, TOM |
| | 72 °C | 60 sekundit | TTR |
| Lõplik ekstensioon | 72 °C | 120 sekundit | K19, TTR, TOM |

} 30 tsükli

2.2.3. Eksperimendi läbiviimine

Polümeraasi ahelreaktsiooniga tuvastatud $K19^{cre+}/TOM^+$ ja TTR^{cre+}/TOM^+ hiired ekspresseerisid tsütoplasmaatilist Cre rekombinaasi, mis oli fuseeritud muteeritud östrogeeni retseptoriga. Cre-LoxP süsteemi aktiveerimiseks süstiti emast võõrutatud 21 päeva vanuste hiirte kõhuõõnde 100 µl rapsiõlis lahustatud östrogeeni analoogi, tamoksifeeni (*Sigma-Aldrich*[®], USA) (20 mg/ml), mis võimaldas rekombinaasil liikuda rakutuuma. Seal indutseeriti *Gt(ROSA)26Sor* lookuse LoxP piirkondade vahel deletsioon, mis eemaldas tdTomato ekspressiooni takistava stopkoodoni. Seeläbi tagati konstitutiivne ja rakujagunemisel edasikanduv tdTomato ekspressioon. (Joonis 11) (Nagy, 2000)



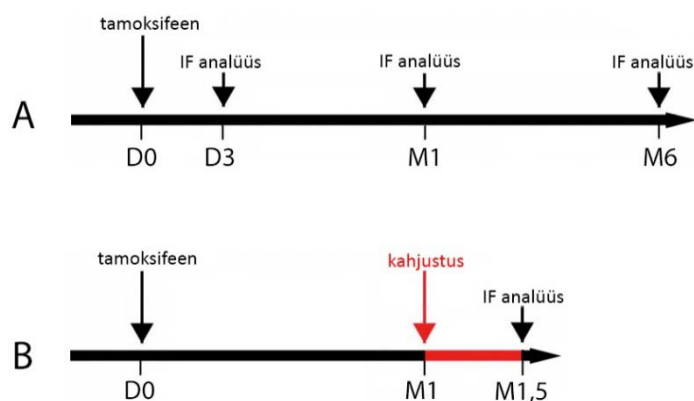
Joonis 11. Rakkudes tdTomato ekspressiooni aktiveerimise skeem. Modifitseeritud¹

¹ http://commons.wikimedia.org/wiki/File:CreLoxP_experiment.png 12.05.14

$K19^{cre+}/TOM^+$ ja TTR^{cre+}/TOM^+ genotüübiga hiirte maksa regeneratsiooni uurimiseks kasutati erinevaid ajapunkte: 3 päeva, 1 kuu ja 6 kuud pärast tamoksifeeni süstimist (Joonis 12, A). Esimese ajapunkti valimisel võeti arvesse Cre-LoxP süsteemi aktiveerumiseks kuluvat aega (3 päeva) ning edaspidi arvestati seda katse nullpunktina. Arengu käigus toimuva transdiferentseerumise uurimiseks valiti järgmiseks ajapunktiks üks kuu pärast tamoksifeeni süstimist ehk 49 päeva vanused täiskasvanud hiired. Pikema aja jooksul toimuva spetsialiseerumise muutuse tuvastamiseks valiti ajapunktiks 6 kuud pärast tamoksifeeni süstimist.

Kahjustuse korral esineva regeneratsiooni uurimiseks tekitati üks kuu pärast tamoksifeeni süstimist $K19^{cre+}/TOM^+$ ja TTR^{cre+}/TOM^+ hiirtele nii sapiteede kui ka parenhüümirakkude kahjustusi (Joonis 12, B). Parenhüümirakkude kahjustamiseks teostati hiirtel osaline hepatektoomia või süstiti ühekordselt kõhuõõnde 100 μ l CCl_4 (*Acros organics*, USA) lahust, mida oli lahjendatud rapsiõlis 1:4. Sapiteede rakkude kahjustamiseks kasutati sapiteede sulgemist või DDC toksiini (*Ssniff Spezialdiäten GmbH*, Saksamaa), mida oli lisatud 100 mg toidu kg kohta. Hiirtel teostatud PH ja BDL operatsioonid viis läbi Rakubioloogia õppetooli doktorant Janeli Viil.

$K19^{cre+}/TOM^+$ hiirtele tehti kõik nimetatud kahjustused ning ka TTR^{cre+}/TOM^+ hiirte puhul kasutati samu meetodeid, kuid need hiired ei taastunud PH ja BDL operatsioonidest. Kahjustuste pikkus ja/või regeneratsiooniaeg oli kõikide katsete puhul kaks nädalat. (Joonis 12, B). Igas ajapunktis kasutati vähemalt kolme rakkude jälgimist võimaldava genotüübiga hiirt ja negatiivse kontrollina vastavat genotüüpi mitteomavaid hiiri. Loomad hukati tservikaalse dislokatsiooni teel ja maksa eemaldamist teostas käesoleva magistritöö koostaja juhendaja järelvalve all.



Joonis 12. Normaalse (A) ja kahjustatud (B) maksaga tehtud katsete ajapunktide skeem. D – päev; M – kuu. D0 on tamoksifeeniga süstimise päev ning noole liikumise suunaga on kujutatud möödunud kuude arvu. (A) Ajapunktide skeem normaaltingimustes maksa regeneratsiooni uurimiseks. (B) Ajapunktide skeem kahjustusega (PH, CCl_4 , BDL, DDC) maksa regeneratsiooni uurimiseks. Modifitseeritud (Tarlow jt, 2014).

2.2.4. Immunofluorestsentsanalüüs

Maksa sapiteede ja parenhüümirakkude *in vivo* jälgimise süsteemi kontrollimiseks eemaldati uuritavast maksast ~1 mm paksune koelõik. Võetud proov asetati alusklaasile, kuhu lisati kuivamise vältimiseks 1:1 glütserool (*AppliChem GmbH*, Saksamaa) PBS (ingl *phosphate buffered saline*) lahust ning kaeti katteklaasiga. Rakkude tdTomato ekspressiooni kontrollimiseks vaadati eraldatud kude *Olympus BX61* (*Olympus*, USA) fluorestsentsmikroskoobiga. Piltide tegemiseks kasutati mikroskoobiga ühendatud *Olympus XM10* CCD kaamerat (*Olympus*, USA) ja *cellSens Standard* tarkvara (*Olympus*, USA).

Külmlõikude tegemiseks eemaldati osa hiire maksa suuremast sagarast, mis asetati 5 ml 4% PFA (*AppliChem GmbH*, Saksamaa) (pH 7,0-7,5) lahusesse ning inkubeeriti kaks tundi 4 °C juures. Seejärel pesti kude 10 minutit 5 ml PBSiga, lisati 5 ml 30% sahharoos-PBS lahust ja inkubeeriti üleöö 4 °C juures. Sahharoosis seisnud kude asetati krüovormi (*Sakura Finetek*, USA) ning kaeti *Tissue-Tek® O.C.T. Compound* (*Sakura Finetek*, USA) külmutamisseguga. Proov külmutati vedelas lämmastikus jahutatud isopentaani (*AppliChem GmbH*, Saksamaa) lahuses ning kude hoiustati -80 °C juures. Immunofluorestsentsanalüüsi teostamiseks lõigati külmutatud maksast *SLEE CRYOSTAT MNT* (*SLEE medical GmbH*, Saksamaa) krüostaadiga 5 µm paksused koelõigud, mis asetati spetsiaalsele külmlõikudele mõeldud StarFrost® (*Waldemar Knittel GmbH*, Saksamaa) alusklaasile. Pärast lõikamist hoiti klaase üleliigse vee aurustumiseks tund aega toatemperatuuril ning seejärel hoiustati -20 °C juures.

Enne immunofluorestsentsanalüüsi lasti koelõikudel soojeneda toatemperatuurini ja neid pesti PBS lahusega 3 korda 5 minutit. Seejärel asetati klaasid antigeenide vabastamiseks 30 minutiks 80 °C 10 mM Na-tsitraadi (pH 8.7) (*AppliChem GmbH*, Saksamaa) lahusesse. Pärast kuumutamist lasti Na-tsitraadi lahuses olevatel klaasidel jahtuda toatemperatuurini, millele järgnes klaaside pesu 3 korda 5 minutit PBSis. Antikehade mittespetsiifilise seondumise vältimiseks ja rakkude permeabiliseerimiseks lisati igale koelõigule 100 µl 1% lõssilahust (*AppliChem GmbH*, Saksamaa), mis sisaldas 0,3% TritonX100 (*AppliChem GmbH*, Saksamaa), ning inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril olevas pimedas niisutuskambris. Ka kõikidel järgnevatel inkubeerimistel lisati igale koelõigule 100 µl lahust ning kasutati samu tingimusi. Permeabiliseerimisele järgnes klaaside pesu PBSis, blokeerimine 4% eesli seerumiga (*Sigma-Aldrich®*, USA) PBSis ja uus pesu PBSiga. Seejärel inkubeeriti koelõike 60 minutit blokeerimisseerumis lahjendatud primaarse K19 antikehaga ning pesti 3 korda 5 minutit PBSis. Järgmisena lisati blokeerimisseerumis lahjendatud eeslis toodetud jänese spetsiifilist Alexa Fluor® 647 konjugeeritud antikeha ning inkubeeriti 60 minutit, millele

järgnes 3 korda 5 minutit PBS pesu. Rakutuumade värvimiseks töödeldi lõike fluorestseeruva DAPI (ingl *4',6-diamidino-2-phenylindole*) (*Sigma-Aldrich*[®], USA) värviga (1 mg/ml), mida lahjendati 1:10000, inkubeeriti 5 minutit ja pesti PBSis. Seejärel lisati igale lõigule 30 µl *DAKO Fluorescent Mounting Medium* (*Dako*, Taani) sulundusvedelikku ja kõige peale asetati katteklaas. Koelõikudega klaase säilitati 4°C juures.

Koelõikude immunofluorestsentsanalüüsiks kasutati fluorestsentsmikroskoopi *Olympus Cell^R* (*Olympus*, USA) ja sellele vastavat *Olympus Cell^R Imaging* (*Olympus*, USA) tarkvara. Analüüsi läbiviimiseks kasutatud fluorokroomid, neid ergastavad laserid ja emiteeritud kiirguse detekteerimiseks kasutatud filtrid on koondatud tabelisse 4. Piltide tegemiseks ja töötlemiseks kasutati *Hamamatsu OCRA-ER* CCD kaamerat (*Hamamatsu*, Jaapan) ja *Hokawo 2.1* (*Hamamatsu*, Jaapan) pilditöötluste programmi.

Tabel 4. Immunofluorestsentsanalüüsi läbiviimiseks kasutatud fluorokroomid, neid ergastavad laserid ja emiteeritud valguse detekteerimiseks kasutatud filtrid.

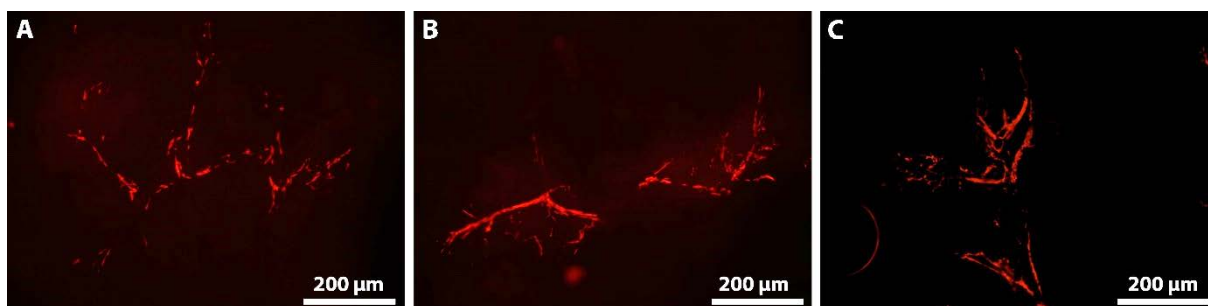
| Fluorokroom | Ergastava laseri lainepikkus (nm) | Emiteeritud valguse detekteerimiseks kasutatud filtrid (nm) |
|------------------------------------|--|--|
| tdTomato | 560 | 607±36 |
| Alexa Fluor[®] 647 | 650 | 684±24 |
| DAPI | 387 | 440±40 |

2.3. Tulemused

2.3.1. Sapiteede rakkude järglaskonna jälgimine $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiirtel

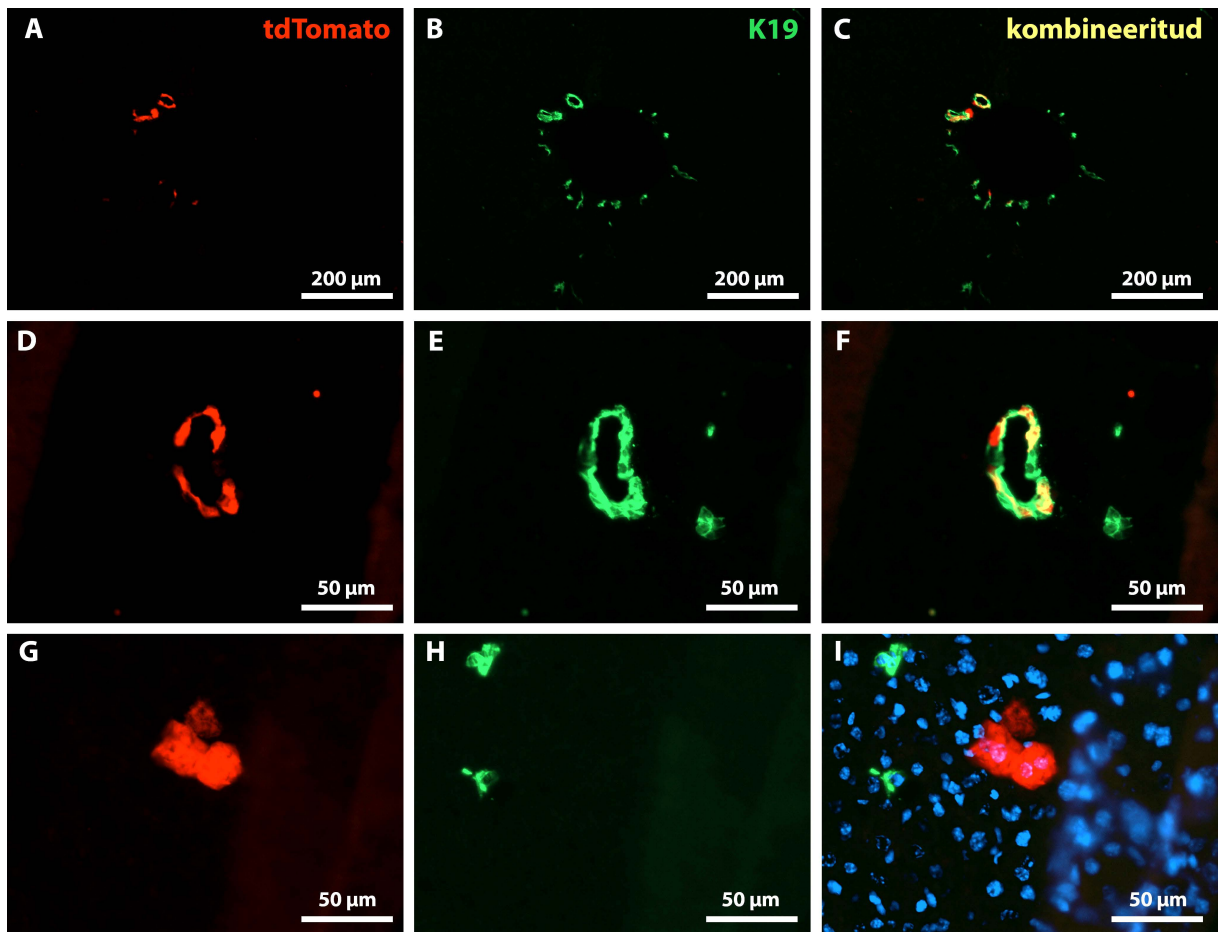
2.3.1.1. $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiirte maksa homöostaas

Maksa sapiteedest pärit rakkude järglaskonna jälgimiseks kasutati $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiiri, kellele süstiti 21 päeva vanuselt tamoksifeeni. Muutuste tuvastamiseks rakkude spetsialiseerumises kasutati erinevaid ajapunkte: 3 päeva, 1 kuu ja 6 kuud pärast tamoksifeeni süstimist (Joonis 12, A). Rakkude *in vivo* jälgimise süsteemi funktsionaalsuse kontrollimiseks eemaldati uuritavatest maksadest ~1 mm paksused lõigud, mida analüüsiti fluorestsentsmikroskoobiga. Koelõikude uurimisel leiti, et 3 päeva pärast tamoksifeeni süstimist olid värvunud peamiselt üksikud sapiteede rakud (Joonis 13, A). Samas kuu aja pärast oli tdTomatot ekspresseerivate rakkude hulk suurenenud ning need moodustasid sapiteedele iseloomulikke struktuure (Joonis 13, B). Sapiteede puid meenutavad struktuurid olid tuvastatavad kuus kuud pärast tamoksifeeni süstimist (Joonis 13, C).

