

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-148-161

ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЗРЕЛЫХ КРЫСИНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ В ДЛИТЕЛЬНО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИЕ ПЕЧЕНОЧНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ

А.М. Григорьев¹, И.В. Холоденко², А.Ю. Лупатов², Р.В. Холоденко³, Л.А. Кирсанова¹, Ю.Б. Басок¹, К.Н. Ярыгин², В.И. Севастьянов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Российская Федерация

Цель: получить длительно пролиферирующие клетки, обладающие признаками прогениторных, за счет дедифференцировки зрелых крысиных гепатоцитов с помощью комбинаций малых молекул. **Материалы и методы.** Гепатоциты, выделенные из крысиной печени путем перфузии, культивировали в присутствии набора из трех малых молекул: агониста Wnt сигнального пути (CHIR99021), ингибиторов TGF- β (A83-01) и ROCK киназы (Y27632). С помощью флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии в процессе культивирования клеток оценивали морфологические характеристики и особенности роста культуры. Проллиферативную активность клеток анализировали с помощью цейтраферной съемки в режиме реального времени. Экспрессию поверхностных и внутриклеточных маркеров анализировали, используя проточную цитофлуориметрию и флуоресцентную микроскопию высокого разрешения. **Результаты.** Используя комплекс малых молекул Y-27632, A-83-01 и CHIR99021, из зрелых крысиных гепатоцитов были получены длительно пролиферирующие клетки, которые экспрессировали маркеры прогениторных клеток, такие как α -фетопротейн и HNF4 α . Клетки имели гепатоцитоподобную морфологию и формировали дискретные кластеры пролиферирующих клеток, образующих в процессе культивирования единый клеточный пласт. Удаление из среды малых молекул приводило к экспансии фибробластоподобных клеток и к элиминации потенциально прогениторных гепатоцитоподобных клеток. **Заключение.** Подтверждена возможность получения пролиферирующих прогениторных клеток с помощью дедифференцировки зрелых гепатоцитов.

Ключевые слова: гепатоциты, дедифференцировка, печеночные прогениторные клетки, малые молекулы, сигнальные пути, Y-27632, A-83-01, CHIR99021.

MATURE RAT HEPATOCYTE DEDIFFERENTIATION INTO LONG-LIVED PROLIFERATING HEPATIC PROGENITOR CELLS

А.М. Григорьев¹, И.В. Кхолоденко², А.Ю. Лупатов², Р.В. Кхолоденко³, Л.А. Кирсанова¹, Ю.Б. Басок¹, К.Н. Ярыгин², В.И. Севастьянов¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

³ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Objective: to obtain long-lived proliferating cells with progenitor features by dedifferentiation of mature rat hepatocytes using combinations of small molecules. **Materials and Methods.** Hepatocytes isolated from rat liver by perfusion were cultured in the presence of a cocktail of three small molecules – Wnt signaling pathway activator (CHIR99021), TGF- β inhibitors (A83-01) and ROCK kinase (Y27632). The morphological characteristics

Для корреспонденции: Григорьев Алексей Михайлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Телефон: (499) 193-86-62. E-mail: Bear-38@yandex.ru

Corresponding author: Alexey Grigoryev. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: 8 (499) 193-86-62. E-mail: Bear-38@yandex.ru

and growth features of the culture were assessed using fluorescence and phase-contrast microscopy during cell culture. Cell proliferative activity was analyzed using real-time time-lapse imaging. The expression of surface and intracellular markers was analyzed using flow cytometry and high-resolution fluorescence microscopy. **Results.** Using a cocktail of small molecules, Y-27632, A-83-01, and CHIR99021, long-lived proliferating cells that express progenitor cell markers, such as α -fetoprotein and HNF4 α , were obtained from mature rat hepatocytes. The cells had hepatocyte-like morphology and formed discrete clusters of proliferating cells, forming a single cell layer during culturing. Removal of the small molecules from the medium led to expansion of fibroblast-like cells and elimination of potentially progenitor hepatocyte-like cells. **Conclusion.** Proliferating progenitor cells can be obtained by dedifferentiation of mature hepatocytes.

Keywords: hepatocytes, dedifferentiation, hepatic progenitor cells, small molecules, signaling pathways, Y-27632, A-83-01, CHIR99021.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на тот факт, что первичные крысиные гепатоциты впервые были выделены из печени более 50 лет назад [1], а первое сообщение о выделении гепатоцитов из человеческой печени появилось спустя еще 20 лет [2], до сих пор остаются нерешенными вопросы длительного культивирования этих клеток и сохранения их в функционально активном состоянии *in vitro*. Между тем к настоящему времени достоверно доказано, что в условиях хронического повреждения печени гепатоциты способны дедифференцироваться в пролиферирующие бипотентные прогениторные/стволовые клетки [3]. В связи с этим большое значение приобретают разработки способов получения прогениторных клеток из зрелых гепатоцитов *in vitro*. Это может не только помочь в большей степени разобраться в происхождении прогениторных клеток печени и в механизмах репрограммирования, но и предложить неограниченный источник клеток для генерации функциональных гепатоцитов, которые находят широкое применение в фармакологии, клинической медицине, тканевой инженерии и при моделировании заболеваний.

За последние несколько лет ученым удалось достичь определенных успехов в данном направлении. Например, были разработаны протоколы трансдифференцировки мезенхимных стволовых клеток в функционально активные гепатоцитоподобные клетки [4], появилось множество работ, в которых гепатоциты получали из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [5], также в ряде исследований описаны подходы к получению так называемых индуцированных гепатоцитов из различных соматических клеток [6]. Все эти методы, безусловно, имеют определенный научный интерес, но в то же время обладают рядом ограничений с точки зрения перспектив использования в клинической практике. В частности, использование генетических модификаций для репрограммирования клеток создает ряд проблем для безопасности их клинического использования. Одним из многообещающих современных подходов, решающих вопросы безопасности, является репрограммирование клеток с

использованием так называемых малых молекул. Малые молекулы – это низкомолекулярные соединения, которые могут включать липиды, моносахариды, вторичные мессенджеры, другие природные соединения, а также лекарственные препараты и иные ксенобиотики. Малые молекулы обладают рядом неоспоримых преимуществ перед любыми другими способами регуляции/изменения судьбы клеток: как правило, они проницаемы для клеток; их проще синтезировать и стандартизировать; себестоимость их невысокая, что позволяет использовать этот способ для массового производства клеток с заданными свойствами. Еще более важно, что эффекты малых молекул можно регулировать, варьируя их концентрации и комбинации, тем самым обеспечивая более высокую степень временного и пространственного контроля над функцией белка-мишени или сигнального пути [7]. В 2017 г. Katsuda et al. [8] опубликовали работу, где была показана возможность получения пролиферирующих печеночных бипотентных прогениторных клеток из зрелых крысиных гепатоцитов с использованием коктейля малых молекул, таких как Y-27632, A-83-01 (ингибиторов ROCK киназы и TGF- β соответственно) и CHIR99021 (агониста Wnt сигнального пути), без каких-либо генетических модификаций. Полученные клетки, которые авторы назвали химически-индуцированными печеночными прогениторами (chemically induced liver progenitors – CLiPs), обладали свойствами стволовых клеток, т. е. пролиферировали в культуре и дифференцировались в гепатоциты и холангиоциты. Примерно в это же время была опубликована еще одна работа, в которой описан способ получения печеночных прогениторных клеток из зрелых мышечных гепатоцитов за счет создания *in vitro* условий, моделирующих условия хронического повреждения печени *in vivo*, когда происходит не только пролиферация зрелых гепатоцитов, но и их обратимое превращение в прогениторные клетки протоков [9]. Помимо вышеупомянутых малых молекул CHIR99021, A83-01 и Y27632, эта среда также содержала эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF), активаторы YAP сигнализации – лизофосфатидную кислоту и

сфингозин-1-фосфат. Полученные таким способом из гепатоцитов пролиферирующие клетки канальцев (duct-like cells – hepPDCs) были способны претерпевать более 30 пассажей без явных морфологических изменений и нарушений кариотипа. Профили генной экспрессии показали, что эти клетки экспрессируют маркеры гепатоцитов, холангиоцитов и печеночных прогениторных клеток, а также способны дифференцироваться в зрелые функционально-активные гепатоциты [9]. Используя аналогичную культуральную среду с небольшими модификациями, через 2 года авторы получили прогениторные клетки из зрелых человеческих гепатоцитов [10].

Также в 2019 г. была опубликована работа Kim et al. [11], которые использовали коктейль из двух малых молекул A83-01 и CHIR99021 в комбинации с EGF и HGF для получения человеческих печеночных прогениторных клеток из зрелых гепатоцитов, которые они назвали человеческие химически-полученные печеночные прогениторы (human chemically derived hepatic progenitors – hCdHs). Полученные клетки hCdHs экспрессировали маркеры печеночных прогениторных клеток и претерпевали около 10 пассажей в культуре, сохраняя нормальный кариотип и способность дифференцироваться в гепатоциты и эпителиальные клетки желчных протоков *in vitro*. Генное профилирование подтвердило на транскрипционном уровне репрограммирование, показав экспрессию генов, ответственных за прогениторное состояние, и супрессию генов зрелых гепатоцитов. При внутриселезеночной трансплантации в нескольких животных моделях hCdHs клетки эффективно заселяли паренхиму печени [11]. Совсем недавно была опубликована работа, в которой похожим образом, используя коктейль из двух малых молекул A83-01, CHIR99021 и HGF, бипотентные прогениторные клетки были получены из зрелых гепатоцитов нечеловекообразных приматов [12].

