

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский  
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации



*На правах рукописи*

Родимова Светлана Алексеевна

**Флуоресцентная, ГВГ и FLIM микроскопия печени при патологии и  
регенерации**

1.5.2 - биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.м.н., чл.-корр. РАН,  
Загайнова Елена Вадимовна

Нижний Новгород – 2025

## Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1 Обзор литературы .....	12
1.1. Особенности регенерации печени.....	12
1.2. Регенерация печени при патологии .....	18
1.2.1. Стеатоз печени .....	19
1.2.2. Фиброз печени .....	22
1.3. Стандартные методы визуализации печени .....	24
1.4. Стандартные методы оценки пролиферативной активности гепатоцитов .....	26
1.5. Стандартные методы оценки функции печени .....	27
1.5.1. Биохимический анализ крови.....	27
1.5.2. Клиренс-тесты .....	27
1.6. Особенности кофактора НАД(Ф)Н и его участие в энергетическом метаболизме клеток .....	28
1.7. Многофотонная микроскопия.....	32
1.8. Генерация второй оптической гармоники .....	35
1.9. FLIM микроскопия.....	37
ГЛАВА 2. Материалы и методы.....	43
2.1. Объекты исследования.....	43
2.2. Методы и методики исследования .....	44
2.2.1. Животные модели.....	44
2.2.2. Морфологический и морфометрический анализ ткани печени .....	46
2.2.3. Биохимический анализ крови .....	47
2.2.4. Оценка восстановления веса печени .....	47
2.2.5. Многофотонная микроскопия в режимах флуоресцентной микроскопии, ГВГ микроскопии и FLIM микроскопии .....	48
2.2.6. Корреляционный анализ анализируемых параметров состояния печени .....	50
2.2.7. Статистический анализ .....	50
ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение .....	51
3.1. Разработка методики оценки состояния печени.....	51

3.1.1. Характеристики нормальной печени при исследовании стандартными методами .....	51
3.1.2. Флуоресцентная микроскопия .....	54
3.1.3. ГВГ микроскопия .....	54
3.1.4. Определение оптимальных условий для исследования ex vivo образцов печени с применением многофотонной микроскопии в разных режимах .....	54
3.1.5. Подбор адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н .....	57
3.1.6. FLIM микроскопия .....	59
3.2. Оценка состояния нормальной печени при регенерации.....	59
3.2.1. Флуоресцентная микроскопия .....	60
3.2.2. ГВГ микроскопия .....	62
3.2.3. FLIM микроскопия .....	62
3.2.4. Корреляционный анализ параметров состояния нормальной печени в момент резекции и при регенерации .....	65
3.3. Оценка состояния печени при стеатозе и фиброзе.....	70
3.3.1. Флуоресцентная микроскопия .....	71
3.3.2. ГВГ микроскопия .....	71
3.3.3. FLIM микроскопия .....	72
3.4. Оценка состояния печени при индукции регенерации на фоне сопутствующей патологии .....	75
3.4.1. Флуоресцентная микроскопия .....	84
3.4.2. ГВГ микроскопия .....	89
3.4.3. FLIM микроскопия .....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	98
ВЫВОДЫ.....	101
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АСТ - аспаргатаминотрансфераза

АТФ – Аденозинтрифосфорная кислота

АФК – активные формы кислорода

ГВГ - генерация второй оптической гармоники

ГЦК - гепатоцеллюлярная карцинома

ГЭ - гепатэктомия

ИЛ-6 - интерлейкин 6

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

НАДН – Никотинамидадениндинуклеотид

НАДФН – Никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАЖБП - неалкогольная жировая болезнь печени

ОКФОС – окислительное фосфорилирование

СЖК - свободные жирные кислоты

ТГ – триацилглицерин

ТГ – триглицериды

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЩФ – щелочная фосфатаза

EGF – epidermal growth factor - эпидермальный фактор роста

FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy – Флуоресцентная микроскопия с временным разрешением

HGF - hepatocyte growth factor - фактор роста гепатоцитов

TCSPC – Time-Correlated Single Photon Counting – времякоррелированный счёт единичных фотонов

TGF- $\alpha$  - Transforming growth factor  $\alpha$  - трансформирующий фактор роста  $\alpha$

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Ежегодно фиксируется более миллиона случаев первичного и метастатического рака печени. На сегодняшний день наиболее эффективным методом лечения остаётся одноэтапная и двухэтапная хирургическая резекция печени [1,2]. Несмотря на современные достижения в хирургической технике, анестезиологическом обеспечении и совершенствовании методов предоперационной оценки состояния печени, сохраняется высокий риск развития острой пострезекционной печеночной недостаточности, связанный, в первую очередь, с сопутствующей патологией печени. Лечение печеночной недостаточности крайне затруднительно и сопряжено с высокими рисками летального исхода, в связи с чем часто возникает необходимость в трансплантации печени [3].

Изучено достаточно данных о регенерации здоровой печени. Однако в реальной клинической практике ту или иную степень стеатоза или фиброза имеют около 15-20 % пациентов, прошедших процедуру резекции печени, и до 20-30 % доноров фрагмента печени для трансплантации [4,5]. При наличии сопутствующей патологии значительно снижается регенераторный потенциал ремнанта (оставшейся части) печени.

Патологические изменения энергетического метаболизма гепатоцитов играют значительную роль в патогенезе печеночной патологии и снижении регенераторного потенциала печени. Известно, что при развитии неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) избыточное накопление свободных жирных кислот в гепатоцитах приводит к дисфункции митохондрий, что сопровождается увеличением образования активных форм кислорода (АФК) [6-8] и истощением антиоксидантной защиты, что еще больше усиливает повреждение клеток [9]. При прогрессировании заболевания в более тяжелую стадию - неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) — в гепатоцитах снижается продукция аденозинтрифосфата (АТФ), что приводит к нарушениям энергетического метаболизма [10-12]. При развитии фиброза также нарушается целостность и

стабильность митохондрий, что приводит к митохондриальной дисфункции и, в конечном итоге, вызывает некроз гепатоцитов в центральной и промежуточной зонах печеночных долек [13-15]. Влияние метаболических изменений в гепатоцитах при патологии на качество регенерации печени до сих пор остается недостаточно изученным. В связи с этим особый интерес представляет прижизненное исследование патологических изменений метаболизма гепатоцитов с возможностью их оценки в клинических условиях.

Решение об объеме резекции основывается на предоперационной оценке функции печени с использованием стандартных клинических методов: гистологических и иммуногистохимических исследований по показаниям специалиста, анализа биохимических показателей крови, различных клиренс-тестов, а также методов лучевой диагностики, таких как УЗИ, КТ, МРТ и эластография [16-22]. Однако, большинство из них не позволяют осуществлять быструю оценку состояния печени во время операции и не предоставляют данных о прижизненных процессах на клеточном уровне. Более того, ни один из существующих клинических методов не дает возможности предсказать регенераторный потенциал печени.

В биомедицинских исследованиях все более широко применяются методы флуоресцентного биоимиджинга, такие как многофотонная микроскопия, с возможностью флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (fluorescence lifetime imaging microscopy – FLIM), регистрации сигнала двухфотонно-возбуждаемой флуоресценции, и генерации второй оптической гармоники (ГВГ). Данные методы не требуют использования дополнительных контрастирующих веществ и позволяют осуществлять прижизненную визуализацию структуры ткани и клеток. Кроме того, анализируя времена жизни флуоресценции различных внутриклеточных кофакторов, таких как никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и его фосфорилированная форма НАДФН, можно оценить изменения в энергетическом метаболизме гепатоцитов, что является важным индикатором состояния печени в целом [23-25]. Следует

отметить, что все перечисленные методы оптического биоимиджинга могут быть реализованы в клинических условиях.

### **Цель и задачи работы**

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.

## **Личный вклад автора**

Автором лично проведены экспериментальные исследования, включая моделирование регенерации и патологии печени. Выполнен анализ всех полученных данных. Разработана методика оценки состояния печени на основе многофотонной микроскопии, включающей флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию. Проведен подбор адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н, а также

оптимальных условий для проведения анализа данных FLIM микроскопии. Принято непосредственное участие в обсуждении полученных результатов и подготовке научных статей и докладов на научных конференциях.

### **Достоверность научных результатов**

Достоверность научных результатов обусловлена надежностью используемых экспериментальных методов исследования и подтверждена воспроизводимостью экспериментальных данных, а также качественным и количественным согласием с теоретическими выводами и обоснованиями.

### **Апробация работы**

Основные результаты и положения диссертации были представлены и обсуждены на международных конференциях (9 докладов) и российских конференциях (23 доклада): 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).

### **Публикации**

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

### **Конкурсная поддержка**

Проведенные исследования поддержаны проектом РФФ № 19-15-00263 «Разработка персонализированного метода предиктивной оценки способности ремнанта печени к регенерации на основе “label-free” время-разрешенного имиджинга».

### **Объем и структура 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.

## ГЛАВА 1 Обзор литературы

### 1.1. Особенности регенерации печени

Здоровая печень обладает высоким восстановительным потенциалом. При этом даже в норме малый процент печеночных клеток остаётся пролиферативно активным (около 0,2% от общего числа гепатоцитов). Постоянно сохраняющаяся пролиферация гепатоцитов направлена на поддержание «гепатостата» - постоянного числа клеток печени и веса органа относительно веса тела. Точные механизмы до конца не изучены, но известно, что отношение массы печени к массе тела организма четко детерминировано [26], в связи с чем здоровая печень будет стремиться сохранить «гепатостат». При остром или хроническом повреждении, или после резекционных вмешательств в оставшемся объеме печени (ремнант) запускаются скоординированные каскады реакций для восстановления первоначального объема и нативной структуры органа.

Высокий регенераторный потенциал печени обусловлен способностью гепатоцитов (дифференцированных клеток) к пролиферации, что обеспечивает рост и поддержание их популяции. Гепатоциты являются высокодифференцированными, часто полиплоидными клетками, выполняющими основные биохимические функции печени, такие как метаболизм белков, углеводов и жиров, детоксикация ксенобиотиков и промежуточных метаболитов, синтез сывороточных белков, а также выполняют функцию секреции желчи и метаболизма холестерина. Уникальной особенностью гепатоцитов является то, что несмотря на активность синтетических процессов, данные клетки сохраняют способность к пролиферации. Экспериментальные модели репопуляции и серийных трансплантаций печеночных клеток показали, что митотически покоящиеся гепатоциты здоровой печени могут пролиферировать практически неограниченно [27].

Исследования последних лет подтвердили существование альтернативного механизма восстановления печени, связанного с

дифференцировкой гепатоцитов из тканевого резерва стволовых клеток, расположенных в каналах Геринга (перипортальная зона печеночной дольки). Такой тип клеток был назван овальными клетками [28]. Овальные клетки представляют собой коммитированные мультипотентные предшественники, способные дифференцироваться в гепатоциты и холангиоциты. Активация стволового резерва происходит, когда пролиферация гепатоцитов замедляется под воздействием определенных гепатотоксинов или при наличии вирусной инфекции [29]. Однако роль стволового резерва в процессе регенерации печени при отсутствии вирусной инфекции или токсического воздействия остается незначительной, даже при потере до 80% объема печени. Поэтому большинство исследователей согласны с тем, что основной вклад в регенерацию печени как в норме, так и при патологии обеспечивает пролиферация гепатоцитов.

В настоящее время существует несколько традиционных моделей индукции регенеративного процесса в печени, однако наиболее распространенной остается частичная гепатэктомия (ГЭ), которая позволяет стандартизировать условия эксперимента благодаря точному определению объема удаляемой ткани [30]. Эта модель хорошо переносится лабораторными животными и дает достоверные результаты. Чаще всего в исследованиях регенерации печени используется 70% (или 2/3) ГЭ, которая соответствует удалению левой передней и медиальной долей печени. Методика 70% ГЭ была впервые описана Хиггинсом и Андерсоном в 1931 году [31]. Модель 30% (или 1/3) ГЭ, при которой удаляется только левая передняя доля печени, менее распространена. Рядом авторов показано, что основным отличием между этими двумя моделями является различие в механизмах восстановления печени. При 30% ГЭ регенерация происходит за счет гипертрофии — увеличения размеров гепатоцитов без их деления, в то время как при 70% ГЭ восстановление объема печени осуществляется путем пролиферации (деления) гепатоцитов [32]. Однако такое разграничение довольно условно. В обеих моделях клетки оставшейся ткани печени переходят из состояния покоя G0 в фазу репликации. Пик регенерации, определяемый по количеству гепатоцитов в S-фазе, наблюдается

через 24 часа после резекции у грызунов и через 48 часов у человека [33]. Обычно к 7-10 дню после резекции у крыс и к 10-14 дню у человека восстанавливается до 90% первоначального объема печени [34]. Пролиферация непаренхиматозных клеток, таких как холангиоциты, звездчатые клетки печени, синусоидальные эндотелиальные клетки, клетки Куфера (макрофаги) и клетки Ито, начинается позже, чем у гепатоцитов. Пик их пролиферации после резекции достигается через 48 часов у крыс и через 72 часа у человека [35,36].