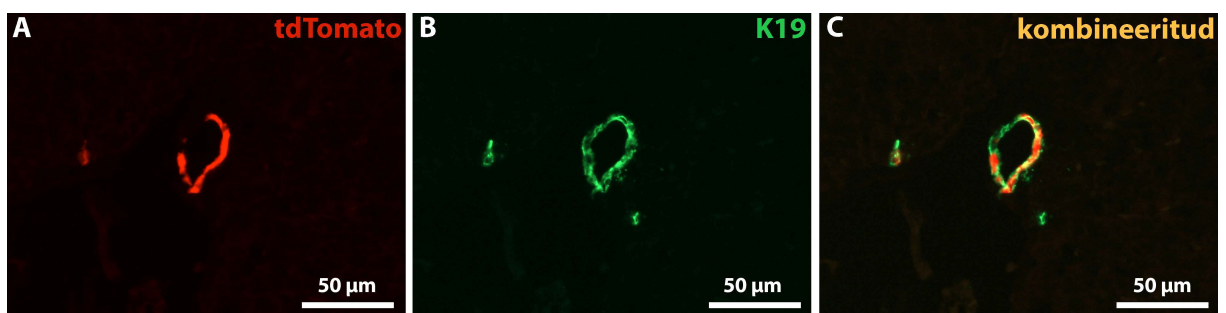


Joonis 13. $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiirte sapiteede rakkude tdTomato ekspressioon ~1 mm paksustel koelõikudel. Sapiteede rakkude tdTomato ekspressioon 3 päeva (A), 1 kuu (B) ja 6 kuud (C) pärast tamoksifeeni süstimist.

Uuritavatest maksadest pärinevaid koelõike analüüsiti ka immunofluorestsentsmeetodil. Kolm päeva pärast tamoksifeeni süstimist eraldatud maksakoes tuvastati peamiselt üksikuid tdTomatot ekspresseerivaid rakke, mis olid sapiteede rakkudele iseloomuliku morfoloogiaga ja ekspresseerisid sapiteede markerit K19 (Joonis 14, A-F). Üksikutel juhtutel leiti koelõikudelt ka hepatotsüütidele omase morfoloogiaga tdTomatot ekspresseerivaid ja K19 mitteekspresseerivaid rakke. (Joonis 14, G-I). Kuu ajaga olid täiskasvanud hiirtel moodustunud peaaegu terviklikud sapiteedele iseloomulikud struktuurid, mille rakud ekspresseerisid nii tdTomatot kui ka sapiteede markerit K19 (Joonis 15).

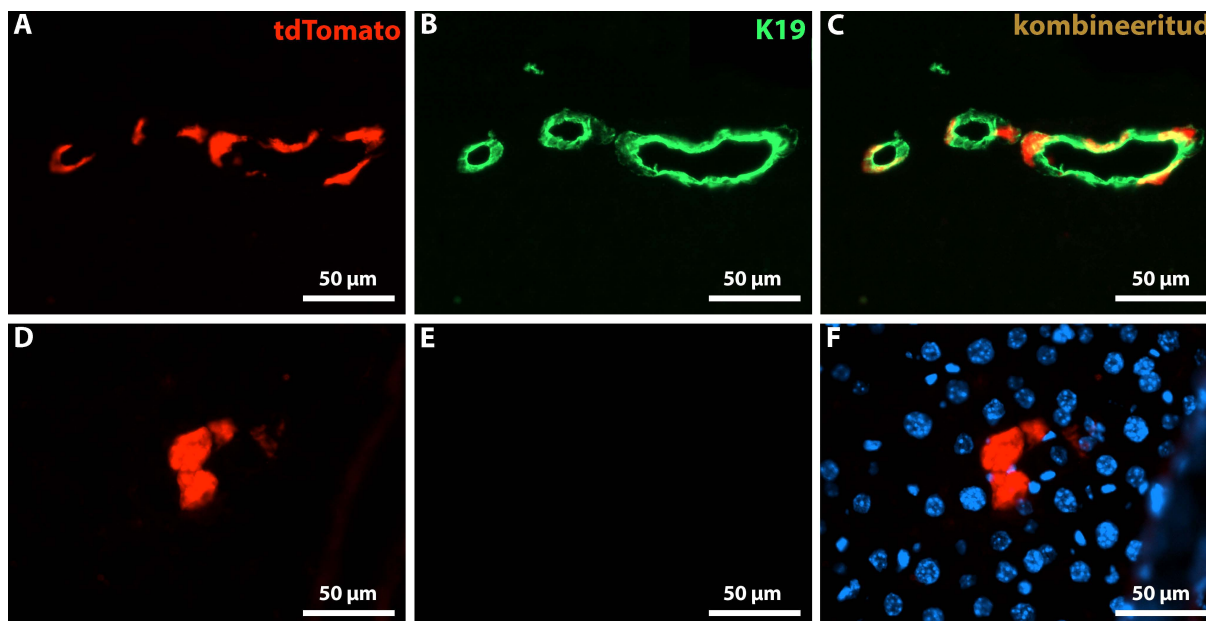


Joonis 14. *K19^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon 3 päeva pärast tamoksifeeni süstimist. (A-F) Sapiteedele iseloomulikud TOM⁺/K19⁺ ja K19⁺ rakud. (G-I) Hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga TOM⁺/K19⁻ rakud. Pildil I on siniselt kujutatud tuumavärv DAPI.



Joonis 15. *K19^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon 1 kuu pärast tamoksifeeni süstimist. (A-C) Sapiteedele iseloomulikud TOM⁺/K19⁺ ja K19⁺ rakud.

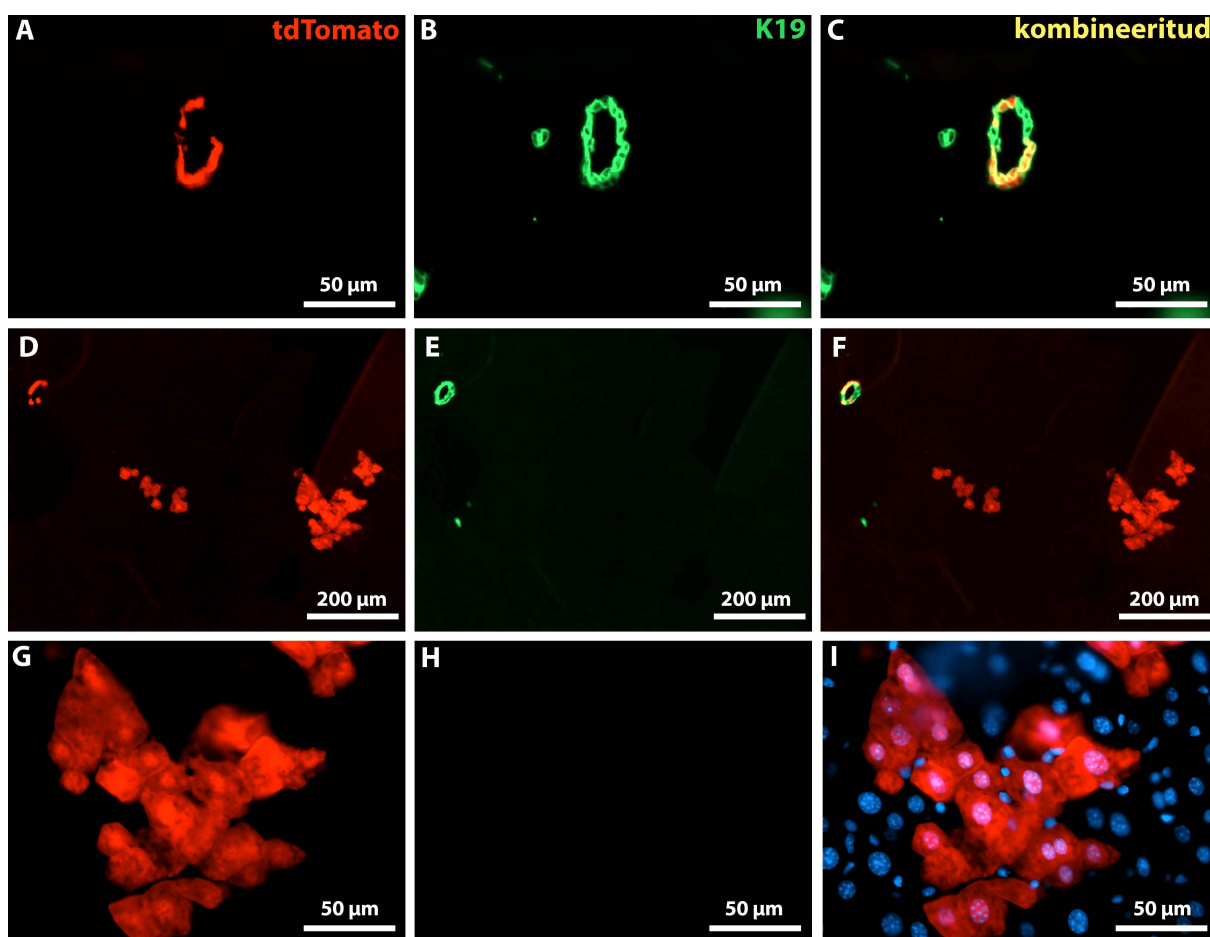
Pärast kuue kuu möödumist oli märgata väikeseid tdTomatot ja sapiteede markerit K19 ekspresseerivate rakkude kolooniad, mis moodustasid endiselt ainult osa sapiteede rakkudest (Joonis 16, A-C). Koelõikudelt leiti ka hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga tdTomatot ekspresseerivaid ja K19 mitteekspresseerivaid rakke, kuid neil puudus DAPI signaal (Joonis 16, D-F). Samas võib tdTomato värvumise kuju alusel arvata, et tegemist on hepatotsüütidega, mille tuumad paiknesid teises tasapinnas.



Joonis 16. *K19^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon 6 kuud pärast tamoksifeeni süstimist. (A-C) Sapiteede iseloomulikud TOM⁺/K19⁺ ja K19⁺ rakud. (D-F) Hepatotsüütidele omase morfoloogiaga TOM⁺/K19⁻ rakud. Pildil F on siniselt kujutatud tuumavärv DAPI.

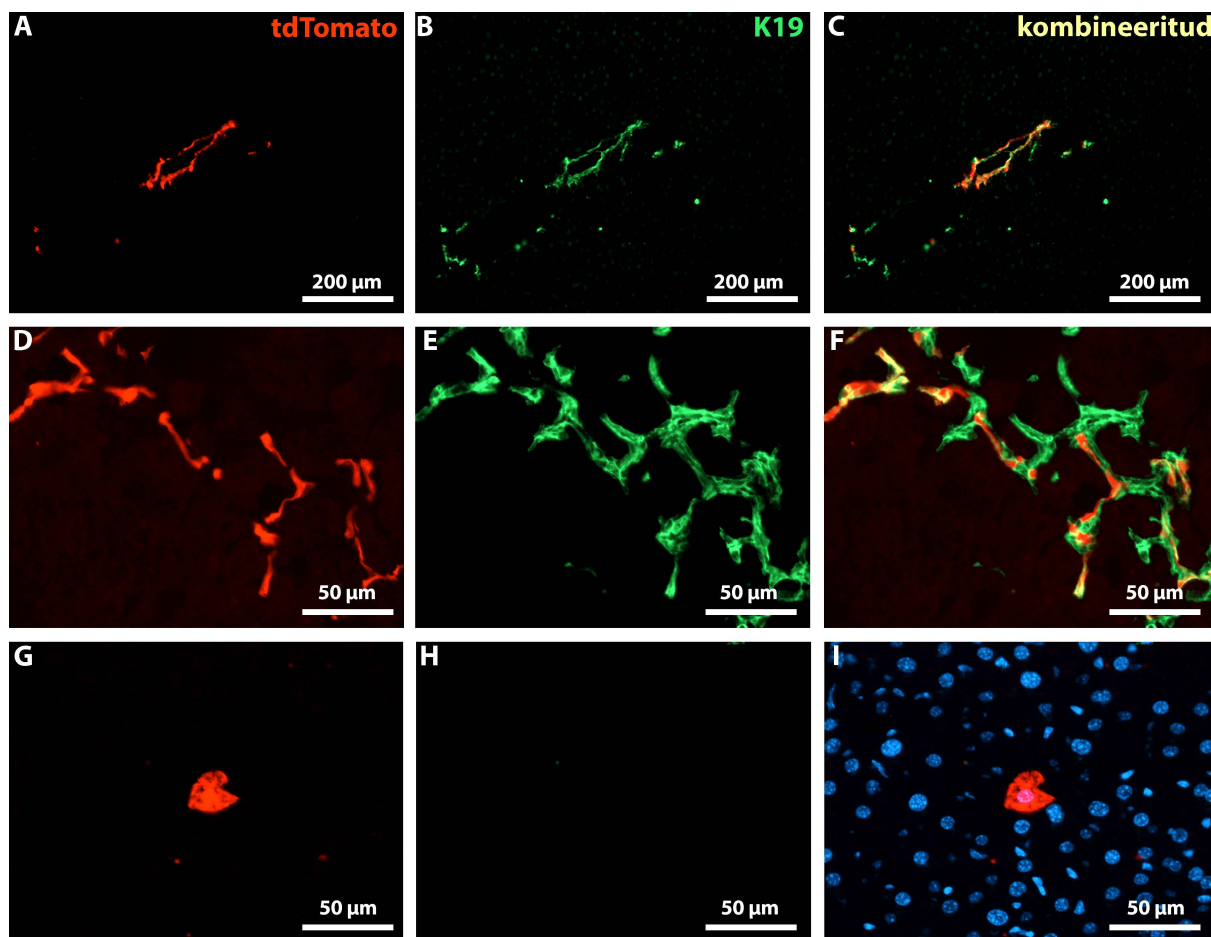
2.3.1.2. $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiirte maksa regeneratsioon kahjustuse korral

Kahjustusest põhjustatud regeneratsiooni uurimiseks tekitati $K19^{cre+}/TOM^+$ hiirtele 1 kuu pärast tamoksifeeni süstimist nii sapiteede kui ka parenhüümirakkude kahjustusi, mille pikkus ja/või regeneratsiooniaeg oli kõikide katsete puhul kaks nädalat. (Joonis 12, B). Immunofluorestsentsanalüüsiga tuvastati, et pärast maksa osalist hepatektoomiat säilis tdTomato ekspressioon sapiteede rakkudes (Joonis 17, A-C), kuid võrreldes kahjustamata maksaga, oli märgata nende hulga vähenemist. Samuti leiti maksa parenhüümist nii üksikuid kui ka kolooniaid moodustavaid $TOM^+/K19^-$ rakke, millel oli ka hepatotsüütidele iseloomulik morfoloogia (Joonis 17, D-I).



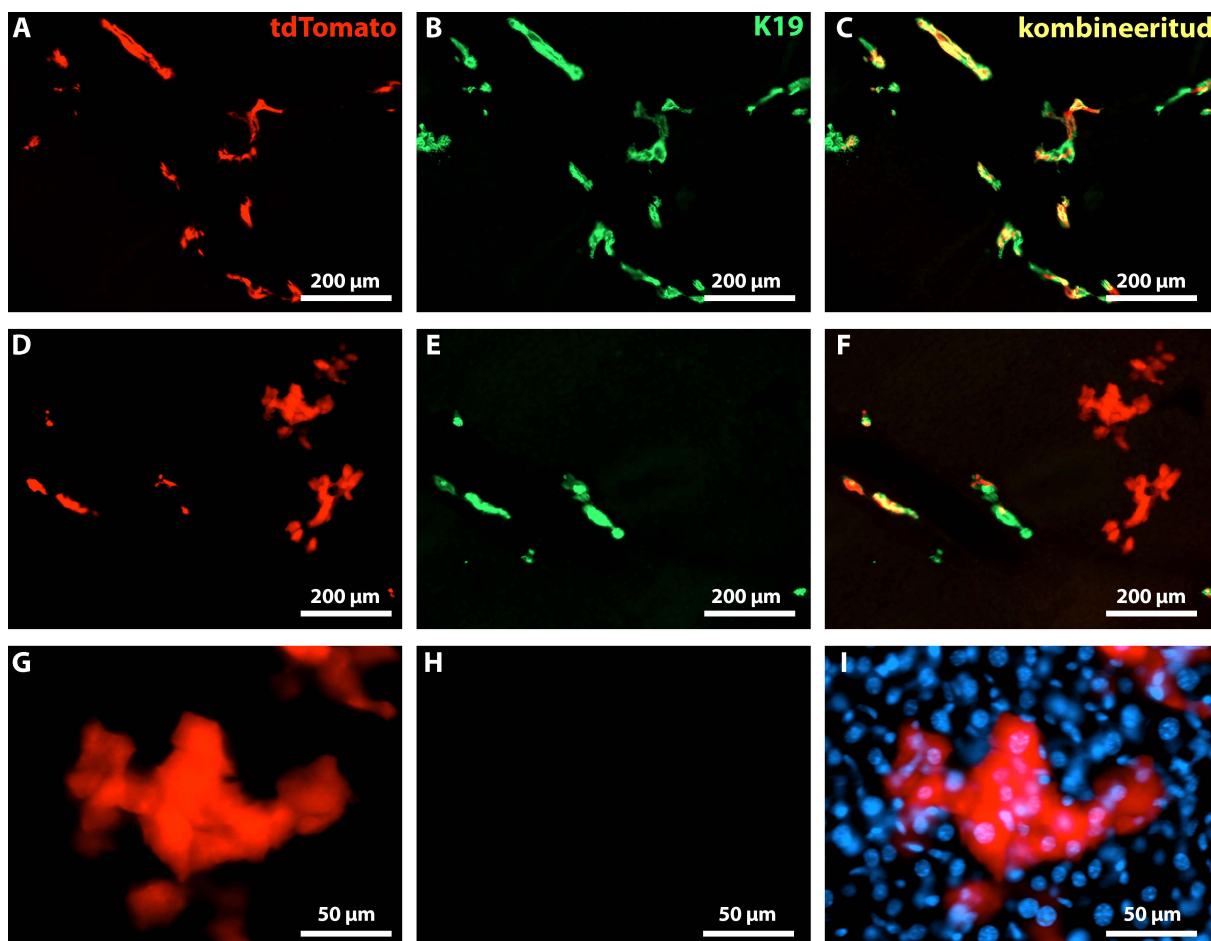
Joonis 17. $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon pärast osalist hepatektoomiat. (A-C) Sapiteedele iseloomulikud $TOM^+/K19^+$ ja $K19^+$ rakud. (D-F) Sapiteede $TOM^+/K19^+$ ja $K19^+$ rakud ning eemal paiknevad hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga $TOM^+/K19^-$ rakud. (G-I) Hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga $TOM^+/K19^-$ rakud. Pildil I on siniselt kujutatud tuumavärv DAPI.

