

на правах рукописи

Родимова Светлана Алексеевна

**ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ, ГВГ И FLIM МИКРОСКОПИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ
ПАТОЛОГИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ**

1.5.2 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2025

Работа выполнена на базе научной лаборатории молекулярных биотехнологий научно-исследовательского института экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Загайнова Елена Вадимовна**
доктор медицинских наук, член-корреспондент
Российской академии наук
Заместитель Генерального директора по развитию ФГБУ
ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА

Официальные оппоненты: **Генина Элина Алексеевна**
доктор физико-математических наук, доцент
Профессор кафедры оптики и биофотоники ФГБОУ ВО
«Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г.
Чернышевского»

Ефименко Анастасия Юрьевна
доктор медицинских наук
Заведующий лабораторией репарации и регенерации
тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский
научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова»

Ведущая организация: ФГАОУ ВО Первый Московский государственный
медицинский университет имени И. М. Сеченова
Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

Защита диссертации состоится «03» апреля 2025 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2025/1521/diss-Rodimova-1521.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Черкасова Елена Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальные проблемы

Ежегодно регистрируется около 1 млн новых случаев первичного и метастатического рака печени. На сегодняшний день наиболее эффективным методом лечения остается хирургическая операция (одноэтапная и двухэтапная резекция печени) (Ramos E. et al., 2016, Mohammadian M. et al. 2018). Несмотря на современные достижения в хирургической технике, анестезиологическом обеспечении и совершенствовании методов предоперационной оценки объема и функции печени, сохраняется высокий риск развития фатальной пострезекционной печеночной недостаточности, связанный, в первую очередь, с сопутствующей патологией, а также с индивидуальным регенераторным потенциалом. Лечение пострезекционной печеночной недостаточности крайне затруднительно, при этом часто возникает необходимость в трансплантации печени (Алиханов Р.Б. дисс.докт.2023).

Накоплено достаточно данных, касающихся процесса регенерации здоровой печени. Однако в реальной клинической практике около 20% пациентов, перенесших резекцию печени, и до 25% доноров фрагмента печени для трансплантации имеют ту или иную степень стеатоза или фиброза (De Meijer V. E. et al., 2010, Su C. W. et al., 2015, Walcott-Sapp S. 2018), что значительно снижает регенераторный потенциал ремнанта печени.

Существенный вклад в патогенез печеночной патологии и снижение регенераторного потенциала печени вносят изменения энергетического метаболизма гепатоцитов. Известно, что при развитии неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) избыточное поступление свободных жирных кислот в печень приводит к перегрузке митохондрий, сопровождающейся повышенным образованием активных форм кислорода (АФК) (Cheng Z., 2013, Koves T. R., 2008, Sookoian S. et al., 2010) и истощением антиоксидантных ферментов, что еще больше усиливает повреждение клеток (Neuschwander-Tetri B. A. et al., 2015). С развитием заболевания и прогрессированием его в неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) в гепатоцитах снижается продукция митохондриального аденозинтрифосфата (АТФ) и нарушается их общий энергетический метаболизм (Nassir F. et al., 2015, Veteläinen R. et al., 2007, Marsman H. A. et al., 2013). При развитии фиброза нарушается целостность и стабильность митохондрий, что приводит к митохондриальной дисфункции и, в конечном итоге, к некрозу гепатоцитов центральной и промежуточной зон долек печени (Dahlke M. H. et al., 2003, Hafez M. M. et al., 2014, Wang S. et al., 2016). Однако влияние метаболических изменений в гепатоцитах на качество регенерации печени до сих пор до конца не изучено. При этом особый интерес представляет прижизненное изучение патологических изменений метаболизма гепатоцитов с возможностью их оценки в условиях *in vivo* в клинике.

Решение об объеме резекции принимается на основании предоперационной оценки функции печени стандартными клиническими методами: анализ биохимических показателей крови (Nyblom H. et al., 2004), различные типы клиренс-тестов (Thomas M. N. et al., 2015; De Gasperi A., 2016), методы визуализации, такие как УЗИ, КТ, МРТ и эластография (Wei W. et al., 2015; Kuznetsova D. S. et al. 2019), а также по показаниям специалиста - гистологическое и иммуногистохимическое исследования (Schuppan, D., 2015; Roehlen, N., et al. 2020). Все эти методы имеют ряд недостатков. Большинство из них не позволяют проводить экспресс-оценку состояния печени интраоперационно и не дают информации о прижизненных процессах, происходящих в ткани на клеточном уровне. Более того, ни один из клинических методов не позволяет проводить предиктивную оценку регенераторного потенциала печени.

В биомедицинских исследованиях активно используются методы флуоресцентного биоимиджинга, такие как многофотонная микроскопия (МФМ) с регистрацией сигнала двухфотонно-возбуждаемой флуоресценции, возможностью генерации второй оптической гармоники (ГВГ), и возможностью флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (fluorescence lifetime imaging microscopy – FLIM). Представленные методы не требуют добавления дополнительного контрастирующего агента и позволяют проводить прижизненную визуализацию структуры ткани на клеточном уровне. Кроме того, на основе получаемых данных о временах жизни флуоресценции различных форм внутриклеточных кофакторов, в частности, никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и его фосфорилированной формы НАДФН, можно судить об изменении метаболического статуса гепатоцитов, который является чувствительным маркером состояния печени в целом (Skala M., et al., 2007, Wang H. et al., 2015, Wang H. et al., 2017, Wang H. et al., 2017). Важно отметить, что все представленные методы оптического биоимиджинга имеют возможность приборной реализации в клинических условиях.

Целью работы стало определение характерных признаков патологии печени и регенераторного потенциала с использованием многофотонной микроскопии, включающей флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка методики оценки состояния печени, а также метаболического статуса гепатоцитов с использованием многофотонной микроскопии, включающей флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию.

2. Анализ состояния печени и энергетического метаболизма гепатоцитов в норме и при индукции регенерации нормальной печени с помощью разработанной методики, верификация индуцированного состояния стандартными методами оценки.

3. Моделирование патологии печени и индукция регенерации печени на фоне сопутствующей патологии. Исследование состояния печени и энергетического метаболизма гепатоцитов при патологии и при регенерации на фоне патологии с помощью разработанной методики, верификация индуцированных состояний стандартными методами оценки.

Научная новизна

- Разработана методика на основе многофотонной микроскопии, включающей флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию, а также подобраны оптимальные условия для проведения исследования свежих образцов ткани печени и энергетического метаболизма гепатоцитов на разных стадиях развития патологии (стеатоза и фиброза), регенерации нормальной печени и регенерации при сопутствующей патологии.

- Впервые с применением многофотонной микроскопии в режимах флуоресцентной микроскопии и ГВГ микроскопии определены характерные особенности структуры ткани печени на разных стадиях стеатоза и фиброза и на разных этапах регенерации в норме и на фоне сопутствующей патологии.

- Впервые с применением многофотонной микроскопии в режиме FLIM микроскопии проведено исследование энергетического метаболизма гепатоцитов в динамике при развитии стеатоза, фиброза, при регенерации в норме и на фоне сопутствующей патологии, которые могут быть использованы для проведения интраоперационной экспресс-оценки состояния печени при обширных резекциях.

Научно-практическая значимость

- Получены новые фундаментальные знания об особенностях состояния печени, а также об особенностях метаболического статуса гепатоцитов в норме, при регенерации и на фоне сопутствующей печеночной патологии.

- Разработанные методики оценки состояния печени и метаболического статуса гепатоцитов на основе многофотонной микроскопии, включающей флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию, могут быть транслированы в клиническую практику для проведения интраоперационной экспресс-оценки состояния печени при планировании резекции.

- Основные выводы и результаты работы могут быть использованы при разработке соответствующих разделов спецкурсов и лекций по биофизике, биомедицине, биохимии, патофизиологии, гепатологии, при разработке новых препаратов, корректирующих метаболический статус гепатоцитов и качество регенерации.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанная методика позволяет оценить структуру и функцию печени, и ее регенераторный потенциал в норме и при сопутствующей патологии на основе методов многофотонной микроскопии с возможностью флуоресцентной микроскопии, ГВГ микроскопии и FLIM микроскопии.

2. Для нормальной регенерации характерно равномерное распределение сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н по всей поверхности среза ткани печени, в то время как при наличии стеатоза и фиброза выявляются зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, которые соответствуют поврежденным гепатоцитам, зонам инфильтрации липидных капель и очагам скопления коллагена.

3. FLIM микроскопия позволяет выявить изменения энергетического метаболизма гепатоцитов при нормальной регенерации, при патологии, и регенерации при сопутствующей патологии, которые не детектируются с применением стандартных методов.

4. FLIM микроскопия позволяет оценить регенераторный потенциал печени. Критерием успешной регенерации являются высокие значения вклада НАДФН в печени, до индукции регенерации. Критерием снижения регенераторного потенциала печени на поздних стадиях печеночной патологии является отсутствие высоких значений вклада НАДФН и увеличения вклада времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН и НАДФН на 3 день регенерации.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, индексируемых Web of Science, Scopus, входящих в перечень ВАК; 33 тезиса конференций.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на международных конференциях (8 докладов) и российских конференциях (21 доклад): Нижегородская сессия молодых ученых (Нижний Новгород, 2019, 2020, 2021); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием "VolgaMedScience" (Нижний Новгород, 2018, 2019, 2020, 2021); Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2018, 2019, 2020, 2021,

2023); Фундаментальная и прикладная медицина "Biomeeting" (Саратов, 2022); Съезд биофизиков России (Сочи, 2019; Краснодар, 2023); Национальный Конгресс по регенеративной медицине (Москва, 2019, 2022); Форум молодых ученых государств – участников СНГ «Наука без границ» (Нижний Новгород, 2022); III Объединенный научный форум, включающий VII Съезд физиологов, VII Съезд биохимиков России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, 2022); VII International symposium «Topical problems of biophotonics» (Нижний Новгород, 2019); TERMIS European Chapter Meeting (Rhodes, Greece, 2019); Sechenov International biomedical summit (Москва, 2020); International conference of Advanced Laser Technologies (Москва, 2021, 2022, Самара, 2023); International conference on laser application in life sciences (LALS'23) (Mugla, Turkey, 2023); Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех 2024» (Сочи, 2024); International conference on laser application in life sciences (LALS'24) (Mugla, Turkey, 2024); VI Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Санкт-Петербург, 2024).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и содержит 27 рисунков и 8 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы содержит 183 источника, в том числе 178 англоязычных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен обзор литературы, посвященный следующим основным темам: особенности регенерации печени, стандартные методы для оценки состояния печени, особенности НАД(Ф)Н и его участие в энергетическом метаболизме клеток, принципы методов многофотонной микроскопии, ГВГ и FLIM микроскопии.

В **главе 2** перечислены использованные в работе объекты исследования, реактивы и оборудование, описаны методики исследований.

Лабораторные животные. Серии экспериментов проводили на самцах крыс линии Wistar весом 250-350 г. 8 животных было использовано для подбора параметров и настроек для многофотонной микроскопии, ГВГ и FLIM микроскопии, включая подбор адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции. Общее количество животных, использованных для индукции регенерации нормальной печени, составило 40. Общее количество животных, использованных для моделирования стеатоза и токсического фиброза с последующей индукцией регенерации, составило 80. Лабораторных животных содержали в условиях SPF-вивария с 12-часовым циклом дня и ночи.

Животные модели. Индукцию регенерации нормальной печени проводили с применением моделей 30% и 70% гепатэктомии (ГЭ). Процедуру 70% ГЭ печени выполняли по классической методике с удалением левой латеральной и медианной долей печени. По аналогичной методике осуществляли 30% ГЭ печени путем удаления только левой боковой доли печени. Мониторинг изменений в ткани печени при регенерации проводили на 3 и 7 дни регенерации. Схема экспериментов по индукции регенерации нормальной печени представлена на Рисунке 1.

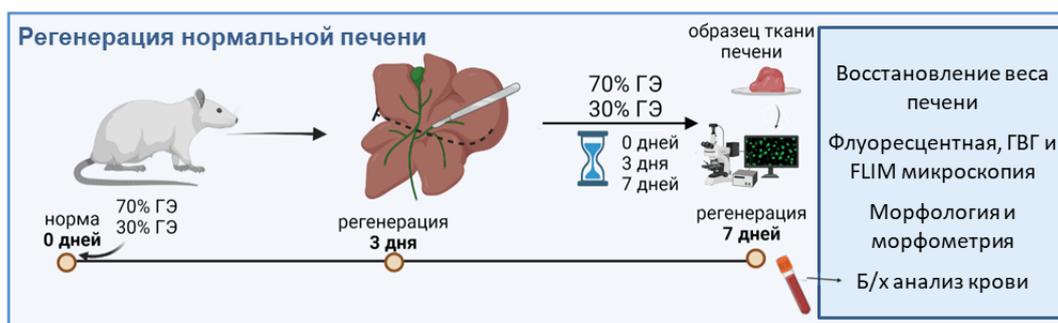


Рисунок 1. Схема экспериментов по индукции регенерации нормальной печени у лабораторных животных и исследованию *ex vivo* образцов ткани печени.