В классическом эксперименте с парабиозом Moolten и Bucher [37] была выдвинута гипотеза о наличии циркулирующих факторов, регулирующих регенерацию печени. Позднее было выяснено, что процесс регенерации проходит три основных этапа, главным образом связанных с последовательной сигнализацией посредством различных ростовых факторов и цитокинов. На первом этапе, называемом инициацией, гепатоциты выходят из состояния покоя, начинается синтез ДНК. Ключевыми ростовыми факторами на этом этапе являются TGF- $\alpha$  и ИЛ-6, а также, по некоторым данным, компоненты комплимента. Длительность первого этапа составляет около 12 часов [38]. Второй этап, названный фазой пролиферации, характеризуется вхождением гепатоцитов в фазу G1 клеточного цикла и началом синтеза таких ростовых факторов, как HGF, EGF, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста (HB-EGF) и TGF- $\alpha$  [39]. Этот этап длится примерно 48 часов, в ходе которого восстанавливается 80-90% первоначальной массы органа. В некоторых случаях масса может превышать исходную, что приводит к активации апоптоза клеток и возвращению размеров органа к норме. На последнем этапе происходит терминация регенерации: активная пролиферация клеток прекращается, и устанавливается гепатостат [32,40]. Сигнальные пути, регулирующие этот этап, пока недостаточно изучены, однако известно, что ключевую роль здесь играет трансформирующий фактор роста  $\beta$  [41].

Далее будут подробно рассмотрены основные молекулярные механизмы, запускающиеся на каждом из описанных этапов. На самом раннем этапе регенерации усиливается синтез активатора плазминогена урокиназы

(uPA) и ремоделирование межклеточного матрикса в течение 1 минуты после ГЭ. Усиление уровня uPA запускает каскад активации металлопротеиназ, uPA также активирует HGF, преобразуя одиночный пептид HGF в его эффекторную гетеродимерную форму. uPA также участвует в ремоделировании белков межклеточного матрикса в течение первых 2 часов после ГЭ. Имеются данные об изменении ряда белков (фибронектин заметно снижается в перипортальной зоне в течение 5 минут после ГЭ), далее следует увеличение мРНК белков межклеточного матрикса, что усиливает их синтез. HGF, встроенный во внеклеточный матрикс как форма про-HGF, высвобождается в плазму как активный HGF, при этом стремительно увеличивается его концентрация в сыворотке в течение 1 часа после ГЭ. Общие изменения ремоделирования межклеточного пространства после ГЭ довольно сложны и включают работу множества факторов, в частности, ингибиторов активатора плазминогена и тканевых ингибиторов металлопротеиназ. Белки межклеточного матрикса и связанные с ними гликозаминогликаны действуют как корцепторы для многих лигандов, связанных с активацией регенерации [42,43].

Ключевым митогеном является HGF, который впервые выявлен на основе его способности индуцировать синтез ДНК в первичных культурах гепатоцитов. В нормальной печени HGF вырабатывается звездчатыми клетками печени и в больших количествах секретируется во внеклеточный матрикс, в основном в перипортальной области дольки, связываясь с гликозаминогликанами и специфическими коллагенами. На более поздних этапах регенерации фактор также вырабатывается синусоидальными эндотелиальными клетками и эндотелиальными прогениторными клетками костного мозга, мигрирующими в печень. Стимуляция регенерации печени происходит при связывании HGF с его рецептором MET (кодируется геном *c-Met*), представляющим собой трансмембранный белок в мембране гепатоцитов и холангиоцитов.

EGF вырабатывается в секретах экзокринных желез, включая слюнные железы и железы Бруннера, имеющие морфологию, схожую со слюнными

железами, и находящимися в подслизистой оболочке двенадцатиперстной кишки. Часть EGF секретируемого всасывается в неизменном виде из просвета двенадцатиперстной кишки и транспортируется в печень через портальный кровоток. EGF в большом количестве постоянно поступает к гепатоцитам, связываясь со специфическим рецептором EGFR (член семейства ErbB). После резекции экспрессия EGFR резко увеличивается, в связи с чем увеличивается поступление EGF в гепатоциты, регулируя их пролиферацию [43].

При химическом поражении печени механизмы пролиферативной реакции оставшихся гепатоцитов в целом аналогичны тем, что запускаются при резекции печени, однако на тканевом уровне восстановление происходит по-разному. Большинство гепатотоксинов вызывают мозаичные повреждения, приводящие к некрозу центральных или периферийных зон печеночных долек. Область повреждения определяется зоной наибольшей активности ферментов, метаболизирующих токсины. Так, гепатоциты в центральной части печеночных долек экспрессируют белки семейства цитохромов и другие ферменты, участвующие в метаболизме и переработке ксенобиотиков. В печени ксенобиотики соответствующим образом метаболизируются для выведения через кровь или желчь. Однако в редких случаях переработка некоторых ксенобиотиков приводит к образованию свободных радикалов, способных реагировать с нуклеофильными остатками белков и нуклеиновых кислот, что приводит к гибели центрилобулярных гепатоцитов. Экспериментальные модели для изучения такого повреждения и путей его восстановления чаще всего использовали четыреххлористый углерод (CCl<sub>4</sub>) или парацетамол в качестве повреждающих агентов у крыс и мышей. Первым свидетельством такого типа повреждения является некроз гепатоцитов в центрилобулярных областях. За этим следует инвазия моноцитов, которые очень активно пролиферируют в месте повреждения и трансформируются в макрофаги, которые в свою очередь резорбируют область некроза. Кроме того, макрофаги вносят свой вклад в регулирование пролиферации гепатоцитов, так как продуцируют митогенные факторы, такие как HGF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL6 и TNF. Наблюдается быстрая

активация EGFR в течение нескольких минут после дозы токсина. Через 24 часа гепатоциты входят в клеточный цикл в основном вокруг области некроза. Однако большинство клеток остальной части долики вступают в клеточный цикл к 48 часам. Пик концентрации HGF в периферической крови наступает два раза, через 12 и 48 часов после интоксикации [32]. При токсическом повреждении источником пролиферирующих клеток становятся оставшиеся гепатоциты непоражённых участков печени [32,44,45].

Точный срок терминации регенерации установить достаточно сложно. Если брать в качестве критерия возврат к нативным значениям соотношения веса печени к весу тела, то завершение регенерации у крыс происходит в среднем через 7-14 дней. Что касается пролиферации гепатоцитов, возвращение синтеза ядерной ДНК к нормальным уровням достигается к 5–6 дню. Однако анализ транскриптомики в клетках печени показывает значительно более длительный срок, при котором происходит возвращение уровня экспрессии генов к нормальным значениям - 14 дней после ГЭ. Несколько сигнальных молекул рассматривались как потенциально связанные с терминацией регенерации печени, в первую очередь это TGF $\beta$ 1. Однако этот факт является дискуссионным, так как удаление рецепторов TGF $\beta$ 1 не продлевает процесс регенерации печени. Пролонгирование процесса регенерации печени наблюдается только при совместном удалении обоих рецепторов TGF $\beta$ 1 и рецептора активина (другой представитель семейства TGF $\beta$ ). Важным регулятором, связанным с прекращением регенерации печени и восстановлением нормальной функции печени, вероятно, являются компоненты межклеточного вещества. В частности, добавление коллагенового геля стабилизирует дифференцировку гепатоцитов, при этом подавляя их пролиферацию. Кроме того, показано, что удаление рецептора интегрин-связанной киназы продлевает регенерацию печени, при этом восстановленный объем может достигать 158% от исходного. Полученные рядом авторов результаты показывают, что сигнализация посредством компонентов межклеточного матрикса играет важную роль в регуляции

терминации регенерации печени, но конкретные сигнальные пути еще нуждаются в дополнительном изучении [43].

## **1.2. Регенерация печени при патологии**

На феномене высокого регенераторного потенциала печени основана эффективная методика лечения опухолей путем удаления (резекции) объема органа, где расположена опухоль. Установлено, что минимальный объем печеночного ремнанта, необходимый для адекватного восстановления функции печени, составляет 25%. Однако этот процент является достаточным лишь при отсутствии патологических изменений в печени. В случаях лекарственно-индуцированного повреждения (в частности, после химиотерапии) или при наличии сопутствующего заболевания (стеатоз, фиброз, цирроз) требуется не менее 40% от исходного объема печеночного ремнанта [46]. Если резецируемый объем органа превышает этот предел, печень не способна восстановить свою функцию, необходимую для жизнедеятельности организма. Более того, даже при удалении меньшего объема печени может развиваться фатальная острая пострезекционная печеночная недостаточность, которая возникает у 5-8% пациентов и остается основной причиной летальных исходов в хирургии печени [46-50]. Таким образом, несмотря на высокий восстановительный потенциал здоровой печени, его способность к регенерации подавляется при наличии острых или хронических поражений, сопровождающихся нарушением архитектуры ткани и/или фиброзом [34,43].

Однако механизмы такого снижения регенераторного потенциала печени достаточно комплексные и до сих пор до конца не изучены. Практически каждая печеночная патология сопровождается хронической потерей гепатоцитов. При этом запускается компенсаторная пролиферация гепатоцитов, которая способствует поддержанию постоянства соотношения веса печени к весу тела. По мере того как гепатоциты вступают в хроническую компенсаторную пролиферацию, изначально полиплоидные гепатоциты постепенно возвращаются к диплоидному статусу. Однако, поскольку

большинство полиплоидных гепатоцитов также имеют случайные отсутствующие хромосомы (являются анеуплоидными), диплоидные гепатоциты, которые возникают в результате этой реверсии ploidy, часто случайным образом имеют только одну копию некоторых хромосом. Это явление создает несбалансированную гетерозиготность. Помимо этого, хроническое воспаление в печени, которое сопровождается постоянной продукцией активных форм кислорода, вносит дополнительный вклад в повреждение цепи ДНК, еще больше нарушая процесс деления гепатоцитов. Таким образом, не смотря на значительное увеличение пролиферативной активности гепатоцитов при хронических заболеваниях (в частности при фиброзе), стоит учитывать, что делящиеся клетки патологически изменены, и в таком случае восстановление клеточной паренхимы не означает восстановление функции печени. При дальнейшем прогрессировании хронического заболевания печени такая патологическая пролиферация гепатоцитов может приводить к неоплазии. Это подтверждается данными о том, что для пациентов с хроническими заболеваниями печени наблюдается высокая частота случаев развития гепатоцеллюлярной карциномы [42,43].

### *1.2.1. Стеатоз печени*

Стеатоз является наиболее распространенной формой НАЖБП, которая может развиваться в НАСГ и цирроз. Данная патология характеризуется накоплением свободных жирных кислот (СЖК) в виде макровезикулярных и/или микровезикулярных липидных капель с высоким содержанием триацилглицерина (ТГ) в гепатоцитах, при отсутствии выявления нарушений архитектуры ткани. В норме ТГ не накапливаются в гепатоцитах, но при избыточном потреблении жиров и углеводов происходит аномальный липидный обмен, приводящий к эктопическому накоплению липидов в печени. СЖК поступают с пищей, образуются в процессе липолиза жировой ткани и/или в ходе липогенеза *de novo*. Затем СЖК окисляются при  $\beta$ -окислении, этерифицируются

в ТГ и упаковываются в липопротеины, которые либо секретируются в кровь, либо накапливаются в виде липидных капель в клетках печени [10].