Keemilisest kahjustusest (CCl₄) taastunud maksa immunofluorestsentsanalüüsiga tuvastati tdTomato ekspressiooni peamiselt üksikutes ja väikseid kolooniaid moodustavates pikliku kujuga sapiteede rakkudes (Joonis 18, A-F). Seega väiksemad sapiteed ja nende rakud olid kahjustuse toimel jagunenud ja hakanud moodustama uusi sapiteede struktuure. Üksikutel juhtudel leiti koelõikudelt ka hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga TOM⁺/K19⁻ rakke (Joonis 18, G-I).



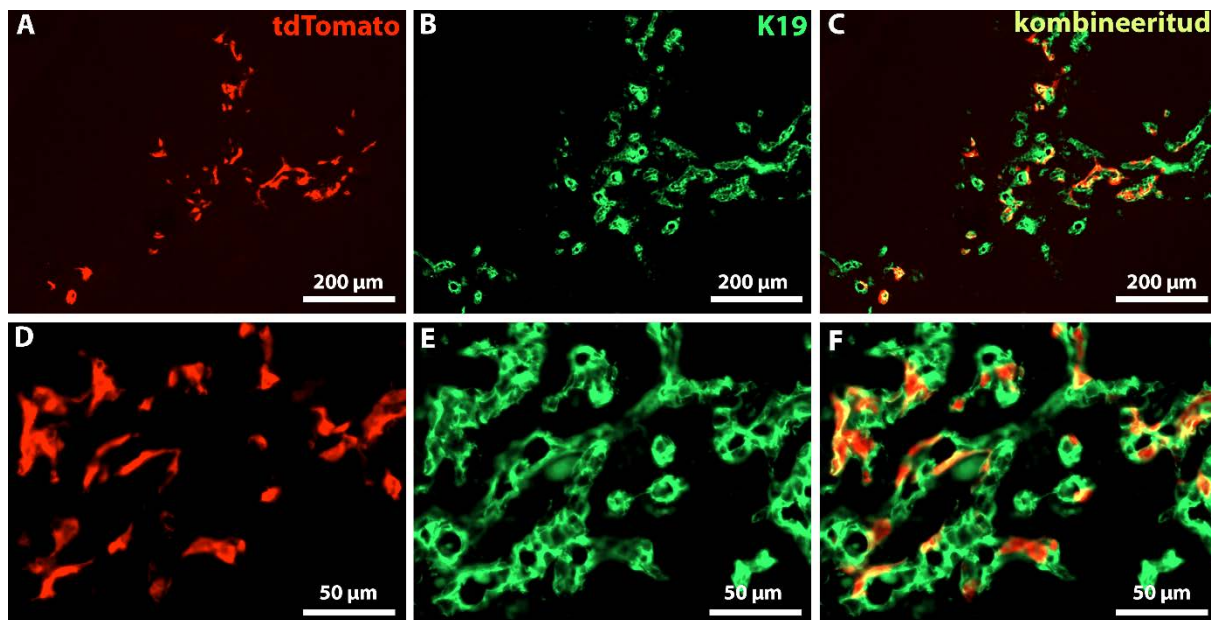
Joonis 18. *K19^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon pärast keemilist kahjustust (CCl₄). (A-C) Sapiteede iseloomulikud TOM⁺/K19⁺ ja K19⁺ rakud. (D-F) Kahjustuse tagajärjel jagunenud TOM⁺/K19⁺ ja K19⁺ rakud. (G-I) Hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga TOM⁺/K19⁻ rakk. Pildil I on siniselt kujutatud tuumavärv DAPI.

Kahjustuse tagajärjel jagunenud ja uusi sapiteede struktuure moodustanud TOM⁺/K19⁺ ja K19⁺ rakke tuvastati ka sapijuha sulgemise korral, kus tdTomato ekspressioon esines nii väiksemates kui ka suuremates rakukolooniates (Joonis 19, A-C). Rakkude jagunemist ja uute sapiteede moodustumist oli aga rohkem just suurte portaalalade piirkonnas ja veidi vähem väikesemate sapiteede lähedal. Kahjustatud maksa parenhüümist leiti nii üksikuid kui ka kolooniaid moodustavaid hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga TOM⁺/K19⁻ rakke (Joonis 19, D-I).



Joonis 19. *K19^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon pärast sapijuha sulgemist. (A-C) Sapiteede iseloomulikud TOM⁺/K19⁺ ja K19⁺ rakud. (D-F) Sapiteede TOM⁺/K19⁺ ja K19⁺ rakud ning eemal paiknevad hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga TOM⁺/K19⁻ rakud. (G-I) Hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga TOM⁺/K19⁻ rakud. Pildil I on siniselt kujutatud tuumavärv DAPI.

Ka DDC kahjustusega hiirte maksas oli märgata $TOM^+/K19^+$ ja $K19^+$ sapiteede rakkude intensiivset jagunemist ning tdTomato oli ekspresseeritud nii üksikutes rakkudes kui ka väiksemates kolooniates (Joonis 20). Samas hepatotsüütidele omase morfoloogiaga $TOM^+/K19^-$ rakke uuritud koelõikude pealt ei tuvastatud.

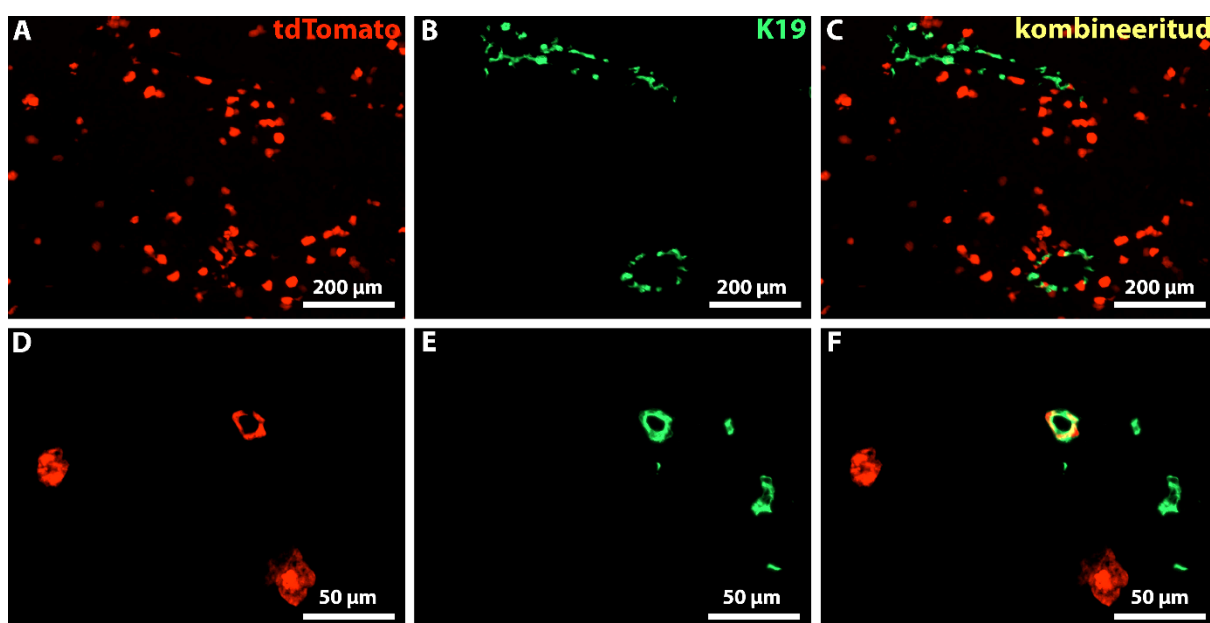


Joonis 20. $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon pärast DDC dieeti. (A-F) Sapiteede iseloomulikud $TOM^+/K19^+$ ja $K19^+$ rakud.

2.3.2. Parenhüümirakkude järglaskonna jälgimine TTR^{cre+}/TOM^+ genotüübiga hiirtel

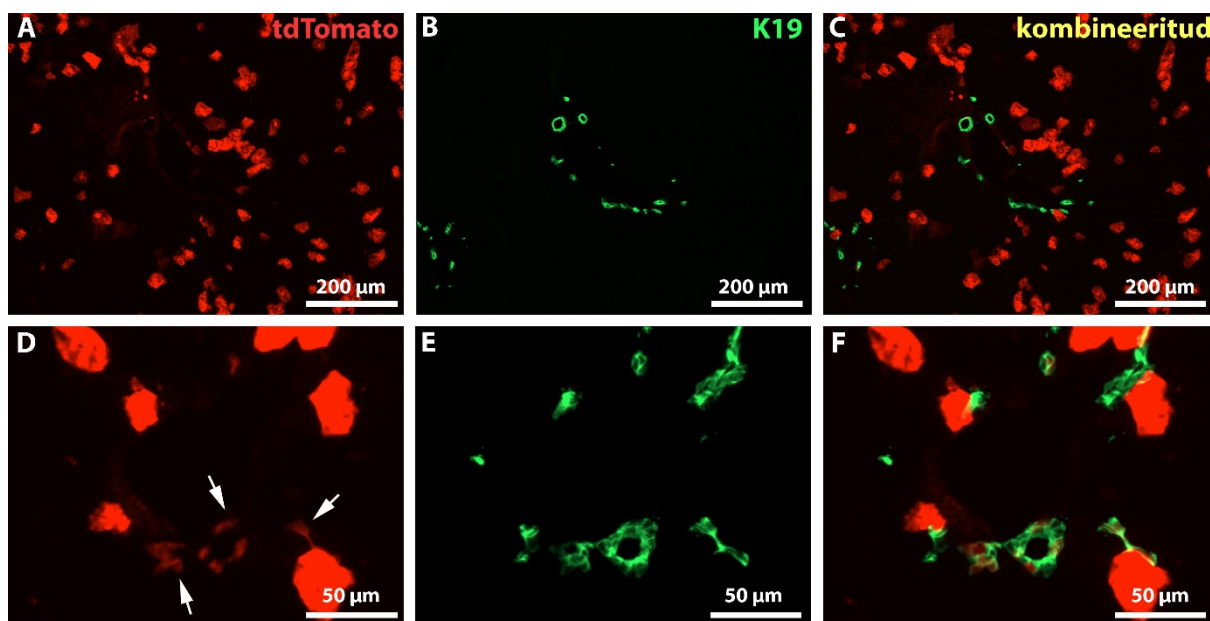
2.3.2.1. TTR^{cre+}/TOM^+ genotüübiga hiirte maksa homöostaas

Maksa parenhüümirakkude järglaskonna jälgimiseks kasutati TTR^{cre+}/TOM^+ genotüübiga hiiri, kusjuures katseplaani oli samasugune nagu $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiirte puhul (Joonis 12, A). Kolm päeva pärast tamoksifeeni süstimist eraldatud maksakoes tuvastati tdTomato ekspressiooni peamiselt üksikutes $TOM^+/K19^-$ hepatotsüütides (Joonis 21, A-C). Samas täheldati ka sapiteede morfoloogiaga $TOM^+/K19^+$ rakke, mis paiknesid tdTomatot ekspresseerivate hepatotsüütide vahetus läheduses või ka kaugemal (Joonis 21, D-F).

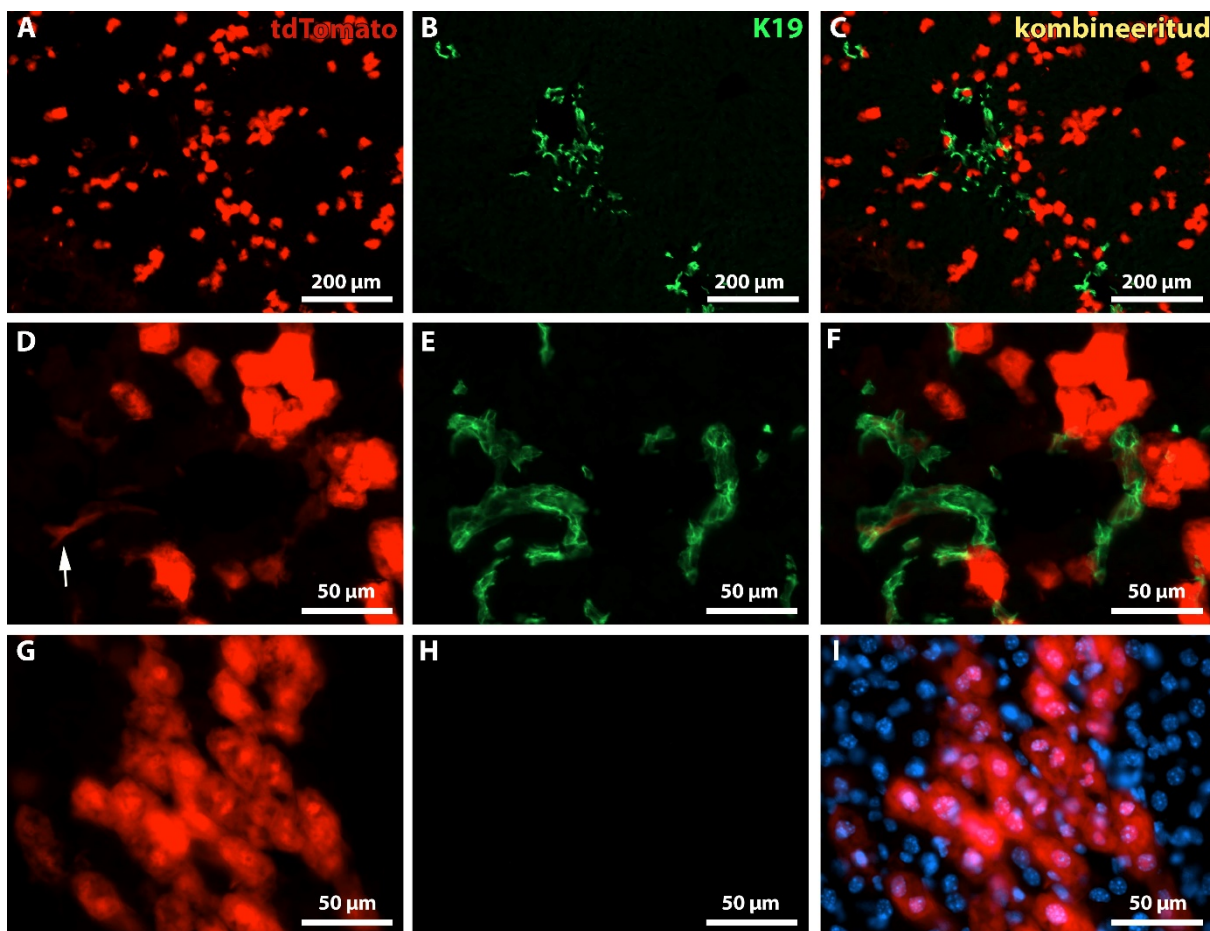


Joonis 21. TTR^{cre+}/TOM^+ genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon 3 päeva pärast tamoksifeeni süstimist. (A-C) tdTomatot ekspresseerivad parenhüümirakud ja $K19^+$ sapiteede rakud. (D-F) tdTomatot ekspresseerivad hepatotsüüdid ja sapiteede morfoloogiaga $TOM^+/K19^+$ rakud.

Kahjustamata hiire jälgimisel selgus, et üks kuu pärast tamoksifeeni süstimist oli tdTomato endiselt ekspresseeritud peamiselt üksikutes hepatotsüütides (Joonis 22, A-C). Samas esines ka kuni seitsmest rakust koosnevaid kolooniaid. Jätkuvalt olid tuvastatavad ka sapiteede morfoloogiaga $TOM^+/K19^+$ rakud, kuid nende tdTomato signaal oli nõrgem kui hepatotsüütidel. (Joonis 22, D-F). Veelgi pikema aja vältel, kuus kuud pärast tamoksifeeni süstimist, olid hepatotsüütide kolooniad veidi suurenenud ning leidus ka rohkem kui 10 rakust koosnevaid kolooniaid (Joonis 23, A-C, G-I). Samuti olid tuvastatavad sapiteede morfoloogiaga $TOM^+/K19^+$ rakud, kuid nende hulk ei olnud aja jooksul märgatavalt suurenenud (Joonis 23, D-F).