Индукцию стеатоза проводили путем перевода животных на высокожировую 12-ти недельную диету (60% жира от общего рациона и 10% раствор фруктозы в свободном доступе в поилке). Мониторинг изменений осуществляли через 3, 6, 9 и 12 недель с начала высокожировой диеты. Индукцию токсического цирроза проводили путем внутривентриального введения 33% раствора тетрахлорметана (CCl₄), растворенного в масле (CCl₄ - 0,1 мл/кг и оливковое масло 0,3 мл/кг), два раза в неделю в течение 8 недель. Мониторинг изменений осуществляли через 2, 4, 6 и 8 недель после начала введения токсина. Индукцию регенерации на разных стадиях стеатоза и фиброза выполняли с использованием 70% ГЭ. Мониторинг изменений при индуцированной регенерации на разных стадиях патологии проводили на 3 и 7 дни после 70% ГЭ. Из резецируемых долей получали *ex vivo* образцы ткани, которые использовали для анализа состояния печени на разных стадиях индуцируемой патологии. Схема экспериментов по индукции стеатоза и фиброза у лабораторных животных с последующим запуском регенерации печени представлена на Рисунке 2.

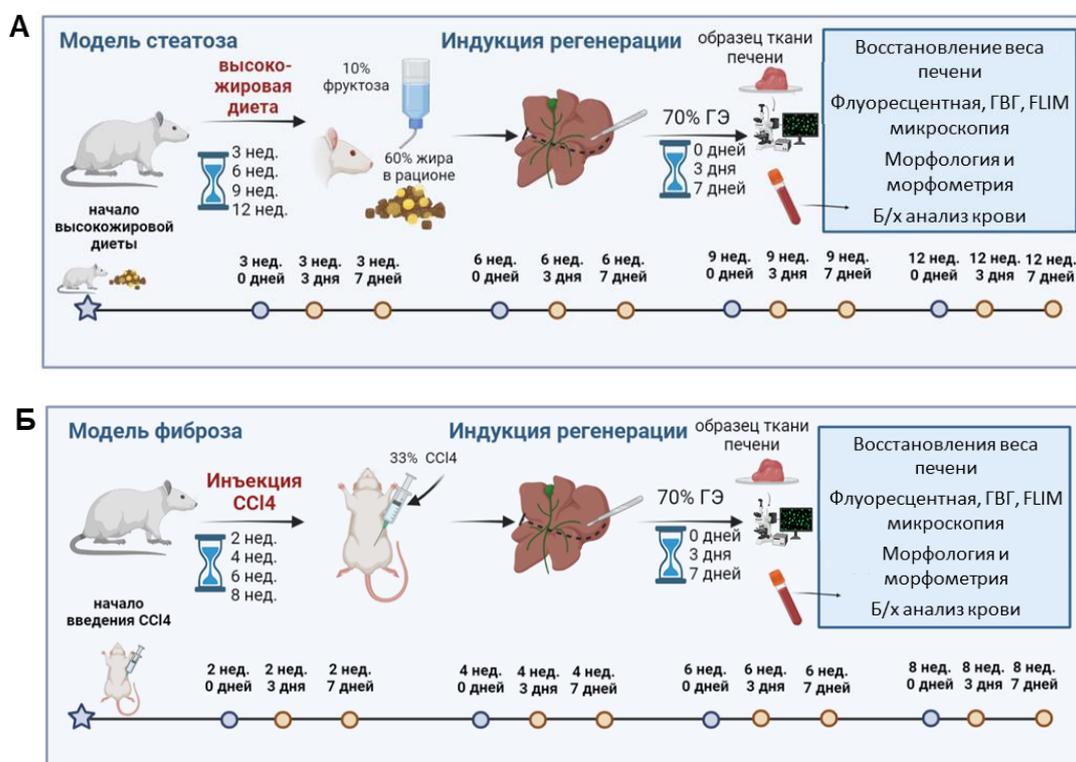


Рисунок 2. Схема экспериментов по индукции (А) стеатоза и (Б) фиброза у лабораторных животных с последующим запуском регенерации печени и исследованию *ex vivo* образцов ткани печени.

Система LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) оснащена фемтосекундным лазером Mai Tai HP (Spectra-Physics, США) и блоком FLIM измерений Power Tau-152 (Becker&Hickl GmbH, Германия),

включающим в себя платы счета фотонов SPC-150 и гибридные детекторы НРМ-100-40, установленные на недесканирующем порту микроскопа. Все измерения проводились с использованием масло-имерсионного объектива С Plan-Apochromat 40x/1.3 (Carl Zeiss, Германия). Средняя мощность лазерного излучения на образце составляла 6 мВт. Для возбуждения флуоресценции НАД(Ф)Н использовали длину волны 750 нм. Детектирование сигнала флуоресценции осуществляли в спектральном диапазоне от 450 до 490 нм. Анализ интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США). Изображения импортировали в программу, исключали фоновый сигнал (за фоновый сигнал принимали изображения без объекта при тех же настройках), выделяли область цитоплазмы и количественно обрабатывали сигнал. *ГВГ микроскопию* с возбуждением на 800 нм использовали для визуализации коллагена в ткани печени, регистрацию сигнала второй гармоники осуществляли в диапазоне 371-421 нм. С использованием программного обеспечения ImageJ проводили количественную оценку интенсивности сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена для каждого поля зрения. *FLIM микроскопию* применяли для оценки метаболического статуса гепатоцитов на основе данных о временах жизни флуоресценции свободной и связанной форм НАДН и НАДФН и их вкладах.

При обработке данных FLIM микроскопии в программе SPCImage (Becker & Hickl GmbH, Германия) выделяли область цитоплазмы клетки, исключали ядро и выбирали участки с допустимым χ^2 (от 0.8 до 1.2). Для подбора адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАДН с применением *ex vivo* образцов здоровой печени проводили сопоставление значений t_2 и χ^2 для биэкспоненциальной и трехэкспоненциальной моделей. Также важным критерием для выбора трехэкспоненциальной модели являлись высокие значения a_3 (>5%). Для обеих моделей значение параметра t_1 было зафиксировано на 400 пс, что является стандартным значением для данного параметра (Sanchez W. Y., et al. 2010). Далее с учетом подобранной модели проводили анализ метаболического статуса гепатоцитов с применением FLIM микроскопии.

В цитоплазме живых клеток анализировали следующие параметры FLIM: t_m (пс) – средневзвешенное время жизни флуоресценции, относительный вклад свободной a_1 (%) и связанной a_2 (%) форм НАДН; относительный вклад НАДФН - a_3 (%); $a_1(\%)+a_2(\%)+a_3(\%)=100\%$; t_1 (пс) – время жизни флуоресценции свободной формы НАДН (имело фиксированное значение 400 пс). В образцах печени с патологией зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, соответствующих поврежденным гепатоцитам, липидной инфильтрации и очагам скопления коллагена, исключали из FLIM анализа.

Морфологический, морфометрический анализ ткани печени, а также оценку *биохимических показателей крови* проводили для стандартной верификации развития патологических состояний печени и подтверждения процесса регенерации. Определяли пролиферативную активность гепатоцитов, выявляли характерные дистрофические изменения в ткани печени и оценивали изменения биохимических показателей крови при различных индуцированных состояниях.

Эффективность восстановления печени оценивали на основе параметра - *процент восстановления веса печени*. Для этого измеряли вес печени и вес животного до индукции регенерации и на разных этапах восстановительного процесса, а затем определяли процент восстановленного веса печени. Полученные значения принимали за «абсолютный процент восстановления веса печени». Для оценки процента восстановления ткани печени при индуцированной патологии по отношению к соответствующему этапу регенерации нормальной печени рассчитывали «относительный процент восстановления массы печени».

Статистический анализ. С целью выявления корреляции между анализируемыми параметрами исходного состояния нормальной печени и её регенераторным потенциалом проводили корреляционный анализ на основе критерия Пирсона с использованием *ex vivo* образцов нормальной печени до и после ГЭ. Попарную корреляцию выявляли для следующих параметров: а2 (%) до и после ГЭ, а3 (%) до и после ГЭ, количество митотических клеток до и после ГЭ, процент восстановления ткани печени при регенерации.

При анализе восстановления веса печени в случае регенерации нормальной печени и регенерации на разных стадиях патологии использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Сравнительный анализ проводили между значениями абсолютного процента восстановления веса печени при регенерации нормальной печени с соответствующими значениями данного параметра при регенерации на разных стадиях патологии; р-значение $\leq 0,05$.

Для каждой временной точки в эксперименте получали по 10 полей зрения, для каждого поля зрения проводили обсчет параметров FLIM по 30 гепатоцитам. Сравнительный анализ данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA10 (StatSoft, США). Статистические различия между разными группами анализировали с помощью попарно-множественного сравнения. Различия в средних значениях между группами считали значимыми при $p \leq 0,05$. Для подтверждения нормальности распределения использовали тест Шапиро-Уилкса. Для попарного сравнения использовали метод попарного t-критерия с использованием поправки Бонферрони.

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

1. Разработка методики оценки состояния печени

При проведении морфологического анализа ни в одном из исследованных образцов нормальной ткани печени не было выявлено признаков воспаления: отека, клеточной инфильтрации или нарушения дольковой архитектуры ткани. Количество и структура коллагеновых волокон в ткани были в пределах нормы.

Количество митотических клеток в нормальной печени составило $0,17 \pm 0,02$. Количество двуядерных и тетраплоидных клеток составило $2,78 \pm 0,5$ (Рисунок 4).

Для нормальной печени показано, что уровни всех исследуемых биохимических параметров сыворотки крови, перечисленных в **Главе 2**, были в пределах допустимой нормы.

Флуоресцентная микроскопия

В нормальной печени сигнал флуоресценции в канале НАД(Ф)Н был распределен равномерно, зон со сниженным сигналом флуоресценции не наблюдалось, выявлены единичные включения витамина А (Рисунок 5А, Б).

ГВГ микроскопия

С применением ГВГ микроскопии было показано отсутствие сигнала ГВГ от фибрилл коллагена ($118,9 \pm 7,5$ усл. ед.), что соответствует отсутствию скоплений коллагеновых волокон в ткани печени (Рисунок 5А, Б).

Подбор адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н

Проведен подбор адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н для дальнейшего анализа данных FLIM микроскопии *ex vivo* образцов ткани печени. При анализе данных FLIM микроскопии, полученных с применением биэкспоненциальной модели, были выявлены значения времен жизни флуоресценции связанной формы НАДН, которые в среднем составляли 3600 ± 160 пс (Рисунок 3А), что не соответствует известным значениям, находящимся в диапазоне 1500–2200 пс (Becker W., Wetzker C., 2018). В связи с этим был сделан вывод, что

фосфорилированная форма (третья компонента) вносит вклад во время жизни флуоресценции связанной формы НАД(Ф)Н. Анализ адекватности выбранной модели проводили с учетом средних значений параметра χ^2 . Значения χ^2 составляли $1,3 \pm 0,24$ и $1,1 \pm 0,02$ для биэкспоненциальной и трехэкспоненциальной моделей аппроксимации кривой соответственно (Рисунок 3А, Б). Значения a_3 при использовании модели кривой затухания флуоресценции с тремя экспонентами составили $7.8 \pm 2\%$. Таким образом, для модели затухания с тремя экспонентами отклонения экспериментальных данных от модельной функции были меньше, чем для биэкспоненциальной модели.