Стеатоз печени диагностируется, если более 5% гепатоцитов содержат липидные капли, при этом отсутствует влияние вторичных факторов, таких как чрезмерное потребление алкоголя, вирусные инфекции или лекарственная токсичность. Золотым стандартом для дифференцирования стадий стеатоза остается гистологический анализ. Изначально считалось, что синтез триглицеридов и накопление жира в печени служат гепатозащитным механизмом. Однако в дальнейшем было накоплено множество данных о том, что избыточное содержание липидов в клетках печени является фактором риска прогрессирования печеночных заболеваний [51,52]. Стеатоз не диагностировали до 1980 года, но в настоящее время предполагается, что до 30% взрослого населения западных стран имеют жировую болезнь печени. Наличие стеатоза ухудшает прогноз восстановления печени после резекционных вмешательств. Около 20% пациентов, для которых проводилась резекция печени, и до 25% доноров для трансплантации имеют ту или иную степень стеатоза. В ряде исследований было показано [3,11,51-53], что риск послеоперационных осложнений и летального исхода увеличивается с возрастанием тяжести стеатоза. Кроме того, у пациентов со стеатозом выше риск осложнений при синдроме ишемии-реперфузии, который часто возникает во время операций и трансплантации печени [54].

Точные механизмы патогенеза стеатоза до сих пор остаются неясными. Однако рядом авторов предложена теория, известная как «теория двух ударов», которая описывает двухстадийный процесс развития заболевания [55-58]. На первом этапе начальные патологические изменения вызваны избытком СЖК в печени, которые метаболизируются в ТГ [59,60]. Эти изменения делают клетки печени уязвимыми для окислительного стресса и действия провоспалительных цитокинов, на втором этапе [61]. Эта последовательность событий приводит к развитию митохондриальной дисфункции [62,63]. В исследовании, в котором проводили сравнение пациентов с микростеатозом (около 5% клеток с

липидными каплями) и макростеатозом (>30% клеток с липидными каплями, липидные капли смещают ядро гепатоцитов), было установлено, что при наличии стеатоза скорость липолиза и глюконеогенеза увеличивается на 50% и 30% соответственно. Наличие стеатоза значительно повышает риски развития фиброза, при этом известны случаи прогрессирования стеатоза в НАСГ даже при низком уровне липидной инфильтрации [64].

В норме длинноцепочечные жирные кислоты метаболизируются в молекулы ацил-КоА с помощью специфических ацил-КоА-синтаз и затем поступают в матрикс митохондрий. В процессе  $\beta$ -окисления и цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) образуются молекулы восстановленного НАДН, которые отдают электроны и протоны в дыхательную цепь митохондрий, с образованием НАД<sup>+</sup> и АТФ [65]. Избыточное поступление жирных кислот в печень вызывает перегрузку митохондрий, в результате чего накапливаются не полностью окисленные субстраты и повышается выработка активных форм кислорода (АФК) [6-8]. Хронический окислительный стресс приводит к истощению антиоксидантных ферментов, таких как глутатион, что усиливает повреждение клеток [9]. Кроме того, постоянный окислительный стресс нарушает целостность митохондриальной мембраны, что, по мнению ряда авторов, инициирует митохондриальную дисфункцию как ключевое событие в необратимом процессе повреждения клеток печени. В результате этого в жировых гепатоцитах снижается продукция АТФ и нарушается общий энергетический метаболизм клеток [10-12], что существенно влияет на снижение регенераторного потенциала печени при развитии стеатоза. Снижение регенераторного потенциала печени было подтверждено и на модели индуцированного стеатоза мышей, где была показана задержка клеточного цикла гепатоцитов, которая связана с постоянным повреждающим действием при окислительном стрессе клеток [64].

### 1.2.2. Фиброз печени

Фиброз печени возникает в ответ на хроническое повреждение печени различной природы и проявляется избыточным образованием и накоплением молекул внеклеточного матрикса и фибрилл коллагена [66], что приводит к нарушению тканевой архитектуры, развитию портальной гипертензии и клеточной гипоксии. Фиброз может прогрессировать в декомпенсированную форму — цирроз. Развитие фиброза связано с хронической патологической пролиферацией клеток печени. В условиях острого не тяжелого повреждения печени зрелые гепатоциты могут заменять апоптотические и некротические клетки [67], однако при хроническом повреждении гепатоциты не в состоянии восстановить поврежденную ткань, в связи с чем поврежденные участки заменяются белками внеклеточного матрикса и фибриллами коллагена [68,69]. Ключевым событием при фиброзе является активация звездчатых клеток печени, которые принимают миофибробластоподобный фенотип, характеризующийся активной пролиферацией, утратой витамина А и активацией продукции альфа-актина гладких мышц ( $\alpha$ -SMA) и коллагена типов I и III [70].

Гистологическое исследование биопсии ткани печени остается золотым стандартом для диагностики стадии фиброза. Наиболее распространена шкала Metavir, которая выделяет четыре стадии заболевания: F0 – отсутствие фиброза; F1 – портальный фиброз без образования септ (минимальный фиброз); F2 – портальный фиброз с единичными септами (умеренный фиброз); F3 – множественные порто-центральные фиброзные септы (серьезный фиброз); F4 – цирроз печени [71]. Однако, выявление стадии фиброза с помощью биопсии печени также имеет ряд ограничений. Взятие малого объема ткани может привести к недооценке стадии фиброза печени. В связи с этим, предпочтение отдается образцам большего размера. Кроме того, процедура взятия биопсия является инвазивной и может приводить к осложнениям, такими как боль (встречается у 84% пациентов), внутрибрюшинное кровотечение.

Несмотря на широкое распространение этой гистологической системы оценки, существует вероятность ошибки, связанной со сложностью

дифференцировки стадий, так как процесс фиброгенеза и фибролиза является динамическим [71].

Тетрахлорид углерода (CCl<sub>4</sub>) широко используется для моделирования хронического фиброза печени. В гепатоцитах этот токсин метаболизируется с участием цитохрома P450, что приводит к образованию высокореактивных свободных радикалов CCl<sub>3</sub>• и CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>•. Эти радикалы активируют реакции перекисидации жирных кислот на митохондриальной мембране, нарушая целостность и стабильность митохондрий, что, в свою очередь, вызывает митохондриальную дисфункцию и ведет к некрозу гепатоцитов в центральной и отчасти промежуточной зонах печеночных долек [13-15]. В норме в процессе митохондриального дыхания значительное количество электронов переносится по электрон-транспортной цепи для обеспечения синтеза АТФ, и лишь небольшая часть восстанавливается, образуя АФК. Однако при воздействии CCl<sub>4</sub> нарушается работа электрон-транспортной цепи, что приводит к повышенной генерации АФК [72]. В результате этого каскада событий происходит гибель гепатоцитов и снижение функции печени. Регулярное многократное воздействие токсина поддерживает хронический воспалительный и патологический регенераторный процесс, связанный с образованием хронических узлов патологической пролиферации гепатоцитов, что в конечном итоге приводит к избыточному накоплению коллагеновых волокон.

Одним из характерных изменений при развитии фиброза является появление зон патологической пролиферации. При развитии фиброза пролиферативная активность гепатоцитов нарушена, и при индукции регенерации большая доля гепатоцитов останавливает деление в промежуточной фазе G1/S, при этом гепатоциты становятся полиплоидными. Интересно, что некоторые пути, такие как Hippo/YAP, участвуют как в регенерации печени, так и в активации звездчатых клеток печени, что еще раз подчеркивает сложный баланс между регенерацией и фиброзом [73].

### 1.3. Стандартные методы визуализации печени

Прижизненная визуализация печени играет ключевую роль в диагностике печеночных заболеваний. В клинической практике объем и структуру печени анализируют с использованием таких методов лучевой диагностики, как КТ, МРТ и УЗИ [74,75].

Для оценки структуры и объема печени в клинической практике широко используются КТ [76] и МРТ [77]. С помощью этих методов получают послойные изображения печени, которые затем поддаются постобработке, в результате чего создается трехмерное изображение органа. Это позволяет выявить возможные изменения в его структуре и вычислить объем. Для постобработки КТ-изображений разработано множество формул и коммерческих программ расчета объема печени [78-80]. Однако данный метод не позволяет точно прогнозировать состояние печени после операции, особенно при наличии сопутствующей патологии [81].

С применением контрастно-усиленной МРТ на основе гадолиния можно получить точную визуализацию структуры ткани печени. При этом скорость вымывания гадолиния служит также показателем функционального состояния паренхимы печени [82]. Данный метод не применяется для пациентов с нарушенной детоксикационной функцией печени. Метод УЗИ часто используется для выявления стеатоза, однако дифференциация стадий стеатоза достаточно затруднена в связи со схожей эхогенностью ткани. МРТ часто используют как неинвазивный и безопасный метод диагностики стеатоза. Принцип МРТ для обнаружения и количественной оценки жира основан на эффекте химического сдвига, который можно определить как разницу резонансных частот между протонами водорода, связанными с триглицеридами и водой. Эту разницу можно непосредственно увидеть в спектрах МРТ или рассчитать с помощью различных существующих подходов.

Стоит учитывать, что плотность печени изменяется в зависимости от степени отложения липидов, гликогена и инфильтрации нерезидентных воспалительных клеток, такие изменения могут быть не связаны с регенерацией

печени [82]. В связи с этим, точность методов КТ и МРТ для определения восстановительного потенциала печени ограничена. К недостаткам метода КТ можно отнести необходимость введения контрастирующего агента, а также применение рентгеновского излучения. При использовании МРТ не используется рентгеновское излучение, однако остается проблема необходимости добавления контрастирующего агента [83].

УЗИ структуры печени является общепринятым методом в клинической практике для диагностики заболеваний печени, оценки эффективности лечения (например, химиотерапии или химиоэмболизации печеночной артерии) и мониторинга состояния печени после операций. УЗИ является доступным методом визуализации в реальном времени, использующим неионизирующее излучение [84]. Его преимуществами являются низкая стоимость и неинвазивность. Однако данный метод имеет ряд недостатков, включая наличие спекл-шумов, возникающих из-за многократного переотражения сигнала от мелких структур с различной плотностью, а также низкое качество изображения [85]. Кроме того, УЗИ обладает ограниченной чувствительностью для дифференциации типов и стадий заболеваний печени. Например, как показывает исследование Zhang et al., в ряде случаев невозможно отличить фиброз и стеатоз (стеатогепатит) от воспалительного процесса, так как эхогенность ткани в таком случае схожа [86].

В современную клиническую практику были введены также ультразвуковая и магнитно-резонансная эластография, которые уже показали свою эффективность в диагностике фиброза печени. Исследования продемонстрировали, что показатели жесткости ткани печени, полученные с помощью эластографии, более надежны для прогнозирования прогрессирующего фиброза и цирроза, чем морфологические признаки, выявляемые на КТ и МРТ-изображениях [87,88]. Однако у этого метода есть и ограничения, в частности, низкая точность оценки жесткости ткани у пациентов с тяжелым ожирением и асцитом [89].

#### **1.4. Стандартные методы оценки пролиферативной активности гепатоцитов**

Пролиферативную активность гепатоцитов в эксперименте и клинике оценивают с использованием различных морфологических и иммуногистохимических методов, которые основаны на подсчете митотического индекса клеток.

Иммуногистохимические методы активно применяются как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике. Наиболее часто используются такие маркеры, как ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA - proliferating cell nuclear antigen - ядерный антиген пролиферирующих клеток), Ki-67 и ДНК-полимераза  $\alpha$ . В экспериментальных условиях с использованием гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, проводят морфометрический анализ клеток, находящихся в стадии митоза.

PCNA функционирует как вспомогательный компонент  $\Delta$ -ДНК-полимеразы. Его экспрессия запускается в G1 фазе и достигает максимума в S фазе. Оценка клеточной пролиферации осуществляется по интенсивности окраски ядер [90,91]. Антиген Ki-67 начинает обнаруживаться в начале G1 и достигает своего максимума в S и M фазах [47,82,93]. ДНК-полимераза  $\alpha$ , фермент, участвующий в синтезе ДНК, не экспрессируется в G0 фазе, но присутствует в остальных фазах клеточного цикла [92].

Главным достоинством подсчета делящихся клеток с использованием гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, является отсутствие неспецифического окрашивания и возможность выявления клеток на различных стадиях митоза [94].

Тем не менее, все указанные методы имеют определенные недостатки. В частности, иммуногистохимический анализ не позволяет точно подсчитать абсолютное количество делящихся гепатоцитов по причине наличия неспецифического окрашивания. Кроме того, митотическая активность варьируется в различных зонах печеночной долики, поэтому образцы биопсии

пациента, охватывающие разные участки, могут содержать различное количество митотических клеток [95-97].

## **1.5. Стандартные методы оценки функции печени**

### *1.5.1. Биохимический анализ крови*

Широко используемым методом диагностики печеночных заболеваний является биохимический анализ крови, который предоставляет информацию о наличии повреждений печени, о ее функции, а также об особенностях липидного обмена.