Учитывая значимость проблемы получения длительно пролиферирующих клеток печени в культуре для решения задач клеточной биологии, отсутствие работ на эту тему в отечественной науке, а также значимость разработки технологии для воспроизводства клеточной массы и использования в регенеративной медицине, мы поставили целью нашей работы получение длительно пролиферирующих клеток, обладающих признаками прогениторных, за счет дедифференцировки зрелых крысиных гепатоцитов с помощью комбинаций малых молекул.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки печени крысы выделяли методом двухстадийной перфузии с использованием коллагеназного буфера с последующей отмывкой и посевом на культуральный пластик, модифицированный бычьим коллагеном I типа. Первую стадию перфузии прово-

дили промывочной средой Liver Perfusion Medium (LPM) (Gibco™, США) объемом 250 мл, первые две минуты со скоростью 5 мл/мин, далее остальной объемом – 25 мл/мин. Вторую стадию перфузии проводили коллагеназным буфером на основе раствора Хенкса (HBSS без Ca^{2+} и Mg^{2+} , без фенолового красного) (Gibco™, США) с добавлением 0,03% коллагеназы IV типа (ПанЭко, Россия) и 0,5% бычьего сывороточного альбумина BSA (Диаэм, Россия) объемом 250 мл со скоростью 25 мл/мин. По окончании перфузии печень помещали в охлажденную до +2...+4 °C среду L-15 (Gibco™, США) и транспортировали из операционной в ламинарный бокс. Далее скальпелем вскрывали капсулу Гилсона, содержимое измельчали в стерильной чашке Петри на льду. После чего пропускали через клеточное сито с размером пор 100 мкм, промывая средой Hepatocyte Wash Medium (Gibco™, США), охлажденной до +2...+4 °C. Суспензию клеток центрифугировали при температуре +2 °C при 50 g в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в свежей порции среды и повторяли процедуру три раза. Далее осадок ресуспендировали в среде William's E Medium (Gibco™, США) с добавлением 5% FBS, (HyClone, UK), 1% антибиотика-антимикотика (Gibco™, США) и 200 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия), после чего подсчитывали количество живых клеток на счетчике клеток BioRad TS20.

Для того чтобы определить рабочие концентрации малых молекул, был проведен колориметрический анализ пролиферации клеток в МТТ-тесте. В качестве клеточной модели гепатоцитов использовали человеческую линию HepG2, которую культивировали в стандартных условиях (37 °C, 5%: CO_2) в полной ростовой среде на основе DMEM/F12 (Gibco™, США) с добавлением 10% FBS, пенициллина/стрептомицина (100X, ПанЭко, Россия) и 200 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия). Для проведения теста в лунки 96-луночного плоскодонного планшета вносили серийные разведения каждого ингибитора: для A-83-01 диапазон концентраций составил от 2,5 до 0,03 мкМ, для CHIR99021 – от 15 до 0,2 мкМ, для Y-27632 – от 50 до 0,75 мкМ. Далее в лунки вносили суспензию клеток (10 тыс. клеток/лунка). Каждая точка в одном эксперименте в четырех повторах. В качестве контроля использовали интактные клетки, культивированные в тех же условиях, но без добавления ингибиторов. Клетки инкубировали с малыми молекулами в течение 4 дней. После этого сливали из лунок культуральную среду, добавляли по 30 мкл в лунку раствора МТТ (5 мг/мл; Sigma, США) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе в течение 2–4 ч до выпадения кристаллов формазана, которые затем растворяли в 100 мкл/лунка ДМСО (диметилсульфоксид; ПанЭко, Россия). Измерение оптической плотности (OD) проводили на планшетном ридере Tecan infinite

M200 Pro (Tescan, США) при длине волны 565 нм. Уровень пролиферации клеток рассчитывали, как описано ранее [13], по формуле:

$$\frac{(\text{OD индуцированных клеток} - \text{OD blank}) / (\text{OD контрольных клеток} - \text{OD blank}) \times 100\%,$$

где OD blank – значения оптической плотности в лунках, содержащих раствор МТТ и ДМСО, но не содержащих клеток; OD контрольных клеток – значения оптической плотности в лунках с интактными клетками.

Для модифицирования поверхности в культуральные флаконы и чашки Петри вносили раствор бычьего коллагена I типа в холодном (+2...+4 °С) DPBS из расчета 12,5 мкг коллагена на 1 см² поверхности, после чего помещали на 1 час в инкубатор при 37 °С. Далее жидкость сливали и производили посев клеточной суспензии в заданной концентрации: 2 × 10⁵ клеток/см². Через два часа инкубирования в стандартных условиях (37 °С, 5%: CO₂), удаляли среду William's E и не прикрепившиеся клетки и добавляли среду Hepatozume-SFM (Gibco™, США) с добавлением 1% антибиотика-антимикотика (Gibco™, США), 200 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), комбинации малых молекул в следующих концентрациях: A-83-01 – 1,25 мкМ, CHIR99021 – 5 мкМ, Y-27632 – 12,5 мкМ. Контрольные клетки культивировали в той же ростовой среде без добавления комплекса малых молекул. Через 48 часов ростовая среда была заменена на среду на основе William's E с теми же добавками. Пассирование клеток осуществляли при достижении 50–70% конfluence по стандартной методике с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия) и реактива TrypLe (Gibco™, США).

Через определенные временные интервалы клетки на чашках Петри окрашивали комплексом витальных красителей Live/Dead Assay (Invitrogen, США), позволяющих оценить морфологию адгезивных клеток и отличить живые и мертвые клетки. Исследование проводили с использованием микроскопической системы сверхвысокого разрешения Leica DMi8 Thunder, оснащенной камерой Leica DFC9000 GTC (Leica, ФРГ).

Пролиферацию клеток оценивали, используя систему микроскопии с автоматической цейтраферной съемкой (IncuCyte ZOOM, США). Система позволяет в режиме реального времени с высокой точностью оценивать конfluence клеточного монослоя и рассчитывать кривые роста клеточной культуры.

Для анализа использовали клетки 1-го пассажа, которые сеяли в культуральные флаконы площадью 25 см² из расчета 4 × 10³ кл/см². Изучали рост клеток на 4 типах сред:

- 1) ростовая среда на основе William's E с добавлением комплекса малых молекул;
- 2) ростовая среда на основе William's E;

3) ростовая среда на основе DMEM/F12 с добавлением комплекса малых молекул;

4) ростовая среда на основе DMEM/F12.

Анализ проводили в режиме реального времени в течение 26 суток. Построение кривых роста осуществлялось в автоматическом режиме программным обеспечением прибора.?

Для проведения цитофлуориметрического анализа экспрессии поверхностного маркера CD29 клетки 1-го пассажа, культивировавшиеся с добавлением комплекса малых молекул, снимали с пластика, инкубировали с антителами к CD29, мечеными FITC (BD Biosciences, США), в течение 1 ч. В качестве контроля использовали неокрашенные клетки. По окончании инкубации клетки дважды отмывали в DPBS, фиксировали в CytoFix (BD Biosciences, США) в течение 15 мин и проводили измерения на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACSAria III (BD Biosciences, США). Анализировали не менее 10 тыс. событий. Обработку данных проводили в программе FlowJo_V10.

Экспрессию внутриклеточных маркеров в клетках, культивировавшихся в присутствии комплекса малых молекул, анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Для этого клетки пермеабилizировали в 0,1% растворе Triton X-100 (Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. После чего инкубировали с первичными антителами против Ki-67, α-фетопротейна (АФП), HNF4α, цитокератина 18 (все – SantaCruz Biotechnology, США) в течение 1 ч, а затем с вторичными антивидовыми антителами, мечеными FITC (все – Sigma, США), в течение 40 мин. В качестве контроля неспецифического связывания использовали клетки, окрашенные только вторичными антивидовыми антителами. Для флуоресцентной микроскопии ядра клеток докрашивали DAPI (1 мкг/мл) (4',6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, США) и заключали препарат в протектор флуоресценции (Anti-Fade Fluorescence Mounting Medium, Abcam, США). Анализ флуоресценции и проточную цитофлуориметрию проводили, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы был проведен анализ влияния малых молекул на уровень пролиферации клеток линии HepG2, а также определены оптимальные концентрации малых молекул для последующей работы.

Из рис. 1 видно, что все три малые молекулы в определенных диапазонах концентраций индуцируют увеличение уровня пролиферативных клеток линии HepG2. Так, ингибитор ROCK киназы (Y27632) повышал уровень пролиферации клеток в диапазоне концентраций от 0,75 до 12,5 мкМ (рис. 1, а), агонист Wnt сигнального пути (CHIR99021) стимулировал

пролиферативную активность в диапазоне от 0,2 до 7,5 мкМ (рис. 1, б), тогда как ингибитор TGF- β (A83-01) увеличивал пролиферацию клеток во всем использованном диапазоне концентраций от 0,03 до 2,5 мкМ (рис. 1, в). Исходя из полученных данных, а также ориентируясь на ранее опубликованные работы, в которых для репрограммирования гепатоцитов использовались те же малые молекулы, были определены следующие рабочие концентрации малых молекул: Y-27632 – 12,5 мкМ, CHIR99021 – 5 мкМ и A-83-01 – 1,25 мкМ.

Для анализа влияния комплекса малых молекул на формирование культуры пролиферирующих клеток из крысиных гепатоцитов использовали флуоресцентную и фазово-контрастную микроскопию. После выделения крысиные гепатоциты были разделены на две культуры. В контрольной культуре клетки культивировали без добавления комплекса малых молекул, в опытной культуре – с добавлением комплекса малых молекул в определенных в предварительных экспериментах рабочих концентрациях.

Флуоресцентная микроскопия клеток, окрашенных комплексом Live/Dead™ через 24 часа после выделения клеток, показала, что и в контроле, и в опытном варианте присутствует значительное количество жизнеспособных клеток (рис. 2).

Примечательно, что уже через сутки после выделения отчетливо видна разница в уровне жизнеспособности контрольной и опытной культур. В контрольных клетках можно наблюдать гораздо более высокий уровень клеточной гибели (рис. 2, а) по сравнению с опытными клетками, которые культивировались в присутствии комплекса малых молекул (рис. 2, б). Морфологически в опытной культуре можно выделить два типа клеток: гепатоцитоподобные и клетки овальной формы.