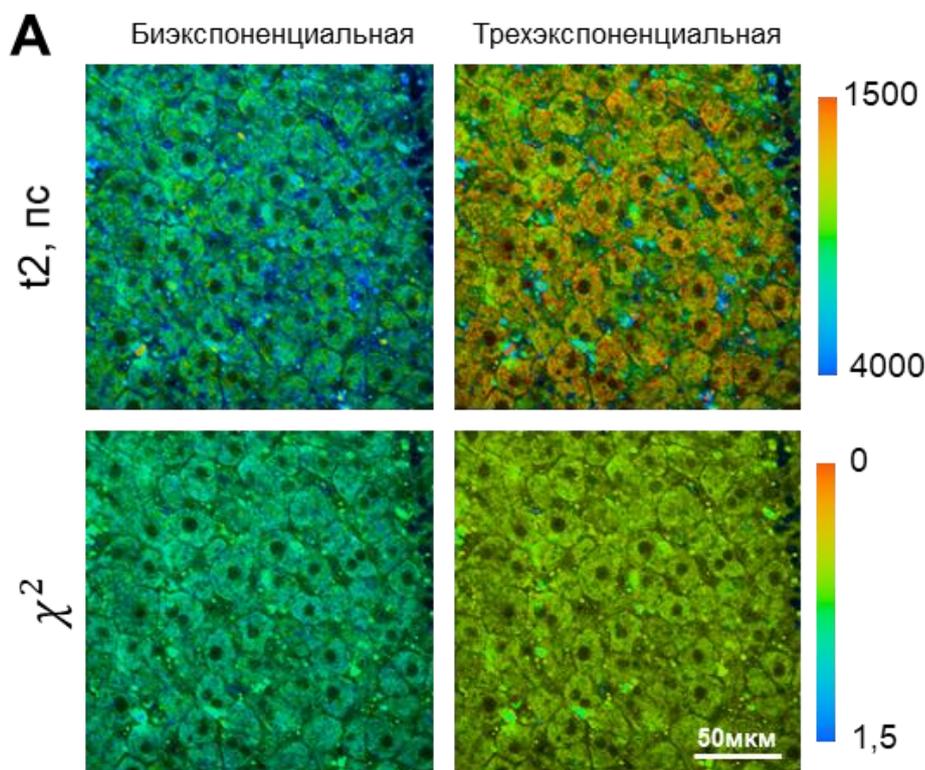
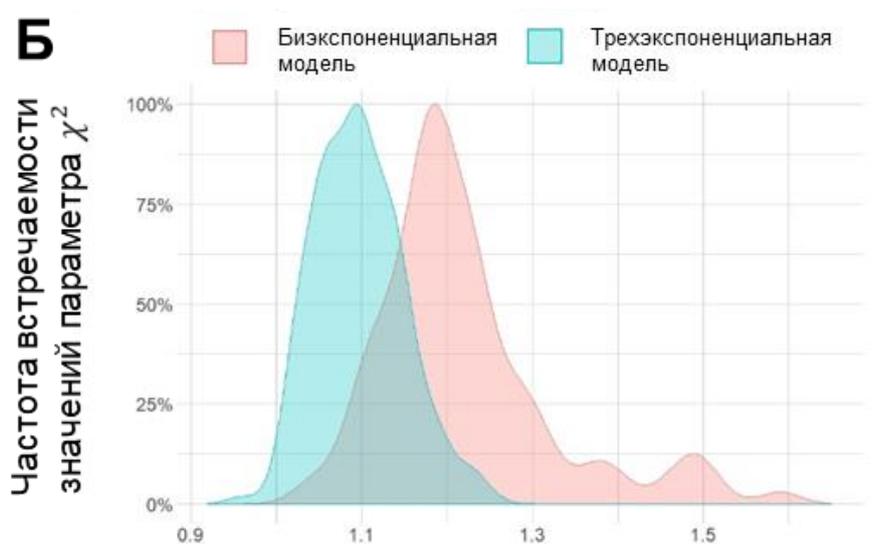


Рисунок 3. Сравнение биэкспоненциальной и трехэкспоненциальной моделей аппроксимации кривой затухания флуоресценции. (А) FLIM-изображения в канале НАДН нормальной печени для параметра времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (t_2) и параметра χ^2 . (Б) Сравнение распределения значений параметров χ^2 для двух моделей аппроксимации кривой затухания флуоресценции. За 100% принимали количество наиболее часто встречаемого значения параметра χ^2 .



В соответствии с полученными результатами, в дальнейшем анализ данных FLIM микроскопии для всех исследуемых состояний ткани печени проводили с использованием трехэкспоненциальной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции кофактора НАД(Ф)Н.

FLIM микроскопия

Были определены характерные значения параметров FLIM в гепатоцитах нормальной печени. Среднее значение средневзвешенных по амплитуде времен жизни флуоресценции (t_m , пс) составило $1145,61 \pm 87,73$ пс. Средние значения вкладов времени жизни флуоресценции свободной ($a_1, \%$) и связанной ($a_2, \%$) формы НАДН были $67,81 \pm 4,84$ и $24,34 \pm 3,37$ соответственно. Среднее значение вклада времени жизни флуоресценции НАДФН составило $7,8 \pm 1,74$. Результаты представлены на Рисунке 5А, Б, В.

Микроскопические признаки нормальной печени: 1. Флуоресцентная микроскопия - равномерное распределение сигнала интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н; 2. ГВГ микроскопия - низкая интенсивность сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена; 3. FLIM микроскопия - высокие значения вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a_2) и НАДФН (a_3) (Рисунок 7).

2. Оценка состояния нормальной печени при регенерации

В случае регенерации нормальной печени при 30% ГЭ на 3 день восстанавливается более 73%, на 7 день - более 88% от первоначального веса печени. Для 70% ГЭ было показано, что на 3 день восстанавливается более 81%, на 7 день - более 93% от исходного веса печени.

Морфологически не было выявлено признаков воспаления: отека, клеточной инфильтрации или нарушения дольковой архитектуры ткани. При этом в обеих моделях наблюдалось накопление липидных капель в гепатоцитах. Такие изменения присутствовали в модели 30% ГЭ, однако наиболее выраженное накопление липидных капель наблюдалось при 70% ГЭ. Данные морфологические изменения являются характерными для печеночной регенерации.

Морфометрический анализ показал, что пролиферативная активность гепатоцитов как при 30% ГЭ, так и при 70% ГЭ на 3 день регенерации выше, чем в норме (0 день). На 7 день регенерации значения снижались, но не достигали значений в норме. Для модели 70% ГЭ на 3 день после операции пролиферативная активность гепатоцитов была значительно выше. Результаты морфометрического анализа представлены на Рисунке 4.

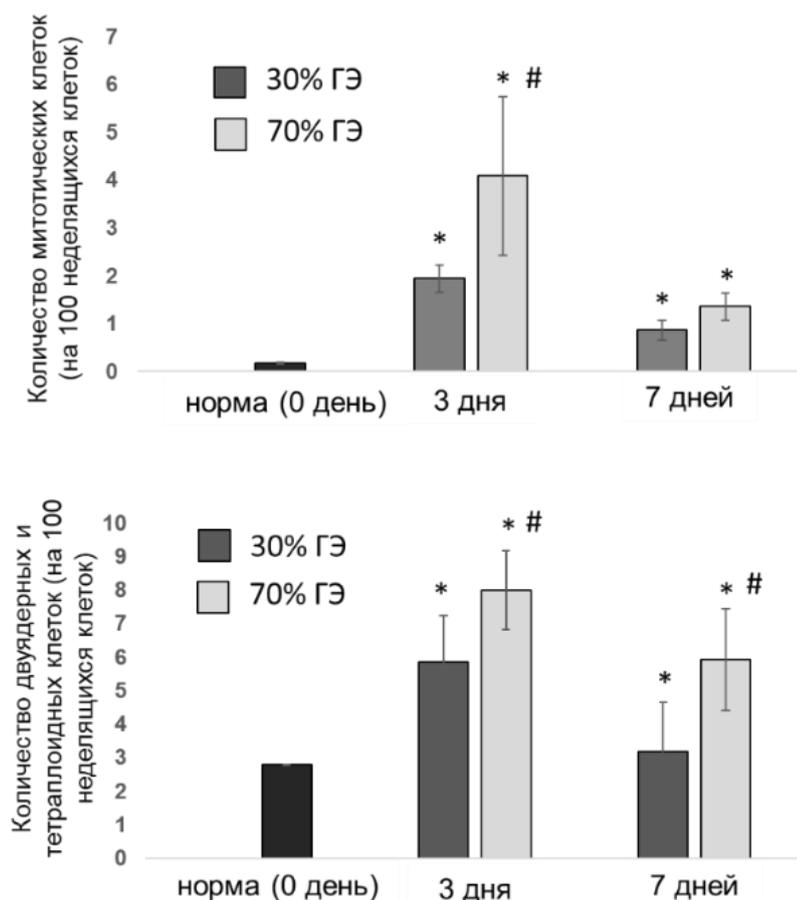


Рисунок 4. Морфометрический анализ ткани печени. Количество митотических клеток; количество тетраплоидных и диплоидных клеток в норме и при регенерации. Значения представлены как количество делящихся клеток на 100 неделящихся клеток. * - статистически значимые различия по сравнению с нормой, # - статистически значимые различия по сравнению с 30% ГЭ для соответствующей временной точки. Данные представлены как $M \pm \sigma$, где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение.

Все исследуемые биохимические показатели крови были в пределах нормы. Исключение составили значения уровня АСТ на 7 день после 70% ГЭ и значения уровня ЩФ на 3 день после 70% ГЭ, которые превышали нормальные значения.

Флуоресцентная микроскопия

Было показано, что сигнал флуоресценции НАД(Ф)Н однороден по всей поверхности среза печени как на 3, так и на 7 день регенерации после 30% и 70% ГЭ. В межклеточном пространстве наблюдались включения витамина А (Рисунок 5А, Б).

ГВГ микроскопия

С применением ГВГ микроскопии было показано отсутствие сигнала ГВГ от скоплений коллагена как для 30% ГЭ ($120,3 \pm 19,5$ усл. ед.) (Рисунок 5А), так и для 70% ГЭ ($115,0 \pm 18,9$ усл. ед.) (Рисунок 5Б), что свидетельствуют об отсутствии осложнений в виде фиброза.

FLIM микроскопия

Для обеих моделей (30% и 70% ГЭ) было показано, что значения t_m , t_2 , и t_3 значительно не отличаются для всех этапов регенерации нормальной печени. При анализе вкладов времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н (a_1 , a_2 и a_3) было обнаружено, что как для 30% ГЭ, так и для 70% ГЭ на 3 день происходит статистически значимое увеличение вклада связанной формы НАДН (a_2) и НАДФН (a_3). На 7 день значения вкладов данных параметров достоверно снижались (Рисунок 5А, Б, В).

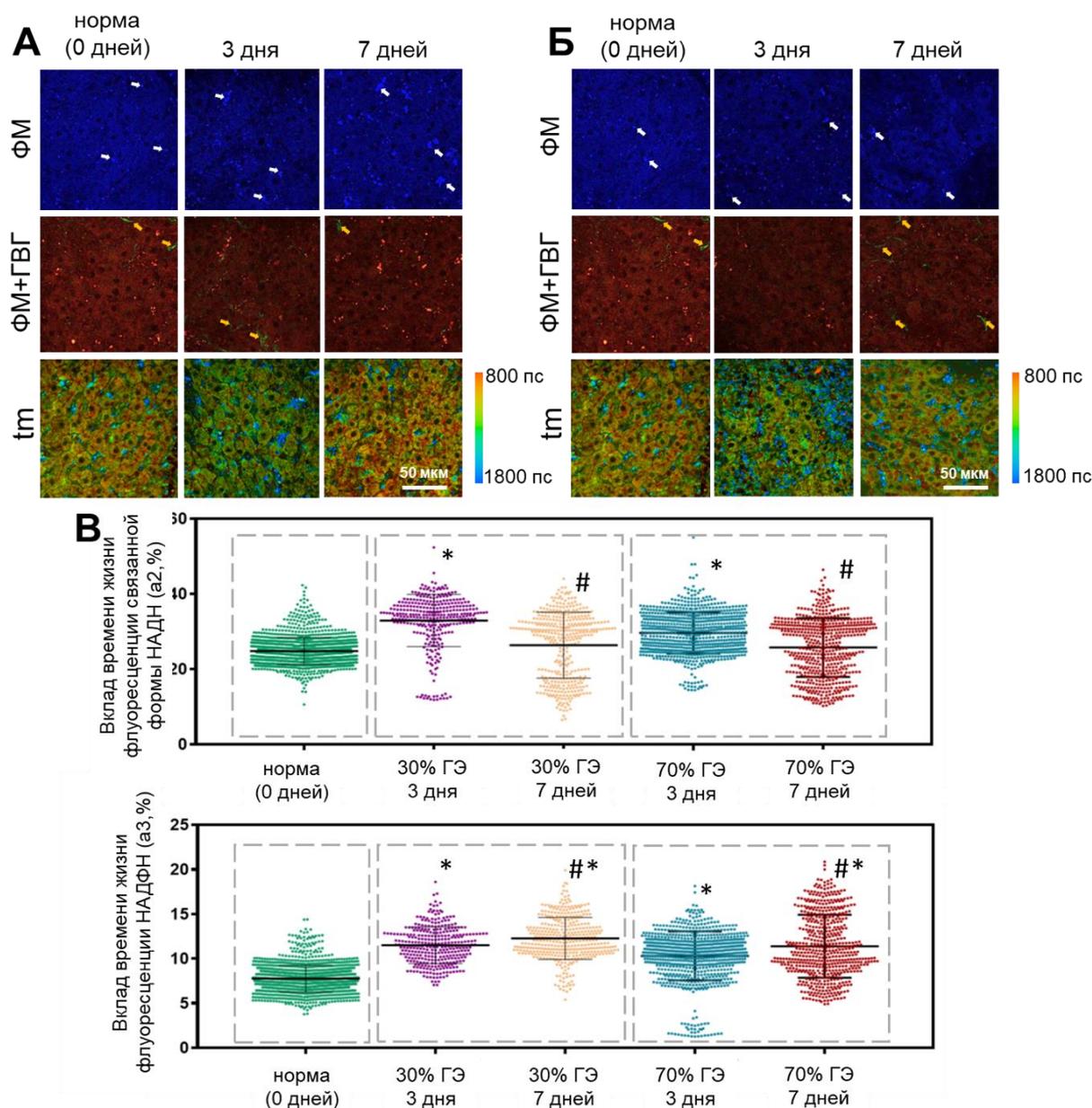


Рисунок 5. Флуоресцентная микроскопия (ФМ), ГВГ микроскопия и FLIM анализ нормальной печени при регенерации. Флуоресцентные изображения при возбуждении флуоресценции НАД(Ф)Н (синий) на длине волны 750 нм; регистрация ГВГ от коллагена (зеленый) и флуоресценции клеток (красный) при возбуждении на длине волны 800 нм (**А**) для 30%ГЭ и (**Б**) 70%ГЭ; FLIM изображения для параметра tm; белыми стрелками обозначены включения витамина А, желтыми стрелками обозначены волокна коллагена; х400. (**В**) Значения вкладов связанной формы НАДН и НАДФН, каждая точка на графике соответствует одному измерению; a2 (%) – вклад связанной формы НАДН; a3 (%) – вклад НАДФН. * - статистически значимые различия по сравнению с нормой; # - статистически значимые различия по сравнению с 3 днем регенерации нормальной печени.