Повреждение гепатоцитов вызывает выброс внутриклеточных ферментов в плазму. В результате в крови наблюдается увеличение уровня билирубина, АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, альдолазы, орнитин-карбамоилтрансферазы и других веществ. Уменьшение уровня мочевины, билирубина и креатинина, которые выводятся печенью, указывает на нарушение её детоксикационной функции. Снижение сывороточного уровня общего белка, глобулина и альбумина, синтезируемых в гепатоцитах, свидетельствует о нарушении синтетической функции печени.

Тем не менее, биохимический анализ крови имеет достаточно низкую специфичность, так как может отражать патологии не только печени, но и других органов, таких как почки и сердце. Кроме того, во время хирургических вмешательств состояние ткани печени может быть уже изменено до уровня, который невозможно обнаружить с помощью стандартных маркеров [98,99]. Также стоит отметить, что период полураспада стандартных маркеров, применяемых в клинической практике, слишком велик для того, чтобы отразить изменения в печени в реальном времени [17,19].

### *1.5.2. Клиренс-тесты*

В клинической практике используется несколько функциональных тестов, которые оценивают скорость выведения (клиренса) различных

экзогенных веществ печени. Наиболее распространены клиренс-тесты с индоцианином зеленым, галактозой и лидокаином [100,101].

Оценка скорости выведения галактозы из крови позволяет определить уровень фосфорилирования галактозы галактокиназой в гепатоцитах. Концентрация галактозы в плазме и моче измеряется по интенсивности реакции между галактозой и НАД, в результате которой образуются галактолактон и НАДН, с использованием спектрофотометрии. Этот тест дает возможность косвенно оценить как функцию, так и метаболическую активность гепатоцитов [102,103].

Индоцианин зеленый выводится из кровотока исключительно гепатоцитами через органические анионные транспортные белки на мембране, с последующим выделением в желчь без предварительной биотрансформации [98,104,105].

Лидокаиновый тест основан на том, что около 90% введенной дозы препарата подвергается N-дезалкилированию в гепатоцитах с образованием моноэтилглицинксилидида и глицинксилидида. При нарушении функции печени период полувыведения лидокаина может увеличиваться в два и более раза [102].

Однако у клиренс-тестов есть значительные недостатки: функциональное состояние печени можно оценить только в момент оперативного вмешательства, что не позволяет предсказать функциональные возможности остатка печени [106]. Кроме того, применение этих методов невозможно у пациентов с экскреторными дефектами или желтухой [105].

#### **1.6. Особенности кофактора НАД(Ф)Н и его участие в энергетическом метаболизме клеток**

В здоровых клетках АТФ служит основным источником энергии, АТФ образуется в результате гликолиза и окислительного фосфорилирования (ОКФОС) [23]. В этих процессах восстановленная форма НАДН и его окисленная форма НАД<sup>+</sup> действуют как окислитель и восстановитель в ряде биохимических реакций [107-112].

В ходе гликолиза глюкоза ( $C_6H_{12}O_6$ ) метаболизируется до пирувата ( $CH_3COCO_2^- + H^+$ ). В результате этих реакций образуются две молекулы АТФ, две молекулы пирувата и две молекулы воды, в результате две молекулы НАД<sup>+</sup> восстанавливаются до НАДН [113,114]. Затем пируват из цитозоля переходит в митохондрии, где он преобразуется в ацетил-коэнзим-А, который участвует в ЦТК. В процессе ЦТК происходит восстановление двух молекул НАД<sup>+</sup> до НАДН, которые затем становятся донорами электронов для реакций в электронно-транспортной цепи митохондрий [115-117].

ОКФОС является более энергоэффективным процессом, при котором синтезируется 32-36 молекул АТФ. В аэробных условиях при метаболизме одной молекулы глюкозы образуется десять молекул НАДН. Далее НАДН окисляется в первом комплексе электрон-транспортной цепи до НАД<sup>+</sup>, при этом протоны накачиваются в межмембранное пространство митохондрий, создавая протонный градиент. Энергия, накопленная при переносе протонов, используется для работы АТФ-синтазы. На один протон приходится три цикла работы АТФ-синтазы, в каждом из которых из одной молекулы АДФ и неорганического фосфата образуется одна молекула АТФ [118]. Таким образом, при окислении одной молекулы НАДН образуется три молекулы АТФ [119].

Известно, что в клетках НАДН существует в свободной форме и в форме, связанной с белками (преимущественно с дегидрогеназами) [120,121]. Свободная форма НАДН находится в цитоплазме и участвует в реакциях гликолиза, тогда как связанная форма локализуется в митохондриях и участвует в реакциях ОКФОСа. Преобладание одной из форм НАДН может указывать на изменения интенсивности гликолиза или ОКФОСа.

В ряде исследований показано, что подход, основанный на оценке преобладания той или иной формы НАДН, эффективен для выявления патологических изменений в клетках и тканях. Так, было показано, что относительный вклад связанного с белком НАДН уменьшаются при гипоксии в клеточной культуре и срезах тканей. В условиях гипоксии для производства АТФ клетки предпочитают гликолиз ОКФОСу.

На сегодняшний день возрос интерес к изучению фосфорилированной формы кофактора — НАДФН. Однако до недавнего времени его обнаружение в клетках было затруднено, это связано со схожестью спектральных характеристик НАДН и НАДФН. Тем не менее, метаболические пути, в которых участвует НАДФН, отличаются от путей, в которых вовлечен НАДН. В частности, НАДФН играет важную роль в различных биосинтетических процессах, таких как пентозофосфатный путь, липогенез и синтез нуклеиновых кислот [122]. Кроме того, НАДФН выступает донором протонов в глутатионовом цикле, обеспечивающим антиоксидантную защиту клеток [107-109,123]. Концентрация нефосфорилированной формы НАДН в клетке более чем в 30 раз выше, чем у НАДФН. Такое различие связано с тем, что в большинстве типов клеток общий пул НАД (окисленные и восстановленные формы) больше, чем НАДФ. Однако основная роль НАДФ — донор электронов в анаболических путях. Поскольку для этого требуется, чтобы пул поддерживался в восстановленном состоянии, соотношение НАДФН/НАДФ<sup>+</sup> поддерживается высоким. Напротив, роль НАД<sup>+</sup> как акцептора электронов в катаболических путях требует, чтобы пул поддерживался в окисленном состоянии. Поэтому соотношение НАДН/НАДФ<sup>+</sup> поддерживается низким. Таким образом, размер общего пула НАДН всегда больше, чем у пула НАДФН [122].

Основные метаболические пути, в которых участвует НАДФН, включают в себя синтез жирных кислот, с восстановлением ацетил-КоА до жирных кислот в процессе липогенеза; синтез стероидов, который обеспечивает восстановительные эквиваленты для ферментов, таких как 3 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа; пентозофосфатный путь, при котором происходит восстановление рибулозо-5-фосфата до рибозо-5-фосфата; синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов; восстановление пула глутатиона и других антиоксидантов, обеспечивая антиоксидантную защиту.

Важной особенностью НАДН, на которой основано множество биологических исследований с применением методов флуоресцентной микроскопии, является его способность к флуоресценции в синем диапазоне

спектра [123,124]. Максимум поглощения излучения кофакторами НАДН и НАДФН наблюдается на длине волны 355 нм, максимум эмиссии находится в диапазоне 400-450 нм [118,125,126].

Спектральные свойства НАДН были впервые описаны в работе в 1930-х и 1940-х годах в работах Отто Варбурга [127]. Исследование флуоресценции НАДН в качестве маркера окислительно-восстановительного состояния в живых образцах началось в 1950-х годах с пионерской работы Chance et al. [128]. В последующие годы активно начаты исследования спектральных свойств НАДН на различных объектах, включая изолированные митохондрии, культуры клеток и органах как в условиях *ex vivo*, так и *in vivo*. Развитие лазерной сканирующей конфокальной микроскопии в 1970-х годах добавило пространственное разрешение к измерениям флуоресценции НАДН, что позволило оценить различия в окислительно-восстановительном состоянии между субклеточными органеллами или различными типами клеток ткани [127].

Спектры эмиссии всех трех форм кофактора НАД(Ф)Н перекрываются [129]. Однако, времена жизни флуоресценции всех форм значительно различаются, что позволяет разделить все три формы кофактора на основе их специфических времен жизни флуоресценции. Время жизни флуоресценции свободной формы НАДН составляет порядка 300 пс. При связывании с белками время жизни флуоресценции увеличивается до 1500-2800 пс. Наконец, среднее время жизни флуоресценции НАДФН составляет порядка 4400 пс. Раздельный анализ вкладов каждой формы кофактора НАД(Ф)Н позволяет получить детальную информацию об особенностях и интенсивности различных метаболических путей в клетках [125].

В большинстве исследований энергетического метаболизма клеток вклад НАДФН игнорируется. Однако в клетках с высоким уровнем синтетической активности (к которым относятся гепатоциты) вклад НАДФН становится значительным, и изучение изменений его вклада представляет интерес [123-126].

Попытки исследовать метаболическую активность клеток предпринимались с середины 20-го века. Однако основной сложностью для подобных исследований является то, что метаболические реакции могут быть очень динамичными и неоднородными как во времени, так и в пространстве. Таким образом, необходим прижизненный мониторинг сложных каскадов метаболических процессов.

Первые исследования оценки активности фосфорилирования митохондрий и окислительно-восстановительных состояний отдельных митохондриальных цитохромов проводилась в середине 20-го века с использованием абсорбционной спектроскопии на изолированных митохондриях [128]. Хотя эти первые исследования были технически очень инновационными и могли предоставить информацию о функциональном состоянии цитохромов, участвующих на разных этапах цепи переноса электронов, они требовали высокой концентрации митохондриальных белков и имели ряд технологических ограничений. С развитием респирометрии высокого разрешения в сочетании с абсорбционной спектроскопией появилась возможность точно проанализировать кинетику кислорода в процессе клеточного дыхания, однако такой подход не может дать представление о клеточной гетерогенности в динамических условиях.

На сегодняшний день подходы, основанные на регистрации флуоресценции НАД(Ф)Н предоставляют специфичную информацию о состоянии клеток и тканей, в связи с чем широко используются в медицинских исследованиях.

### **1.7. Многофотонная микроскопия**

Большая часть имеющихся знаний о биологических процессах на клеточном и субклеточном уровне основана на способности микроскопа непосредственно визуализировать их: оптические изображения совместимы с живыми образцами, поскольку свет неионизирующий, неразрушающий и минимально инвазивный. Флуоресцентная микроскопия, в частности, сочетает в

себе преимущества чувствительности к одиночным молекулам, молекулярной специфичности, субклеточного субмикронного разрешения и сбора данных в реальном времени из живых клеток с незначительной цитотоксичностью. Это позволяет не только изучать структуру образца, но и наблюдать динамику и функцию в режиме реального времени.

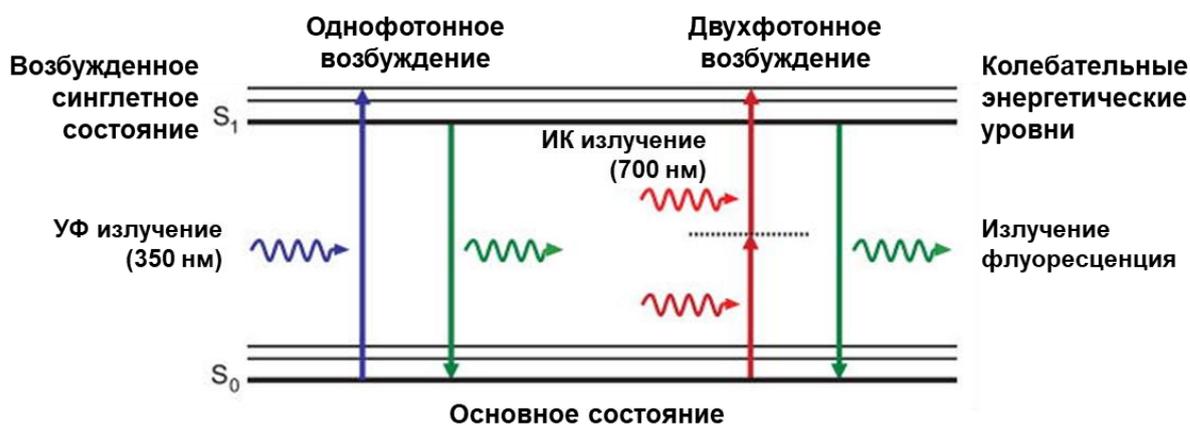
Традиционные инструменты визуализации для оценки метаболической активности клеток часто требуют добавления экзогенных контрастирующих агентов и имеют ограниченное разрешение и чувствительность. Более чувствительные количественные метаболические анализы, основанные на масс-спектрометрии и маркировке углерода, не могут быть реализованы прижизненно (с использованием живых клеток) и, кроме того, технология требует предварительной гомогенизации клеток и тканей. Таким образом, данные методы не позволяют детектировать динамические или гетерогенные аспекты метаболических реакций. Подходы на основе флуоресцентной визуализации высокого разрешения, которые реализуются с применением экзогенных флуоресцентных зондов, чувствительных к изменениям потенциала митохондриальной мембраны или нацеленные на определенные клеточные органеллы или белки, не имеют таких ограничений, но требуют клеточных манипуляций и могут быть искажены артефактами, связанными с неравномерным распределением флуорофоров в клетках и тканях [127].