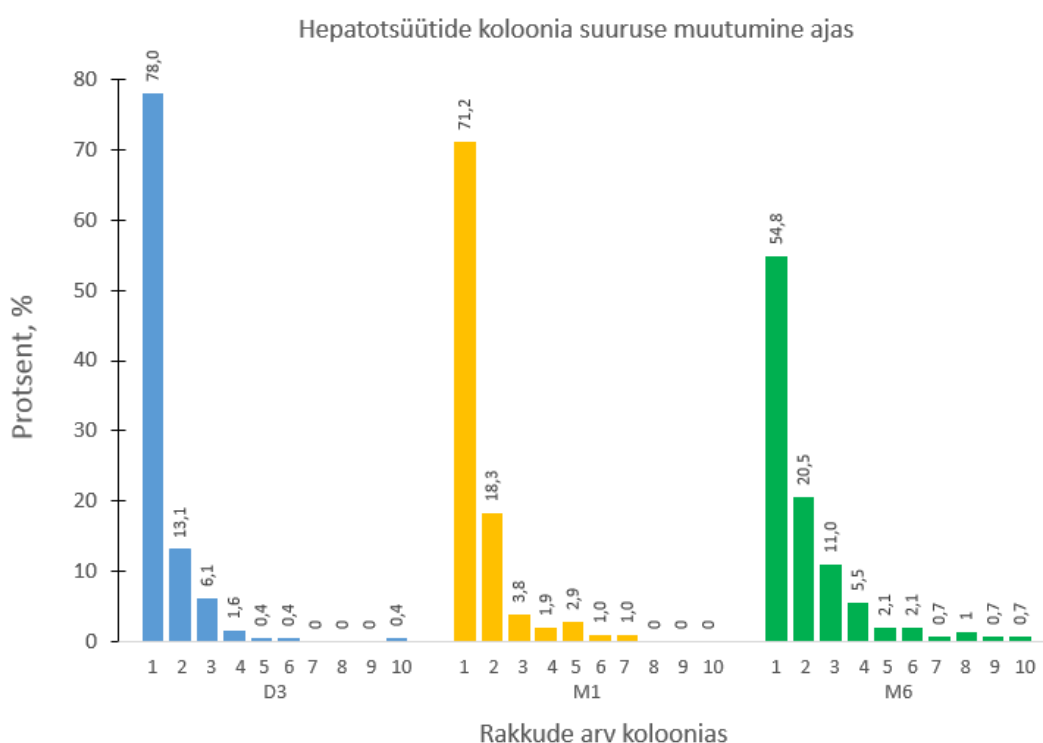


Joonis 22. *TTR^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon 1 kuu pärast tamoksifeeni süstimist. (A-C) tdTomatot ekspresseerivad parenhüümirakud ja K19⁺ sapiteede rakud. (D-F) tdTomatot ekspresseerivad hepatotsüüdid ja sapiteede morfoloogiaga TOM⁺/K19⁺ rakud (valged nooled).



Joonis 23. *TTR^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirte maksa tdTomato ekspressioon 6 kuud pärast tamoksifeeni süstimist. (A-C) TOM⁺ hepatotsüüdid ja K19⁺ sapiteede rakud. (D-F) TOM⁺ hepatotsüüdid ja sapiteede morfoloogiaga TOM⁺/K19⁺ rakud (valge nool). (G-I) Ligi 20 rakust koosnev hepatotsüütide koloonia. Pildil I on siniselt kujutatud tuumavärv DAPI.

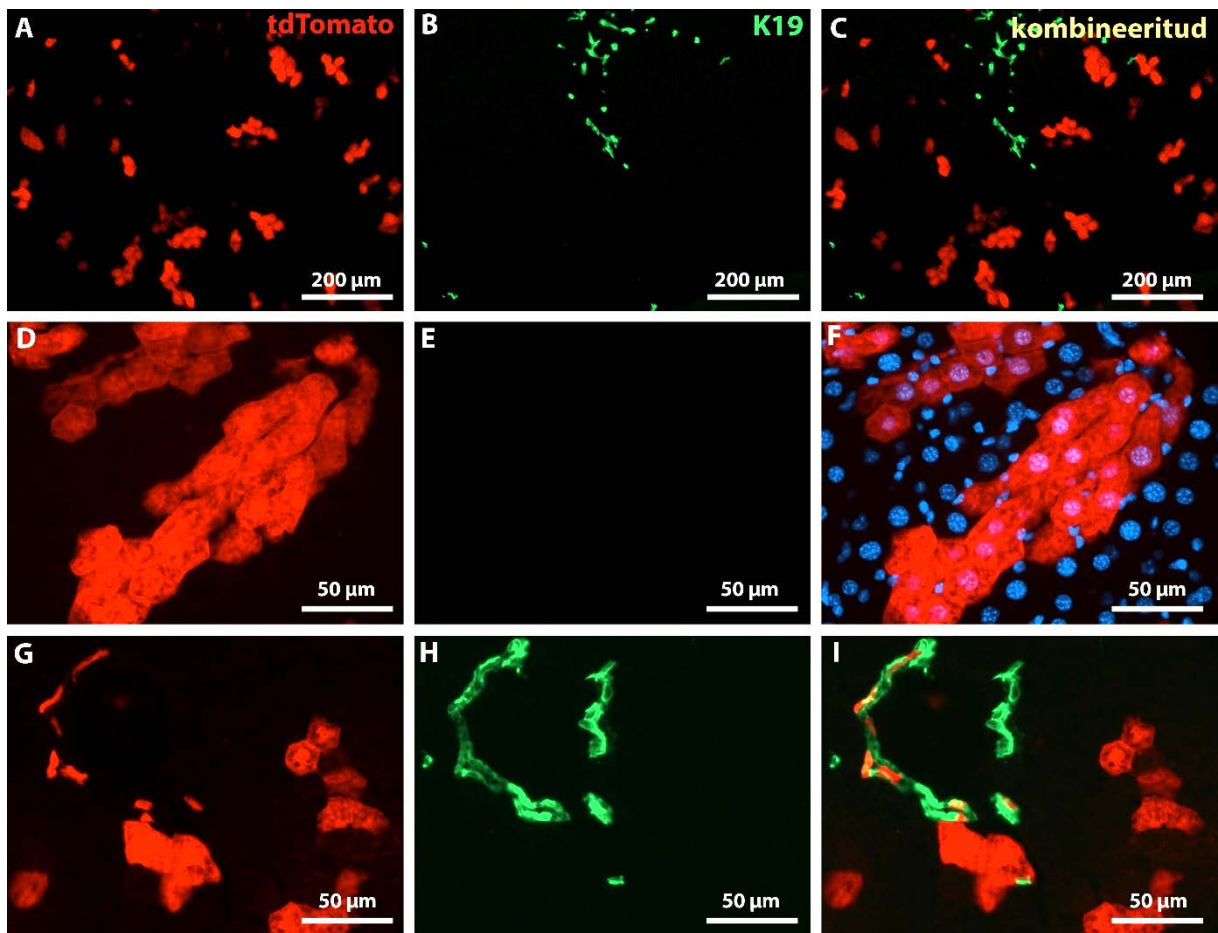
Võrreldes TTR^{cre+}/TOM^+ genotüübiga hiirte maksa parenhüümirakkude kolooniate suuruseid, tuvastati aja jooksul toimuv normaalse maksa hepatotsüütide jagunemine ja seeläbi ka rakukolooniate suurenemine (Joonis 24). Erinevatel ajapunktidel tehtud koelõikudelt loeti kokku üksikute ja kolooniaid moodustavate hepatotsüütide arv. Arvutuste tulemusel leiti, et kolm päeva pärast tamoksifeeni süstimist oli üksikuid rakke 78% ning keskmine koloonia moodustanud rakkude arv oli 1,4 (Joonis 24, D3; LISA 3). Kuu aega pärast tamoksifeeni süstimist oli aga märgata üksikute maksarakkude arvu vähenemist ja nende arvelt kolooniate suurenemist (Joonis 24, M1). Pikema aja vältel vähenes üksikute rakkude arv veelgi (54,8%), ning suurenes kolooniaid moodustavate rakkude arv. Selle tulemusena oli kuus kuud pärast tamoksifeeni süstimist keskmine koloonia moodustunud rakkude arv 2,1. (Joonis 24; LISA 3)



Joonis 24. Hepatotsüütide koloonia suuruse muutumine ajas. D – päev; M – kuu. Sinisega on kujutatud rakukolooniate suurused ja nende protsent kolm päeva pärast tamoksifeeni süstimist. Kollasega on toodud olukord 1 kuu pärast tamoksifeeni süstimist ja rohelisega 6 kuud pärast tamoksifeeni süstimist.

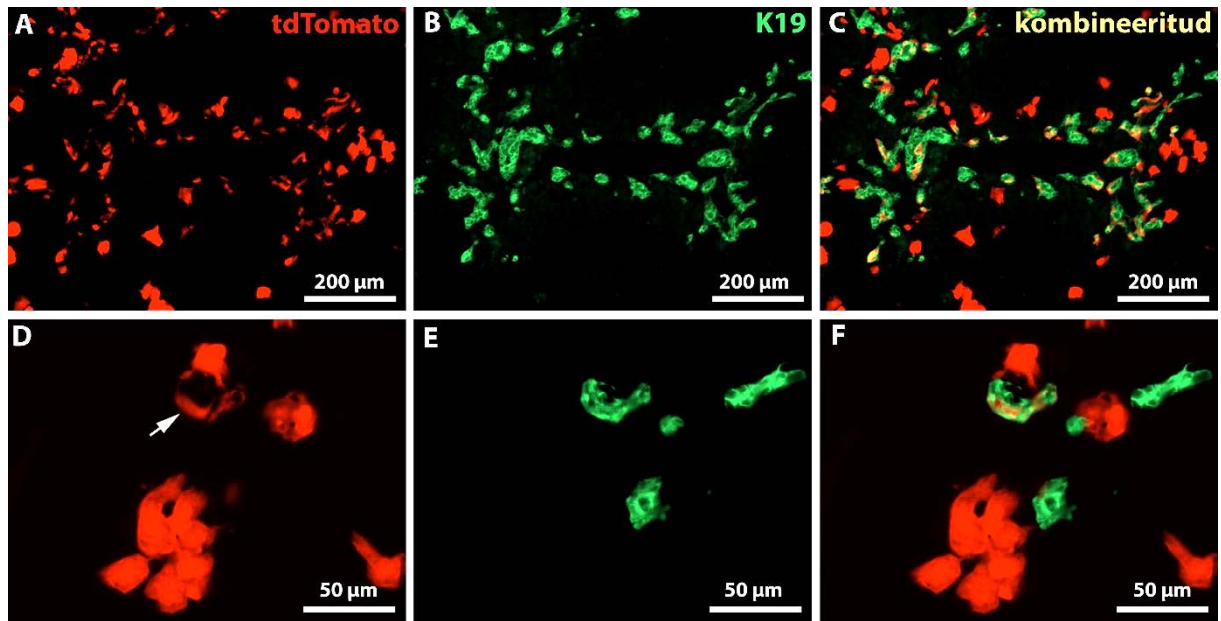
2.3.2.2. *TTR^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirte maksa regeneratsioon kahjustuse korral

Keemilise kahjustusega (CCl₄) maksas oli tdTomato ekspresseeritud nii parenhüümi- kui ka sapiteede rakkudes (Joonis 25, A-C, G-I). Peamiselt moodustasid tdTomatot ekspresseerivad hepatotsüüdid 3- 10 rakust koosnevaid kolooniaid (Joonis 25, A-C), kuid leidus ka suuremaid rakkude kogumikke (Joonis 25, D-F). Samas sapiteedele iseloomuliku morfoloogiaga TOM⁺/K19⁺ rakkude hulk ei olnud kahjustamata maksaga võrreldes märgatavalt suurenenud.



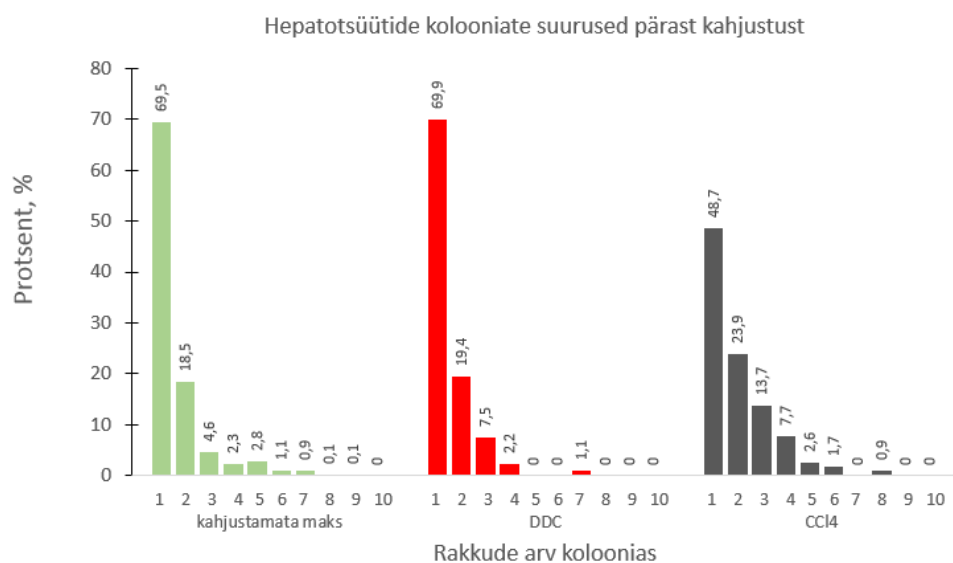
Joonis 25. *TTR^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiire keemilise kahjustusega (CCl₄) maksa tdTomato ekspressioon. (A-C) TOM⁺ hepatotsüütide kolooniad ja K19⁺ sapiteede rakud. (D-F) Ligi 20 rakust koosnev hepatotsüütide koloonia. Pildil F on siniselt kujutatud tuumavärv DAPI. (G-I) TOM⁺ hepatotsüüdid ja sapiteede morfoloogiaga TOM⁺/K19⁺ rakud.

DDC dieedil olnud hiirtel esines tdTomato ekspressioon peamiselt üksikutes rakkudes, kuid leidus ka kuni viiest parenhüümirakust koosnevaid kolooniaid (Joonis 26). Samuti oli näha kahjustuse tagajärjel toimunud aktiivset sapiteede rakkude jagunemist ja uute sapiteede moodustumist (Joonis 26, A-C). Lisaks esines ka palju TOM⁺/K19⁺ ja sapiteede morfoloogiaga rakke (Joonis 26, D-F).



Joonis 26. *TTR^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiire DDCga kahjustatud maksa tdTomato ekspressioon. (A-F) tdTomatot ekspresseerivad hepatotsüüdid ja sapiteede morfoloogiaga K19⁺ rakud. (D-F) TOM⁺ hepatotsüüdid ja TOM⁺/K19⁺ sapiteede morfoloogiaga rakud (valge nool).

TTR^{cre+}/TOM⁺ genotüübiga hiire kahjustatud maksa parenhüümirakkude kolooniate suuruseid võrreldes leiti, et hepatotsüütidele toksilise CCl₄ tagajärjel toimub nende jagunemine ja seega suureneb kolooniad moodustavate rakkude arv (Joonis 27). Sapiteedele toksilise DDC dieeti korral maksarakkude kolooniate suurenemist, võrreldes kahjustamata maksaga, ei täheldatud (Joonis 27). Pärast CCl₄ kahjustust oli maksarakkude keskmine koloonia suurus 2,1 raku, kuid DDC dieedi ja kahjustamata maksal 1,5 raku (LISA 2).



Joonis 27. Hepatotsüütide kolooniate suurused pärast kahjustust. Rohelisega on kujutatud kahjustamata maksa rakukolooniate suurused ja nende protsent. Punasega ja halliga on kujutatud vastavalt kaks nädalat pärast DDC ja CCl₄ kahjustust leiduvate rakukolooniate suurused ja nende protsent.

2.4. Arutelu

Maksa regeneratsioonimehhanismi ei ole veel täpselt kirjeldatud ja see tekitab vastava ala uurijate seas palju diskussiooni. Regeneratsiooni eest vastutavate rakkude defineerimine aitaks välja töötada farmakoloogilisi strateegiaid krooniliste maksahaiguste raviks ja rakupõhist teraapiat erinevate maksakahjustuste korral. Arvatakse, et maksa homöostaasi eest vastutavad diferentseerunud ning jagunemisvõimelised hepatotsüüdid ja sapiteede rakud. Kahjustuse korral võivad aga maksa paranemises osaleda ka täiskasvanud tüvirakud, kuid siiani pole nende olemasolu suudetud tuvastada. Samas on üldlevinud arvamus, et maksa potentsiaalsed täiskasvanud tüvirakud võivad paikneda Heringi kanalis. (Alison jt, 1996; Dan ja Yeoh, 2008; Isse jt, 2013; Schmelzer jt, 2006; Zorn, 2008; Theise jt, 1999; Yovchev jt, 2008)

Seni on maksa tüvirakkude tuvastamiseks kasutatud meetodeid, mis ei võimalda jälgida hepatotsüütide ja sapiteede rakkude põlvnemist. Samuti on leitud, et normaalsetes hepatotsüütides võidakse ekspresseerida sapiteede transkriptsioonifaktoreid ning tamoksifeen võib põhjustada maksarakkudes sapiteede markerite ekspressiooni. Seega tuleks maksa regeneratsioonis osalevate rakkude täpsemaks identifitseerimiseks uurida rakkude kлонаalset jagunemist. (Carpentier jt, 2011; Espanol-Suner jt, 2012; Furuyama jt, 2011; Huch jt, 2013; Isse jt, 2013; Iverson jt, 2011; Malato jt, 2011; Tarlow jt, 2014). Käesolevas magistritöös kasutati *in vivo* rakkude järglaskonna jälgimise meetodit, et uurida maksa homöostaasis ja kahjustatud maksa regeneratsioonis osalevaid rakke. Selleks kasutati sapiteede ja hepatotsüütide järglaskonna jälgimist võimaldavaid hiiri, et uurida võimalikku muutuste toimumist nii ajas kui ka erinevate maksakahjustuste korral.