Известно, что увеличение a2 (вклад времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН) свидетельствует об усилении окислительного фосфорилирования (ОКФОСа), а увеличение a3 (вклад времени жизни флуоресценции НАДФН) указывает на усиление интенсивности биосинтетических процессов, таких как липогенез и синтез нуклеиновых кислот (Skala et al., 2007; Blacker et al., 2014). Таким образом показано, что на 3 день регенерации нормальной печени происходит усиление ОКФОСа и биосинтетических процессов.

Значимых отличий в динамике изменения метаболического статуса гепатоцитов для моделей 30% ГЭ и 70% ГЭ выявлено не было, однако результаты морфометрического анализа и

оценки восстановления веса печени показали, что процесс регенерации был более выражен в модели 70% ГЭ. Кроме того, в клинике объем удаляемой печени варьирует от 50 до 80% (в зависимости от индивидуальных анатомических особенностей пациента) и в среднем составляет 65% (Каприн, А. Д. и др., 2016; Pyassov, N. 2020). Таким образом, модель 70% ГЭ является более приближенной к реальной клинической практике. В связи с этим в дальнейшем моделирование регенерации печени при сопутствующей патологии проводилось на модели 70% ГЭ.

Корреляционный анализ

С целью выявления связи между анализируемыми параметрами исходного состояния печени в момент резекции (0 дней) и эффективностью регенераторного процесса был проведен корреляционный анализ на основе критерия Пирсона. Основным параметром, который достоверно отражает эффективность регенерации, является процент восстановления веса печени после ГЭ. Высокую положительную корреляцию с параметром «абсолютный процент восстановления веса печени» показал параметр а3 для обеих моделей ГЭ на 3 и 7 день регенерации (Рисунок 6А). Линейная зависимость параметра а3 в момент резекции и параметра «абсолютный процент восстановления веса печени» подтверждена путем построения диаграммы рассеивания значений данных параметров (Рисунок 6Б).

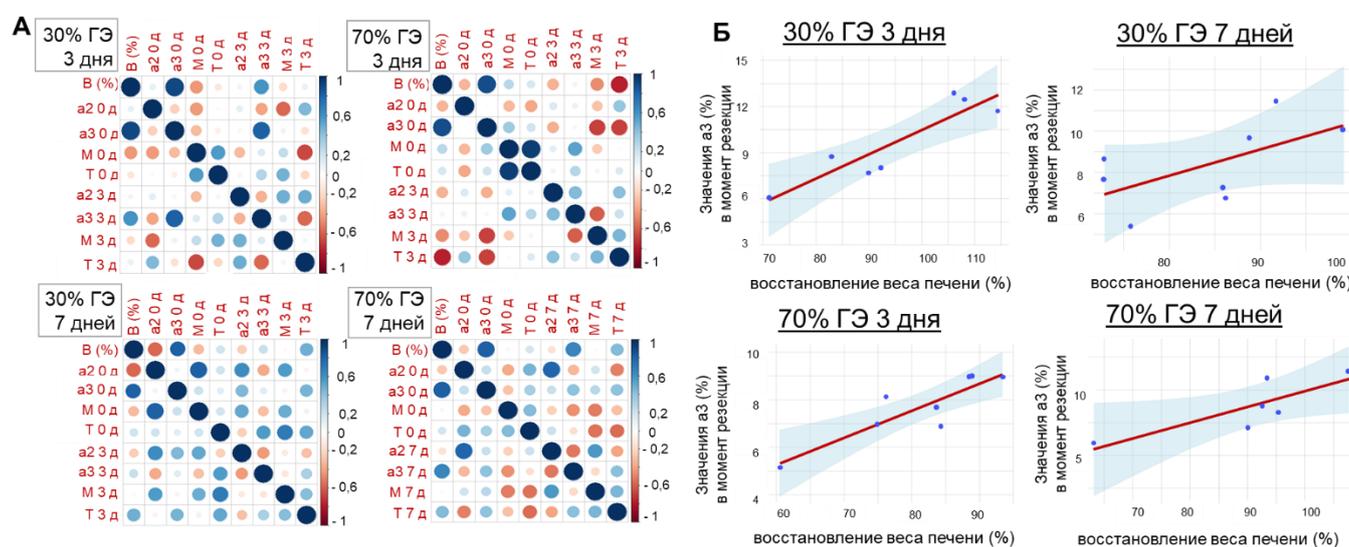


Рисунок 6. (А) Результаты корреляционного анализа всех исследуемых параметров в момент резекции и после индукции регенерации нормальной печени для 30 % и 70% ГЭ; В – процент восстановления веса печени; М – количество митозов; Т – количество тетраплоидных клеток; (Б) Диаграмма рассеивания значений параметра «абсолютный процент восстановления веса печени» относительно значений параметра а3 в момент резекции; голубым цветом изображен доверительный интервал 95% вероятности.

Таким образом, проведенный корреляционный анализ показал, что высокие значения времени жизни флуоресценции НАДФН (а3) в момент резекции являются критерием эффективной регенерации печени.

Микроскопические признаки регенерации нормальной печени: 1. Флуоресцентная микроскопия - равномерное распределение сигнала интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н; 2. ГВГ микроскопия - низкая интенсивность сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена; 3. FLIM микроскопия - резкое увеличение значений вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (а2) и НАДФН (а3) на 3 день регенерации (Рисунок 7).

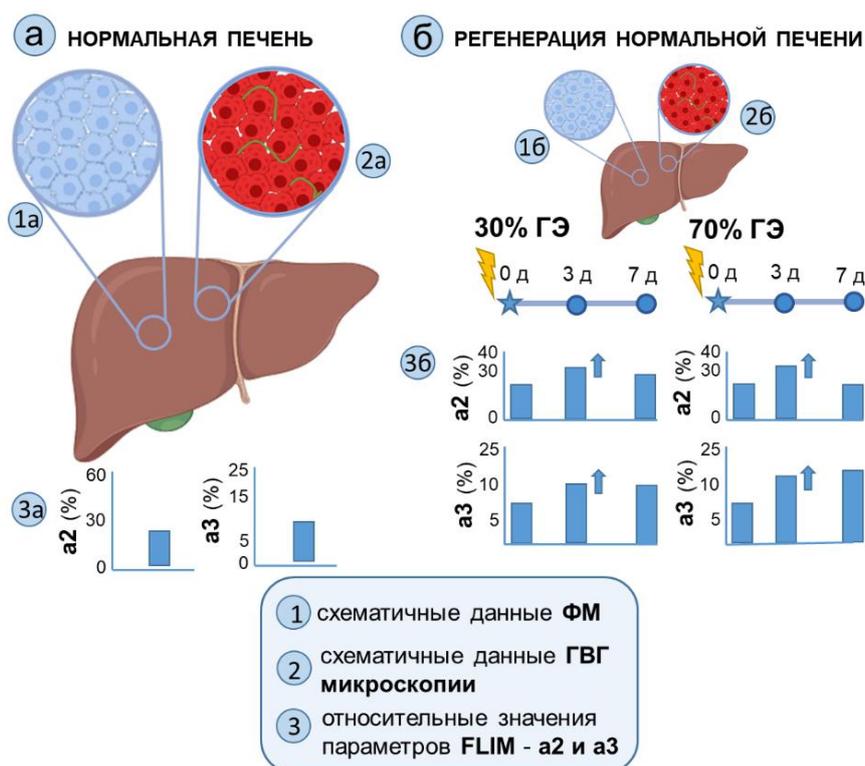


Рисунок 7. Схема. Микроскопические признаки печени в норме (а) и при регенерации (б), полученные в режимах флуоресцентной микроскопии (1), ФГМ микроскопии (2) и FLIM микроскопии (3).

3. Оценка состояния печени при стеатозе и фиброзе

Морфологический анализ структуры печени при индуцированном **стеатозе** на стадии микростеатоза выявил выраженную липидную инфильтрацию гепатоцитов и единичные очаги фиброза. На стадии макростеатоза выявили выраженную липидную инфильтрацию гепатоцитов (липидные капли, смещение ядра гепатоцитов) и единичные очаги фиброза (F0-F1 по шкале Metavir). Для обеих стадий патологии не было выявлено признаков воспаления (Рисунок 10А) (Schuppan, D., 2015; Roehlen, N., et al. 2020)). Архитектура ткани на каждой стадии стеатоза существенно не нарушалась.

При моделировании **фиброза** морфологический анализ выявил типичные патологические изменения. На стадии F1 по Metavir наблюдали портальный фиброз без образования септ. На стадии F2 по Metavir формировались единичные очаги фиброза с единичными септами, и происходило накопление липидных капель в гепатоцитах. На стадии F3 по Metavir (серьезный фиброз) наблюдались очаги воспалительной инфильтрации и выраженный фиброз с множественными септами (Рисунок 11А). Кроме того, на поздних стадиях F2-F3 по Metavir происходило нарушение архитектуры ткани за счет образования фиброзных септ (Рисунок 11А).

Количество митотических и тетраплоидных клеток при **стеатозе** и **фиброзе** значительно снижалось относительно нормы (Рисунке 9).

При **стеатозе** уровни ЩФ, АСТ и АЛТ на всех стадиях патологии были выше нормальных значений. Уровни креатинина и мочевины не превышали нормальных значений на всех сроках наблюдения. Общий белок преимущественно был снижен, что свидетельствовало об ухудшении синтетической функции печени. Биохимические показатели, отражающие липидный обмен, значительно не превышали нормальных значений. При **фиброзе** ЩФ, АСТ и АЛТ имели высокие значения. Уровень мочевины, креатинина и общего белка, биохимические показатели крови, отражающие липидный обмен, не превышали нормальных значений, однако отмечалось незначительное повышение ЛПНП и ЛПВП на стадии F2-F3 по Metavir.

Флуоресцентная микроскопия

В модели **стеатоза** в образцах наблюдались зоны со сниженным сигналом интенсивности НАД(Ф)Н, которые преимущественно были обусловлены зонами высокой липидной инфильтрации, характеризующимися множественными яркими липидными каплями (Рисунок 10А). Интенсивность флуоресценции НАД(Ф)Н в данных зонах была снижена в 3-6 раз относительно печени в норме, что связано со снижением концентрации флуорофора в поврежденных гепатоцитах (Schaefer P. M., et al., 2019). При **фиброзе** наблюдались зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н на стадии F1 по Metavir, данные зоны преимущественно соответствовали единичным фиброзным септам. На стадии F2-F3 по Metavir также наблюдались зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, которые были ассоциированы с множественными фиброзными септами (Рисунок 11А). Интенсивность флуоресценции НАД(Ф)Н в данных зонах была снижена в 3-5 раз относительно печени в норме, что связано с низкой интенсивностью флуоресценции коллагена при возбуждении на длине волны 750 нм (Chen J., et al., 2009).

ГВГ микроскопия

В модели **стеатоза** с использованием ГВГ микроскопии выявлены единичные зоны интенсивного сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена, которые морфологически соответствуют единичным очагам фиброза ($286,4 \pm 24,4$ усл. ед.) (Рисунок 10А). В модели **фиброза** выявлены обширные зоны интенсивного сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена (F1 по Metavir $186,3 \pm 12,1$ усл. ед.; F2-F3 по Metavir $367,1 \pm 15,3$ усл. ед.), которые на стадии F2-F3 по Metavir морфологически соответствуют очагам фиброза с множественными септами (Рисунок 11А).