Многофотонная микроскопия является разновидностью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. В конструкцию современных конфокальных микроскопов входит «пинхол», который отсекает лишнее фоновое излучение от образца. Достижения в области оптики и электроники позволили достигнуть высокой скорости сканирования образца и высокого качества изображения. Большинство конфокальных микроскопов формируют изображение либо путем отражения света от образца, либо при возбуждении флуоресценции от экзогенных или эндогенных флуорофоров [130,131].

Многофотонная микроскопия основана на принципе Гёпперт-Майер. Согласно этому принципу, при увеличении мощности света возрастает

вероятность того, что атом флуорохрома поглотит два или более фотонов одновременно [130,131]. В результате молекула излучает фотон с более высокой энергией, чем при однофотонном поглощении. Поскольку энергия фотона обратно пропорциональна его длине волны, два поглощённых фотона должны иметь длину волны примерно вдвое большую, чем требуется для возбуждения одним фотоном [132]. Например, флуорофор, поглощающий ультрафиолетовый свет (в частности, НАДН), может быть возбужден двумя фотонами ближнего инфракрасного света с удвоенной длиной волны, если оба фотона достигают флуорофора в интервале около  $10^{-17}$  -  $10^{-19}$  секунд [133]. Для достижения такого редкого события плотность фотонов должна быть в миллион раз выше, чем при однофотонном поглощении. Поэтому для генерации двухфотонной флуоресценции с высоким квантовым выходом необходима очень высокая мощность лазера, что достигается за счёт использования импульсного лазерного излучения. При этом пиковая мощность во время импульса достаточно велика для генерации двухфотонного возбуждения, в то время как средняя мощность лазера остаётся низкой [130]. Спектры возбуждения для многофотонной микроскопии шире по сравнению с видимым светом, следовательно, возбуждается широкий спектр различных флуорофоров с возможностью получения высококонтрастных изображений.

На Рисунке 1 представлена расширенная диаграмма Яблонского, иллюстрирующая поглощение одного фотона с короткой длиной волны и одновременное поглощение двух фотонов ближнего инфракрасного диапазона, в обоих случаях создающее возбужденное состояние с одинаковым энергетическим уровнем.



**Рисунок 1.** Диаграмма Яблонского для однофотонной и многофотонной (двухфотонной) флуоресценции (рисунок адаптирован из [134]).

Микроскопия с двухфотонным (многофотонным) возбуждением флуоресценции является альтернативой однофотонной конфокальной микроскопии и имеет ряд преимуществ. В конфокальной микроскопии используется диафрагма, которая блокирует фоновую флуоресценцию, возникающую вне фокальной плоскости [135]. Несмотря на то, что сигнал собирается только в плоскости фокуса, возбуждающий свет с короткой длиной волны (в ультрафиолетовом диапазоне) вызывает фотообесцвечивание и фототоксичность по всему образцу, что критично для исследований живых тканей [130,131]. Также возбуждение флуоресценции в длинноволновом диапазоне, где находится окно оптической прозрачности биологических тканей, позволяет исследовать ткани на глубину около 400-500 мкм [136-138].

### 1.8. Генерация второй оптической гармоники

Явление генерации второй оптической гармоники заключается в образовании вторичных электромагнитных волн с удвоенной частотой, возникающих в результате нелинейного взаимодействия электромагнитной волны с нецентросимметричными структурами, такими как коллаген. Для этого процесса необходим тензор нелинейной восприимчивости второго порядка, что делает возможным генерацию второй оптической гармоники только в нецентросимметричных структурах [139]. ГВГ микроскопия осуществляется в

режиме двухфотонного или многофотонного возбуждения и позволяет визуализировать фибриллярный коллаген [140,141]. В качестве источников возбуждения используются импульсные фемтосекундные лазеры с длительностью импульсов от 100 до 200 фс, а также иногда лазеры с импульсами в наносекундном диапазоне [142]. Диапазон длин волн, при которых происходит генерация ГВГ микроскопии, от 730 до 820 нм [143-145].

Кроме генерации второй оптической гармоники существуют также гармоники высших порядков, такие как третья оптическая гармоника, которую можно зарегистрировать при взаимодействии электромагнитных волн с коллагеном [145-149]. Однако микроскопия на основе третьей оптической гармоники технически сложнее по сравнению с ГВГ, поскольку требует использования более специфических источников излучения с длинными волнами (более 1200 нм) и/или УФ-детекторов (менее 300 нм), получаемый сигнал значительно слабее. Поэтому для визуализации коллагена ГВГ микроскопия остается наиболее распространенным микроскопическим методом.

Режим двухфотонно возбуждаемой флуоресценции обеспечивает визуализацию архитектуры ткани печени, в то время как сигнал второй гармоники обеспечивает точную идентификацию фибриллярного коллагена.

Подход, основанный на ГВГ, показал свою эффективность для выявления очагов фиброзирование при наличии печеночной патологии. Так, в работе Goh et al. была показана возможность количественной оценки сигнала от фибрилл коллагена при наличии НАЖБП. Данный метод позволил авторам дифференцировать начальные стадии НАСГ, при которых уже запускался процесс фиброзирование [150]. В работе Gailhouste et al. было показано, что ГВГ микроскопия надежна для определения стадии фиброза при хроническом гепатите В, при этом точность выше, чем при использовании гистологических методов [151].

Таким образом, на данный момент ГВГ микроскопия активно используется в биомедицинских исследованиях для качественной и количественной оценки коллагена в тканях, анализа ориентации коллагеновых

волокон и их структурных изменений, а также при различных физиологических или патологических процессах.

### 1.9. FLIM микроскопия

FLIM-микроскопия — это метод, позволяющий визуализировать и анализировать сложные клеточные процессы на основе данных о времени жизни флуоресценции различных флуорофоров. Время жизни флуоресценции определяется как среднее время, в течение которого молекула флуорофора остается в возбужденном состоянии до возвращения в основное состояние с испусканием фотона [152,153]. Существует несколько подходов к реализации FLIM, но все они позволяют получить информацию о фотофизических событиях, которые трудно или невозможно наблюдать с помощью визуализации интенсивности флуоресценции, поскольку FLIM не зависит от концентрации флуорофора. Время жизни флуоресценции, по сравнению с интенсивностью флуоресценции, менее подвержено артефактам, возникающим из-за рассеяния излучения, фотообесцвечивания, неравномерного освещения образца, длины пути света или изменения параметров интенсивности возбуждения.

Когда молекула находится в возбужденном состоянии, существует вероятность электронного перехода  $S_1 \rightarrow S_0$ . Эта вероятность определяется константой скорости перехода  $k$  ( $s^{-1}$ ), которая физически эквивалентна константе мономолекулярной реакции. Обратная величина  $k$  имеет размерность времени и называется временем жизни флуоресценции ( $\tau$ ).

В жидких растворах молекулы флуорофоров сталкиваются с молекулами растворителя или другими веществами за время  $\tau$ , что может привести к безызлучательному высвобождению энергии, известному как тушение флуоресценции. В присутствии тушителя с концентрацией  $[Q]$  время жизни флуоресценции при динамическом тушении описывается уравнением Штерна-Фольмера (представлено ниже).

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \kappa_q \tau [Q]$$

Здесь  $I_0$  и  $I$  – интенсивность флуоресценции в отсутствии и в присутствии тушителя соответственно;  $\kappa_q$  - молекулярная константа скорости тушения;  $\tau$  - время затухания (жизни) флуоресценции в присутствии тушителя;  $[Q]$  - концентрация тушителя.

Физический смысл  $\tau$  – это время, за которое интенсивность сигнала флуоресценции снижается до  $1/e$  или до 36,8% от исходного уровня. Интенсивность флуоресценции в присутствии тушителя в момент времени  $t$  определяется по формуле:

$$I(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i}$$

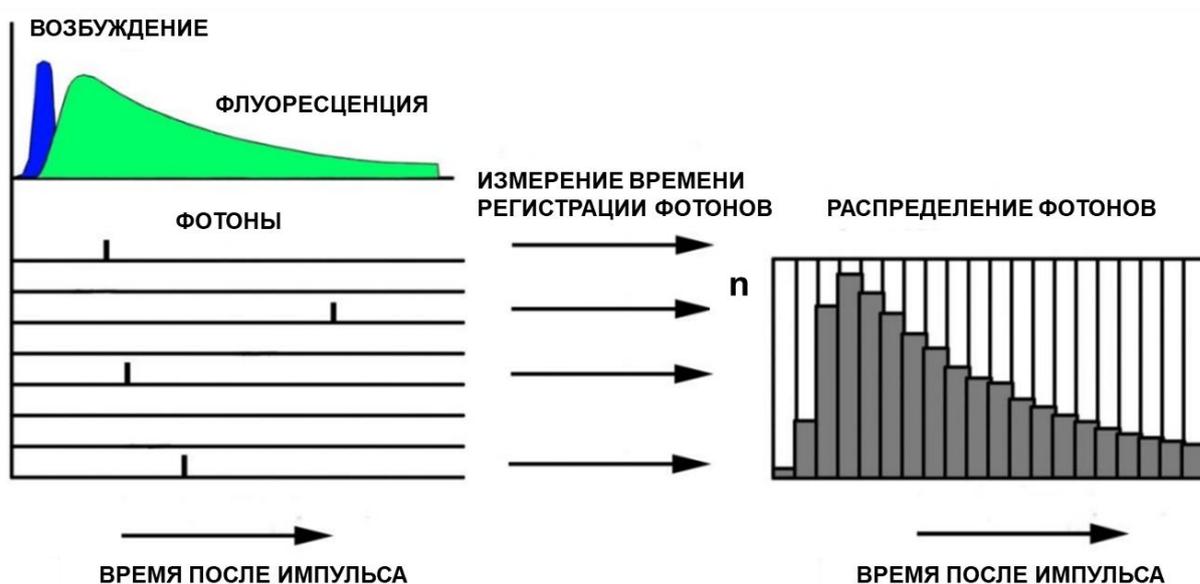
Средневзвешенное время жизни ( $\tau_m$ ) многоэкспоненциальной смеси образцов представляет собой сумму времен жизни флуоресценции каждого типа молекулы ( $\tau_i$ ), с учетом их относительного вклада [154].

$$\tau_m = \sum_i \tau_i a_i$$

Основным методом получения данных FLIM микроскопии является импульсный подход, при котором образец зондируют коротким импульсом, после чего оценивается характер затухания флуоресценции и далее результаты аппроксимируются экспоненциальной кривой [155].