На пятые сутки эксперимента отмечались еще более существенные различия в опытной и контрольной культурах клеток (рис. 3, а, б). К этому времени в контрольной культуре в основном сохраняются одиночные сильно распластанные клетки с признаками нарушения плазматической и ядерной мембран

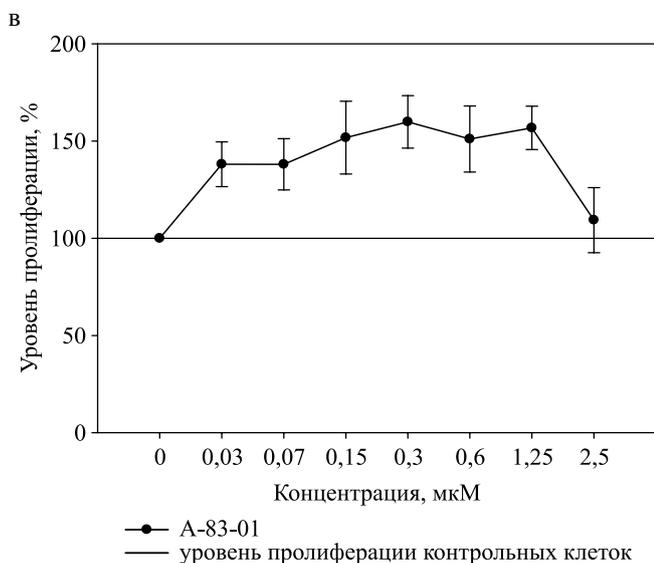
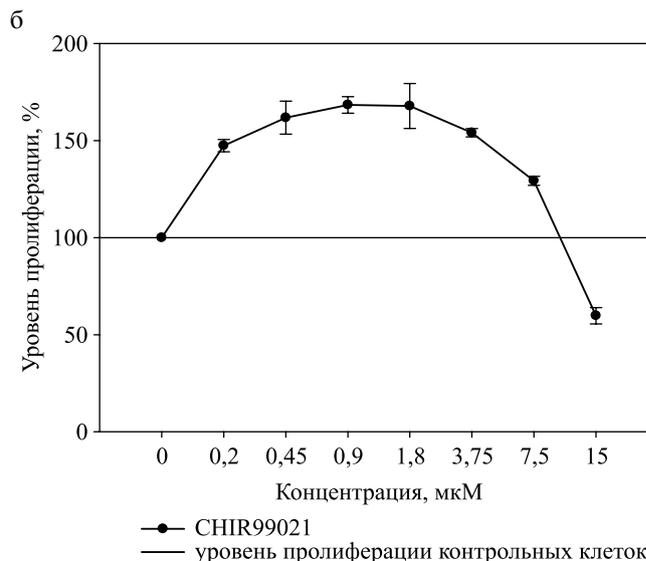
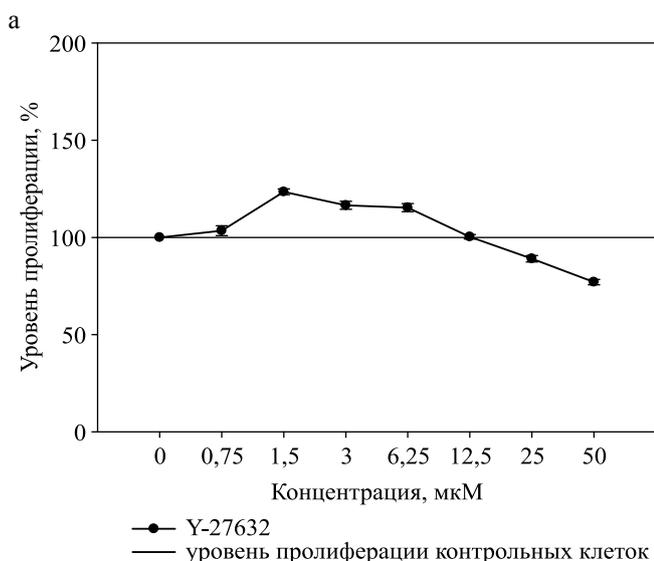


Рис. 1. Зависимость уровня пролиферации клеток линии HepG2 от концентраций малых молекул в культуральной среде: а – клетки культивировали в присутствии серийных разведений Y-27632; б – клетки культивировали в присутствии серийных разведений CHIR99021; в – клетки культивировали в присутствии серийных разведений A-83-01

Fig. 1. Dependence of the HepG2 cells proliferation level on the concentration of small molecules in the culture medium: а – cells were cultured in the presence of serial dilutions of Y-27632; б – cells were cultured in the presence of serial dilutions of CHIR99021; в – cells were cultured in the presence of serial dilutions of A-83-01

и повышенной вакуолизацией (рис. 3, а). Тогда как в опытной культуре наряду с такими же зрелыми клетками, переходящими в состояние клеточной гибели, визуализировались группы вновь образовавшихся клеток (рис. 3, б).

К 7-м суткам эксперимента в контрольной культуре продолжился процесс клеточной гибели (рис. 3, в). А в опытной культуре отчетливо визуализировалось усиление пролиферации с образованием небольших клеточных кластеров (рис. 3, г). На 10-е сутки эксперимента в связи с полной гибелью клеток в контрольной культуре наблюдение продолжали только в опытном варианте. В течение этого времени в опытной культуре наблюдалось увеличение количества клеток в образовавшихся кластерах, уплотнение их структуры и формирование внеклеточного матрикса (рис. 4).

Через 15 суток эксперимента наблюдалась экспансия клеток в кластерах, которая приводила к их разрастанию, слиянию с соседними кластерами и формированию клеточного пласта. Уровень клеточной гибели в культуре был незначительным (рис. 5).

Для всех последующих экспериментов использовались клетки после первого пассажа, которые с момента выделения непрерывно культивировались в присутствии комплекса малых молекул. Чтобы оценить влияние различных ростовых сред и комплекса малых молекул на рост клеток в культуре, был

проведен анализ пролиферации и построены кривые роста с использованием системы микроскопии с автоматической цейтраферной съемкой. Анализ роста клеточной популяции на разных средах с добавлением комплекса малых молекул и без них показал, что наиболее быстрый рост и равномерную экспансию проявляли клетки, которые культивировались на средах (DMEM/F12 и William's E) без добавления малых молекул (рис. 6).

Однако при визуальном анализе изображений было обнаружено, что в обоих вариантах ростовых сред при отсутствии комплекса малых молекул рост клеточной популяции происходил за счет экспансии фибробластоподобных клеток. Характерные кластеры гепатоцитоподобных клеток в этих вариантах отсутствовали на всем протяжении эксперимента (26 суток).

С другой стороны, при культивировании клеток в обоих типах ростовых сред (DMEM/F12 и William's E) в присутствии комплекса малых молекул после первого пассажа происходило формирование кластеров гепатоцитоподобных клеток, такое же, как мы наблюдали в исходном опытном варианте после выделения гепатоцитов до пассирования. Таким образом, показано, что для поддержания роста и пролиферации гепатоцитоподобных, но не фибробластоподобных, клеток необходимо не только первоначальное воздействие комплекса малых молекул,

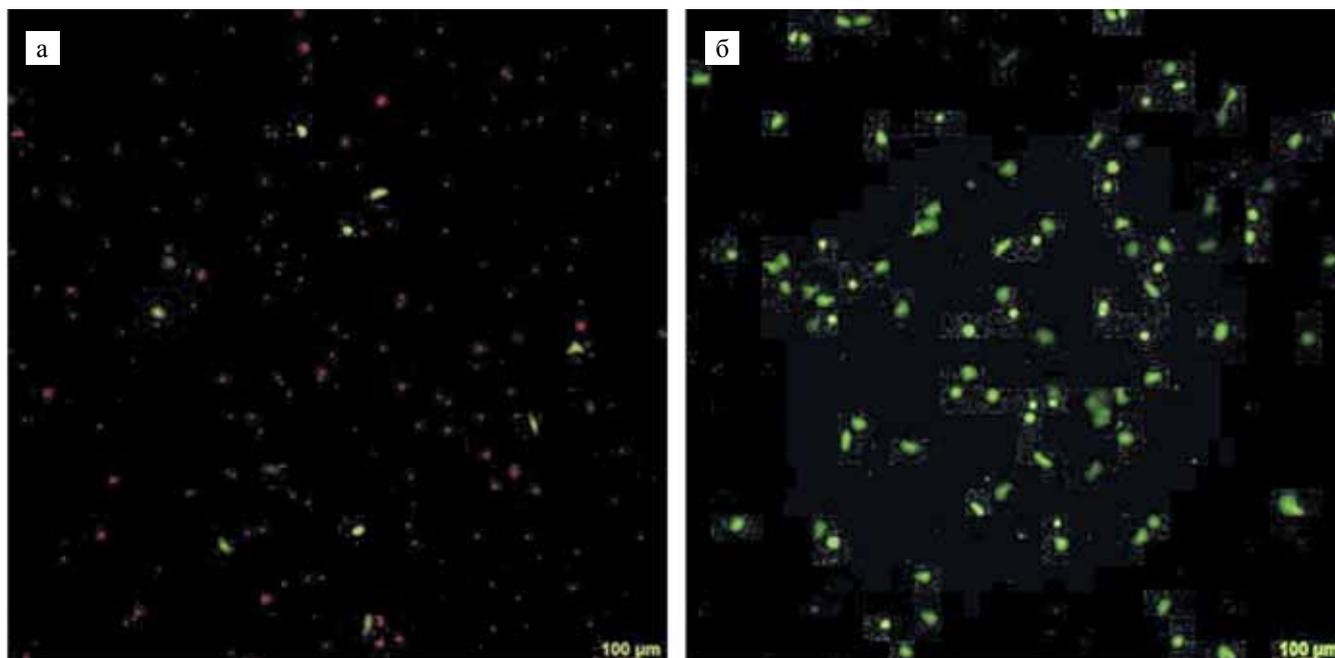


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия клеток печени через 24 ч после выделения. Окрашивание Live/Dead™: а – контрольные клетки (без добавления комплекса малых молекул); б – опытные клетки (с добавлением комплекса малых молекул). Зеленый цвет – живые клетки, красный цвет – клетки в состоянии клеточной гибели. ×50