FLIM микроскопия

При индукции **стеатоза** значения вклада времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a_2 , %) резко снижались на стадии микростеатоза (3 недели). Однако в ходе развития патологии данный показатель увеличивался и на стадии макростеатоза (9 недель) практически достигал значений, соответствующих нормальной печени, однако в дальнейшем снижались (12 недель), что свидетельствовало об уменьшении интенсивности ОКСФОСа в гепатоцитах, вероятно, связанного с развитием митохондриальной дисфункции. Значения вклада времени жизни флуоресценции НАДФН (a_3 , %) на всех стадиях стеатоза были ниже значений для нормальной печени, что может свидетельствовать о снижении синтетической активности гепатоцитов на всех стадиях стеатоза. Результаты представлены на Рисунке 10А, Б.

При **фиброзе** на стадии F1 по шкале Metavir наблюдалось постепенное снижение значений вклада времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a_2 , %) (Рисунок 11А, Б). Такой результат свидетельствует о снижении интенсивности ОКСФОСа в гепатоцитах, что может быть связано с развитием митохондриальной дисфункции. На стадии F2-F3 по Metavir происходил постепенный рост значений a_2 , что может быть следствием реакции ткани печени на хроническое повреждение, ведущее к компенсаторной регенерации и пролиферации гепатоцитов. На стадии F1 по Metavir также происходило резкое снижение вклада НАДФН (a_3 , %), однако на стадии F2-F3 по Metavir (8 недель) значения a_3 возвращались к значениям, соответствующим нормальной печени (Рисунок 11А, Б). Так как НАДФН участвует в реакциях липогенеза и пентозофосфатном пути (Chen, L., et al., 2019), такой результат может свидетельствовать о снижении синтетической активности гепатоцитов на ранних стадиях фиброза. На стадии F2-F3 по Metavir патология переходит в хроническую форму, и происходит активация компенсаторных процессов, таких как активация антиоксидантной системы, в частности, глутатионового цикла, в котором участвует НАДФН.

Микроскопические признаки развития стеатоза: 1. Флуоресцентная микроскопия - зоны со сниженным сигналом интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н, площадь которых постепенно увеличивалась при развитии патологии; 2. ГВГ микроскопия –единичные обширные зоны сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена; 3. FLIM микроскопия - значимое уменьшение значений вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a2) и НАДФН (a3), относительно соответствующих значений в норме (Рисунок 8).

Микроскопические признаки развития фиброза: 1. Флуоресцентная микроскопия - зоны со сниженным сигналом интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н; 2. ГВГ микроскопия – множественные зоны сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена; 3. FLIM микроскопия – на стадии F1 по Metavir показано значимое уменьшение значений вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a2) и НАДФН (a3) относительно соответствующих значений для нормальной печени, на стадии F2-F3 по Metavir значения вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a2) и НАДФН (a3) не отличались от соответствующих значений для нормальной печени (Рисунок 8).

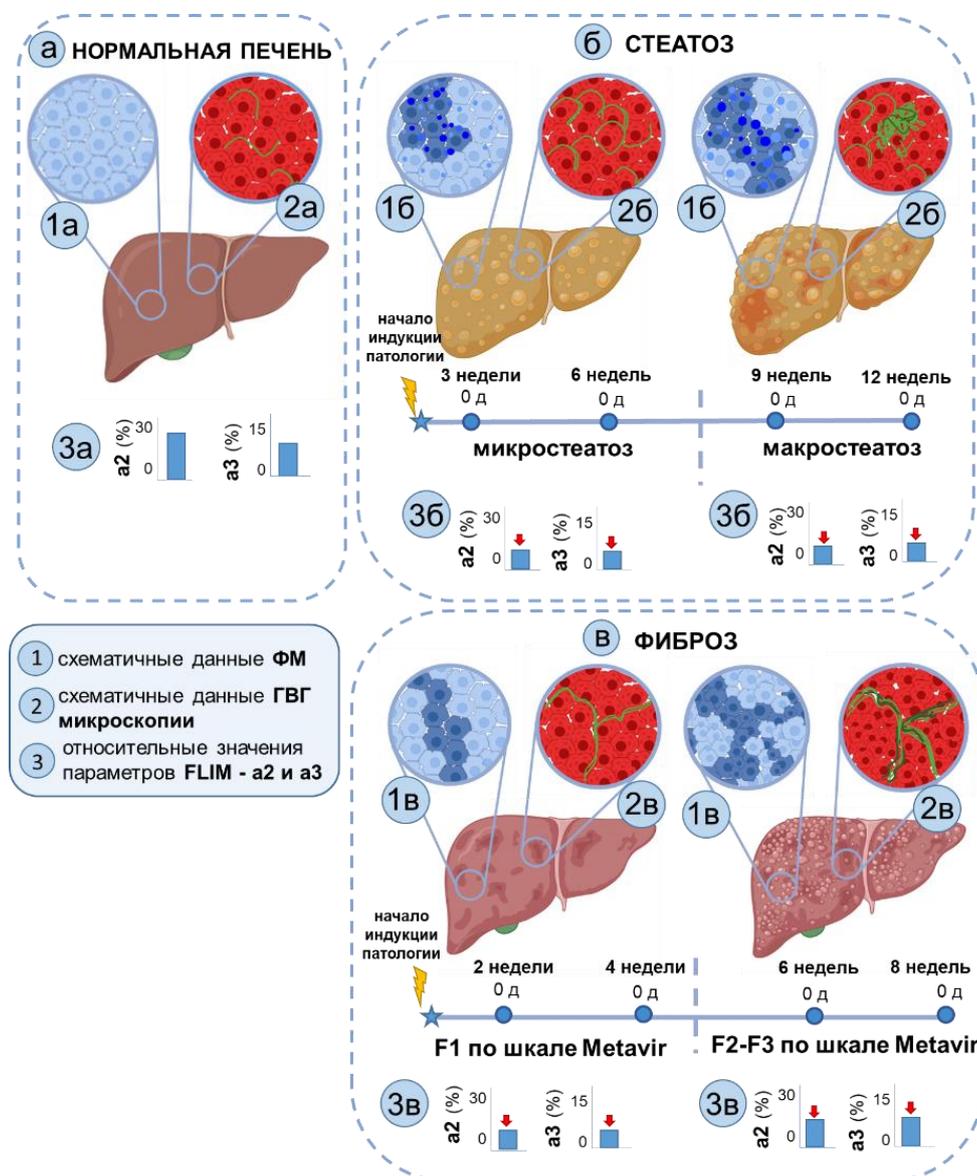


Рисунок 8. Схема. Микроскопические признаки печени в норме (а) и при развитии стеатоза (б) и фиброза (в), полученные в режимах флуоресцентной микроскопии (1), ГВГ микроскопии (2) и FLIM микроскопии (3).

Выявленные микроскопические признаки, характерные для разных стадий индуцированной патологии, коррелируют с гистологическими изменениями на определенных клинических стадиях

патологии, что является актуальным для интраоперационной оценки состояния печени при проведении одноэтапной резекции.

4. Оценка состояния печени при индукции регенерации на фоне сопутствующей патологии

Проведен анализ восстановления веса печени после 70% ГЭ на разных этапах регенерации при стеатозе и фиброзе. При индукции **стеатоза** был выявлен рост абсолютного и относительного процента восстановления веса печени на стадии микростеатоза. Далее на стадии макростеатоза наблюдалось постепенное снижение абсолютного и относительного процента веса печени на 3 и 7 день регенерации, исключение составила временная точка – 6 недель 7 дней. Стоит отметить, что увеличение веса и объема печени на стадии микростеатоза происходит не только за счет деления клеток, но и за счет увеличения липидных капель и коллагена в ткани.

На всех стадиях **фиброза** происходило снижение как абсолютного, так и относительного процента восстановления веса печени, исключение составили временные точки 4 недели 3 дня и 8 недель 3 дня.

Стоит учитывать, что оценка веса печени не позволяет точно оценить регенераторный потенциал печени и не отражает функцию ремнанта печени (Michalopoulos G. K., Bhushan B., 2021).

Морфологический анализ ткани печени при индукции регенерации на всех стадиях **стеатоза** на 3 и 7 день регенерации выявил выраженную липидную инфильтрацию гепатоцитов (Рисунок 10А). После индукции регенерации выявляли нарушение структуры ткани, связанное с несоответствием скорости пролиферации гепатоцитов и скорости восстановления межклеточного вещества.

Процесс регенерации на разных стадиях **фиброза** характеризовался выраженным микровезикулярным стеатозом на 3 и 7 день регенерации (Рисунок 11А). Также было выявлено нарушение дольковой архитектуры при регенерации для всех стадий патологии, что связано со скоплением коллагена, формирующего фиброзные септы.

С развитием **стеатоза** происходило постепенное снижение пролиферативной активности гепатоцитов по сравнению с регенерацией нормальной печени (Рисунок 9А), что является следствием липотоксичности и повреждения гепатоцитов. На ранних стадиях **фиброза** наблюдалось резкое снижение пролиферативной активности гепатоцитов с последующим увеличением количества делящихся гепатоцитов на поздних стадиях (Рисунок 9Б), что может быть связано с появлением областей хронической патологической пролиферацией гепатоцитов (регенераторные узлы), характерных для хронической формы фиброза (Cordero-Espinoza L., Huch M. 2018).

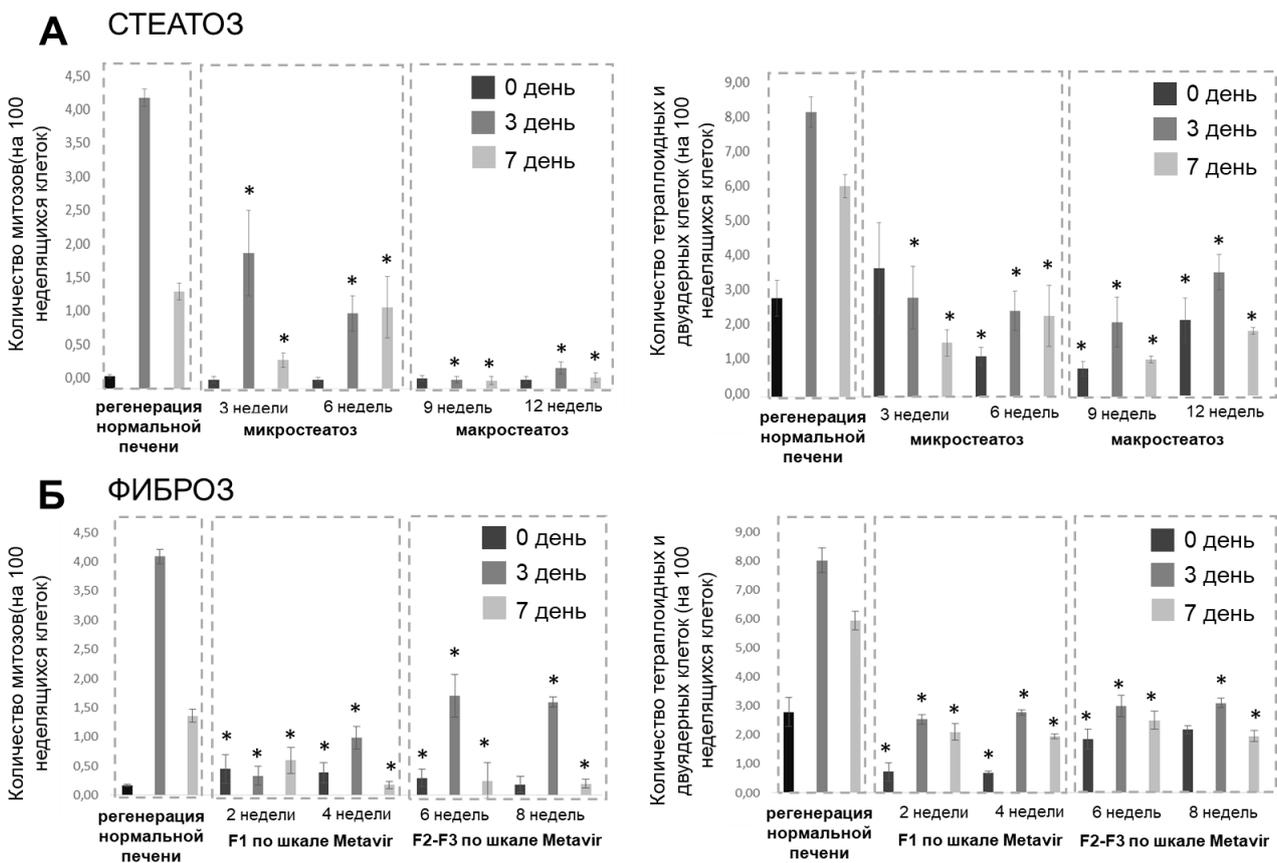


Рисунок 9. Морфометрический анализ ткани печени. На графиках представлены значения количества митотических клеток и количества тетраплоидных и двуядерных клеток при регенерации на разных стадиях (А) стеатоза и (Б) фиброза. Мониторинг проводили на разных стадиях патологии в момент резекции (0 дней) и на 3 и 7 дни регенерации. Данные представлены как $M \pm \sigma$, где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение. * - статистически значимое различие по сравнению с соответствующей временной точкой для регенерации нормальной печени, p -значение $\leq 0,05$.