Kõigepealt kontrolliti süsteemi funktsionaalsust ja ajas toimuvaid muutusi $K19^{cre+}/TOM^+$ genotüübiga hiirte koelõikudel, kus nähti moodustuvate sapiteede struktuure ja pikema aja jooksul pea täieliku sapiteede puu moodustumist (Joonis 13). Sapiteede homöostaasi mehhanismi kohta on varasemalt olnud palju vastakaid seisukohti. Näiteks on arvatud, et uued sapiteede rakud võivad tekkida periportaalsetest hepatotsüütidest (Desmet jt, 1995), olemasolevate sapiteede rakkude jagunemisel (Slott jt, 1990) või ka sapiteede tüvirakkudest (Theise jt, 1999). Täpsemad uuringud on aga selgitanud, et sapiteede homöostaasi tagab peamiselt diferentseerunud ja jagunemisvõime säilitanud sapiteede rakkude replitseerumine (Magami jt, 2002) ning ka käesolevas magistritöös leiti, et sapiteede rakkude uuenemine toimub eelkõige olemasolevate rakkude jagunemisel. Saadud tulemused aga ei välista sapiteede tüvirakkude osalemist antud protsessis ning selle kindlaks tegemiseks tuleks

kasutada teisi sapiteedes paiknevate potentsiaalsete tüvirakkude markereid, näiteks Sox9 (ingl *SRY (sex determining region Y)-box 9*). Selliste uuringute tulemusena on aga leitud, et antud rakud ei jagune aja jooksul märkimisväärselt (Tarlow jt, 2014). Seega võime arvata, et sapiteede uuenemise eest vastutavad peamiselt sapiteede diferentseerunud rakud.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli ka uurida normaalse maksa homöostaasi ja rakkude võimalikku transdiferentseerumist sapiteede rakkudest hepatotsüütideks ja vastupidi. Selleks uuriti *K19^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiiri erinevatel ajapunktidel ning leiti, et aja jooksul ei toimu märkimisväärselt hepatotsüütide asendumist sapiteedest pärit rakkudega (Joonis 14; Joonis 15; Joonis 16). Proovidest tuvastati küll üksikutel juhtudel maksarakkudele iseloomuliku morfoloogiaga rakke, kuid nende hulk ei ole normaalse maksa säilitamiseks piisav. (Joonis 15, G-I; Joonis 16, D-F). Potentsiaalsete transdiferentseerunud rakkude paremaks tuvastamiseks võiks kasutada näiteks maksarakkude tuumaspetsiifilist HNF4 α antikeha. Üksikute periportaalse hepatotsüütide tekkimist on ka varem kirjeldatud (Furuyama jt, 2011; Iverson jt, 2011). Samasuguseid tulemusi on saadud ka tamoksifeen Cre-LoxP, mida kasutati ka käesolevas töös, AAV-TTR-Cre (AAV, ingl *adeno-associated virus*) süsteemi (Tarlow jt, 2014) ning teiste meetoditega (Carpentier jt, 2011; Espanol-Suner jt, 2012; Malato jt, 2011). Seega võib antud töö praeguste tulemuste põhjal arvata, et normaalse maksa homöostaasi eest vastutavad peamiselt diferentseerunud ja jagunemisvõimelised maksarakud, sest hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga rakke oli niivõrd vähe ja need ei osalenud aktiivselt maksa parenhüümi uuenemises.

K19^{cre+}/TOM⁺ genotüübiga hiiri kasutati ka erinevate mehhanismidega tekitatud maksakahjustuse järgse regeneratsiooni uurimiseks, et jälgida sapiteede rakkude jagunemist ja tuvastada võimalikku sapiteede rakkude transdiferentseerumist maksarakkudeks. Maksa keemiline kahjustus (CCl₄) ja sapiteede kahjustus (DDC) põhjustasid küll sapiteede rakkude aktiivset jagunemist, kuid märkimisväärsed muutusi rakkude spetsialiseerumises ei tuvastatud. (Joonis 18; Joonis 20). Samuti ei olnud üksikute ja hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga rakkude hulk tõusnud. Seega võib arvata, et antud toksiliste kahjustuste tagajärjel toimub küll sapiteede rakkude aktiivne jagunemine, kuid see ei vii rakkude spetsialiseerumise muutusteni, nagu on ka leitud varasemate uuringute tulemusena (Espanol-Suner jt, 2012; Furuyama jt, 2011; Huch jt, 2013; Itoh ja Miyajima, 2013; Malato jt, 2011; Tarlow jt, 2014). On ka võimalik, et sapiteede rakud küll ei transdiferentseeru, kuid toetavad hepatotsüütide jagunemist juksta- või parakriinsete signaalidega ning on seega vajalikud maksa terviklikuks regeneratsiooniks (Ishikawa jt, 2012; Takase jt, 2013).

Samas on sapiteede epiteelile iseloomuliku K19 markeri asemel kasutatud DDC kahjustuse uurimiseks ka maksa eellasrakkude markerit Sox9 (Dorrell jt, 2011). Katsete tulemusena leiti, et kahjustusega hiirte maksas on rakkude spetsialiseerumise muutumine küllaltki tavapärase. Selles töös kasutati katsete läbiviimiseks samamoodi tamoksifeeni süstimisel aktiveeruvat Cre süsteemi ja kaks nädalat kestnud DDC dieeti. Kuna aga Sox9 markerit on kasutatud ka teiste meetodite korral, mille tulemusena rakkude transdiferentseerumist ei tuvastatud (Tarlow jt, 2014), siis ei saa käesoleva töö ja Dorrelli leitud tulemuste erinevus tulla kasutatud markerist, vaid eksperimendi läbiviimise meetodite erinevustest. Seega on praegu kasutusel olevad süsteemid küllaltki puudulikud ja nende abil saadud tulemused küsitava väärtusega.

K19^{cre+}/TOM⁺ genotüübiga hiirtele tehtud PH ja BDL operatsioonide tulemusena tekkis maksa parenhüümi aga tunduvalt rohkem tdTomatot ekspresseerivad ja hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga rakke ning nende kolooniaid (Joonis 17, D-I; Joonis 19, D-I). Seni on arvatud, et pärast osalist hepatektoomiat vastutavad maksa regeneratsiooni eest peamiselt jagunevad hepatotsüüdid (Fausto, 2004; Grisham, 1962; Michalopoulos, 2010; Taub, 2004; Yin jt, 2011), kuid käesoleva töö tulemus viitab võimalikule sapiteede rakkude transdiferentseerumisele ja/või oletatavate K19 ekspresseerivate tüvirakkude osalusele selles protsessis. Värvunud rakukolooniate esinemine pärast sapijuha sulgemist viitab samuti võimalikule tõsisest kahjustusest tingitud rakkude transdiferentseerumisele ja jagunemisele.

Mõlema kahjustuse tagajärjel moodustunud kolooniad paiknesid aga tdTomatot ekspresseerivatest sapiteede rakkudest küllaltki kaugel (Joonis 17, D-F; Joonis 19, D-F) ja seega on võimalik, et osa nähtud kolooniatest tekkisid käesolevas töös juba varem kirjeldatud hepatotsüütidele omase morfoloogiaga rakkude jagunemisel. Kuna *K19^{cre+}/TOM⁺* genotüübiga hiirtel võivad värvuda nii sapiteede rakud kui ka sapiteedes paiknevad potentsiaalsed tüvirakud, siis ei võimalda uuringute läbiviimiseks kasutatud meetod kindlaks teha, kas värvunud hepatotsüüdid on tekkinud sapiteede rakkude transdiferentseerumise või sapiteedes leiduvate tüvirakkude diferentseerumise tulemusena. Selle väljaselgitamiseks tuleks teostada täiendavaid uuringuid teiste markeritega, mis võimaldaks veelgi täpsemalt määrata rakkude kloonilist jagunemist, näiteks Sox9. Samuti tuleks tdTomatot ekspresseerivate maksarakkude hulga ja selle muutuste kindlakstegemiseks kasutada FACS (ingl *fluorescence-activated cell sorting*) analüüsi. Samas ei saa välistada, et antud töös leitud vähesel määral toimuv muutus sapiteede rakkude spetsialiseerumises võib osutada nii pikas perspektiivis kui ka kroonilise kahjustuse korral funktsionaalselt oluliseks.

Lisaks uuriti normaalse maksa homöostaasi ka TTR^{cre+}/TOM^+ genotüübiga hiirtel, mis võimaldasid jälgida parenhüümirakkude järglaskonda. Katsete läbiviimiseks rakendati varem kasutatud ajapunktide skeemi – vahemikus kolm päeva kuni kuus kuud pärast tamoksifeeni süstimist (Joonis 12, A). Esimeses ajapunktis tuvastati tdTomato ekspressiooni peamiselt üksikutes hepatotsüütides, mis moodustasid kõikidest värvunud rakkudest ~80% (Joonis 21, A-C; Joonis 24, D3). Saadud protsent on küll veidi väiksem kui varem avaldatud tulemused (Tarlow jt, 2014), kuid erinevusi võivad põhjustada kasutatud ajapunktid ja kolooniasse kuuluvate rakkude hulga lugemise meetodika. Kuu aega pärast tamoksifeeni süstimist oli keskmine rakkude arv koloonias suurenenud (Joonis 22, A-C; Joonis 24, M1) ning kuue kuu pärast olid moodustunud juba suuremad rakkude kolooniad ja üksikute rakkude hulk oli langenud 54 protsendini (Joonis 23, A-C; Joonis 24, M6). Maksa homöostaasi tagamiseks toimuvat parenhüümirakkude jagunemist on erinevate meetoditega ka varemgi tuvastatud (Grisham, 1969; Ng ja Iannaccone, 1992; Wright ja Alison, 1984). Seega võib nii kirjanduses avaldatud kui ka käesoleva töö tulemuste põhjal arvata, et maksa uuenemise eest vastutavad tüvirakkude asemel hoopis spetsialiseerunud, kuid jagunemisvõimelised hepatotsüüdid. Seega on töö tulemusena leitud hepatotsüütide kolooniate tekkimine ootuspärane ning viitab maksa tavapärasele homöostaasile ja sellest tingitud maksarakkude jagunemisele.

Samuti leiti TTR^{cre+}/TOM^+ genotüübiga hiirte maksa analüüsil sapiteede rakkudele iseloomuliku morfoloogiaga ja tdTomatot ekspresseerivaid rakke (Joonis 21, D-F; Joonis 22, D-F; Joonis 23, D-F), kuid neid täheldati tunduvalt rohkem kui $K19^{cre+}/TOM^+$ hiirte puhul. Seega võiks arvata, et homöostaasi korral on maksarakkude muutumine sapiteede rakkudeks tõenäolisem kui vastupidine transdiferentseerumine. Antud väide on aga vastuolus üldlevinud arvamusega, et maksa täiskasvanud tüvirakud paiknevad sapiteedes ning vajadusel arenevad neist hepatotsüüdid (Isse jt, 2013). Seega tuleks tdTomatot ekspresseerivate sapiteede rakkude hulga ja selle muutuste kindlakstegemiseks kasutada FACS analüüsi. Küsimusi tekitab ka $TOM^+/K19^+$ rakkude madalam tdTomato ekspressioonitase kui parenhüümirakkudel. Samas võis signaali tugevuse erinevust põhjustadagi just rakkude transdiferentseerumine ja selle käigus toimunud muutused, mis mõjutasid omakorda ka tdTomato ekspressiooni.

Küllaltki tõenäoline on ka võimalus, et TTR promootor on aktiivne osades sapijuha rakkudes ja sellisel juhul ei sobi antud TTR^{cre+}/TOM^+ süsteem hepatotsüütide transdiferentseerumise uurimiseks. Meetodi mittetäiuslikkusele viitab ka teise uurimisgrupi tulemus, kus $AAV-TTR-Cre$ vektorsüsteemi kasutamisel $R26R-Confetti$ hiires ei leitud hepatotsüütidest transdiferentseerunud sapiteede rakke (Tarlow jt, 2014). Seega tuleks käesolevas töös leitud maksarakkude transdiferentseerumise täpsemaks uurimiseks ja kontrollimiseks kasutada

alternatiivseid meetodeid, näiteks kirjeldatud vektorsüsteemi ja/või alternatiivsed hepatotsüütidele iseloomulikke promotoreid, nagu albumiin.

TTR^{cre+}/TOM⁺ genotüübiga hiirtele tekitatud maksakahjustused (CCl₄ ja DDC) põhjustasid intensiivset sapiteede rakkude jagunemist (Joonis 25, A-C; Joonis 26, A-C). CCl₄ tagajärjel oli märgata ka tdTomatot ekspresseerivate rakukolooniate moodustumist, mis paiguti koosnesid enam kui 10 rakust (Joonis 25, D-F; Joonis 27). See viitab kahjustuse tagajärjel toimunud intensiivsele maksarakkude jagunemisele. Teades, et CCl₄ on eelkõige toksiline hepatotsüütidele (Weber jt, 2003), on saadud tulemus ka ootuspärane. Koelõikudelt leiti nii suuri kui ka väikseid kolooniaid, seega jagunes osa rakke kahjustuse parandamiseks korduvalt ning mõni rakk ei jagunenud üldse. CCl₄ kahjustusest põhjustatud hepatotsüütide jagunemist on tuvastatud ka teistes katsetes (Tarlow jt, 2014) ja seega kinnitavad käesolevas töös saadud tulemused, et täiskasvanud ja jagunemisvõimelised hepatotsüüdid on maksarakkude kahjustuse korral olulised uute hepatotsüütide allikad.

DDC kahjustuse korral aga niivõrd intensiivset hepatotsüütide jagunemist ei täheldatud (Joonis 27). See on küll vastuolus varem avaldatud tulemustega (Tarlow jt, 2014), kuid on võimalik, et pikema kahjustuse korral põhjustab DDC dieet maksarakkude jagunemist. Toksiini poolt kahjustatud maksas täheldati ka TOM⁺/K19⁺ ja sapiteede morfoloogiaga rakke (Joonis 26, D-F), mida oli märgatavalt rohkem kui varem käsitletud normaalses ja CCl₄ kahjustusega maksas. Saadud tulemus on kooskõlas varasemate eksperimentaalsete tulemustega, kus DDC dieedi korral tekkisid sapiteede rakud peamiselt hepatotsüütidest (Sekiya ja Suzuki, 2014; Yanger jt, 2013). Samas on ka vastupidiseid näiteid, kus maksarakud ei osalenud sapiteede regeneratsioonis (Malato jt, 2011; Wang jt, 2003). Seega tuleks tdTomatot ekspresseerivate sapiteede rakkude hulga ja selle muutuste kindlakstegemiseks kasutada FACS analüüsi. Samuti tuleks maksarakkude transdiferentseerumise täpsemaks uurimiseks ja kontrollimiseks kasutada eelpool kirjeldatud vektorsüsteemi või alternatiivsed hepatotsüütidele iseloomulikke promotoreid.

Käesolevas magistritöös leiti, et tõsise maksakahjustuse tagajärjel esineb vähesel määral sapiteede rakkude transdiferentseerumist hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga rakkudeks. Samas parenhüümirakkude spetsialiseerumist sapiteede rakkudeks tuleks kontrollida alternatiivsete meetoditega, näiteks kasutada tdTomato asemel *R26R-Confetti* hiireliini ja/või tamoksifeni asemel *AAV-cre* vektorit. Kirjanduses toodud uuringute läbiviimiseks on kasutatud erinevaid meetodeid ning katsemudeleid, kuid need mõjutavad omakorda saadud tulemusi, mis võivad seetõttu olla vastuolulised. Ka käesolevas töös

täheldati, et mõned tulemused kinnitavad teistes uurimisgruppides saadud andmed, kuid mõned on vastuolus seni teadaolevaga. Probleemiks võib olla ka olemasolevate kahjustuse mudelite ebaefektiivsus, mistõttu tõelisi maksa täiskasvanud tüvirakke ei aktiveerita. Seega maksa regeneratsiooni veelgi paremaks uurimiseks oleks vaja välja töötada täpsemaid hiirte rakkude klonaalse jälgimise mudeleid. Samuti puuduvad teised funktsionaalsed ja usaldusväärsed rakkude jälgimise loommudelid, mistõttu ei saa ka käesoleva töö tulemusi võrdsustada roti või inimese maksas toimuva regeneratsiooniga.