Fig. 2. Fluorescence microscopy of cells 24 h after isolation. Live/Dead™ staining: а – control cells (without the addition of a set of small molecules); б – experimental cells (with the addition of a set of small molecules). Green – living cells, red – cells in a state of cell death. ×50

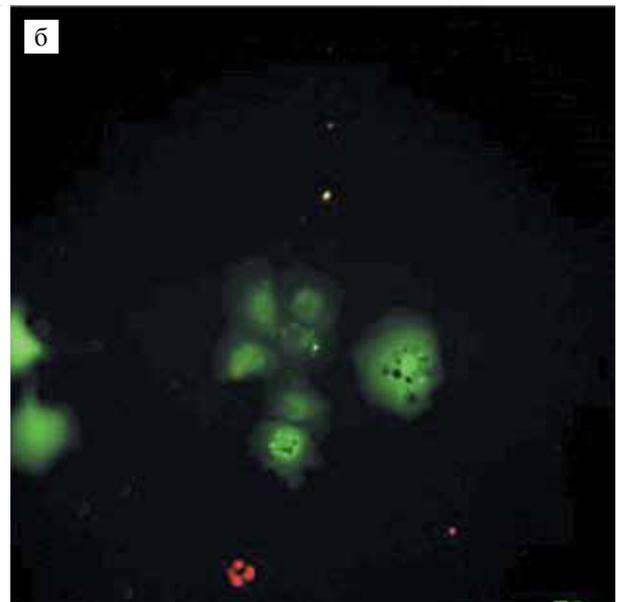
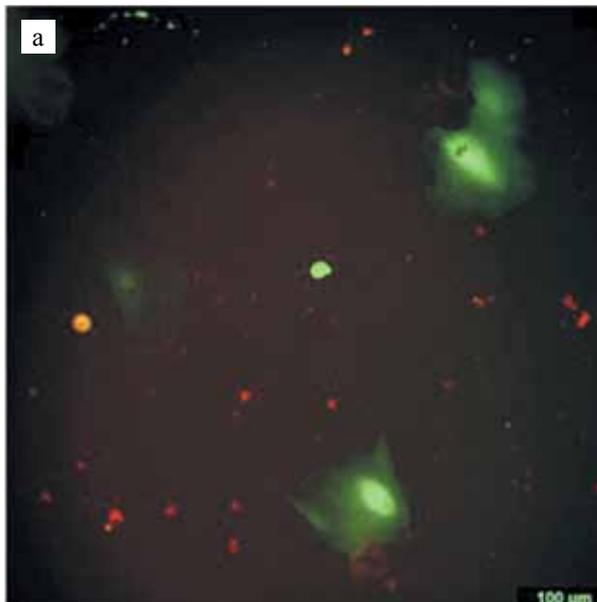
но и их постоянное присутствие в ростовой среде на протяжении всего периода культивирования.

Примечательно, что при культивировании на среде DMEM/F12 процесс формирования клеточных кластеров начинался значительно раньше (через 48 часов после посадки клеток), тогда как в среде William's E начало формирования кластеров отмечали только на 7-е сутки культивирования. Различалось также и количество клеточных кластеров по полям зрения. Для

каждого образца клеточных культур анализировали 80 полей зрения на культуральный флакон площадью 25 см². При культивировании на среде DMEM/F12 в присутствии малых молекул клеточные кластеры встречались в 90% проанализированных полей зрения. При росте на среде William's E с добавлением малых молекул этот показатель достигал только 50%.

Фазово-контрастная микроскопия клеток на разных сроках роста клеточной культуры позволила

5-е сутки



7-е сутки

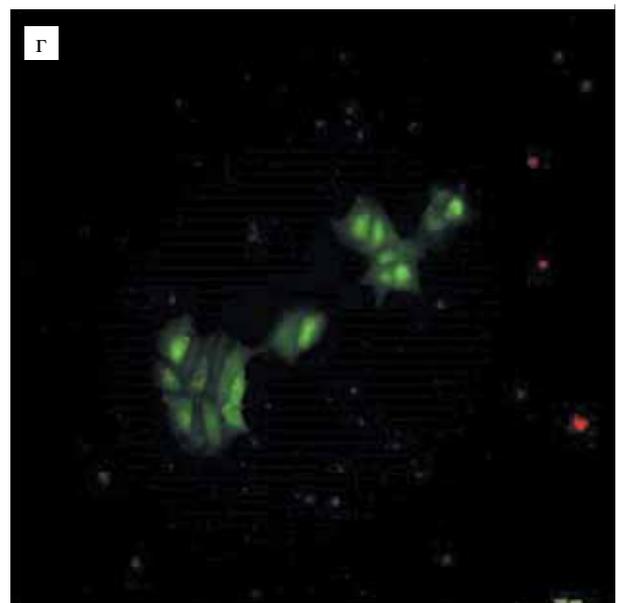
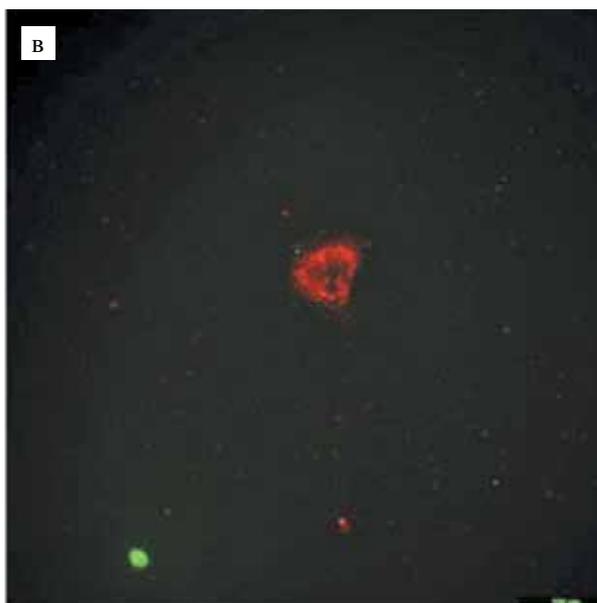


Рис. 3. Флуоресцентная микроскопия клеток печени на 5-е (а и б) и 7-е (в и г) сутки после выделения: а, в – контрольные клетки (без добавления комплекса малых молекул), б, г – опытные клетки (с добавлением комплекса малых молекул); б – группа новообразовавшихся клеток; г – формирование клеточных кластеров. Зеленый цвет – живые клетки, красный цвет – клетки в состоянии клеточной гибели. Окрашивание Live/Dead™. ×200

Fig. 3. Fluorescence microscopy of cells on the 5th (a and б) and 7th (в and г) days after isolation: а, в – control cells (without the addition of a set of small molecules), б, г – experimental cells (with the addition of a set of small molecules); б – a group of newly formed cells; г – the formation of cell clusters. Green – living cells, red – cells in a state of cell death. Live/Dead™ staining. ×200

визуализировать процесс формирования отдельных кластеров. Центром образования такого кластера являются крупные, в основном двухъядерные клетки неправильной формы (рис. 7).

В формирующемся клеточном кластере обнаруживается заметное число клеток, содержащих два ядра. Известно, что одной из характерных особенностей печени является полиплоидия гепатоцитов, т. е. увеличение числа набора хромосом на клетку. Полиплоидные гепатоциты могут быть представлены в нескольких вариантах: они могут быть тетраплоидными (двухъядерными с $2n$ набором хромосом или одноядерными с $4n$ набором хромосом) или октаплоидными (двухъядерными с $4n$ набором хромосом или одноядерными с $8n$ набором хромосом) [14]. Функциональная роль полиплоидии гепатоцитов пока не совсем ясна. Однако показано, что полиплоидные гепатоциты обладают повышенной пролиферативной способностью, экспрессируя ряд генов, ассоциированных с прохождением клеточного цикла [15].

Далее в процессе культивирования происходит активное деление клеток и периферический рост кластера с формированием на более поздних сроках значительных скоплений плотно упакованных клеток (рис. 8, а), находящихся в тесном соседстве с фибробластоподобными клетками (рис. 8, б).

Анализ экспрессии поверхностных и внутриклеточных маркеров проводили на клетках после 1-го пассажа, культивировавшихся с добавлением комплекса малых молекул.

CD29, или интегрин $\beta 1$, относится к семейству интегриновых белков, которые вовлечены во взаимодействия клеток с белками внеклеточного матрикса, такими как коллаген, ламинин и фибронектин, а также в составе гетеродимеров, участвует в межклеточных взаимодействиях, играет функциональную роль в миграции, адгезии и выживании клеток. CD29 широко экспрессирован на различных типах клеток, включая мезенхимные и эпителиальные клетки, а также стволовые/прогениторные клетки различного происхождения [16]. Так, CD29 наряду с CD44 и CD90 зачастую рассматривается в качестве маркера мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК), выделяемых из разных тканевых источников, как у человека [17], так и у грызунов [18]. Во взрослой печени интегрин $\beta 1$ экспрессируют зрелые гепатоциты [19], а также печеночные стволовые клетки и гепатобласты [20].

Используя проточную цитофлуориметрию, мы проанализировали экспрессию на поверхности клеток интегрин $\beta 1$ (CD29) (рис. 9, а).

Как видно из рис. 9, а, экспрессия CD29 наблюдалась на более чем 60% клеток. Морфологически в этой культуре преобладали гепатоцитоподобные клетки (рис. 9, б).