При индукции регенерации на разных стадиях **стеатоза** уровни ЩФ, АСТ и АЛТ превышали диапазон нормальных значений. Уровни креатинина и мочевины не превышали нормальных значений на всех сроках наблюдения. Общий белок преимущественно был снижен, что свидетельствует об ухудшении синтетической функции печени. Биохимические показатели, отражающие липидный обмен, значительно не превышали нормальных значений.

При индукции регенерации на разных стадиях **фиброза** ЩФ, АСТ и АЛТ имели высокие значения. Уровни мочевины и креатинина преимущественно не выходили за пределы нормальных значений. Уровень общего белка был снижен как на 3, так и 7 день регенерации на каждой стадии патологии, что свидетельствует о нарушении синтетической функции регенерирующей печени. Биохимические показатели, отражающие липидный обмен, были в пределах нормальных значений.

Флуоресцентная микроскопия

При запуске регенерации при **стеатозе** в ткани печени присутствовали зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, которые преимущественно были ассоциированы с зонами высокой липидной инфильтрации (Рисунок 10А). Интенсивность флуоресценции НАД(Ф)Н в данных зонах была снижена в 3-6 раз относительно печени в норме, что связано со снижением концентрации флуорофора в поврежденных гепатоцитах. Наблюдалось нарушение архитектуры ткани. При индуцированном **фиброзе** также выявляли зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, которые преимущественно были ассоциированы с очагами скопления

коллагена (Рисунок 11А). Интенсивность флуоресценции НАД(Ф)Н в данных зонах была снижена в 3-5 раз относительно печени в норме, что связано с низкой интенсивностью флуоресценции коллагена при возбуждении на длине волны 750 нм. Также происходило нарушение дольковой архитектуры ткани, что связано с появлением фиброзных септ и несоответствием скорости пролиферации гепатоцитов и скорости синтеза межклеточного вещества.

На разных стадиях **стеатоза** и **фиброза** до и после индукции регенерации была проведена количественная оценка интенсивности сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н в двух выявленных зонах - в зонах, ассоциированных с поврежденными гепатоцитами, очагами липидной инфильтрацией и очагами фиброза (зоны низкой интенсивности сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н) и в зонах метаболически активных гепатоцитов (зоны высокой интенсивности сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н).

При **стеатозе** отношение интенсивности сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н в обеих выявленных зонах варьировалось от $3,20 \pm 1,76$ у.е. до $6,24 \pm 2,68$ у.е. При **фиброзе** отношение интенсивности сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н в обеих выявленных зонах варьировалось от $2,96 \pm 1,33$ у.е. до $4,49 \pm 2,37$ у.е.

Выявлено постепенное снижение площади зон с высокой интенсивностью сигнала НАД(Ф)Н в процессе развития **стеатоза**, что связано с расширением площади поврежденных гепатоцитов и липидной инфильтрации. В случае **фиброза** также происходит общее снижение площади зон с высоким сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н при прогрессировании патологии.

ГВГ микроскопия

В модели **стеатоза** с применением ГВГ микроскопии выявлены единичные зоны интенсивного сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена ($236,1 \pm 13,9$ усл. ед.), что согласуются с данными морфологического анализа, где были выявлены единичные очаги скопления коллагена (Рисунок 10А). Для модели **фиброза** выявлены обширные зоны интенсивного сигнала второй гармоники (F1 по Metavir $146,3 \pm 12,1$ усл. ед.; F2-F3 по Metavir $271,6 \pm 8,6$ усл. ед.), что также согласовывалось с данными гистологического анализа, где на стадии F2 по Metavir при регенерации были выявлены единичные очаги фиброза, а на стадии F3 по Metavir при регенерации наблюдались многочисленные скопления коллагеновых волокон, формирующие фиброзные септы (Рисунок 11А).

FLIM микроскопия

При индукции регенерации с сопутствующим **стеатозом** на стадии микростеатоза (3 недели) на 3 день регенерации происходило резкое увеличение вклада времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН ($a_2, \%$) и вклада НАДФН ($a_3, \%$) с последующим снижением на 7 день. Такая тенденция аналогична регенерации нормальной печени. Но уже на стадии макростеатоза резкое увеличение значений a_3 на 3 день регенерации отсутствовало. Таким образом, значения a_2 и a_3 до и после ГЭ были практически одинаковыми (Рисунок 10А, Б). Такая тенденция свидетельствует о низкой интенсивности ОКФОСа и биосинтетических процессов в гепатоцитах в связи с развитием митохондриальной дисфункции на поздних стадиях патологии (Mansouri A., et al., 2018).

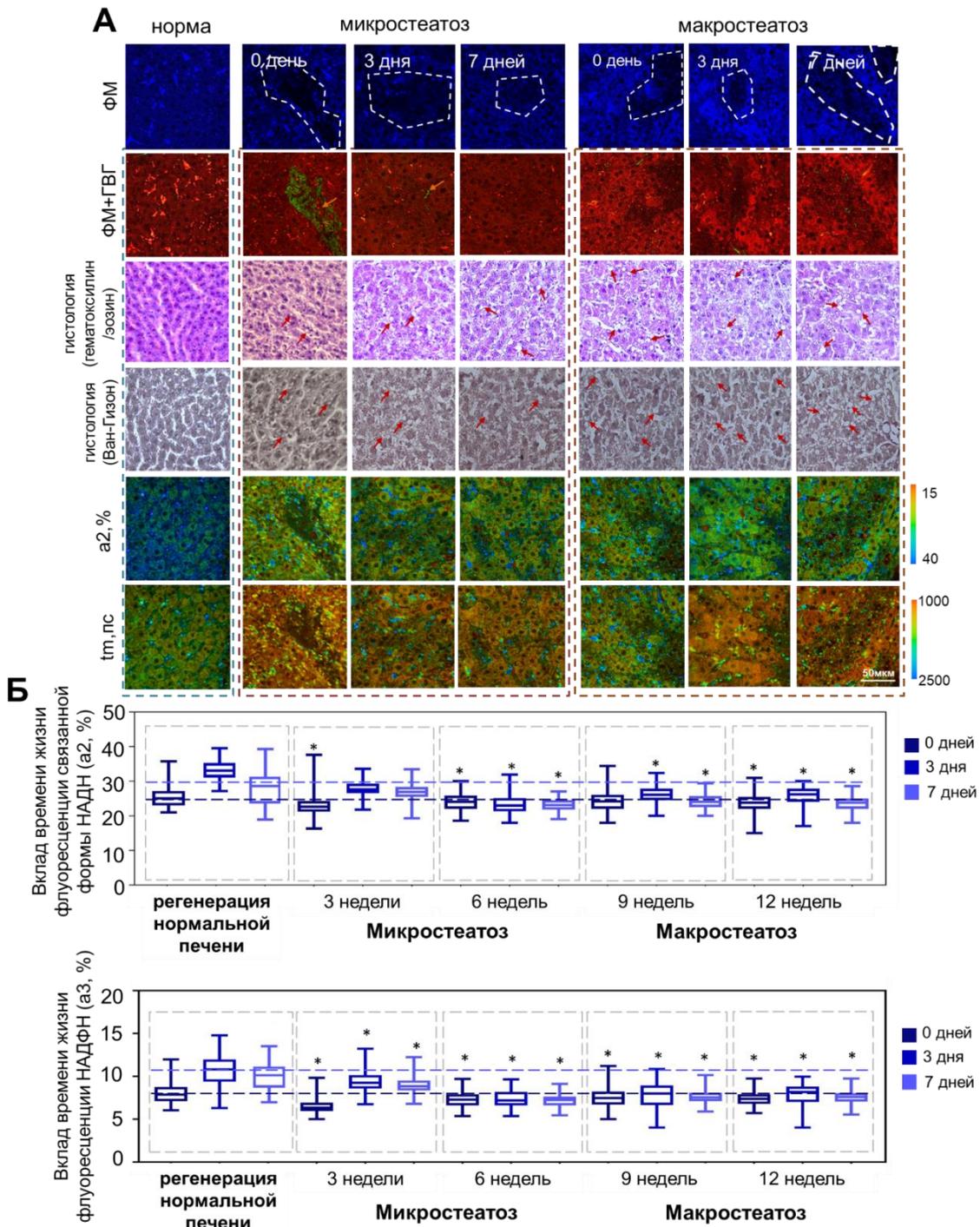


Рисунок 10. Анализ структуры ткани печени и метаболического статуса гепатоцитов на разных стадиях **стеатоза** при регенерации. **(А)** Флуоресцентные изображения НАД(Ф)Н при возбуждении на длине волны 750 нм. Регистрация второй гармоники от коллагена (зеленый цвет) и флуоресценции клеток (красный цвет) при возбуждении на длине волны 800 нм; оранжевые стрелки обозначают коллаген. Гистологические изображения, окраска гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона; красные стрелки указывают на липидные капли в гепатоцитах; FLIM изображения для параметра tm; x400. **(Б)** Значения FLIM параметров a2 и a3 на разных этапах регенерации при стеатозе. Пунктирной линией обозначены медианы значений a2 и a3 для регенерации нормальной печени на 0 и 3 дни. *- статистически значимые различия по сравнению с соответствующим этапом регенерации нормальной печени.

При индукции регенерации при **фиброзе** на стадии F1 по Metavir значения a2 и a3 до и после ГЭ практически не изменялись. На стадии F2-F3 по Metavir такая тенденция сохранялась для параметра a2, что свидетельствует о низкой интенсивности ОКФОСа в гепатоцитах, в связи с

развитием митохондриальной дисфункции. Однако на данной стадии патологии происходило увеличение значений параметра a_3 на 3 день регенерации с последующим снижением на 7 день (Рисунок 11А, Б), что соотносится с запуском компенсаторных процессов на поздних стадиях фиброза (Aydin M.M., Akçalı K. C., 2018; Kumar S. et al., 2021). На всех стадиях фиброза выявляли гепатоциты, у которых значения параметров FLIM резко отличались от основной массы клеток. Такие гепатоциты находились в областях патологической пролиферации и не включались в анализ данных FLIM микроскопии.

Связанная форма НАДН и НАДФН участвует в реакциях ОКФОСа и биосинтетических процессах. Таким образом отсутствие скачка значений параметра a_2 и a_3 указывает на повреждение гепатоцитов, что коррелирует с результатами морфологического и морфометрического анализа печени при стеатозе и фиброзе.

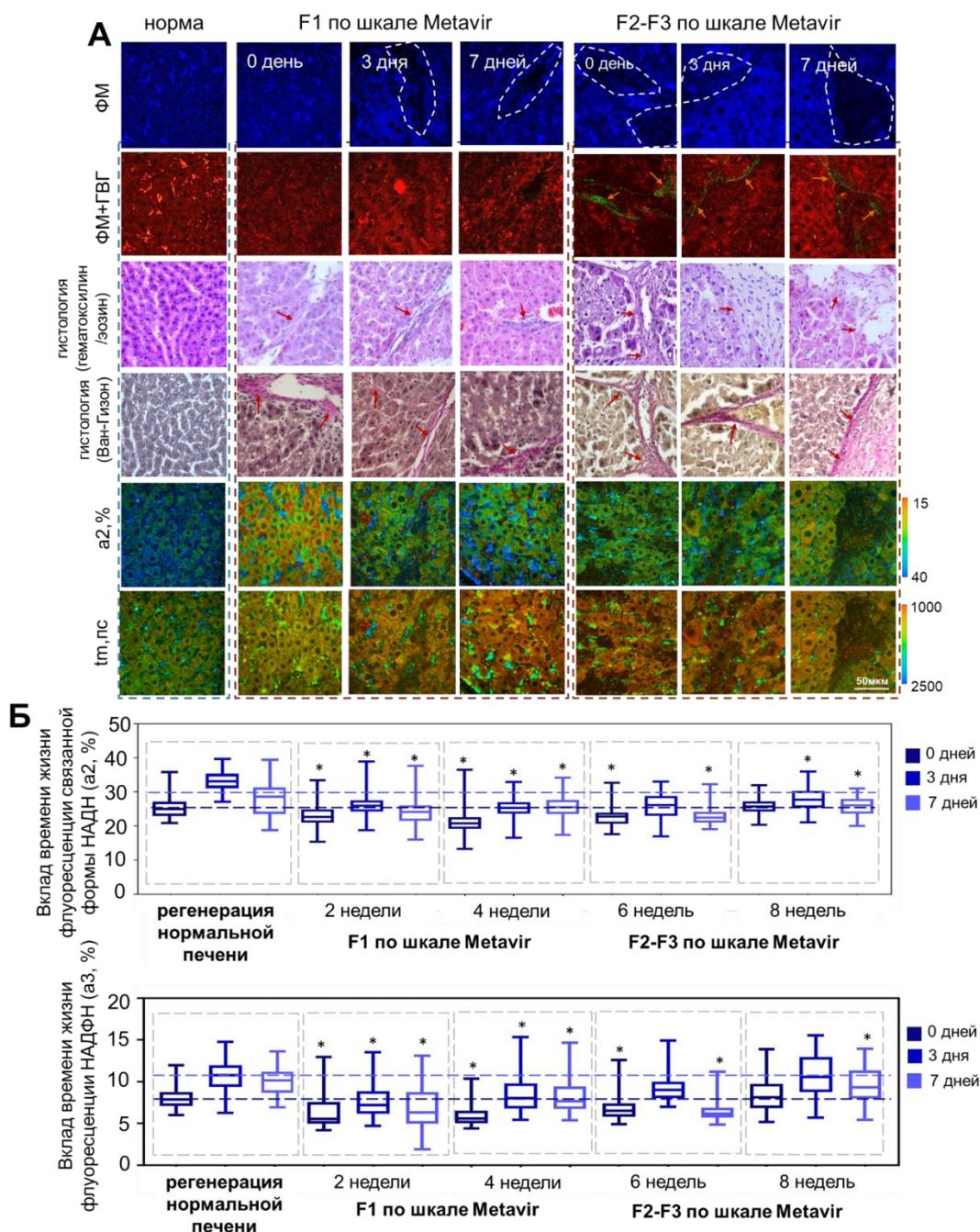


Рисунок 11. Анализ структуры ткани печени и метаболического статуса гепатоцитов на разных стадиях фиброза при регенерации. (А) Флуоресцентные изображения НАД(Ф)Н при возбуждении на длине