KOKKUVÕTE

Maksal on suur regeneratsioonivõime, kuid selle mehhanismi ei ole suudetud veel täielikult kirjeldada. Seetõttu oli antud töö eesmärgiks uurida maksa homöostaasis ja kahjustatud maksa regeneratsioonis osalevaid rakke. Kuna eksperimentaalses osas kasutati uurimisobjektina hiire maksa, siis sisaldas kirjandusele tuginev osa ülevaadet maksa ülesehitusest ja rakutüüpidest. Samuti anti ülevaade maksa organogeneesist, postnataalsest arengust ja peamistest funktsioonidest. Põhjalikumalt kirjeldati ka maksa regeneratsiooniga seotud hüpoteese ja probleeme. Sealjuures toodi välja peamised maksa regeneratsiooni uurimiseks kasutatavad ja maksakahjustusi tekitavad meetodid, nagu osaline hepatektoomia, sapiteede sulgemine, CCl₄ ja DDC toksiinid.

Antud magistritöö üheks eesmärgiks oli luua *in vivo* süsteem maksa sapiteede ja parenhüümirakkude järglaskonna jälgimiseks. Selleks kasutati mudelorganismina hiireliine ($K19^{cre+}$, TTR^{cre+} ja TOM^+), kelle omavahelisel ristamisel saadud järglastel oli võimalik jälgida sapiteede rakkude ($K19^{cre+}/TOM^+$) ja parenhüümirakkude jagunemist (TTR^{cre+}/TOM^+). Cre-LoxP hiirtesse süstitud tamoksifeen põhjustas rakkudes tdTomato ekspressiooni, mis omakorda võimaldas jälgida rakkude jagunemist. Mõlema süsteemi korral oli märgata rakkude värvumist kolm päeva pärast tamoksifeeni süstimist ja ekspressiooni säilimist vähemalt kuue kuu vältel. Seega on mõlemad saadud süsteemid funktsionaalselt töökorras ja stabiilsed.

Teiseks eesmärgiks oli jälgida hiire maksa sapiteede ja parenhüümirakkude jagunemist erinevatel ajapunktidel ning seeläbi tuvastada võimalikku transdiferentseerumist maksa erinevate rakuliste komponentide vahel. Selleks jälgiti sapiteede rakkude ja parenhüümirakkude jagunemist kuni kuue kuu jooksul. Sapiteede rakkude jagunemise jälgimisel selgus, et normaalses maksas toimub väga vähesel määral sapiteede rakkude transdiferentseerumine hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga rakkudeks. Leitud muutus sapiteede rakkude spetsialiseerumises ei ole aga piisav maksa parenhüümi homöostaasi tagamiseks. Parenhüümirakkude jagunemise jälgimisel leiti, et maksa homöostaasi eest vastutavad peamiselt diferentseerunud ja jagunemisvõimelised hepatotsüüdid. Lisaks sellele tuvastati ka maksarakkude transdiferentseerumist sapiteede rakkudeks, kuid võib arvata, et saadud tulemus on põhjustatud meetodi mittetäielikust spetsiifikast.

Kolmandaks eesmärgiks oli tekitada täiskasvanud hiire maksas sapiteede ja parenhüümirakkude kahjustusi ning seeläbi uurida rakkude võimalikku transdiferentseerumist maksa erinevate rakuliste komponentide vahel. Selleks jälgiti sapiteede rakkude ja

parenhüümirakkude jagunemist erinevate kahjustuste tagajärjel, nagu PH, CCl₄, BDL ja DDC. Sapiteede rakkude jagunemise jälgimisel leiti, et CCl₄ ja DDC kahjustus ei põhjusta rakkude transdiferentseerumist hepatotsüütideks. Samas PH ja BDL tekitasid muutusi rakkude spetsialiseerumises, kuid transdiferentseerunud rakkude hulk ei olnud piisav maksa taastootmiseks. Parenhüümirakkude jagunemise jälgimisel leiti, et sapiteedele toksiline DDC dieet ei põhjustanud muutusi hepatotsüütide jagunemises. Küll aga märgati transdiferentseerunud rakkude hulga suurenemist, võrreldes kahjustamata maksaga. Samas CCl₄ kahjustusega maksas tuvastati küll hepatotsüütide aktiivset jagunemist, aga mitte rakkude transdiferentseerumist. Saadud tulemuste kontrollimiseks tuleks kasutada ka alternatiivseid meetodeid.

Käesolevas magistritöös leitud sapiteede rakkude transdiferentseerumine hepatotsüütidele iseloomuliku morfoloogiaga rakkudeks aitab paremini mõista hiire maksa regeneratsioonimehhanisme. Samas parenhüümirakkude spetsialiseerumise muutust sapiteede rakkudeks tuleks kontrollida alternatiivsete meetoditega. Saadud tulemusi saab rakendada täiendavate katsesüsteemide loomiseks ja pikemas perspektiivis on võimalik nende põhjal töötada välja ravimeid ja strateegiaid maksakahjustuste ning krooniliste maksahaiguste raviks.

Transdifferentiation Between Hepatocytes and Biliary System Cells in Liver Regeneration

Kadri Valter

SUMMARY

The liver is known to be a highly regenerative organ and this feature has been studied for a long time, but the complete regeneration mechanism is still not yet fully understood. Initially, it was thought that liver regeneration was ensured by the differentiation of liver specific adult stem cells. However, studies have shown that differentiated liver hepatocytes and biliary cells are actually responsible for liver homeostasis. The presence of adult hepatic stem cells has not yet been detected, but it is believed that they might be located in the region of hepatic bile ducts.

A variety of methods have been used to detect liver stem cells, but the exact identity of the cells involved in liver regeneration has remained unclear. Different liver damaging methods have been used to enable regeneration and activate stem cells, however, the results obtained by them is inconsistent and inadequate. Therefore, more accurate methods should be used to identify cells responsible for liver regeneration.

In the current work, the structure and cell types of the liver were reviewed. In addition, liver organogenesis, postnatal development and main functions were described. Moreover, since the research was done on liver regeneration, problems and hypotheses associated with its mechanisms were discussed. These include liver damage inducing methods, such as partial hepatectomy, bile duct ligation, CCl₄, and DDC toxins, which are commonly used to research the regeneration of damaged liver.

This work is part of a larger project which aims to investigate the role and regulation of stem cells in liver regeneration and tumors. Defining the cells responsible for regeneration helps us to develop new methods for the treatment of chronic liver diseases and cell-based therapies for different types of liver damage.

The first objective of this thesis was to create a system for *in vivo* tracing of hepatic biliary and parenchymal cells. This was achieved by crossbreeding different mouse strains ($K19^{cre+}$, TTR^{cre+} , and TOM^+), whose offspring could be used to trace biliary ($K19^{cre+}/TOM^+$) and parenchymal cells (TTR^{cre+}/TOM^+). Cells were distinguished by tdTomato staining, which

was induced by the injection of tamoxifen into Cre-LoxP mice. In both systems, tdTomato expression was noticeable three days after tamoxifen injection and it lasted for at least six months. Thus it can be said that both of the systems were working and functionally stable.

The second objective of this study was to trace bile duct and liver parenchymal cells at different time-points, and thereby detect potential transdifferentiation between different liver cell compartments. Biliary and parenchymal cells were traced for up to six months. Biliary duct cells showed some capability to transdifferentiate into cells with hepatocyte-like morphology. However, there were not enough cells with changed specialization to ensure the homeostasis of liver parenchyma. Traced parenchymal cells showed that liver homeostasis is mainly achieved through replication of differentiated hepatocytes. In addition, some biliary cells were found to be transdifferentiated from hepatocytes, but this result might have been caused by the inaccuracy of the used method.

The third objective was to cause liver and biliary duct damage and thereby examine the potential transdifferentiation between different cellular compartments. Bile duct and parenchymal cells were traced throughout the liver damage, such as PH, CCl₄, BDL, and DDC. It was found that CCl₄ and DDC do not cause bile duct cells to transdifferentiate into hepatocytes. However, transdifferentiated cells occurred after PH and BDL, but their amount was not sufficient for the total reproduction of the liver. On the one hand, tracing parenchymal cells revealed that DDC diet, toxic to biliary cells, caused no remarkable change in the replication of hepatocytes. However, compared to healthy liver, an increase in transdifferentiated cells was observed. On the other hand, parenchymally toxic CCl₄ caused rapid hepatocyte proliferation, but no transdifferentiation. The obtained results should be controlled by using alternative methods.

In conclusion, described transdifferentiation of bile duct cells into morphologically hepatocyte-like cells contributes to the understanding of the liver regeneration mechanism in mouse. However, the change in specialization of parenchymal cells into biliary cells should also be tested with alternative methods. Obtained results can ultimately be applied to develop other experimental systems and to contribute to drug development for treating liver damage and chronic liver diseases.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdalla, E.K., Vauthey, J.N. ja Couinaud, C. (2002). The caudate lobe of the liver: implications of embryology and anatomy for surgery. *Surg Oncol Clin N Am* 11: 835-848.
- Alison, M.R., Golding, M., Sarraf, C.E., Edwards, R.J. ja Lalani, E.N. (1996). Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology* 110: 1182-1190.
- Anderson, G.J., Darshan, D., Wilkins, S.J. ja Frazer, D.M. (2007). Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals* 20: 665-674.
- Apte, U., Gkretsi, V., Bowen, W.C., Mars, W.M., Luo, J.H., Donthamsetty, S., Orr, A., Monga, S.P., Wu, C. ja Michalopoulos, G.K. (2009). Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology* 50: 844-851.
- Apte, U., Zeng, G., Thompson, M.D., Muller, P., Micsenyi, A., Cieply, B., Kaestner, K.H. ja Monga, S.P. (2007). beta-Catenin is critical for early postnatal liver growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1578-1585.
- Assimakopoulos, S.F. ja Vagianos, C.E. (2009). Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol* 15: 121-123.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J. ja Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449: 1003-1007.
- Behrens, A., Sibilina, M., David, J.P., Mohle-Steinlein, U., Tronche, F., Schutz, G. ja Wagner, E.F. (2002). Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* 21: 1782-1790.
- Berger, M.L., Bhatt, H., Combes, B. ja Estabrook, R.W. (1986). CCl₄-induced toxicity in isolated hepatocytes: the importance of direct solvent injury. *Hepatology* 6: 36-45.
- Bioulac-Sage, P., Le Bail, B. ja Balabaud, C. 1992. Liver and biliary tract histology, p. 12-20. In N. McIntyre, J.-P. Benhamou, J. Bircher, M. Rizzetto ja J. Rodes (ed.), *Oxford Textbook Of Clinical Hepatology*, 2nd ed., vol.1. Oxford University Press, New York, United States.
- Bird, T.G., Lorenzini, S. ja Forbes, S.J. (2008). Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res* 331: 283-300.
- Bismuth, H., Aldridge, M.C. ja Kunstlinger, F. 1992. Macroscopic anatomy of the liver, p. 3-4. In N. McIntyre, J.-P. Benhamou, J. Bircher, M. Rizzetto ja J. Rodes (ed.), *Oxford Textbook Of Clinical Hepatology*, 2nd ed., vol.1. Oxford University Press, New York, United States.
- Bjorntorp, P. ja Sjostrom, L. (1978). Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism* 27: 1853-1865.

- Blake, C.C. ja Oatley, S.J. (1977). Protein-DNA and protein-hormone interactions in prealbumin: a model of the thyroid hormone nuclear receptor? *Nature* 268: 115-120.
- Bourseau-Guilmain, E., Griveau, A., Benoit, J.P. ja Garcion, E. (2011). The importance of the stem cell marker prominin-1/CD133 in the uptake of transferrin and in iron metabolism in human colon cancer Caco-2 cells. *PLoS One* 6: e25515.
- Bralet, M.P., Branchereau, S., Brechot, C. ja Ferry, N. (1994). Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am J Pathol* 144: 896-905.
- Bucher, N.L. (1963). Regeneration of Mammalian Liver. *Int Rev Cytol* 15: 245-300.
- Campbell, J.S., Prichard, L., Schaper, F., Schmitz, J., Stephenson-Famy, A., Rosenfeld, M.E., Argast, G.M., Heinrich, P.C. ja Fausto, N. (2001). Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest* 107: 1285-1292.
- Canbay, A., Feldstein, A., Baskin-Bey, E., Bronk, S.F. ja Gores, G.J. (2004). The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 1191-1196.
- Carpentier, R., Suner, R.E., van Hul, N., Kopp, J.L., Beaudry, J.B., Cordi, S., Antoniou, A., Raynaud, P., Lepreux, S., Jacquemin, P., Leclercq, I.A., Sander, M. ja Lemaigre, F.P. (2011). Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology* 141: 1432-1438, 1438 e1431-1434.
- Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D. ja Desdouets, C. (2010). Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling. *Cell Cycle* 9: 460-466.
- Chiang, J.Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50: 1955-1966.
- Clotman, F., Jacquemin, P., Plumb-Rudewiez, N., Pierreux, C.E., Van der Smissen, P., Dietz, H.C., Courtoy, P.J., Rousseau, G.G. ja Lemaigre, F.P. (2005). Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* 19: 1849-1854.
- Cohen, D.E. (2008). Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *J Clin Lipidol* 2: S1-3.
- Cohen, L., McKinnell, J., Puglisi, V., Greco, A., Nardi, M., Lee, M. ja Karparkin, M. (1997). Prothrombin synthesis in the adult and fetal liver. *Thromb Haemost* 78: 1468-1472.
- Cornell, R.P. (1985). Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration. *Am J Physiol* 249: R551-562.
- Costa, R.H. ja Grayson, D.R. (1991). Site-directed mutagenesis of hepatocyte nuclear factor (HNF) binding sites in the mouse transthyretin (TTR) promoter reveal synergistic interactions with its enhancer region. *Nucleic Acids Res* 19: 4139-4145.
- Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V. ja Taub, R. (1996). Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274: 1379-1383.

- Czaja, M.J. 1998. Liver regeneration following hepatic injury, p. 28-49. *In* A. Strain ja A. M. Diehl (ed.), *Liver Growth and Repair*, Chapman and Hall, London, UK.
- Dalu, A. ja Mehendale, H.M. (1996). Efficient tissue repair underlies the resiliency of postnatally developing rats to chlordecone + CCl₄ hepatotoxicity. *Toxicology* 111: 29-42.
- Dan, Y.Y. ja Yeoh, G.C. (2008). Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 23: 687-698.
- Desmet, V., Roskams, T. ja Van Eyken, P. (1995). Ductular reaction in the liver. *Pathol Res Pract* 191: 513-524.
- Dickson, P.W., Howlett, G.J. ja Schreiber, G. (1982). Metabolism of prealbumin in rats and changes induced by acute inflammation. *Eur J Biochem* 129: 289-293.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A. ja Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130: 1120-1133.
- Dorrell, C., Erker, L., Schug, J., Kopp, J.L., Canaday, P.S., Fox, A.J., Smirnova, O., Duncan, A.W., Finegold, M.J., Sander, M., Kaestner, K.H. ja Grompe, M. (2011). Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev* 25: 1193-1203.
- Duncan, A.W., Dorrell, C. ja Grompe, M. (2009). Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 137: 466-481.
- Duncan, S.A., Navas, M.A., Dufort, D., Rossant, J. ja Stoffel, M. (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281: 692-695.
- Erker, L. ja Grompe, M. (2007). Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res* 1: 90-102.
- Espanol-Suner, R., Carpentier, R., Van Hul, N., Legry, V., Achouri, Y., Cordi, S., Jacquemin, P., Lemaigre, F. ja Leclercq, I.A. (2012). Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* 143: 1564-1575 e1567.
- Ezure, T., Sakamoto, T., Tsuji, H., Lunz, J.G., 3rd, Murase, N., Fung, J.J. ja Demetris, A.J. (2000). The development and compensation of biliary cirrhosis in interleukin-6-deficient mice. *Am J Pathol* 156: 1627-1639.
- Evarts, R.P., Hu, Z., Omori, N., Omori, M., Marsden, E.R. ja Thorgeirsson, S.S. (1996). Precursor-product relationship between oval cells and hepatocytes: comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis* 17: 2143-2151.
- Fausto, N. (2000). Liver regeneration. *J Hepatol* 32: 19-31.
- Fausto, N. (2004). Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39: 1477-1487.

- Fausto, N. ja Campbell, J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 120: 117-130.
- Fausto, N., Campbell, J.S. ja Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* 43: S45-53.
- Fellous, T.G., Islam, S., Tadrous, P.J., Elia, G., Kocher, H.M., Bhattacharya, S., Mears, L., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., Greaves, L.C., Chinnery, P.F., Taylor, G., McDonald, S.A., Wright, N.A. ja Alison, M.R. (2009). Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* 49: 1655-1663.
- Foss, T.R., Wiseman, R.L. ja Kelly, J.W. (2005). The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates. *Biochemistry* 44: 15525-15533.
- Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., Liebes, L. ja Yee, H. (2005). Intravital observation of *Plasmodium berghei* sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol* 3: e192.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J.M., Behringer, R.R., Nakamura, T. ja Uemoto, S. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 43: 34-41.
- Gao, B. (2005). Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* 2: 92-100.
- Gendrault, J.L., Steffan, A.M., Bingen, A. ja Kirn, A. 1988. Kupffer and endothelial cells, p. 17-38. In P. Bioulac-Sage ja C. Balabaud (ed.), *Sinusoids in Human Liver: Health and disease*, The Kupffer Cell Foundation, Riswijk.
- Gonzalez, F.J. (2008). Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. *Drug Metab Pharmacokinet* 23: 2-7.
- Grant, D.M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *J Inher Metab Dis* 14: 421-430.
- Grisham, J.W. (1962). A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H³. *Cancer Res* 22: 842-849.
- Grisham, J.W. 1969. Cellular Proliferation in the Liver, p. 28-43. In R. J. M. Fry (ed.), *Normal and Malignant Cell Growth*, Springer-Verlag, New York, USA.
- Haga, S., Ozaki, M., Inoue, H., Okamoto, Y., Ogawa, W., Takeda, K., Akira, S. ja Todo, S. (2009). The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49: 204-214.
- Hanada, S., Snider, N.T., Brunt, E.M., Hollenberg, P.F. ja Omary, M.B. (2010). Gender dimorphic formation of mouse Mallory-Denk bodies and the role of xenobiotic metabolism and oxidative stress. *Gastroenterology* 138: 1607-1617.
- Hart, S.N., Cui, Y., Klaassen, C.D. ja Zhong, X.B. (2009). Three patterns of cytochrome P450 gene expression during liver maturation in mice. *Drug Metab Dispos* 37: 116-121.