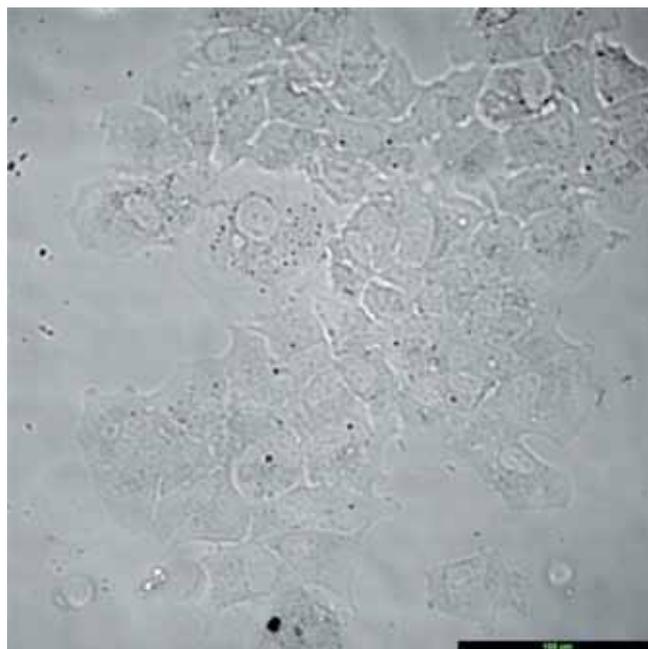


Рис. 4. Фазово-контрастная микроскопия плотного кластера, состоящего из клеток с гепатоцитоподобной морфологией, к 10-м суткам в опытной культуре. $\times 200$

Fig. 4. Phase contrast microscopy of a dense cluster consisting of cells with hepatocyte-like morphology by day 10 in an experimental culture. $\times 200$

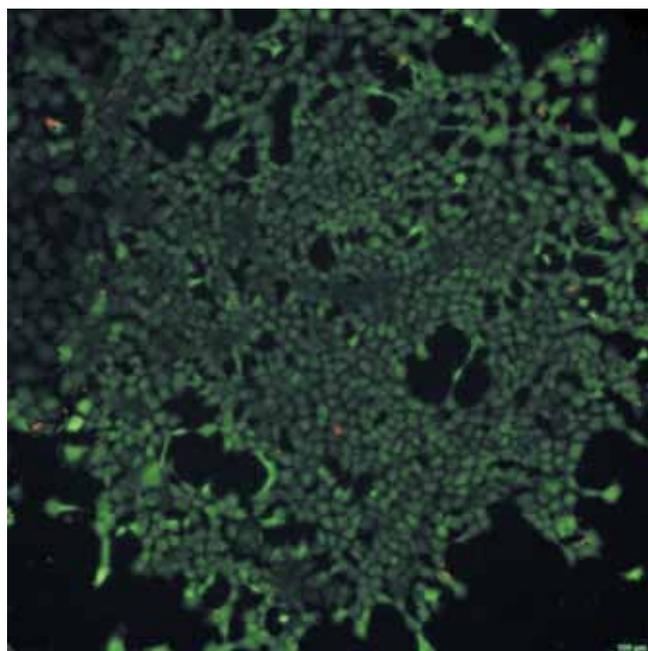


Рис. 5. Флуоресцентная микроскопия клеток на 15-е сутки после выделения. Экспансия клеток в кластерах, приводящая к формированию крупных клеточных скоплений. Зеленый цвет – живые клетки, красный цвет – клетки в состоянии клеточной гибели. Окрашивание Live/Dead™. $\times 100$

Fig. 5. Fluorescence microscopy of cells on the 15th day after isolation. Expansion of cells in clusters, leading to the formation of large cell conglomerates. Green – living cells, red – cells in a state of cell death. Live/Dead™ staining. $\times 100$

Делеция интегрин $\beta 1$ в эмбриональной печени приводит к нарушению нормального развития полярности гепатоцитов, к отсутствию спецификации межклеточных контактов и к невозможности форми-

рования канальцев. Направленная делеция интегрин $\beta 1$ во взрослых гепатоцитах предотвращает восстановление нормальной архитектуры гепатоцитов после повреждения печени с последующим развитием

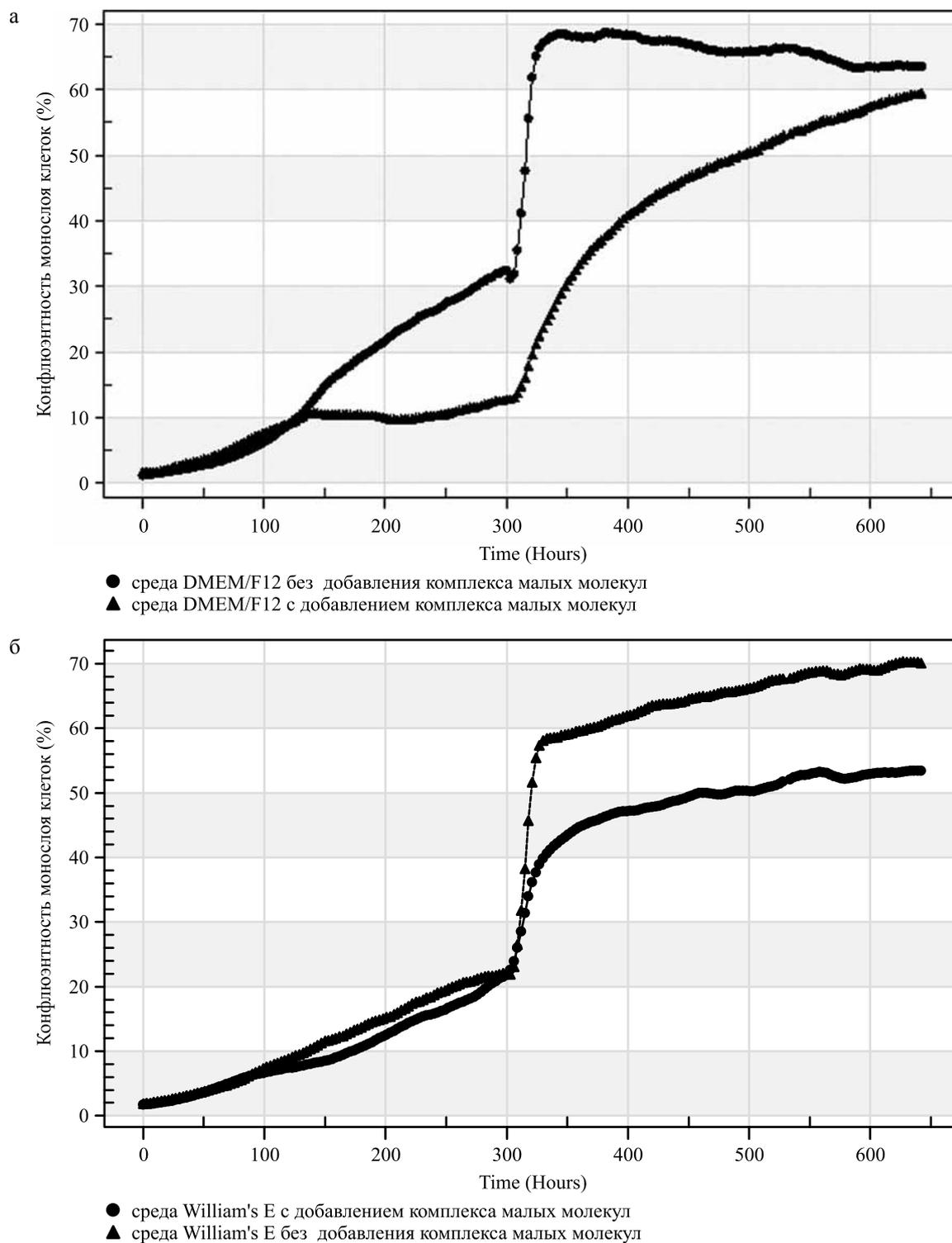


Рис. 6. Кривые роста клеток I пассажа, культивировавшихся на разных средах в течение 26 сут. Построение кривых роста основано на оценке % конфлюэнтности монослоя за счет фотофиксации полей зрения каждые 4 часа: а – клетки культивировались на среде DMEM/F12; б – клетки культивировались на среде William’s E

Fig. 6. Growth curves of the cells at 1st passage, cultivated on different media for 26 days. The construction of growth curves is based on an estimate of the % confluence of the monolayer due to photographic fixation of the visual fields every 4 hours: а – cells were cultured in DMEM/F12 medium; б – cells were cultured on William’s E medium

фиброза [21]. Таким образом, экспрессия CD29 на клетках, полученных из крысиных гепатоцитов после культивирования их в присутствии малых молекул, может также обеспечивать поддержание характерной архитектуры формирующихся кластеров и способствовать пролиферации.

Экспрессию внутриклеточных маркеров в клетках анализировали с использованием двух методов. Используя метод флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, была проведена оценка

экспрессии таких печень-ассоциированных белков, как цитокератин 18, альфа-фетопротеин, HNF4 α , а также маркера пролиферирующих клеток Ki-67.

Маркер пролиферации Ki-67 экспрессируется в ядре в течение G1, S и G2-M фаз клеточного цикла в пролиферирующих клетках [22]. Показали, что практически 100% клеток экспрессируют данный белок (рис. 10, а).