волны 750 нм. Регистрация второй гармоники от коллагена (зеленый цвет) и флуоресценции клеток (красный цвет) при возбуждении на длине волны 800 нм; оранжевые стрелки обозначают коллаген. Гистологические изображения, окраска гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона; красные стрелки указывают на коллаген; FLIM изображения для параметра t_m ; $\times 400$. **(Б)** Значения FLIM параметров a_2 и a_3 на разных этапах регенерации при фиброзе. Пунктирной линией обозначены медианы значений a_2 и a_3 для регенерации нормальной печени на 0 и 3 дни. *- статистически значимые различия по сравнению с соответствующим этапом регенерации нормальной печени.

Таким образом, с применением FLIM микроскопии было показано, что на поздних стадиях стеатоза и фиброза метаболический статус гепатоцитов при регенерации не соответствует условиям для осуществления эффективной регенерации, а именно не происходит роста значений вкладов связанной формы НАДН и НАДФН на 3 день регенерации, что удовлетворяло бы энергетическим потребностям гепатоцитов.

Микроскопические признаки снижения регенераторного потенциала печени при стеатозе:

1. Флуоресцентная микроскопия – зоны со сниженным сигналом интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н, площадь зон увеличивалась при развитии патологии; 2. ГВГ микроскопия – единичные обширные зоны сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена; 3. FLIM микроскопия – отсутствие резкого увеличения значений вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a_2) и НАДФН (a_3) на 3 день регенерации на всех стадиях патологии (Рисунок 12).

Микроскопические признаки снижения регенераторного потенциала печени при фиброзе:

1. Флуоресцентная микроскопия – зоны со сниженным сигналом интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н, площадь зон увеличивалась при развитии патологии; 2. ГВГ микроскопия – множественные зоны сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена; 3. FLIM микроскопия – отсутствие резкого увеличения значений вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a_2) и НАДФН (a_3) на 3 день регенерации на стадии F1 по Metavir, с последующим ростом значений a_3 на 3 день регенерации на стадиях F2-F3 по Metavir (Рисунок 12).

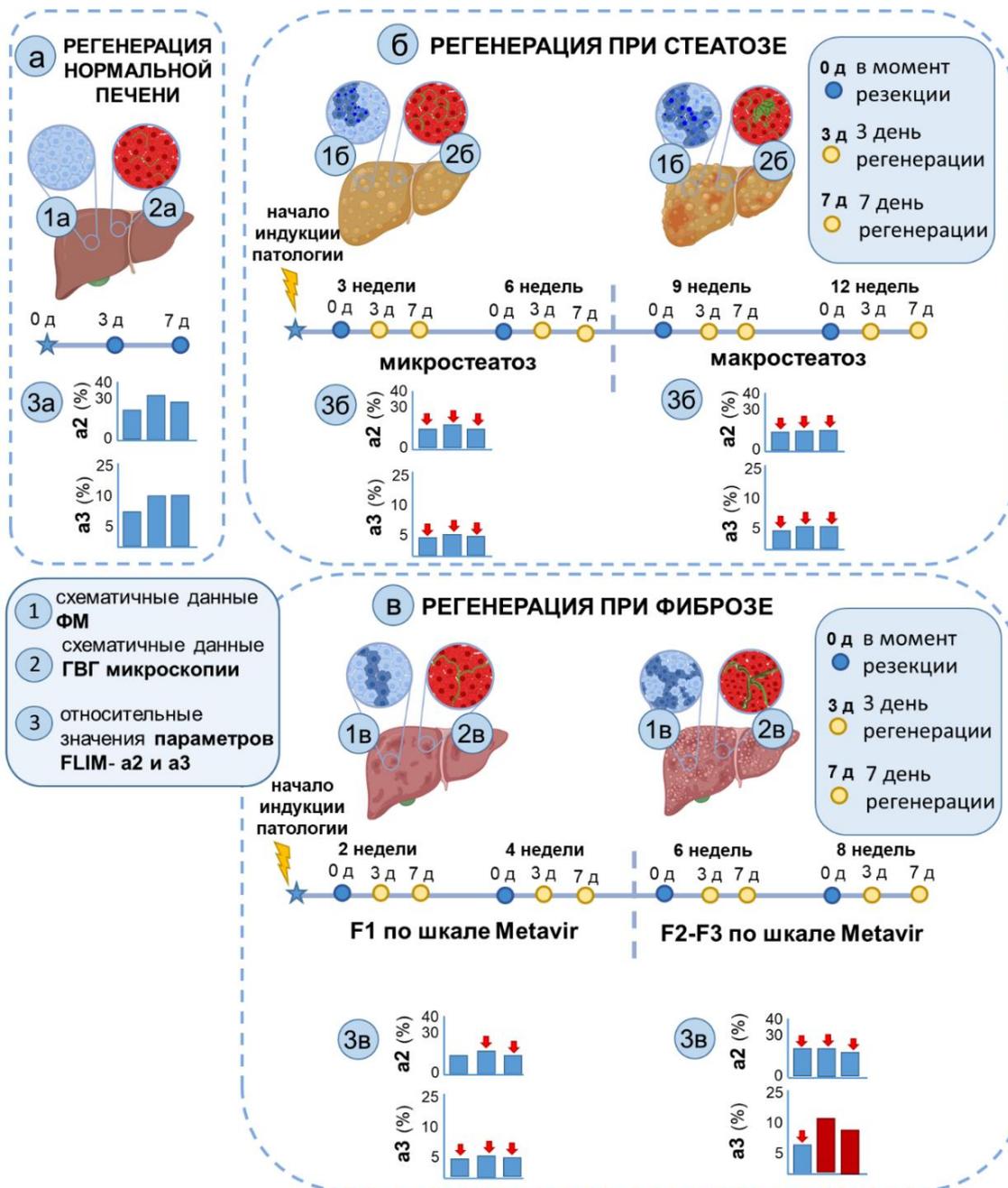


Рисунок 12. Схема. Микроскопические признаки печени при регенерации в норме (а) и на фоне сопутствующего стеатоза (б) и фиброза (в), полученные в режимах флуоресцентной микроскопии (1), ГВГ микроскопии (2) и FLIM микроскопии (3).

Полученные с использованием FLIM микроскопии признаки позволят прогнозировать эффективность регенерации печени на фоне сопутствующей патологии, что актуально для интраоперационной оценки состояния печени на втором этапе двухэтапной резекции печени.

При достаточном развитии технологии все выявленные микроскопические признаки, полученные с использованием МФМ, включающей флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию, могут быть использованы для интраоперационной оценки состояния печени и определения степени патологии.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика оценки состояния печени на основе многофотонной микроскопии, включающей флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию.

2. Выявлены характерные для печени показатели в норме и при регенерации. В режиме флуоресцентной микроскопии показано равномерное распределение сигнала интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н. В режиме ГВГ микроскопии выявлен низкий сигнал второй гармоники от фибрилл коллагена. В режиме FLIM микроскопии показана ключевая роль для успешной регенерации высоких значений вклада времени жизни флуоресценции НАДФН (а3) ($7,8 \pm 2$ %) в момент резекции и резкого увеличения значений вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (а2) ($33,9 \pm 3$ %) и НАДФН (а3) ($14,5 \pm 1$ %) на 3 день регенерации.

3. Выявлены характерные показатели для патологии печени. При стеатозе в режиме флуоресцентной микроскопии - зоны со сниженным сигналом интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н (в 3-6 раз) (липидная инфильтрация). В режиме ГВГ микроскопии - единичные зоны сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена (микростеатоз 141 -274 усл. ед.; макростеатоз 238 -376 усл. ед.). В режиме FLIM микроскопии - уменьшение значений а2 (микростеатоз 22-24 %; макростеатоз 24,3 %) и а3 (микростеатоз 6,5-7,3 %; макростеатоз 7,2-7,5 %) относительно соответствующих значений в норме. При фиброзе в режиме флуоресцентной микроскопии выявлены зоны со сниженным сигналом интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н (в 3-5 раз) (скопления коллагена). В режиме ГВГ микроскопии - множественные зоны сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена (F1 по шкале Metavir 219 – 439 усл. ед.; F2-F3 по шкале Metavir 240 – 467 усл. ед.). В режиме FLIM микроскопии на ранней стадии показано уменьшение значений а2 (F2-F3 по Metavir 23,1-25,7 %) и а3 (F2-F3 по Metavir 7-8,4 %) по сравнению с нормой, однако на поздней стадии значения а2 (микростеатоз 24,4-27,9 %; макростеатоз 24,2-26,5 %) и а3 (микростеатоз 7,4-9,5 %; макростеатоз 7,6-8,3 %) не отличались от соответствующих значений в норме.

4. Выявлены характерные показатели для регенерации печени на фоне сопутствующей патологии. Показатели, полученные в режимах флуоресцентной микроскопии и ГВГ микроскопии, определялись только стадией патологии. Тогда как в режиме FLIM микроскопии были выявлены характерные изменения при регенерации: при стеатозе на всех стадиях патологии показано отсутствие резкого увеличения значений а2 (микростеатоз 24,4-27,9 %; макростеатоз 24,2-26,5 %) и а3 (микростеатоз 7,4-9,5 %; макростеатоз 7,6-8,3 %) на 3 день регенерации, при фиброзе показано отсутствие резкого увеличения только значений а2 (F1 по Metavir 25,2-26,2 %; F2-F3 по Metavir 27,2-28,7 %) на 3 день регенерации на всех стадиях патологии. Однако для а3 (F1 по Metavir 8,6-8,7 %; F2-F3 по Metavir 10,8-11 %) такая тенденция наблюдалась только на ранних стадиях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Родимова, С. А.,** Кузнецова, Д. С., Бобров, Н. В., Вдовина, Н. В., Загайнов, В. Е., & Загайнова, Е. В. (2019). Современные методы оценки восстановительного потенциала печени после ее резекции (обзор). *Современные технологии в медицине*, 11(4), 175-190.
2. Kuznetsova, D. S., **Rodimova, S. A.,** Gulin, A., Reunov, D., Bobrov, N., Polozova, A. V., ... & Zagaynova, E. V. (2019). Metabolic imaging and secondary ion mass spectrometry to define the structure and function of liver with acute and chronic pathology. *Journal of biomedical optics*, 25(1), 014508 (Q1).
3. **Rodimova, S.,** Kuznetsova, D., Bobrov, N., Elagin, V., Shcheslavskiy, V., Zagainov, V., & Zagaynova, E. (2020). Mapping metabolism of liver tissue using two-photon FLIM. *Biomedical Optics Express*, 11(8), 4458-4470 (Q1).
4. **Родимова, С. А.,** Кузнецова, Д. С., Бобров, Н. В., Гулин, А. А., Васин, А. А., Губина, М. В., ... & Загайнова, Е. В. (2021). Мультифотонная микроскопия и масс-спектрометрия в прижизненном выявлении метаболической гетерогенности гепатоцитов. *Современные технологии в медицине*, 13(2), 18-31.
5. **Rodimova, S. A.,** Kuznetsova, D. S., Bobrov, N. V., Gulin, A. A., Reunov, D. G., Karabut, M. M., ... & Zagaynova, E. V. (2021). Interrogation of the Liver During Regeneration by Fluorescence Lifetime Imaging and Mass Spectrometry. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 27(4), 1-11 (Q1).
6. **Rodimova, S.,** Elagin, V., Karabut, M., Koryakina, I., Timin, A., Zagainov, V., ... & Kuznetsova, D. (2021). Toxicological Analysis of Hepatocytes Using FLIM Technique: In Vitro versus Ex Vivo Models. *Cells*, 10(11), 2894 (Q1).
7. **Rodimova, S.,** Bobrov, N., Mozherov, A., Elagin, V., Karabut, M., Shchechkin, I., ... & Kuznetsova, D. (2023). Optical Biomedical Imaging Reveals Criteria for Violated Liver Regenerative Potential. *Cells*, 12(3), 479 (Q1).
8. **Rodimova, S.,** Mozherov, A., Elagin, V., Karabut, M., Shchechkin, I., Kozlov, D., ... & Kuznetsova, D. (2023). Label-Free Imaging Techniques to Evaluate Metabolic Changes Caused by Toxic Liver Injury in PCLS. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9195 (Q1).
9. **Rodimova, S.,** Mozherov, A., Elagin, V., Karabut, M., Shchechkin, I., Kozlov, D., ... & Kuznetsova, D. (2023). Effect of Hepatic Pathology on Liver Regeneration: The Main Metabolic Mechanisms Causing Impaired Hepatic Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9112 (Q1).
10. **Rodimova S.,** Bobrov N., Mozherov A., Elagin V., Karabut M., Ermakova P., Shchechkin I., Kozlov D., Krylov D., Gavrina A., Kashina A., Zagainov V., Zagaynova E., Kuznetsova D. (2023). The Effect of Diabetes Mellitus Type 1 on the Energy Metabolism of Hepatocytes: Multiphoton Microscopy and Fluorescence Lifetime Imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), 17016 (Q1).
11. **Rodimova S.,** Kozlov D., Krylov D., Mikhailova L., Kozlova V., Gavrina A., Mozherov A., Elagin V., Kuznetsova D. Nanoparticles for Creating a Strategy to Stimulate Liver Regeneration. *Современные технологии в медицине*, 6(3), с. 5-16, 2024.