На сегодняшний день метод время-коррелированного счёта фотонов (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) является наиболее востребованным подходом для регистрации времени жизни флуоресценции разного рода флуорофоров [109]. Данный подход основан на детектировании одиночных фотонов при возбуждении флуоресценции импульсным фемто- или пикосекундным лазером, с детектированием времени от момента возбуждения молекулы до момента прихода фотона на детектор, после детектирования всех фотонов, поступивших на детектор, строится характерная кривая затухания

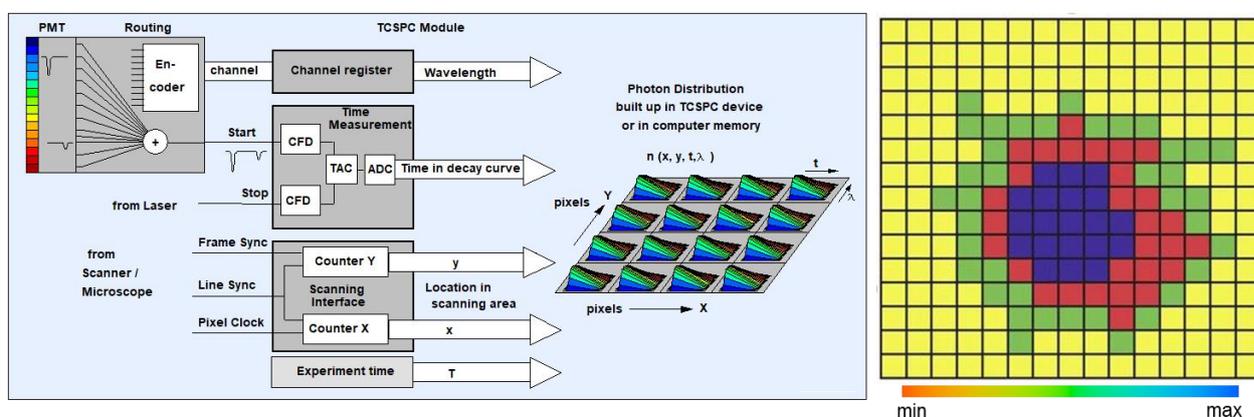
флуоресценции [152,153]. При постоянном импульсном воздействии в течение времени происходит накопление фотонов, пришедших на детектор системы и, в результате, строится статистическая диаграмма распределения фотонов в ходе единичного импульса [109,152,153]. Метод FLIM, основанный на TCSPC, позволяет идентифицировать экспоненциальные кривые со сложным (многоэкспонентным) профилем затухания флуоресценции. При этом, чем больше компонент вносят вклад в уравнение, описывающее характерную экспоненциальную кривую, тем больше фотонов должно быть накоплено в ходе эксперимента для корректного анализа значений времен жизни флуоресценции. Принцип TCSPC представлен на Рисунке 2.



**Рисунок 2.** Принцип одномерного времякоррелированного счета фотонов (TCSPC) [156].

Данные FLIM-микроскопии представляют собой матрицу пикселей, кодирующих одну или несколько кривых затухания флуоресценции с множеством временных каналов, каждый из которых соответствует определенному времени после лазерного импульса. Для упрощения визуализации пространственного распределения параметров FLIM проводится псевдоокрашивание, при котором каждый пиксель закодирован в цветовой

шкале. Принцип формирования псевдо-окрашенного FLIM изображения с применением программного обеспечения SPCImage представлен на Рисунке 3.



**Рисунок 3.** Принцип формирования псевдо-окрашенного FLIM изображения с применением программного обеспечения SPCImage [152].

Универсальная модель кривой затухания флуоресценции представляется в виде суммы экспонент с соответствующими весами (вкладами)  $a_1, a_2, \dots, a_n$ :

$$F(t) = \sum_{i=1}^n a_i e^{-t/\tau_i}$$

где  $t$  - общее время затухания флуоресценции, а  $\tau$  – время, в течение которого число возбужденных молекул уменьшается в  $e$  раз.

Время жизни флуоресценции индивидуально для каждого флуорофора и существенно зависит от его молекулярного окружения, парциального давления кислорода, температуры, pH и других факторов [157-160]. Особый интерес представляют данные о временах жизни флуоресценции различных форм НАД(Ф)Н, которые участвуют в различных процессах энергетического метаболизма клетки [23].

Технология FLIM представляет собой мощный инструмент для изучения биологических процессов на клеточном уровне. FLIM позволяет различать свободную и связанную формы НАДН, что имеет важное значение для

понимания энергетического метаболизма клеток. Короткая компонента времени жизни флуоресценции соответствует свободной форме НАДН, тогда как длинная компонента (с длинным временем жизни флуоресценции) соответствует связанной форме НАДН. Изменение значений параметров FLIM служит индикатором различных метаболических состояний клеток. В частности, изменения времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН, указывает на изменение характера гашения флуоресценции самого кофактора НАДН, из чего, в свою очередь, можно судить об изменении характера микроокружения флуорофора.

Хотя идея измерения флуоресценции образцов под микроскопом с наносекундным временным разрешением возникла еще в 1950-х годах, появление FLIM как метода картирования времени жизни флуоресценции началось только в 1989 году. В этом году были опубликованы первые работы с описанием метода флуоресцентной визуализации, где контраст изображения обеспечивается временем жизни флуоресценции. С тех пор возможности FLIM микроскопии резко возросли за счет появления FLIM со спектральным разрешением, FLIM с поляризационным разрешением и FLIM с чувствительностью к одиночным фотонам. Растущей популярности способствует коммерческая доступность данной технологии: модуль FLIM доступен для обычных микроскопов, для широкопольной, конфокальной и многофотонной микроскопии, включая программное обеспечение для анализа данных [152,153].

В 1992 году Lakowicz с соавторами предложили использовать технологию FLIM для разделения свободного и связанного с белками НАДН [159]. Авторы впервые зарегистрировали время жизни флуоресценции свободной формы НАДН в растворе и в комплексе с малатдегидрогеназой. В дальнейшем в 2014 году Blacker с соавторами предложили методику разделения НАДН и НАДФН в живых клетках и тканях по времени жизни флуоресценции [122].

Затухание флуоресценции НАДН имеет мультиэкспоненциальный характер, но в упрощенном представлении анализируется с использованием биэкспоненциальной или трехэкспоненциальной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции. При таком подходе короткая компонента времени жизни флуоресценции соответствует свободной форме кофактора (не связанной с белком), при этом связывание с белками приводит к росту времени жизни флуоресценции за счет тушения [159,161]. Отношение вкладов всех компонент затухания флуоресценции каждой из форм кофактора изменяется в соответствии с изменениями энергетического метаболизма клетки [23,129,162,163].

При построении кривой затухания необходимо подбирать параметры для аппроксимации, чтобы аппаратная кривая соответствовала экспериментальным данным. Критерием валидности модели аппроксимации является близость среднего квадратичного отклонения экспериментальных данных от модельной функции ( $\chi^2$ ). Этот параметр представляет собой сумму квадратов разницы между наблюдаемой и ожидаемой частотой результатов, деленную на ожидаемую частоту [157,158].

Преимущества FLIM включают:

1. Отсутствие необходимости в контрастных агентах: это позволяет проводить исследования в живых клетках без вмешательства в их физиологические процессы.

2. Прижизненный мониторинг: FLIM позволяет отслеживать изменения в метаболизме клеток в реальном времени, что особенно важно для динамического изучения клеточных процессов.

3. Чувствительность к метаболическим изменениям: FLIM демонстрирует высокую чувствительность к различным состояниям клеток, включая канцерогенез [164] и дифференцировку стволовых клеток [165,166]. Кроме того, в ряде работ показана эффективность подхода на основе FLIM для выявления патологических изменений в печени [24,25]. Корреляция с биохимическими маркерами: результаты, полученные с помощью FLIM, могут

быть сопоставлены со стандартными методами биохимического анализа, что подтверждает их надежность.

FLIM микроскопия имеет широкий спектр применений, включая обнаружение резонансного переноса энергии Фёрстера (FRET) для выявления белковых взаимодействий или конформационных изменений белков; оценка микровязкости клеток с использованием специализированных роторов, меняющих свою конформацию при изменении вязкостных свойств клеток; оценка температуры; оценка концентрации различных внутриклеточных ионов; оценка внутриклеточного pH [167].

На сегодняшний день FLIM микроскопия показала свою эффективность для точного выявления границ опухоли и неизменной ткани, благодаря чему метод стал востребованным и активно транслируется в зарубежную клиническую практику.

Таким образом, FLIM микроскопия становится важным инструментом в биомедицинских исследованиях, открывая новые горизонты для изучения клеточной физиологии и патологии. Метод может использоваться для выявления ранних изменений в клетках при различных заболеваниях, что имеет большое значение для диагностики и разработки новых терапевтических подходов.

## **ГЛАВА 2. Материалы и методы**

### **2.1. Объекты исследования**

Серии экспериментов проводились на самцах крыс линии Wistar весом 250-350 г., возрастом 2-3 месяца. 8 животных было использовано для подбора оптимальных параметров и настроек для проведения многофотонной микроскопии, ГВГ и FLIM микроскопии, включая подбор адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции. Общее количество животных, использованных для моделирования регенерации нормальной печени, составило 40. Общее количество животных, использованных для моделирования стеатоза и фиброза с последующей индукцией регенераторного процесса, составило 80. Лабораторные животные содержались в условиях SPF-вивария с 12-часовым

циклом дня и ночи. Все эксперименты, проводимые на животных, были одобрены локальным этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета (Нижний Новгород, Россия), Протокол №6 от 17.04.2019 и Протокол №15 от 23.09.2022.

## **2.2. Методы и методики исследования**

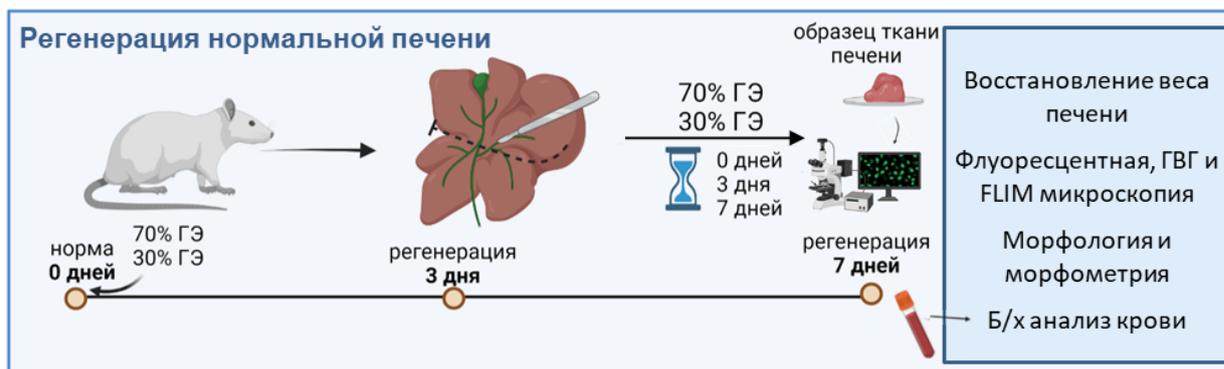
### *2.2.1. Животные модели*

Индукция регенерации нормальной печени проводилась путем 30% и 70% ГЭ. Процедура 70% ГЭ выполнялась по методике G.M. Higgins и R.M. Anderson [31]. Методика включает удаление левой передней и медиальной долей печени. По аналогичной методике выполнена резекция 30% печени путем удаления только левой боковой доли печени. Индукция регенерации на разных стадиях стеатоза и фиброза проводилась путем 70% ГЭ. Перед операцией каждое животное взвешивалось. Перед проведением хирургических манипуляций животных наркотизировали путем внутримышечного введения смеси Золетила (40 мг/кг веса животного, Virbac SA, Carros, Франция) и 2% Ксила (10 мг/кг веса животного, Interchemie, Нидерланды). Далее удаляли волосяной покров с области грудной клетки и живота и обрабатывали 70% спиртом, после чего выполняли срединную лапаротомию. Затем накладывали лигатуры на соответствующие долевым сосуды, впоследствии легированные доли удаляли. После проведения резекционных вмешательств лапаротомический разрез зашивали непрерывным швом. В работе использовался шовный материал полиэстер 5-0 (Vicril, США).

Из резецируемых долей получали *ex vivo* образцы, которые исследовали в качестве контроля (0 день регенерации). После резекции животное помещали в чистую клетку и содержали в стандартных условиях вивария. Ежедневно контролировали состояние животного. Мониторинг изменений в печени при регенерации проводили на 3 и 7 день регенерации. Для этого животное выводилось из эксперимента путем декапитации, и затем полностью забирался орган. Получаемые резецированные доли печени или целый орган

промывали физиологическим раствором и взвешивали. Точки мониторинга были выбраны на основе анализа литературных данных. Известно, что в норме регенерация печени характеризуется активной пролиферацией клеток именно на третий день, а на седьмой день процесс регенерации практически прекращается, при этом восстанавливается около 90% от исходной массы печени [32,168,169].

Методика индукции регенерации нормальной печени представлена на Рисунке 4.