Цитокератин 18 – белок цитоскелета и основной промежуточный филамент, экспрессируемый в пе-

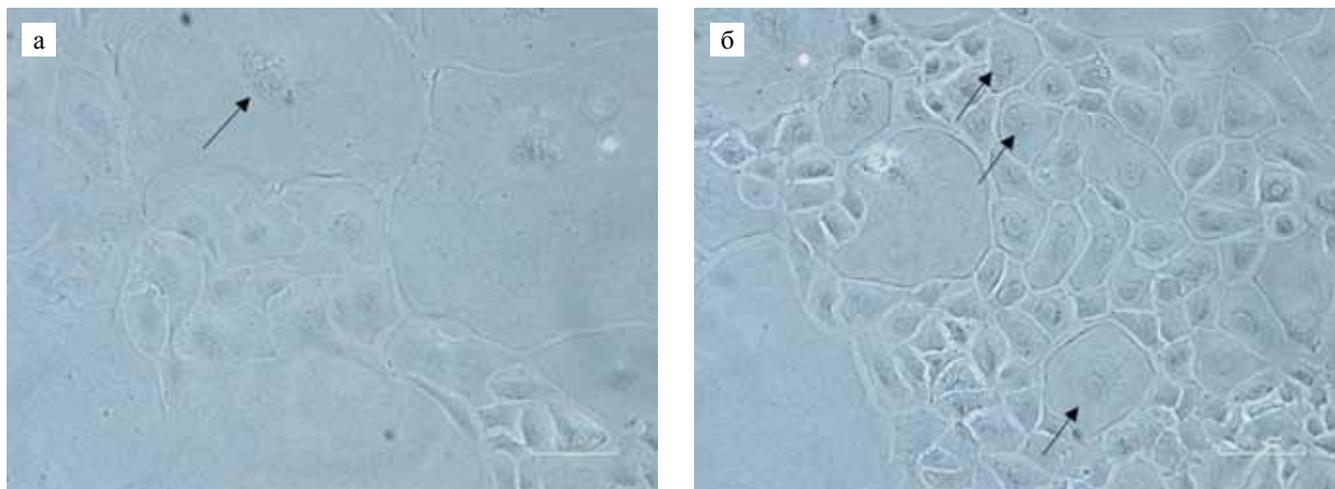


Рис. 7. Фазово-контрастная микроскопия кластеров гепатоцитоподобных клеток, формирующихся в присутствии комплекса малых молекул: а – центральная двухъядерная клетка, предположительно дающая начало росту кластера; б – разрастание клеток в кластере; стрелками обозначены двухъядерные клетки. $\times 200$

Fig. 7. Phase contrast microscopy of hepatocyte-like cell clusters formed in the presence of a small moleculeset: а – central binucleated cell, presumably giving rise to cluster growth; б – proliferation of cells in a cluster; arrows indicate binucleated cells. $\times 200$

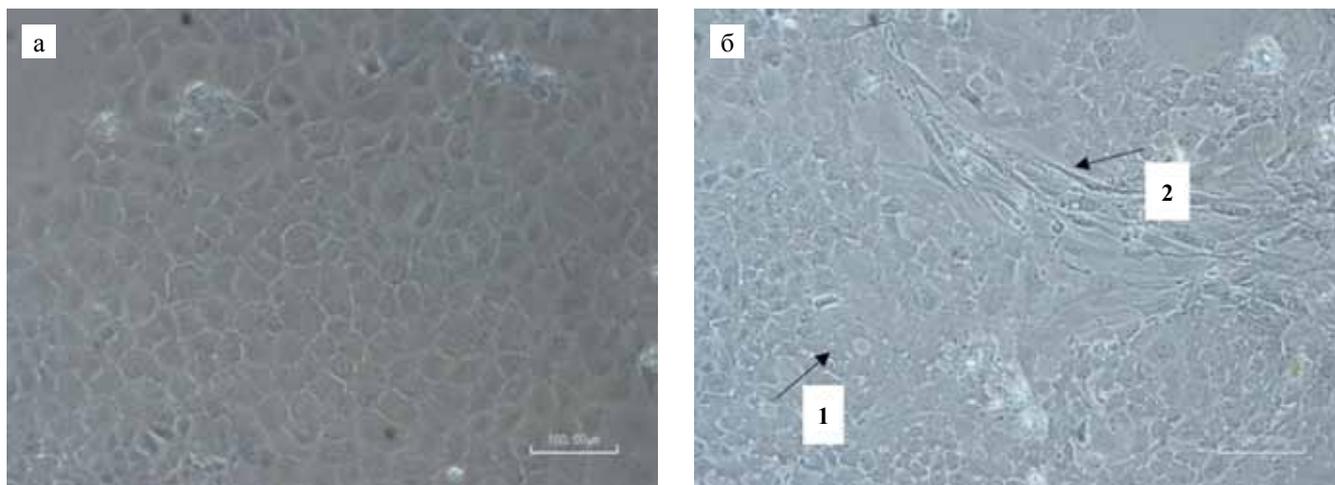


Рис. 8. Фазово-контрастная микроскопия клеточного пласта на поздних сроках культивирования (47 суток) в присутствии комплекса малых молекул: а – плотный кластер гепатоцитоподобных клеток; $\times 200$; б – зона контакта разных типов клеток в составе единого клеточного пласта; 1 – гепатоцитоподобные клетки, 2 – фибробластоподобные клетки; $\times 100$

Fig. 8. Phase contrast microscopy of the cell layer at late stages of cultivation (47 days) in the presence of a small moleculeset: а – dense cluster of hepatocyte-like cells; $\times 200$; б – contact zone of cells with different morphology as part of a single cell layer; 1 – hepatocyte-like cells, 2 – fibroblast-like cells; $\times 100$

чени [23]. Показано, что цитокератин 18 наряду с цитокератином 19 экспрессируется в человеческих печеночных стволовых клетках, аналогичных овальным клеткам грызунов [24]. Мы показали, что экспрессия цитокератина 18 характерна для всех клеток в культуре, имеющих гепатоцитоподобную морфологию (рис. 10, б).

Гепатоцитарный ядерный фактор (Hepatocyte nuclear factor) 4α (HNF4α) является орфанным ядер-

ным рецептором, который известен как мастер-регулятор печеночных дифференцировочных процессов, поскольку регулирует большое количество гепатоцит-специфичных генов [25]. HNF4α регулирует такие важные функции печени, как гликолиз, глюконеогенез, метаболизм жирных кислот, синтез желчных кислот, метаболизм лекарств, синтез аполипопротеина, уреогенез и коагуляцию крови, за счет регуляции транскрипции множества генов, вовлеченных в

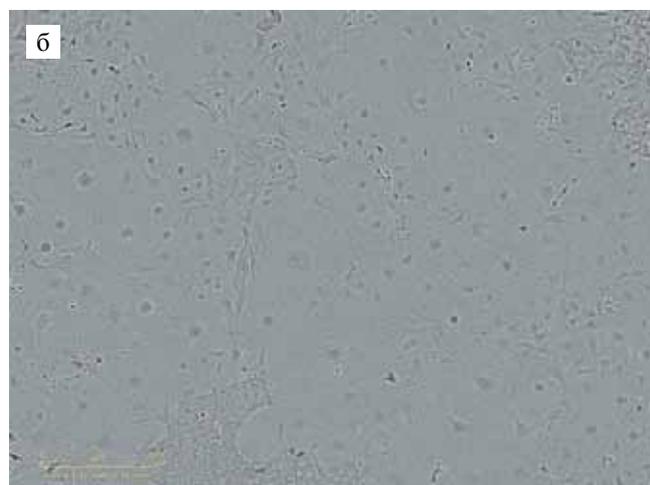
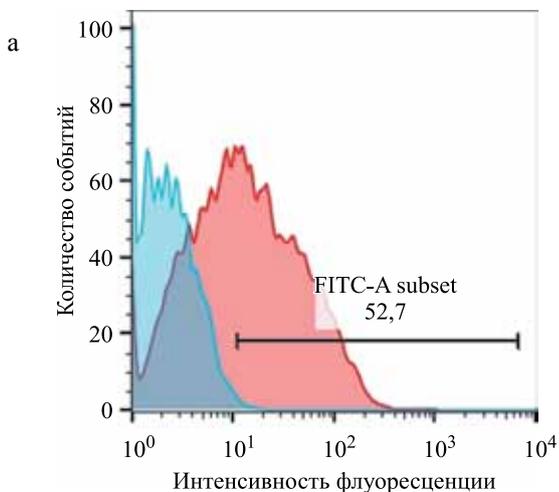


Рис. 9: а – цитофлуориметрический анализ экспрессии CD29. Голубой пик – аутофлуоресценция контрольных клеток, не окрашенных антителами. Красный пик – флуоресценция анти-CD29-FITC, связавшихся с клетками; б – фазово-контрастная микроскопия культуры. ×100

Fig. 9: a – flow cytometric analysis of CD29 expression. Blue peak – autofluorescence of control cells, unstained with antibodies. Red peak – fluorescence of anti-CD29-FITC bound to cells; б – phase contrast microscopy of the culture. ×100