- Hofmann, A.F. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 159: 2647-2658.
- Hofmann, A.F., Hagey, L.R. ja Krasowski, M.D. (2010). Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *J Lipid Res* 51: 226-246.
- Houssaint, E. (1980). Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ* 9: 269-279.
- Hu, M., Kurobe, M., Jeong, Y.J., Fuerer, C., Ghole, S., Nusse, R. ja Sylvester, K.G. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells. *Gastroenterology* 133: 1579-1591.
- Hu, Z., Evarts, R.P., Fujio, K., Marsden, E.R. ja Thorgeirsson, S.S. (1995). Expression of fibroblast growth factor receptors flg and bek during hepatic ontogenesis and regeneration in the rat. *Cell Growth Differ* 6: 1019-1025.
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., Haft, A., Vries, R.G., Grompe, M. ja Clevers, H. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494: 247-250.
- Hussain, S.Z., Sneddon, T., Tan, X., Micsenyi, A., Michalopoulos, G.K. ja Monga, S.P. (2004). Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp Cell Res* 292: 157-169.
- Ingbar, S.H. (1963). Observations concerning the binding of thyroid hormones by human serum prealbumin. *J Clin Invest* 42: 143-160.
- Ishikawa, T., Factor, V.M., Marquardt, J.U., Raggi, C., Seo, D., Kitade, M., Conner, E.A. ja Thorgeirsson, S.S. (2012). Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology* 55: 1215-1226.
- Isse, K., Lesniak, A., Grama, K., Maier, J., Specht, S., Castillo-Rama, M., Lunz, J., Roysam, B., Michalopoulos, G. ja Demetris, A.J. (2013). Preexisting epithelial diversity in normal human livers: a tissue-tethered cytometric analysis in portal/periportal epithelial cells. *Hepatology* 57: 1632-1643.
- Itoh, T. ja Miyajima, A. (2013). Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology*
- Iverson, S.V., Comstock, K.M., Kundert, J.A. ja Schmidt, E.E. (2011). Contributions of new hepatocyte lineages to liver growth, maintenance, and regeneration in mice. *Hepatology* 54: 655-663.
- Jeske, D.J. ja Dietschy, J.M. (1980). Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using [3H]water. *J Lipid Res* 21: 364-376.
- Johnson, S.J., Hines, J.E. ja Burt, A.D. (1992). Macrophage and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury. *J Pathol* 166: 351-358.
- Jones, E.A. ja Summerfield, J.A. 1988. Kupffer cells, p. 683-704. *In* I. M. Arias, W. B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter ja D. A. Shafritz (ed.), *The Liver, Biology and Pathobiology*, Raven Press, New York, United States.

- Junnila, M., Rahko, T., Sukura, A. ja Lindberg, L.A. (2000). Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effects by oral administration of betaine in male Han-Wistar rats: a morphometric histological study. *Vet Pathol* 37: 231-238.
- Kalinichenko, V.V., Bhattacharyya, D., Zhou, Y., Gusarova, G.A., Kim, W., Shin, B. ja Costa, R.H. (2003). Foxf1 +/- mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl4 injury. *Hepatology* 37: 107-117.
- Kamiya, A., Kinoshita, T. ja Miyajima, A. (2001). Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 492: 90-94.
- Kanai, M., Raz, A. ja Goodman, D.S. (1968). Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 47: 2025-2044.
- Karakus, E., Karadeniz, A., Simsek, N., Can, I., Kara, A., Yildirim, S., Kalkan, Y. ja Kisa, F. (2011). Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl4). *J Hazard Mater* 195: 208-213.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R. ja Wojtowicz, J.M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115: 97-105.
- Kim, K.H., Kim, H.C., Hwang, M.Y., Oh, H.K., Lee, T.S., Chang, Y.C., Song, H.J., Won, N.H. ja Park, K.K. (2006). The antifibrotic effect of TGF-beta1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 1072-1078.
- Klaassen, C.D. ja Aleksunes, L.M. (2010). Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev* 62: 1-96.
- Koniaris, L.G., McKillop, I.H., Schwartz, S.I. ja Zimmers, T.A. (2003). Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 197: 634-659.
- Kuwahara, R., Kofman, A.V., Landis, C.S., Swenson, E.S., Barendsward, E. ja Theise, N.D. (2008). The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 47: 1994-2002.
- Lemaigre, F.P. (2003). Development of the biliary tract. *Mech Dev* 120: 81-87.
- Li, W. ja Chung, S.C. (2001). An improved rat model of obstructive jaundice and its reversal by internal and external drainage. *J Surg Res* 101: 4-15.
- Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V. ja Taub, R. (2002). STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 277: 28411-28417.
- Limaye, P.B., Alarcon, G., Walls, A.L., Nalesnik, M.A., Michalopoulos, G.K., Demetris, A.J. ja Ochoa, E.R. (2008). Expression of specific hepatocyte and cholangiocyte transcription factors in human liver disease and embryonic development. *Lab Invest* 88: 865-872.
- Limaye, P.B., Bhawe, V.S., Palkar, P.S., Apte, U.M., Sawant, S.P., Yu, S., Latendresse, J.R., Reddy, J.K. ja Mehendale, H.M. (2006). Upregulation of calpastatin in regenerating

- and developing rat liver: role in resistance against hepatotoxicity. *Hepatology* 44: 379-388.
- Lunz, J.G., 3rd, Contrucci, S., Ruppert, K., Murase, N., Fung, J.J., Starzl, T.E. ja Demetris, A.J. (2001). Replicative senescence of biliary epithelial cells precedes bile duct loss in chronic liver allograft rejection: increased expression of p21(WAF1/Cip1) as a disease marker and the influence of immunosuppressive drugs. *Am J Pathol* 158: 1379-1390.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Zariwala, H.A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., Lein, E.S. ja Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13: 133-140.
- Magami, Y., Azuma, T., Inokuchi, H., Kokuno, S., Moriyasu, F., Kawai, K. ja Hattori, T. (2002). Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver. *Liver* 22: 419-425.
- Magnus, I.A., Roe, D.A. ja Bhutani, L.K. (1969). Factors affecting the induction of porphyria in the laboratory rat. Biochemical and photobiological studies using diethyl 1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-pyridine-3,5-dicarboxylate (DDC) as a porphyrogenic agent. *J Invest Dermatol* 53: 400-413.
- Malato, Y., Naqvi, S., Schurmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M.A., Grimm, D. ja Willenbring, H. (2011). Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* 121: 4850-4860.
- Mall, F.P. (1906). A study of the structural unit of the liver. *American Journal of Anatomy* 5: 227-308.
- Manibusan, M.K., Odin, M. ja Eastmond, D.A. (2007). Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 25: 185-209.
- Matsumoto, Y., Niimoto, S., Katayama, K., Hirose, K., Yamaguchi, A. ja Torigoe, K. (2002). Effects of biliary drainage in obstructive jaundice on microcirculation, phagocytic activity, and ultrastructure of the liver in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9: 360-366.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. ja Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135: 1457-1470.
- McCay, P.B., Lai, E.K., Poyer, J.L., DuBose, C.M. ja Janzen, E.G. (1984). Oxygen- and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observation of lipid radicals in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 259: 2135-2143.
- Means, A.L., Xu, Y., Zhao, A., Ray, K.C. ja Gu, G. (2008). A CK19(CreERT) knockin mouse line allows for conditional DNA recombination in epithelial cells in multiple endodermal organs. *Genesis* 46: 318-323.
- Medlock, E.S. ja Haar, J.L. (1983). The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. *Anat Rec* 207: 31-41.

- Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A. ja Kahn, C.R. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6: 87-97.
- Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213: 286-300.
- Michalopoulos, G.K. (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 176: 2-13.
- Michalopoulos, G.K. (2013). Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol* 3: 485-513.
- Michalopoulos, G.K. (2014). The Liver Is a Peculiar Organ When It Comes to Stem Cells. *Am J Pathol*
- Michalopoulos, G.K., Barua, L. ja Bowen, W.C. (2005). Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology* 41: 535-544.
- Michalopoulos, G.K., Bowen, W.C., Mule, K. ja Luo, J. (2003). HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr* 11: 55-75.
- Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D., Stein, H. ja Surrenti, C. (1991). Transforming growth factors beta 1 and beta 2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. *Am J Pathol* 139: 1221-1229.
- Moll, R., Divo, M. ja Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129: 705-733.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. ja Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24.
- Muriel, P. ja Mourelle, M. (1990). Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. *J Appl Toxicol* 10: 275-279.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26: 99-109.
- Nagy, P., Bisgaard, H.C. ja Thorgeirsson, S.S. (1994). Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *J Cell Biol* 126: 223-233.
- Ng, Y.K. ja Iannaccone, P.M. (1992). Fractal geometry of mosaic pattern demonstrates liver regeneration is a self-similar process. *Dev Biol* 151: 419-430.
- Nordlie, R.C., Foster, J.D. ja Lange, A.J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr* 19: 379-406.
- Novikoff, P.M. ja Yam, A. (1998). Stem cells and rat liver carcinogenesis: contributions of confocal and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 46: 613-626.

- Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K. ja Miyajima, A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 136: 1951-1960.
- Oshima, Y., Suzuki, A., Kawashimo, K., Ishikawa, M., Ohkohchi, N. ja Taniguchi, H. (2007). Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 132: 720-732.
- Paku, S., Dezso, K., Kopper, L. ja Nagy, P. (2005). Immunohistochemical analysis of cytokeratin 7 expression in resting and proliferating biliary structures of rat liver. *Hepatology* 42: 863-870.
- Paku, S., Schnur, J., Nagy, P. ja Thorgeirsson, S.S. (2001). Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 158: 1313-1323.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 19: 491-505.
- Parola, M., Leonarduzzi, G., Biasi, F., Albano, E., Biocca, M.E., Poli, G. ja Dianzani, M.U. (1992). Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology* 16: 1014-1021.
- Patton, K.T. ja Thibodeau, G.A. 2009. *Anatomy of the Digestive System*, In K. T. Patton ja G. A. Thibodeau (ed.), *Anatomy & Physiology*, 7th ed., Elsevier Science Health Science Division, Edinburgh.
- Petersen, B.E., Zajac, V.F. ja Michalopoulos, G.K. (1997). Bile ductular damage induced by methylene dianiline inhibits oval cell activation. *Am J Pathol* 151: 905-909.
- Petropoulos, C.J., Yaswen, P., Panzica, M. ja Fausto, N. (1985). Cell lineages in liver carcinogenesis: possible clues from studies of the distribution of alpha-fetoprotein RNA sequences in cell populations isolated from normal, regenerating, and preneoplastic rat livers. *Cancer Res* 45: 5762-5768.
- Phillips, J.R., Angulo, P., Petterson, T. ja Lindor, K.D. (2001). Fat-soluble vitamin levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 96: 2745-2750.
- Pilkis, S.J. ja Granner, D.K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885-909.
- Poli, G. (1993). Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull* 49: 604-620.
- Poliard, A.M., Bernuau, D., Tournier, I., Legres, L.G., Schoevaert, D., Feldmann, G. ja Sala-Trepat, J.M. (1986). Cellular analysis by in situ hybridization and immunoperoxidase of alpha-fetoprotein and albumin gene expression in rat liver during the perinatal period. *J Cell Biol* 103: 777-786.
- Preisegger, K.H., Factor, V.M., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Denk, H. ja Thorgeirsson, S.S. (1999). Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease. *Lab Invest* 79: 103-109.
- Ramadori, G. ja Saile, B. (2004). Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 84: 153-159.

- Raz, A. ja Goodman, D.S. (1969). The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex. *J Biol Chem* 244: 3230-3237.
- Recknagel, R.O., Glende, E.A., Jr., Dolak, J.A. ja Waller, R.L. (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43: 139-154.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J. ja Collins, A.T. (2004). CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 117: 3539-3545.
- Roberts, E.A. ja Sarkar, B. (2008). Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Am J Clin Nutr* 88: 851S-854S.
- Roskams, T., De Vos, R., Van Eyken, P., Myazaki, H., Van Damme, B. ja Desmet, V. (1998). Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol* 29: 455-463.
- Roulot, D., Sevcsik, A.M., Coste, T., Strosberg, A.D. ja Marullo, S. (1999). Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats. *Hepatology* 29: 1730-1738.
- Russell, D.W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72: 137-174.
- Sagrinati, C., Netti, G.S., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Meini, C., Gacci, M., Squecco, R., Carini, M., Gesualdo, L., Francini, F., Maggi, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Serio, M., Romagnani, S. ja Romagnani, P. (2006). Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 17: 2443-2456.
- Saile, B. ja Ramadori, G. (2007). Inflammation, damage repair and liver fibrosis--role of cytokines and different cell types. *Z Gastroenterol* 45: 77-86.
- Santoni-Rugiu, E., Jenes, P., Thorgeirsson, S.S. ja Bisgaard, H.C. (2005). Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* 113: 876-902.
- Saxena, R. ja Theise, N. (2004). Canals of Hering: recent insights and current knowledge. *Semin Liver Dis* 24: 43-48.
- Schadinger, S.E., Bucher, N.L., Schreiber, B.M. ja Farmer, S.R. (2005). PPARgamma2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1195-1205.
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., Kulik, M., Sherwood, S., Tallheden, T., Cheng, N., Furth, M.E. ja Reid, L.M. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204: 1973-1987.
- Schmelzer, E., Wauthier, E. ja Reid, L.M. (2006). The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 24: 1852-1858.

- Schreiber, G., Lesch, R., Weinszen, U. ja Zahring, J. (1970). The distribution of albumin synthesis throughout the liver lobule. *J Cell Biol* 47: 285-289.
- Sekiya, S. ja Suzuki, A. (2014). Hepatocytes, Rather than Cholangiocytes, Can Be the Major Source of Primitive Ductules in the Chronically Injured Mouse Liver. *Am J Pathol*
- Sell, S. (1990). Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 50: 3811-3815.
- Septer, S., Edwards, G., Gunewardena, S., Wolfe, A., Li, H., Daniel, J. ja Apte, U. (2012). Yes-associated protein is involved in proliferation and differentiation during postnatal liver development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G493-503.
- Sergi, C., Adam, S., Kahl, P. ja Otto, H.F. (2000). Study of the malformation of ductal plate of the liver in Meckel syndrome and review of other syndromes presenting with this anomaly. *Pediatr Dev Pathol* 3: 568-583.
- Shi, J., Aisaki, K., Ikawa, Y. ja Wake, K. (1998). Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 153: 515-525.
- Shiojiri, N. (1984). The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 79: 25-39.
- Shiojiri, N., Sano, M., Inujima, S., Nitou, M., Kanazawa, M. ja Mori, M. (2000). Quantitative analysis of cell allocation during liver development, using the *spf(ash)*-heterozygous female mouse. *Am J Pathol* 156: 65-75.
- Shiojiri, N., Takeshita, K., Yamasaki, H. ja Iwata, T. (2004). Suppression of C/EBP alpha expression in biliary cell differentiation from hepatoblasts during mouse liver development. *J Hepatol* 41: 790-798.
- Sigal, S.H., Brill, S., Fiorino, A.S. ja Reid, L.M. (1992). The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol* 263: G139-148.
- Sirica, A.E., Richards, W., Tsukada, Y., Sattler, C.A. ja Pitot, H.C. (1979). Fetal phenotypic expression by adult rat hepatocytes on collagen gel/nylon meshes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 283-287.
- Slott, P.A., Liu, M.H. ja Tavoloni, N. (1990). Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology* 99: 466-477.
- Soprano, D.R., Soprano, K.J. ja Goodman, D.S. (1986). Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7330-7334.
- Sparks, E.E., Huppert, K.A., Brown, M.A., Washington, M.K. ja Huppert, S.S. (2010). Notch signaling regulates formation of the three-dimensional architecture of intrahepatic bile ducts in mice. *Hepatology* 51: 1391-1400.
- Steer, C.J. (1995). Liver regeneration. *FASEB J* 9: 1396-1400.
- Stocker, E., Wullstein, H.K. ja Brau, G. (1973). Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine (author's transl) [in German]. *Virchows Arch B Cell Pathol* 14: 93-103.