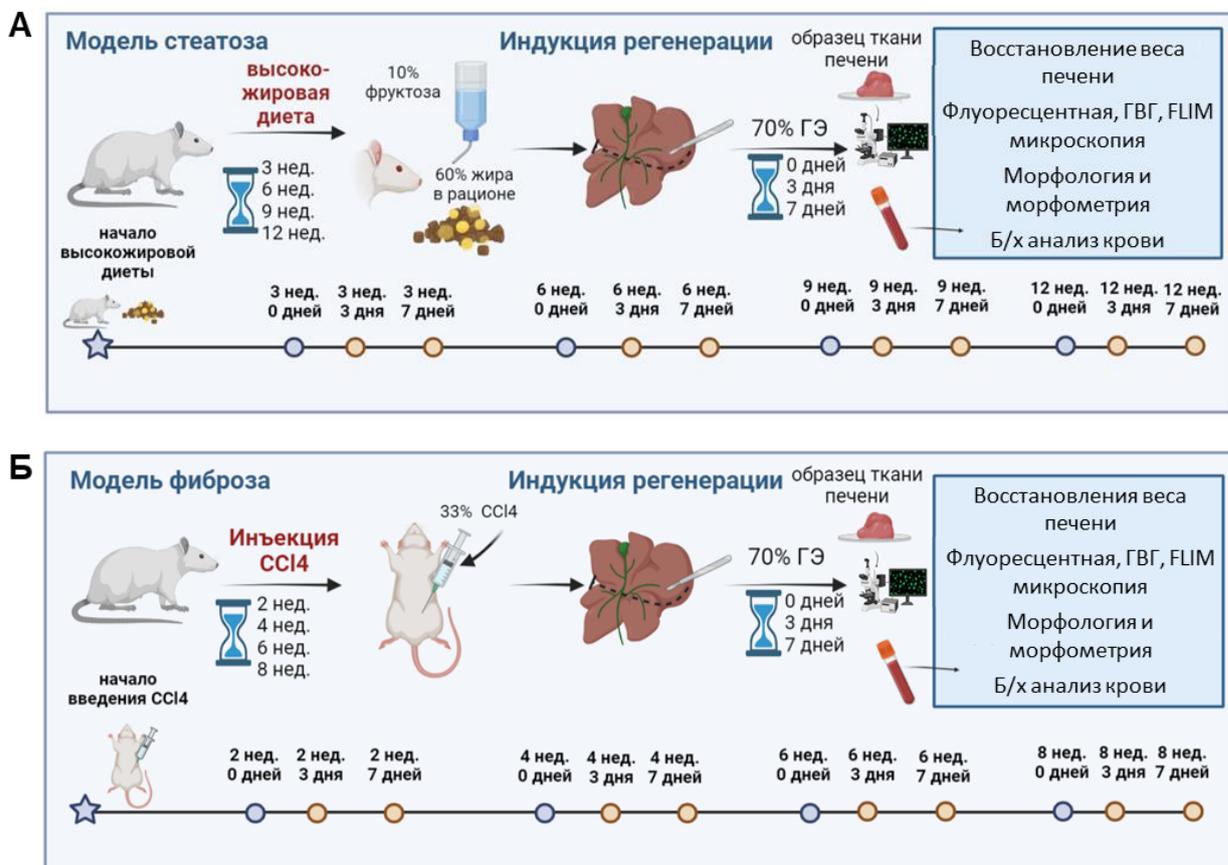
**Рисунок 4.** Схема экспериментов по индукции регенерации нормальной печени у лабораторных животных и исследованию *ex vivo* образцов ткани печени.

Индукцию стеатоза проводили путем перевода животных на высокожировую 12-недельную диету (60% жира от общего рациона и 10% раствор фруктозы в свободном доступе в поилке) [170]. Мониторинг изменений в печени проводили через 3, 6, 9 и 12 недель с момента перевода животных на высокожировую диету. На каждой из указанных временных точек патологии проводилась 70% ГЭ, с последующим мониторингом изменений в печени в момент резекции (0 день), на 3 и 7 день регенерации.

Индукция фиброза проводилась путем внутрибрюшинного введения 33% тетрахлорметана -  $CCl_4$  (ЭКОС-1, Россия), растворенного в масле ( $CCl_4$  - 0,1 мл/кг и оливковое масло 0,3мл/кг) [171]. Инъекции проводились два раза в неделю в течение 8 недель. Мониторинг изменений в печени проводили через 2, 4, 6 и 8 недель с момента первого введения токсина. На каждой из указанных временных точек патологии проводилась 70% ГЭ, с последующим

мониторингом изменений в печени в момент резекции (0 день), на 3 и 7 день регенерации.

Для обеих патологий *ex vivo* образцы печени, полученные в момент резекции, принимали за 0 день регенерации. Методики индукции стеатоза и фиброза с последующим запуском регенерации представлены на Рисунке 5.



**Рисунок 5.** Схема экспериментов по индукции (А) стеатоза и (Б) фиброза у лабораторных животных с последующим запуском регенерации печени и исследованию *ex vivo* образцов ткани печени.

### 2.2.2. Морфологический и морфометрический анализ ткани печени

В качестве стандартного метода для оценки структуры ткани печени применяли гистологический анализ, оценивая наличие дистрофических изменений клеток печени, а также скопления коллагена в ткани печени. Гистологический анализ проводился на срезах ткани печени, окрашенных гематоксилином и эозином, и по методу Ван-Гизона по стандартному протоколу [7]. Пролиферативную активность гепатоцитов оценивали с применением

морфометрического анализа на основе изменений следующих показателей: количество тетраплоидных гепатоцитов (клеток с ярко окрашенным увеличенным ядром) и двуядерных клеток, а также количество митотических гепатоцитов. Средние значения всех этих параметров рассчитывали пропорционально на 100 неделящихся клеток. Исследование проводили на гистологических срезах (окраска гематоксилином и эозином) [94].

### *2.2.3. Биохимический анализ крови*

Образцы крови получали из хвостовой вены крыс перед проведением резекционных вмешательств и перед выведением животных из эксперимента. Сыворотку крови получали центрифугированием цельной крови при 3000 об/мин в течение 15 мин. По уровню креатинина, мочевины, общего белка, альбумина и глобулина в сыворотке крови оценивали функцию печени. По уровню АСТ, АЛТ и ЩФ в сыворотке крови выявляли наличие цитолиза клеток печени. Изменения в липидном обмене определяли по уровню липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и ТГ в сыворотке крови. Анализ проводился на автоматизированном биохимическом анализаторе (Mindray BS-120, Китай) с использованием стандартных реактивов (Витал, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

### *2.2.4. Оценка восстановления веса печени*

Для вычисления процента восстановления печени при регенерации измеряли отношение веса тела животного к весу печени в момент резекции и на разных этапах регенерации, а затем вычисляли процент восстановленного веса печени.

*Исходный вес печени* до резекции рассчитывали по формуле: *вес резецированной печени* ( $z$ )/0,3 для модели 30% ГЭ и *вес резецированной печени* ( $z$ )/0,7 для модели 70% ГЭ.

Процент восстановления веса печени определяли по формуле:

*вес оставшейся печени (ремнанта) (z) / вес тела после ГЭ (z) / исходный вес печени (z) / вес тела до ГЭ (z)* - это значение принималось за «абсолютный процент восстановления веса печени». Для анализа восстановительной способности печени при патологии относительно регенерации нормальной печени вычисляли «относительный процент восстановления массы печени». Для этого определяли, какой процент составляет абсолютный восстановленный вес печени при патологии (*абсолютный вес<sub>пат</sub>*) от абсолютного восстановленного веса нормальной печени (*абсолютный вес<sub>норм</sub>*) на соответствующем этапе регенерации — 3 или 7 день регенерации: *абсолютный вес<sub>пат</sub> (z) / абсолютный вес<sub>норм</sub> (z) \* 100%*.

#### 2.2.5. Многофотонная микроскопия в режимах флуоресцентной микроскопии, ГВГ микроскопии и FLIM микроскопии

Многофотонная микроскопия проводилась с использованием системы LSM 880 (Carl Zeiss, Германия), которая была оснащена фемтосекундным лазером Mai Tai HP (Spectra-Physics, США) и масляно-иммерсионным объективом C-Apochromat W Korr (Carl Zeiss, Германия) с увеличением 40x и числовой апертурой 1.3, с поддержкой ГВГ и FLIM микроскопии. Модуль FLIM был укомплектован системой время-коррелированного счёта фотонов SPC 150 TCSPC (Becker Hickl GmbH, Германия). Для возбуждения флуоресценции НАД(Ф)Н использовали длину волны 750 нм, регистрация флуоресценции проводилась в диапазоне 450-490 нм при мощности возбуждающего излучения 6 мВт. Интенсивность флуоресценции в канале НАД(Ф)Н анализировалась с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США). Изображения импортировались в программу, где исключался фоновый сигнал (изображения без объекта при тех же настройках), выделялась цитоплазма и проводился количественный анализ сигнала. ГВГ микроскопия использовалась для визуализации коллагена в печени, сигнал второй гармоники генерировали на длине волны 800 нм, регистрация сигнала осуществлялась в диапазоне 371-421 нм, также на длине волны 800 нм проводилось возбуждение собственной

флуоресценции клеток с регистрацией в диапазоне 433–660 нм. Количественная оценка интенсивности сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена проводилась с использованием ImageJ для каждого поля зрения. FLIM микроскопия применялась для изучения энергетического метаболизма гепатоцитов на основе данных о временах жизни флуоресценции свободной и связанной форм НАДН и НАДФН.

При обработке данных FLIM в программе SPImage (Becker Hickl GmbH, Германия) выделялась цитоплазма клетки, исключая ядро, и выбирались участки с оптимальными значениями  $\chi^2$  (от 0.8 до 1.2). Время регистрации флуоресценции составляло 60 секунд, а количество фотонов в каждом пикселе было не менее 5000 для биэкспоненциальной модели и не менее 10000 для трехэкспоненциальной модели. Для выбора адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАДН на *ex vivo* образцах здоровой печени сопоставлялись значения  $t_2$  и  $\chi^2$  для обеих моделей. Высокие значения  $a_3$  (более 5%) служили важным критерием для выбора трехэкспоненциальной модели. Значение параметра  $t_1$  было фиксировано на уровне 400 пс, что является стандартным для данного параметра в FLIM [172].

После подбора модели проводился анализ энергетического метаболизма гепатоцитов с помощью FLIM микроскопии. В цитоплазме живых клеток исследовались следующие параметры FLIM:  $t_m$  (пс) – средневзвешенное время жизни флуоресценции, относительные вклады свободной  $a_1$  (%) и связанной  $a_2$  (%) форм НАДН; относительный вклад НАДФН -  $a_3$  (%); сумма  $a_1(\%) + a_2(\%) + a_3(\%)$  равнялась 100%;  $t_1$  (пс) – время жизни флуоресценции свободной формы НАДН (фиксированное значение 400 пс). В образцах печени с патологией, в зонах со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, ассоциированных с поврежденными гепатоцитами, липидной инфильтрацией и очагами накопления коллагена, анализ с использованием FLIM микроскопии не проводился, в связи с недостаточностью количества фотонов для анализа данных.

Схема эксперимента по исследованию *ex vivo* образцов ткани печени методами многофотонной микроскопии представлена на Рисунках 4 и 5.

#### *2.2.6. Корреляционный анализ анализируемых параметров состояния печени*

С целью выявления корреляции между анализируемыми параметрами исходного состояния нормальной печени и её регенераторным потенциалом проводили корреляционный анализ на основе критерия Пирсона. Корреляционный анализ проводили с использованием *ex vivo* образцов нормальной печени до и после ГЭ. Парную корреляцию выявляли для следующих параметров:  $a_2$  (%) до и после ГЭ,  $a_3$  (%) до и после ГЭ, количество митотических клеток до и после ГЭ, абсолютный процент восстановления печени после ГЭ.

#### *2.2.7. Статистический анализ*

Для определения статистической значимости при анализе восстановления веса печени при регенерации нормальной печени и при регенерации на разных стадиях стеатоза и фиброза 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;  $p$ -значение  $\leq 0,05$ .

С применением многофотонной микроскопии в режимах флуоресцентной микроскопии, ГВГ микроскопии и FLIM микроскопии получали 10 изображений (полей зрения) для каждой временной точки эксперимента. Для каждого поля зрения проводили количественный анализ интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н в двух выявленных зонах – с высокой и низкой интенсивностью сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н, при этом для каждой зоны выделяли область интереса в цитоплазме 30 гепатоцитов. Для каждого поля зрения проводили анализ параметров FLIM для 30 гепатоцитов.