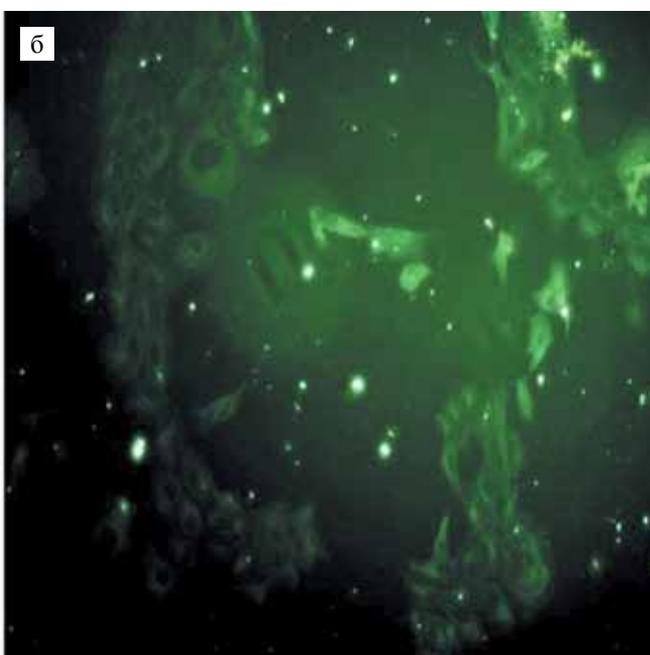
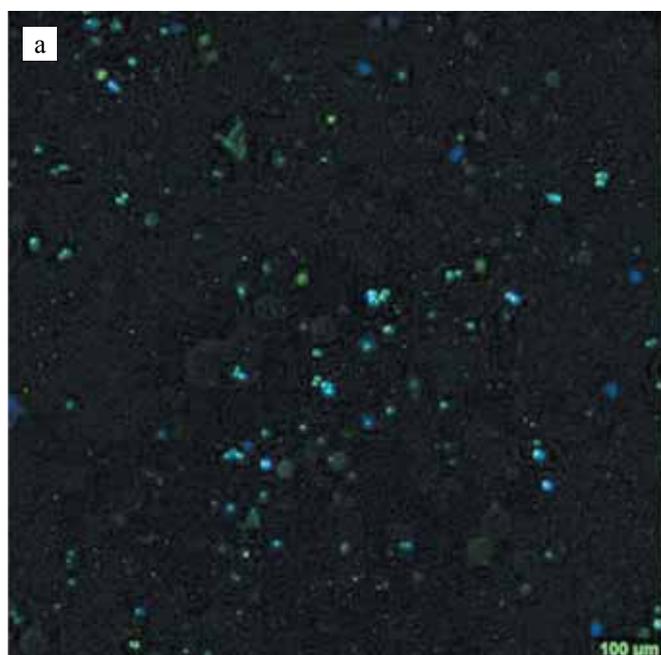


Рис. 10. Флуоресцентная микроскопия клеток после культивирования в присутствии малых молекул: а – клетки окрашены антителами к Ki-67. Ядра докрашены DAPI. ×100; б – клетки окрашены антителами к цитокератину 18. ×200

Fig. 10. Fluorescence microscopy of cells after cultivation in the presence of small molecules: а – cells are stained with antibodies to Ki-67. Nuclei are contrasted with DAPI. ×100; б – cells are stained with antibodies to cytokeratin 18. ×200

каждую из этих функций [26–28]. Помимо зрелых гепатоцитов HNF4 α экспрессируется бипотентными гепатобластами человека и грызунов в эмбриогенезе [29], а также печеночными стволовыми клетками во взрослом органе [30].

Мы также обнаружили экспрессию HNF4 α преимущественно в клетках, формирующих характерные кластеры (рис. 11, а).

На полученных изображениях отчетливо видна ядерная локализация HNF4 α , что характерно для нор-

мальных печеночных клеток. Экспрессия HNF4 α в клетках, культивировавшихся в присутствии комплекса малых молекул, свидетельствует об их гепатоцитарном происхождении и прогениторном потенциале.

α -фетопроtein (АФП) является одним из наиболее изученных маркеров клеточной дифференцировки и развития опухоли. Этот белок экспрессируется фетальными и злокачественными гепатоцитами и не экспрессируется нормальными зрелыми гепатоцита-

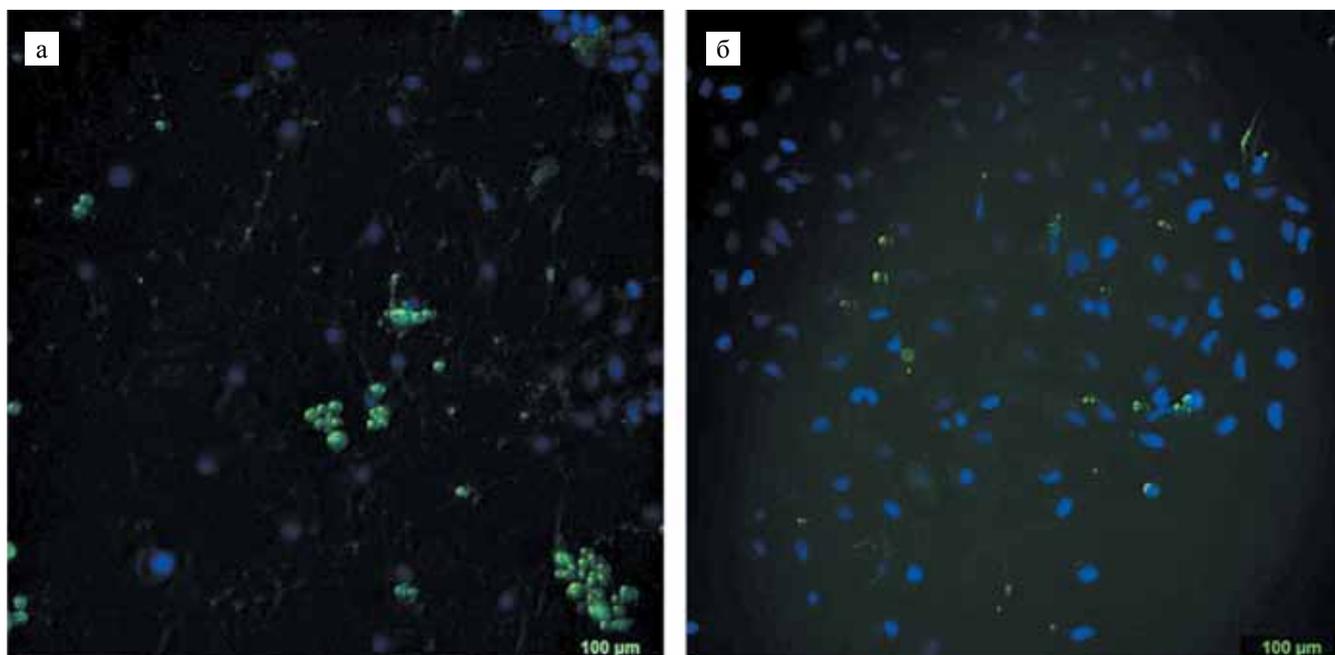


Рис. 11. Флуоресцентная микроскопия клеток после культивирования в присутствии малых молекул: а – клетки, окрашенные анти-HNF4 α ; б – клетки, окрашенные антителами к АФП. Ядра клеток докрашены DAPI. $\times 200$

Fig. 11. Fluorescence microscopy of cells after cultivation in the presence of small molecules: а – cells stained with anti-HNF4 α ; б – cells stained with antibodies to AFP. Nuclei are contrasted with DAPI. $\times 200$

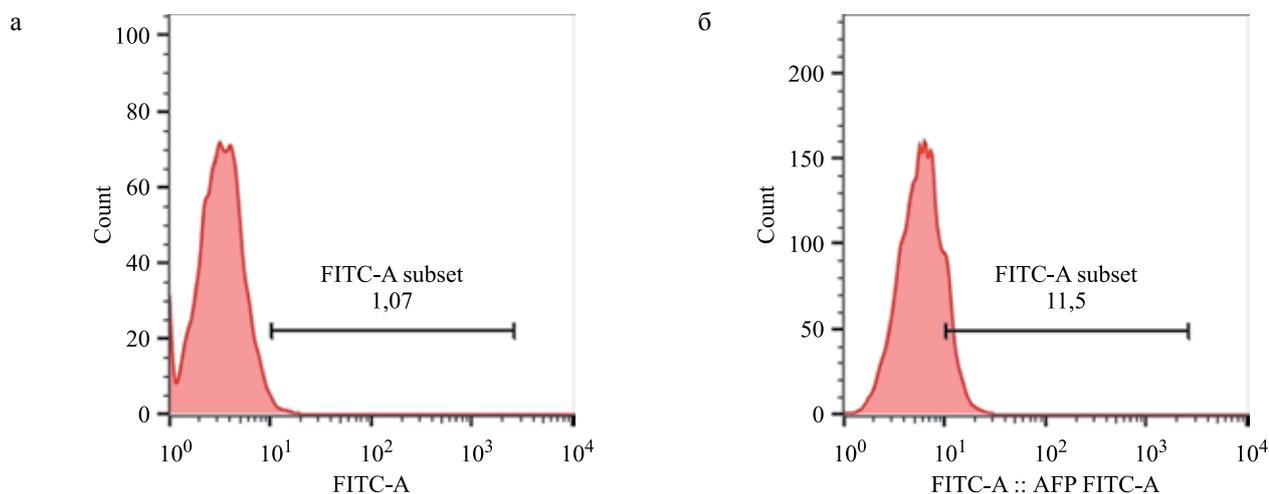


Рис. 12. Цитофлуориметрический анализ экспрессии АФП в клетках: а – контрольные клетки, окрашенные вторичными антивидовыми антителами; б – клетки, окрашенные антителами к АФП

Fig. 12. Flow cytometric analysis of AFP expression in cells: а – control cells stained with secondary anti-species antibodies; б – cells stained with antibodies to AFP

ми [31]. АФП является одним из основных маркеров овальных клеток [32] и незрелых гепатоцитов [33]. В связи с тем что экспрессия АФП сильно коррелирует с экспрессией фетальных генов в онтогенезе, этот белок служит идеальным кандидатным маркером для отслеживания и изучения путей развития стволовых клеток, их дифференцировки и редифференцировки.

Экспрессию α -фетопротейна мы анализировали двумя методами, используя флуоресцентную микроскопию и проточную цитофлуориметрию. Для этого проводили внутриклеточное окрашивание клеток антителами, специфичными к АФП. Результаты окрашивания представлены на рис. 11, б и 12. При проведении флуоресцентной микроскопии мы наблюдали не очень отчетливую картину экспрессии АФП в клетках, а именно очень мало клеток оказались окрашены антителами к данному белку, и его локализация в большинстве клеток была преимущественно околоядерная, и только в отдельных клетках АФП распределялся в цитоплазме, что является характерным для данного белка (рис. 11, б).

Для подтверждения наличия экспрессии АФП был проведен цитофлуориметрический анализ внутриклеточного окрашивания клеток соответствующими антителами (рис. 12).