- Stoyanovsky, D.A. ja Cederbaum, A.I. (1999). Metabolism of carbon tetrachloride to trichloromethyl radical: An ESR and HPLC-EC study. *Chem Res Toxicol* 12: 730-736.
- Strasberg, S.M. (1997). Terminology of liver anatomy and liver resections: coming to grips with hepatic Babel. *J Am Coll Surg* 184: 413-434.
- Susick, R., Moss, N., Kubota, H., Lecluyse, E., Hamilton, G., Luntz, T., Ludlow, J., Fair, J., Gerber, D., Bergstrand, K., White, J., Bruce, A., Drury, O., Gupta, S. ja Reid, L.M. (2001). Hepatic progenitors and strategies for liver cell therapies. *Ann N Y Acad Sci* 944: 398-419.
- Takase, H.M., Itoh, T., Ino, S., Wang, T., Koji, T., Akira, S., Takikawa, Y. ja Miyajima, A. (2013). FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev* 27: 169-181.
- Tan, X., Yuan, Y., Zeng, G., Apte, U., Thompson, M.D., Cieply, B., Stolz, D.B., Michalopoulos, G.K., Kaestner, K.H. ja Monga, S.P. (2008). Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology* 47: 1667-1679.
- Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A. ja Vasseur-Cognet, M. (2002). A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology* 35: 1072-1081.
- Tarlow, B.D., Finegold, M.J. ja Grompe, M. (2014). Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in oval cell injury. *Hepatology*
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 836-847.
- Tennent, G.A., Brennan, S.O., Stangou, A.J., O'Grady, J., Hawkins, P.N. ja Pepys, M.B. (2007). Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood* 109: 1971-1974.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A. ja Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30: 1425-1433.
- Thurman, R.G. ja Kauffman, F.C. (1985). Sublobular compartmentation of pharmacologic events (SCOPE): metabolic fluxes in periportal and pericentral regions of the liver lobule. *Hepatology* 5: 144-151.
- Tomasi, A., Albano, E., Banni, S., Botti, B., Corongiu, F., Dessi, M.A., Iannone, A., Vannini, V. ja Dianzani, M.U. (1987). Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of the mechanism of activation. *Biochem J* 246: 313-317.
- Tremblay, K.D. ja Zaret, K.S. (2005). Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol* 280: 87-99.
- Turley, S.D., Spady, D.K. ja Dietschy, J.M. (1995). Role of liver in the synthesis of cholesterol and the clearance of low density lipoproteins in the cynomolgus monkey. *J Lipid Res* 36: 67-79.

- van den Akker, C.H., Schierbeek, H., Rietveld, T., Vermes, A., Duvekot, J.J., Steegers, E.A. ja van Goudoever, J.B. (2008). Human fetal albumin synthesis rates during different periods of gestation. *Am J Clin Nutr* 88: 997-1003.
- Van Eyken, P. ja Desmet, V.J. (1993). Cytokeratins and the liver. *Liver* 13: 113-122.
- Van Eyken, P., Sciote, R., Callea, F., Van der Steen, K., Moerman, P. ja Desmet, V.J. (1988). The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology* 8: 1586-1595.
- Walthall, K., Cappon, G.D., Hurtt, M.E. ja Zoetis, T. (2005). Postnatal development of the gastrointestinal system: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 74: 132-156.
- Wang, H., Park, O., Lafdil, F., Shen, K., Horiguchi, N., Yin, S., Fu, X.Y., Kunos, G. ja Gao, B. (2010). Interplay of hepatic and myeloid signal transducer and activator of transcription 3 in facilitating liver regeneration via tempering innate immunity. *Hepatology* 51: 1354-1362.
- Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M. ja Grompe, M. (2003). The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1: 11881-11888.
- Weber, L.W., Boll, M. ja Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33: 105-136.
- Whitmore, I. (1999). Terminologia anatomica: new terminology for the new anatomist. *Anat Rec* 257: 50-53.
- Wright, N. ja Alison, M. 1984. The Liver, p. 880–908. In N. Wright ja M. Alison (ed.), *The Liver*, Clarendon Press, Oxford.
- Xia, J.L., Dai, C., Michalopoulos, G.K. ja Liu, Y. (2006). Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 168: 1500-1512.
- Xu, C.P., Liu, J., Liu, J.C., Han, D.W., Zhang, Y. ja Zhao, Y.C. (2007). Dynamic changes and mechanism of intestinal endotoxemia in partially hepatectomized rats. *World J Gastroenterol* 13: 3592-3597.
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J.J. ja Fausto, N. (1997). Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1441-1446.
- Yamazaki, Y., Moore, R. ja Negishi, M. (2011). Nuclear receptor CAR (NR1H3) is essential for DDC-induced liver injury and oval cell proliferation in mouse liver. *Lab Invest* 91: 1624-1633.
- Yanger, K., Zong, Y., Maggs, L.R., Shapira, S.N., Maddipati, R., Aiello, N.M., Thung, S.N., Wells, R.G., Greenbaum, L.E. ja Stanger, B.Z. (2013). Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev* 27: 719-724.

- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J. ja Buck, D.W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012.
- Yin, S., Wang, H., Park, O., Wei, W., Shen, J. ja Gao, B. (2011). Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3. *Am J Pathol* 178: 1614-1621.
- Yovchev, M.I., Grozdanov, P.N., Zhou, H., Racherla, H., Guha, C. ja Dabeva, M.D. (2008). Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 47: 636-647.
- Zajicek, G., Oren, R. ja Weinreb, M., Jr. (1985). The streaming liver. *Liver* 5: 293-300.
- Zaret, K.S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 9: 329-340.
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Fickert, P., Lackner, C., Trauner, M. ja Denk, H. (2004). The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J Pathol* 204: 367-376.
- Zhao, B., Lei, Q.Y. ja Guan, K.L. (2008). The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 20: 638-646.
- Zhao, R. ja Duncan, S.A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology* 41: 956-967.
- Zorn, A.M. 2008. Liver development, *In* A. F. Schier (ed.), *StemBook*, The Stem Cell Research Community, Ohio, USA.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

¹http://commons.wikimedia.org/wiki/File:CreLoxP_experiment.png 12.05.14

TÄNUSÕNAD

Eelkõige tänan oma juhendajat Viljar Jaksi, kes usaldas mulle niivõrd suure projekti läbiviimise ning lasi mul iseseisvalt kogeda teadustöö läbiviimise rõõme ja muresid. Samuti tänan meie uurimisgrupi doktoranti Janeli Viili, kes oli nii emotsionaalseks kui ka praktiliseks toeks minu projekti läbiviimisel. Ta aitas heast tahtest kaasa käesoleva magistritöö valmimisele ning teostas hiirtel läbiviidud operatsioone. Eriline tänu ka minu elukaaslasele, kes veetis loendamatu tunde minuga tulemuste üle arutledes, tööd parandades ja mind motiveerides. Mainimata ei saa ka jätta Rakubioloogia õppetooli kollektiivi meeldivat seltskonda, kes on nagu teise perekonna eest.

LISAD

LISA 1. Loomkatsete luba.

ASUTUSESISESEKS KASUTAMISEKS
PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM
Märke tehtud "17." veebruar 2014 . a .
Juurdepääsupiirang kehtib kuni „17.02.2019“
või
Alus: Avaliku teabe seadus § 35 lg 1 p17,



PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM LOOMKATSEPROJEKTI LOAKOMISJON

OTSUS
Tallinnas

17. veebruar 2014 nr 25

Loomkatseprojekti luba

Loomakaitseaduse § 45 lõike 2 alusel ning loomkatseprojekti loakomisjoni 17. veebruari 2014. a istungi protokoll nr 10 kohaselt otsustati järgmist:

1. Anda luba **Viljar Jaks'ile** (sünd. 05.12.1967, aadress: Riia 23, Tartu, 51010) loomkatseprojekti: „**Maksa tüvirakkude roll ja regulatsioon maksa regeneratsioonis ning maksakasvajate tekkel**“ läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1.1. loomkatseprojekti kavandaja ja loomkatseprojekti eest vastutav isik **Viljar Jaks** (sünd. 05.12.1967, aadress: Riia 23, Tartu, 51010);

1.2. loomkatseprojekti läbiviimise aeg ja koht: 01.03.2014 - 28.02.2017, Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaarium, KL1202, aadress: Riia 23, Tartu, 51010;

1.3. loomkatseprojekti kaasatud isikud: **Kristiina Mäemets-Allas** (sünd. 31.01.1977);

1.4. katseloomade liik ja arv: 204 hiirt

1. Aasta

Kokku 1. aastal 78 Rosa26-rTA/TRE-hiirt ning 18 Nu/Nu BalbC hiirt.

2. Aasta

Erinevate maksa rakuliste komponentide osa selgitamine regeneratsioonis vajaks 3 CreERT liini puhul 3 katsepunkti iga kahjustuse meetodi kohta. Kontrollina kasutatakse kahjustamata hiiri. Seega kasutatavate hiirte arv selles katses on 54. (3 Cre liini x 3 katsepunkti x (3 maksakahjustusega hiirt + 3 kontrollhiirt))

3. Aasta

Lgr5-ekspresseerivate rakkude päritolu kindlakstegemine nõuab 2 CreERT liini kasutamist 3 maksakahjustuse meetodi puhul. Kuna ka siin on oluline kontrollide

lisamine siis vajatakse samuti 54 hiirt (2 Cre liini x 3 katsepunkti x 3 maksakahjustusega hiirt x 3 kontrollhiirt))

1.5. loomkatse rakendatavad menetlused:

1. Loomkatsete käigus tekitatakse hiirte maksas maksakahjustus järgmistel viisidel:

a) CCl₄ (süsiniktetrakloriid 1,25mg/kg) intraperitoneaalne (i.p.) injektsioon lahustatuna taimeõlis tekitab keskmise astmega maksakahjustus, mis paraneb ca 7 päeva jooksul. Tegemist on 24h jooksul mõõduva keskmise astme valu/kannatusega. Valu vähendamiseks süstitakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas. Juhul kui hiirel tekivad tugeva kannatuse sümptomid või peritoneaalärritusnähud hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

b) DDC (3,5-diethoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiin) dieet (100mg/ toidu kg kohta) 7 päeva põhjustab keskmise kahjustuse, mis paraneb 1 nädalaga. Kuna valu põhjus on maksa pais/turse siis valuvaigistite manustamine ei anna soovitud efekti. Juhul kui hiirel tekivad tugeva kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

c) osaline maksareseksioon üldanesteesias (hypnorm/dormicumi vesilahuse - fentanüültsitraat 0,079 mg/ml; fluanision 2,5 mg/ml ja midasolaam 1,25 mg/ml intraperitoneaalne süst, 0,05 - 0,1 ml/10g, anesteesia kestus ca 60 min). Kõhuõõs avatakse ning vasak sagar eemaldatakse (30% maksast) ja kõhuõõs suletakse. Kuna tegemist on tugeva valuga manustatakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas 4 postoperatiivse päeva jooksul. Juhul kui valu sümptomid püsivad jätkatakse valuvaigisti manustamist. Maks regenereerub 2 nädalaga. Hiired hukatakse 2 nädala möödumisel peale protseduuri. Kui hiir ei taastu 24h jooksul või tekivad kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

2. CreERT rekombinaasi aktiveerimiseks süstitakse hiiri tamoksifeeni lahusega taimeõlis 1-10mg/hiire kohta 1-2 korda i.p. Tegemist on väga lühiajalist ebamugavustunnet, kergelt valu ja stressi põhjustava protseduuriga. Sel juhul hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 135 hiirel.

3. Spontaansete maksakasvajate tekitamine ühekordse dietüülnitroosamiini (DEN) õililahuse süstiga (i.p. 25mg/kg kuni 4x üle päeva, 21 päeva vanustele hiirtele) ning pideva fenobarbitaali manustamisega joogivees (0,05%). Kasvajate arengut jälgitakse 40 nädala jooksul. DEN süstid põhjustavad lühiajalist ebamugavust (vt punkt 2). Fenobarbitaali manustamine ei tekita mingeid vaevusi. Maksakasvajate teke on üldiselt valutut, kuid võivad esineda tõsised tüsistused (pais ja sellest astsiit, valusündroom), mis väljenduvad hiirte apaatsuses, sundasendis, kaalulanguses üle 20%). Nende sümptomite ilmnemisel hiired hukatakse koheselt. Kergema valu sümptomite ilmnemisel manustatakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas. Protseduur viiakse läbi 39 hiirel.

5. Tetratsükliinõltsuva transkriptsiooni aktiveerimiseks manustatakse hiirtele doksütsükliini (2 g/l) joogivees, millele on lisatud 5% sahharoosi. Ka pikaajaline doksütsükliini manustamine ei oma mingeid negatiivseid mõjusid ei hiirte arengule, elukvaliteedile ega viljakusele. Protseduur viiakse läbi 78 hiirel.

6. Maksarakude transplantatsiooniks, kõhuõõs avatakse üldanesteesias ja sorditud rakud süstitakse maksa vasakusse sagarasse kasutades insuliinisüstalt (G30). Kõhuõõs suletakse, haav kaetakse ning hiirele manustatakse valuvaigistit subkutaanselt. Hiirt jälgitakse 2x päevas 3 postoperatiivse päeva jooksul. Valuvaigistit manustatakse nagu

punktis 1a 3 postop päeva jooksul 1x päevas. Kui hiir ei taastu 24h jooksul või tekivad kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 18 hiirel.

Humaansete lõpp-punktide üldised kriteeriumid: Katsed lõpetatakse enne planeeritud katse lõppu hiirte üldseisundi halvenemisel (esinevad kannatussümptomid: spetsiifiline sundasend, loidus, toidust keeldumine); kaalulangusel üle 20%, kui tekib astsiit või kui operatsioonide korral loom ei ole 2. postoperatiivse päeva lõpuks taastunud (loom on loid, sundasendis).

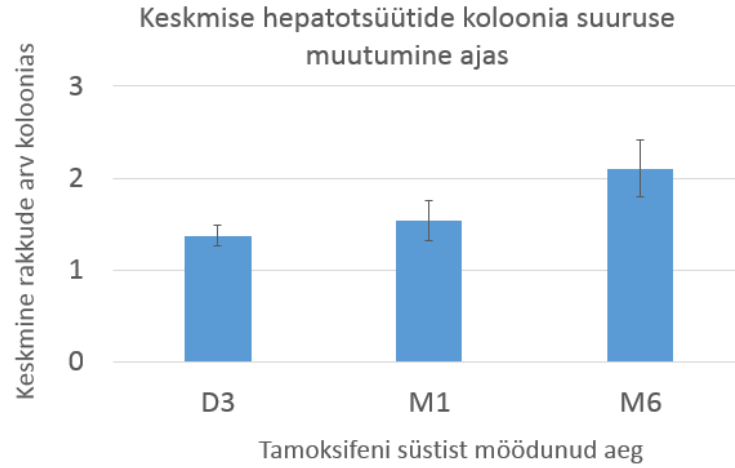
Loomade hukkamise meetoodika: Loomad hukatakse tservikaalse dislokatsiooni teel katse lõppemisel või ülalpool defineeritud humaansete lõpp-punktide saabumisel. Ühtegi katselooma ei kasutata katsetes korduvalt. Loomadel läbi viidavate katsete üksikasjaline kirjeldus on toodud punktis 1.

2. Otsust on õigus vaidlustada haldusmenetluse seaduses või halduskohtumenetluse seadustikus ettenähtud korras ja tähtaja jooksul.

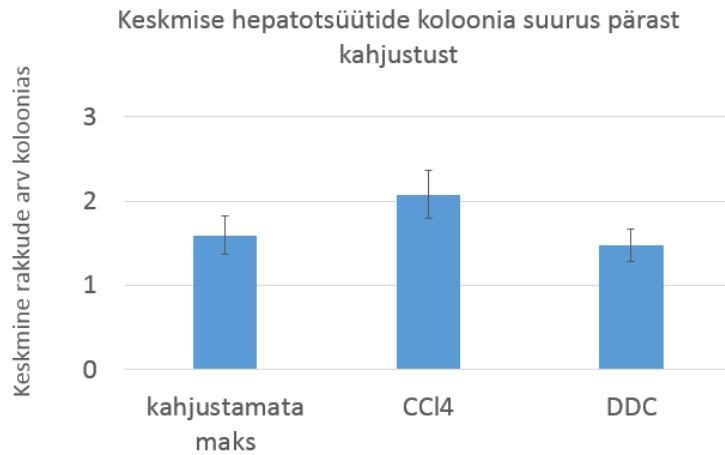
Mario Plaas
/allkirjastatud digitaalselt/

Komisjoni esimees

LISA 3. Keskmise hepatotsüütide koloonia suuruse muutumine ajas. D – päev; M – nädal. Kolm päeva pärast tamoksifeeni süstimist oli keskmine koloonia suurus 1,4 rakku. 1 ja 6 kuud hiljem oli see vastavalt 1,5 ja 2,1. Graafikul on toodud keskmiste 95% usalduspiirid ning erinevus D3 ja M6 vahel on statistiliselt oluline ($p < 0.01$).



LISA 2. Keskmine hepatotsüütide koloonia suurus pärast kahjustust. Kahjustamata maksa keskmine hepatotsüütide koloonia oli 1,6 ja kahjustatud maksal pärast CCl₄ kahjustust 2,1 ja pärast DDC dieeti 1,5. Graafikul on toodud keskmiste 95% usalduspiirid ning CCl₄ ja kahjustuseta maksa vaheline erinevus on statistiliselt oluline ($p < 0.01$).



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ KADRI VALTER _____
(*autori nimi*)
(sünnikuupäev: _____ 25.11.1990 _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
____ **Hepatotsüütide ja biliaarse süsteemi rakkude vaheline transdiferentseerumine
maks regeneratsioonis** _____,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ VILJAR JAKS _____,
(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, ____26.05.2014____ (*kuupäev*)