Тезисы конференций

1. **Родимова С. А.,** Кузнецова Д. С., Дуденкова, В. В., Бобров Н. В., Вдовина Н. В., Загайнова Е. В. Исследование структурно-функционального состояния гепатоцитов в норме и при индуцированном холестазах методами мультифотонной микроскопии // Научные труды XXIII Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические науки) 2018. С. 151-152.
2. **Родимова С. А.,** Кузнецова Д. С., Бобров Н. В., Реунов Д. Г., Вдовина Н. В., Загайнов В. Е., Загайнова Е. В. Метаболический имиджинг печени в процессе регенерации // Научные труды VI Съезда биохимиков России 2019. С. 286.
3. **Родимова С. А.,** Кузнецова Д. С., Реунов Д. Г., Бобров Н. В., Вдовина Н. В., Загайнов В. Е., Загайнова Е. В. Исследование структурно-функционального состояния гепатоцитов в процессе печеночной регенерации // Сборник научных трудов VI Съезда Биофизиков России 2019. С. 244-245.
4. **Rodimova S.A.,** Kuznetsova D.S., Bobrov N.V., Reunov D.G., Vdovina N.V., Zagainov V.E., Zagaynova E.V. Metabolic imaging of hepatocytes during liver regeneration by multiphoton microscopy // VII International symposium Topical Problems of Biophotonics 2019. P. 176-177.
5. **Rodimova S.A.,** Kuznetsova D.S., Bobrov N.V., Reunov D.G., Zagainov V.E., Zagaynova E.V. Multiphoton microscopy and FLIM analysis of liver structure and function during regeneration// TERMIS European Chapter Meeting 2019. P. 1675.
6. **Rodimova S.A.,** Reunov D.G., Kalabusheva E., Dashinimaev E., Meleshina A.V. Metabolic imaging of IPS cells during dermal differentiation // TERMIS European Chapter Meeting 2019. P. 1674.
7. **Родимова С. А.,** Дуденкова В. В., Бобров Н. В., Кузнецова Д. С. Исследование структурно-функционального состояния гепатоцитов в норме и при индуцированном холестазах методами мультифотонной микроскопии // Научные труды 72-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» 2019. С. 182.
8. **Родимова С.А.,** Дуденкова В.В., Бобров Н.В., Кузнецова Д. С. Мультифотонная микроскопия печени крыс в норме и при индуцированном холестазах: структурно-функциональные особенности // Сборник научных трудов V Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience» 2019. С. 458-459.
9. **Родимова С.А.,** Кузнецова Д. С., Бобров Н. В., Реунов Д. Г., Вдовина Н. В., Загайнов В. Е., Загайнова Е. В. Метаболический имиджинг печени в процессе регенерации // Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине 2019. С. 196.
10. Загайнова Е. В., Кузнецова Д. С., **Родимова С. А.,** Реунов Д. Г., Гулин А. А., Бобров Н. В., Вдовина Н. В., Загайнов В. Е. Разработка нового способа интраоперационной оценки регенераторного потенциала печени на основе мультипараметрического имиджинга // Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине 2019. С. 94.
11. **Родимова С.А.,** Кузнецова Д.С., Дуденкова В.В., Бобров Н.В., Вдовина Н.В., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В. Метаболический имиджинг ткани печени в процессе нормальной регенерации //Сборник научных трудов VII Троицкой конференции с международным участием 2020. С. 213-214.
12. Кузнецова Д.С., Елагин В.В., **Родимова С.А.,** Минаев Н.В., Шпичка А.И., Карабут М.М., Загайнова Е.В., Тимашев П.С. Метаболизм стволовых клеток на гетерогенных тканеинженерных конструкциях// Сборник научных трудов VII Троицкой конференции с международным участием 2020. С. 206-208.

13. **Rodimova S.A.**, Kuznetsova D.S., Bobrov N.V., Vadim E.V., Shcheslavskiy V.I., Zagainov V.E., Zagaynova E.V. Determination of the correct conditions for the analysis of the metabolic status of liver tissue using multiphoton microscopy // 15th annual meeting of the European Society for Molecular Imaging – ESMI, European Molecular Imaging Meeting 2020.
14. **Родимова С.А.**, Кузнецова Д.С., Бобров Н.В., Вдовина Н.В. Комплексный анализ структурно-функционального состояния ткани печени при регенерации // Сборник научных трудов VI Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience» 2020. С. 76-78.
15. **Родимова С. А.**, Кузнецова Д. С., Дуденкова В. В., Бобров Н. В., Гулин А. А., Щеславский В. И., Вдовина Н. В., Загайнов В. Е., Загайнова Е. В. Исследование структурно-функционального состояния ткани печени в процессе нормальной регенерации // сборник научных трудов 25-ой Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические, гуманитарные науки) 2020.
16. **Родимова С.А.**, Аюпова А.И., Вдовина Н.В. Метаболический имиджинг ткани печени при индуцированном стеатозе// Сборник научных трудов VI Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience» 2020. С. 78-80.
17. **Rodimova S.A.**, Kuznetsova D.S., Bobrov, Elagin V.V., Shcheslavskiy V.I., Zagainov V.E., Zagaynova E.V. Determination of the correct conditions for the analysis of the metabolic status of liver tissue using multiphoton microscopy// Sechenov International Biomedical Summit 2020. P. 20.
18. **Rodimova S.**, Elagin V., Minaev N., Shpichka A., Karabut M., Timashev P., Zagaynova E., Kuznetsova D. Influence of scaffold structural heterogeneity on stem cell metabolism // Sechenov International Biomedical Summit 2020. P. 20.
19. **Родимова С.А.**, Кузнецова Д.С., Дуденкова В.В., Бобров Н.В., Вдовина Н.В., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В. Комплексный анализ структурно-функционального состояния ткани печени при регенерации// сборник научных трудов 73-ей Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» 2020. С. 178.
20. Kuznetsova D. S., **Rodimova S. A.**, Bobrov N. V., Gulin A. A., Shcheslavskiy V. I., Zagainov V. E., Zagaynova E.V. Metabolic imaging and secondary ion mass spectrometry to investigate liver structure and function during regeneration. SPIE BiOS 2021.
21. **Родимова С.А.**, Кузнецова Д. С., Бобров Н. В., Гулин А. А., Загайнов В. Е., Загайнова Е. В. Исследование структурно-функционального состояния ткани печени в процессе регенерации методами мультифотонной микроскопии и масс-спектрометрии // Сборник научных трудов VII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience» 2021.
22. **Родимова С.А.**, Елагин В.В., Тимашев П. С., Загайнова Е. В., Кузнецова Д. С. Влияние структурной гетерогенности скаффолдов на эффективность остеогенной дифференцировки стволовых клеток // Сборник научных трудов VII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience». 2021.
23. **Родимова С.А.**, Кузнецова Д. С., Бобров Н. В., Гулин А. А., Елагин В. В., Карабут М. М., Щеславский В. И., Загайнов В. Е., Загайнова Е. В. Метаболический статус гепатоцитов в норме и в процессе печеночной регенерации // Сборник научных трудов 74-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2021.
24. Щечкин И.Д., **Родимова С.А.**, Бобров Н.В., Крылов Д.П., Козлов Д.С., Елагин В.В., Карабут М.М., Можеров А.М., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В., Кузнецова Д.С. «FLIM imaging of pathological liver during regeneration»// сборник научных трудов 29-ой Международной конференции по передовым лазерным технологиям (ALT'22), 2022. С. 96.
25. Кузнецова Д.С., **Родимова С.А.**, Бобров Н.В., Щечкин И.Д., Крылов Д.П., Козлов Д.С., Елагин В.В., Карабут М.М., Можеров А.М., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В. "Метаболический имиджинг как инструмент для анализа регенераторного потенциала и патологии печени" // Сборник научных трудов III Объединенного научного форума, включающего VII Съезд физиологов, VII Съезд биохимиков России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды», 2022, Т.1. С.76.
26. **Родимова С. А.**, Кузнецова Д. С., Бобров Н. В., Елагин В. В., Карабут М. М., Гулин А. А., Щеславский В. И., Загайнов В. Е., Загайнова Е. В. «Исследование метаболического статуса гепатоцитов в норме и в процессе регенерации методами мультифотонной микроскопии» // Сборник научных трудов III Объединенного научного форума, включающего VII Съезд физиологов, VII Съезд биохимиков России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды», 2022, Т.3. С.76.
27. **Родимова С.А.**, Бобров Н.В., Щечкин И.Д., Крылов Д.П., Козлов Д.С., Елагин В.В., Карабут М.М., Можеров А.М., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В., Кузнецова Д.С. «Метаболический имиджинг ткани печени в процессе регенерации при наличии сопутствующих печеночных патологий» // Сборник научных трудов V Национального конгресса по регенеративной медицине, 2022, Т. 17, № 3, С. 198.
28. **Родимова С.А.**, Бобров Н.В., Щечкин И.Д., Крылов Д.П., Козлов Д.С., Елагин В.В., Карабут М.М., Можеров А.М., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В., Кузнецова Д.С. «Новые оптические критерии сниженного регенераторного потенциала печени при патологии» // Сборник научных трудов Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием Фундаментальная и прикладная медицина "Biomeeting", 2022.
29. **Родимова С.А.**, Бобров Н.В., Щечкин И.Д., Крылов Д.П., Козлов Д.С., Елагин В.В., Карабут М.М., Можеров А.М., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В., Кузнецова Д.С. «Метаболический имиджинг ткани печени в процессе регенерации при сопутствующей патологии» // Сборник научных трудов VII Съезда биофизиков России, 2023, Т. 1, С. 318.
30. **Rodimova, S.A.**, Elagin, V.V., Mozherov, A.M., Shchekhin, I.D., Krylov, D.P., Kozlov, D.S., Karabut, M.M., Gavrina, A.I., Bobrov, N.V., Zagainov, V.E., Zagaynova, E.V., Kuznetsova, D.S. «Biomedical metabolic imaging revealed new criteria for reducing the regenerative potential of the liver» // сборник научных трудов 29-ой Международной конференции по передовым лазерным технологиям (ALT'23), 2023. С.117.
31. **Rodimova, S.A.**, Mozherov, A.M., Shchekhin, I.D., Krylov, D.P., Kozlov, D.S., Zyuzin, M.V., Kuznetsova, D.S. «Fluorescent intravital bioimaging to analyze nanoparticles cytotoxicity and biodistribution using tissue slices» // сборник научных трудов 17 International conference on laser application in life sciences (LALS'23), 2023. С.64.
32. **Rodimova, S.A.**, Elagin, V.V., Mozherov, A.M., Karabut M.M., Gavrina A.I., Bobrov N.V., Zagainov V.E., Zagaynova E.V., Kuznetsova, D.S. « Optical Criteria of the Pathological Liver during the Regeneration»// сборник научных трудов 18 International conference on laser application in life sciences (LALS'24), 2024. С.72.
33. **Родимова С.А.**, Елагин В.В., Можеров А.М., Щечкин И.Д., Крылов Д.П., Козлов Д.С., Гаврина А.И., Бобров Н.В., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В., Кузнецова Д.С. «Новые оптические признаки снижения регенераторного потенциала печени при патологии» //Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине, 2024, С. 851.