Как следует из рис. 12, около 10% клеток экспрессируют α -фетопротейн, что подтверждает результат, полученный с помощью флуоресцентной микроскопии. Таким образом, наличие экспрессии АФП в клетках, полученных из зрелых крысиных гепатоцитов после культивирования в присутствии комплекса малых молекул, свидетельствует об их дедифференцировке/репрограммировании в незрелое прогениторное состояние.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индукция зрелых гепатоцитов комплексом малых молекул может служить одним из подходов к репрограммированию терминально дифференцированных клеток в прогениторное состояние. Показано, что наличие в среде трех малых молекул Y-27632, A-83-01 и CHIR99021 позволяет культивировать крысиные гепатоциты в течение длительного времени (более 2 месяцев). При этом происходят существенные изменения в их морфологии и начинают экспрессироваться маркеры печеночных прогениторных клеток, такие как АФП и HNF4 α . Полученный результат открывает новые возможности для изучения механизма дедифференцировки/репрограммирования зрелых гепатоцитов. На наш взгляд, он является отправной точкой для дальнейших исследований, направленных на изучение свойств печеночных прогениторных клеток человека, разработку способов их получения с последующим применением в лечении терминальных стадий заболеваний печени, таких как цирроз

различной этиологии и злокачественные новообразования.

Авторы выражают благодарность д. м. н. М.Ю. Шагидулину за помощь в проведении манипуляций с лабораторными животными.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) Тема № 5.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Berry MN, Friend DS.* High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 1969; 43: 506–520. doi: 10.1083/jcb.43.3.506. PMID: 4900611.
2. *Guguen-Guillouzo C, Campion JP, Brissot P, Glaise D, Launois B, Bourel M et al.* High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep.* 1982; 6: 625–628. doi: 10.1016/0309-1651(82)90187-4. PMID: 6286153.
3. *Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, Wakefield L, Wilson EM, Finegold MJ et al.* Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell.* 2014; 15: 605–618. doi: 10.1016/j.stem.2014.09.008. PMID: 25312494.
4. *Afshari A, Shamdani S, Uzan G, Azarpira N.* Different approaches for transformation of mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11: 54. doi: 10.1186/s13287-020-1555-8. PMID: 32033595.
5. *Kholodenko IV, Kholodenko RV, Manukyan GV, Lupatov AY, Yarygin KN.* Isolation of Induced Pluripotent Cells from Stromal Liver Cells of Patients with Alcoholic Cirrhosis. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 163: 535–541. doi: 10.1007/s10517-017-3845-4. PMID: 28853085.
6. *Lim KT, Lee SC, Gao Y, Kim KP, Song G, An SY et al.* Small Molecules Facilitate Single Factor-Mediated Hepatic Reprogramming. *Cell Rep.* 2016; 15: 814–829. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.071. PMID: 27149847.
7. *Kim Y, Jeong J, Choi D.* Small-molecule-mediated reprogramming: a silver lining for regenerative medicine. *Exp Mol Med.* 2020; 52: 213–226. doi: 10.1038/s12276-020-0383-3. PMID: 32080339.
8. *Katsuda T, Kawamata M, Hagiwara K, Takahashi RU, Yamamoto Y, Camargo FD et al.* Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity. *Cell Stem Cell.* 2017; 20: 41–55. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.007. PMID: 27840021.
9. *Wu H, Zhou X, Fu GB, He ZY, Wu HP, You P et al.* Reversible transition between hepatocytes and liver progenitors for *in vitro* hepatocyte expansion. *Cell Res.* 2017; 27: 709–712. doi: 10.1038/cr.2017.47. PMID: 28374751.

10. Fu GB, Huang WJ, Zeng M, Zhou X, Wu HP, Liu CC et al. Expansion and differentiation of human hepatocyte-derived liver progenitor-like cells and their use for the study of hepatotropic pathogens. *Cell Res.* 2019; 29: 8–22. doi: 10.1038/s41422-018-0103-x. PMID: 30361550.
11. Kim Y, Kang K, Lee SB, Seo D, Yoon S, Kim SJ et al. Small molecule-mediated reprogramming of human hepatocytes into bipotent progenitor cells. *J Hepatol.* 2019; 70: 97–107. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.007. PMID: 30240598.
12. Hee Hong D, Lee C, Kim Y, Lee SB, Han SC, Kim SJ et al. Generation of Hepatic Progenitor Cells from the Primary Hepatocytes of Nonhuman Primates Using Small Molecules. *Tissue Eng Regen Med.* 2021; 18: 305–313. doi: 10.1007/s13770-020-00327-8. PMID: 33591557.
13. Kholodenko IV, Kalinovskiy DV, Svirshchevskaya EV, Doronin II, Konovalova MV, Kibardin AV et al. Multimerization through Pegylation Improves Pharmacokinetic Properties of scFv Fragments of GD2-Specific Antibodies. *Molecules.* 2019; 24: 3835. doi: 10.3390/molecules24213835. PMID: 31653037
14. Zhang S, Lin YH, Tarlow B, Zhu H. The origins and functions of hepatic polyploidy. *Cell Cycle.* 2019; 18: 1302–1315. doi: 10.1080/15384101.2019.1618123. PMID: 31096847.
15. Katsuda T, Hosaka K, Matsuzaki J, Usuba W, Prieto-Vila M, Yamaguchi T et al. Transcriptomic Dissection of Hepatocyte Heterogeneity: Linking Ploidy, Zonation, and Stem/Progenitor Cell Characteristics. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020; 9: 161–183. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.08.011. PMID: 31493546.
16. Togarrati PP, Dinglasan N, Desai S, Ryan WR, Muench MO. CD29 is highly expressed on epithelial, myoepithelial, and mesenchymal stromal cells of human salivary glands. *Oral Dis.* 2018; 24: 561–572. doi: 10.1111/odi.12812. PMID: 29197149.
17. Kholodenko IV, Kurbatov LK, Kholodenko RV, Manukyan GV, Yarygin KN. Mesenchymal Stem Cells in the Adult Human Liver: Hype or Hope? *Cells.* 2019; 8: 1127. doi: 10.3390/cells8101127. PMID: 31546729.
18. Zou W, Zhao J, Li Y, Wang Z, Yan H, Liu Y et al. Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote the Migration and Invasion of Colorectal Cancer Stem Cells. *Onco Targets Ther.* 2020; 13: 6617–6628. doi: 10.2147/OTT.S249353.
19. Terry C, Hughes RD, Mitry RR, Lehec SC, Dhawan A. Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules. *Cell Transplant.* 2007; 16: 639–647. doi: 10.3727/000000007783465000. PMID: 17912955.
20. Turner RA, Mendel G, Wauthier E, Barbier C, Reid LM. Hyaluronan-supplemented buffers preserve adhesion mechanisms facilitating cryopreservation of human hepatic stem/progenitor cells. *Cell Transplant.* 2012; 21: 2257–2266. doi: 10.3727/096368912X637000. PMID: 22472355.
21. Masuzaki R, Ray KC, Roland J, Zent R, Lee YA, Karp SJ. Integrin β 1 Establishes Liver Microstructure and Modulates Transforming Growth Factor β during Liver Development and Regeneration. *Am J Pathol.* 2021; 191: 309–319. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.10.011. PMID: 33159885.
22. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol.* 1987; 133: 579–584. doi: 10.1002/jcp.1041330321. PMID: 3121642.
23. Chougule P, Sumitran-Holgersson S. Cytokeratins of the liver and intestine epithelial cells during development and disease. in: Hamilton G. Cytokeratins – Tools in Oncology. InTech, 2012; 118–158.
24. Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291: G45–54. doi: 10.1152/ajpgi.00465.2005. PMID: 16769813.
25. Walesky C, Apte U. Role of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) in cell proliferation and cancer. *Gene Expr.* 2015; 16: 101–108. doi: 10.3727/105221615X14181438356292. PMID: 25700366.
26. Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ. Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 1393–1403. doi: 10.1128/MCB.21.4.1393-1403.2001. PMID: 11158324.
27. Inoue Y, Yu AM, Inoue J, Gonzalez FJ. Hepatocyte nuclear factor 4 α is a central regulator of bile acid conjugation. *Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279: 2480–2489. doi: 10.1074/jbc.M311015200. PMID: 14583614.
28. Inoue Y, Peters LL, Yim SH, Inoue J, Gonzalez FJ. Role of hepatocyte nuclear factor 4 α in control of blood coagulation factor gene expression. *Journal of Molecular Medicine – Jmm.* 2006; 84: 334–344. doi: 10.1007/s00109-005-0013-5. PMID: 16389552.
29. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development.* 2015; 142: 2094–2108. doi: 10.1242/dev.114215. PMID: 26081571.
30. Li K, Zhang H, Wang Y, Wang Y, Feng M. Differential expression of HNF4 α isoforms in liver stem cells and hepatocytes. *J Cell Biochem.* 2006; 99: 558–564. doi: 10.1002/jcb.20939. PMID: 16639723.
31. Khamzina L, Borgeat P. Correlation of alpha-fetoprotein expression in normal hepatocytes during development with tyrosine phosphorylation and insulin receptor expression. *Mol Biol Cell.* 1998; 9: 1093–1105. doi: 10.1091/mbc.9.5.1093. PMID: 9571242.
32. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology.* 2004; 39: 1477–1487. doi: 10.1002/hep.20214. PMID: 15185286.
33. Giri S, Acikgöz A, Bader A. Isolation and Expansion of Hepatic Stem-like Cells from a Healthy Rat Liver and their Efficient Hepatic Differentiation of under Well-defined Vivo Hepatic like Microenvironment in a Multiwell Bioreactor. *J Clin Exp Hepatol.* 2015; 5: 107–122. doi: 10.1016/j.jceh.2015.03.003. PMID: 26155038.

Статья поступила в редакцию 24.07.2021 г.
The article was submitted to the journal on 24.07.2021