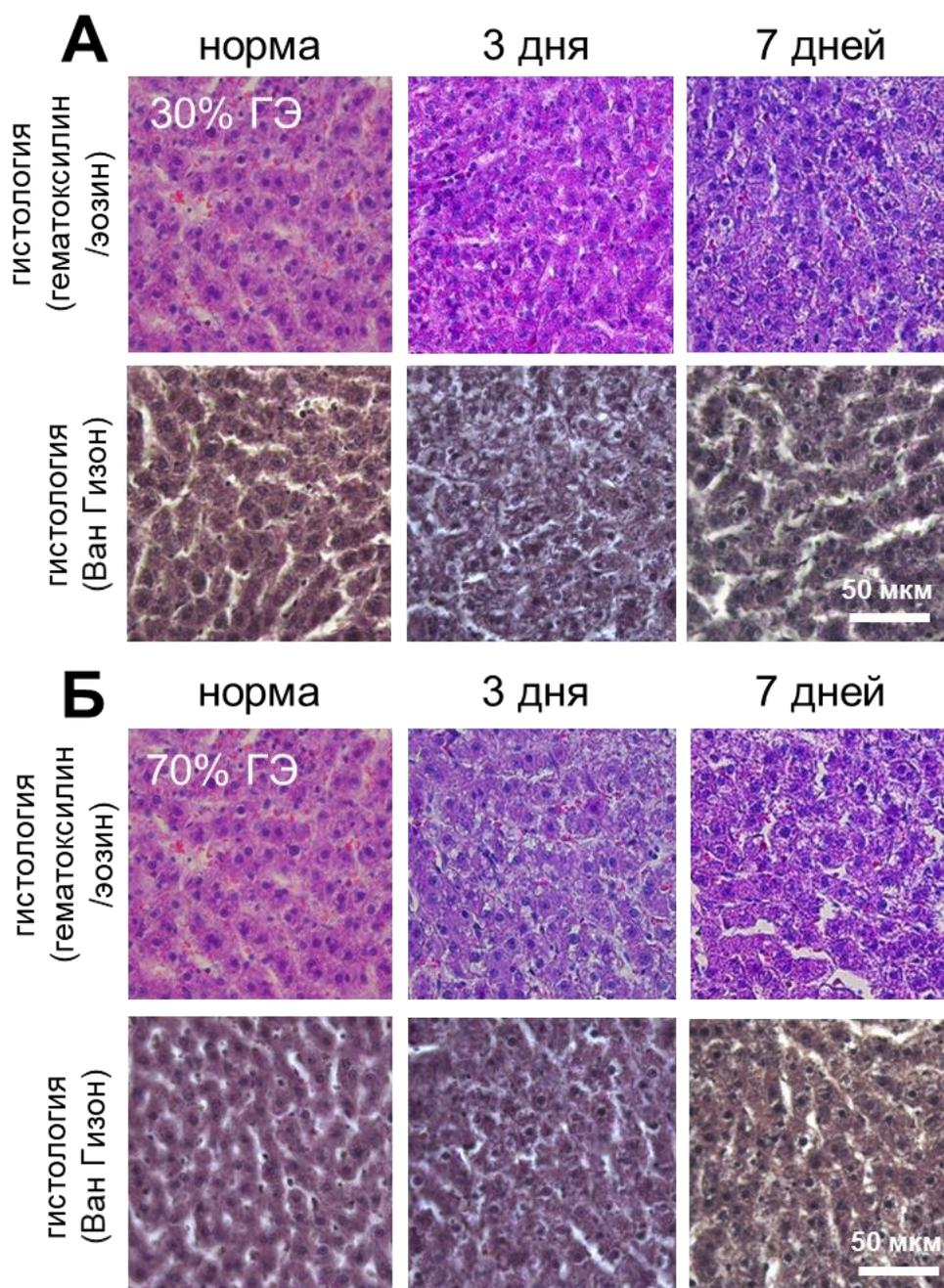
Сравнительный анализ данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA10 (StatSoft, США). Статистические различия между разными группами анализировали с помощью попарно-множественного сравнения. Различия в средних значениях между группами считались значимыми при  $p \leq 0,05$ . Для подтверждения нормальности распределения использовали тест Шапиро-Уилкса. Для попарного сравнения использовали метод попарного t-критерия с использованием поправки Бонферрони.

### **ГЛАВА 3. Результаты и их обсуждение**

#### **3.1. Разработка методики оценки состояния печени**

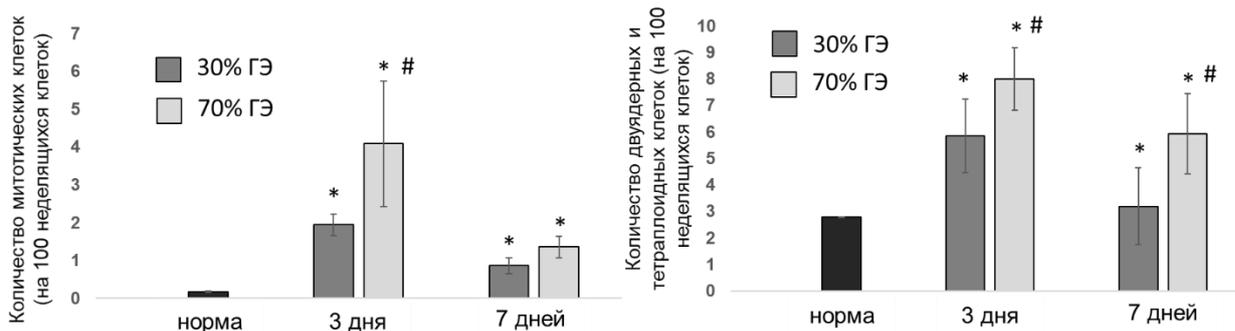
##### *3.1.1. Характеристики нормальной печени при исследовании стандартными методами*

При проведении морфологического анализа ни в одном из исследованных образцов нормальной печени не было выявлено признаков воспаления: отека, клеточной инфильтрации или нарушения дольковой архитектуры ткани (Рисунок 6А, Б). Структура коллагеновых волокон в ткани были в пределах нормы (Рисунок 6А, Б).



**Рисунок 6.** Гистологические изображения печени в норме при регенерации для моделей (А) 30% ГЭ и (Б) 70% ГЭ; окраска гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона; шкала 50мкм; х400.

Морфометрический анализ показал, что количество митотических клеток в нормальной печени составило  $0,17 \pm 0,02$ . Количество двуядерных и тетраплоидных клеток составило  $2,78 \pm 0,5$ . Результаты морфометрического анализа представлены на Рисунке 7.



**Рисунок 7.** Морфометрический анализ ткани печени. Показано количество митотических клеток и количество тетраплоидных и двуядерных клеток в норме и при регенерации. Значения представлены как количество делящихся клеток на 100 неделящихся клеток. \* - статистически значимые различия по сравнению с контролем, # - статистически значимые различия по сравнению с 30% ГЭ для соответствующей временной точки. Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение.

Для нормальной печени было показано, что уровни всех исследуемых биохимических параметров сыворотки крови были в пределах допустимой нормы. Результаты представлены в Таблице 1.

**Таблица 1.** Уровень биохимических показателей сыворотки крови в норме и в процессе регенерации нормальной печени для моделей 30% ГЭ и 70% ГЭ.

	Норма	30% ГЭ 3 дня	30% ГЭ 7 дней	70% ГЭ 3 дня	70% ГЭ 7 дня
АСТ (ус.ед/л)	30,4	38,38	33,81	40,25	119,08
АЛТ (ус.ед/л)	39,56	46,55	53,44	35,11	63,41
ЩФ (ус.ед/л)	61,73	85,58	41,89	97,57	45,21
Креатинин (мкмоль/л)	53,42	62,7	59,11	67,63	48,1
Общий белок (г/л)	70,06	55,83	60,61	62,26	61,07
Мочевина (ммоль/л)	5,74	7,55	7,12	8,71	6,14
ЛПВП (мг/дл)	12,39	26,57	24,52	23,8	22,59
ЛПНП (мг/дл)	16,7	21,1	20,09	25,03	24,37
ТГ (ммоль/л)	0,72	0,78	0,58	0,83	0,8

### *3.1.2. Флуоресцентная микроскопия*

В нормальной печени сигнал флуоресценции НАД(Ф)Н был распределен равномерно, зон со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н не наблюдалось, выявлены единичные включения витамина А (Рисунок 10А, Б).

### *3.1.3. ГВГ микроскопия*

С применением ГВГ микроскопии было показано отсутствие сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена ( $118,9 \pm 7,5$  усл. ед.), что соответствует отсутствию скоплений коллагеновых волокон в ткани печени (Рисунок 10А,Б).

### *3.1.4. Определение оптимальных условий для исследования ex vivo образцов печени с применением многофотонной микроскопии в разных режимах*

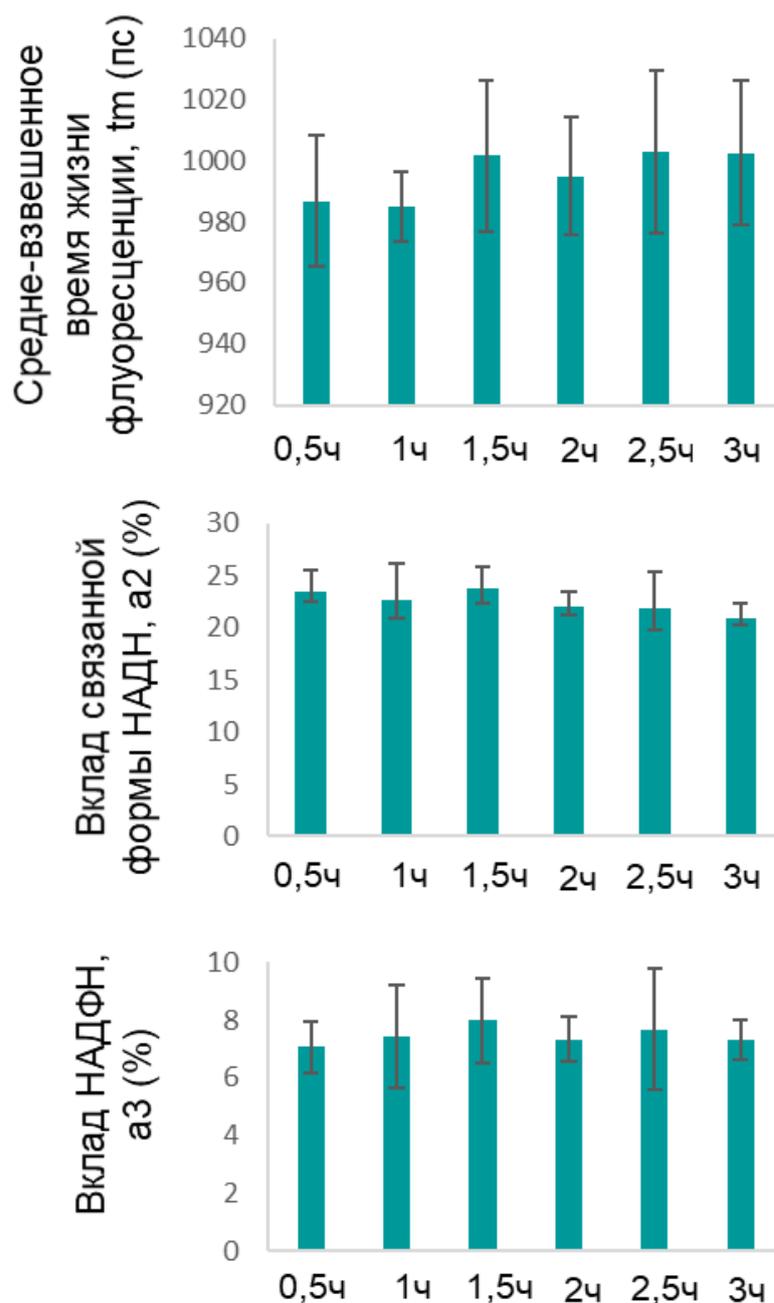
Были определены оптимальные условия для проведения анализа состояния печени с применением многофотонной микроскопии. В режиме флуоресцентной микроскопии было проведено сравнение интенсивности сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н при получении сигнала с поверхности среза ткани и через печеночную капсулу (с поверхности органа). Было показано, что интенсивность сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н при получении сигнала с поверхности среза была в среднем выше в  $2,12 \pm 0,07$  раза, чем интенсивность сигнала при получении изображений через печеночную капсулу (с поверхности органа). В связи с полученными результатами, в дальнейшей работе исследование ex vivo образцов ткани печени с применением методов многофотонной микроскопии проводилось с поверхности среза.

Также были определены оптимальные сроки для проведения анализа данных FLIM микроскопии, при которых метаболический статус гепатоцитов в ex vivo образцах оставался стабильными, и значения исследуемых параметров FLIM были корректны (соответствовали известным из литературных источников значениям). Было показано, что в течение трёх часов энергетический метаболизм гепатоцитов в ex vivo образцах оставался стабильным.

Были установлены оптимальные условия для анализа состояния печени с использованием разных режимов многофотонной микроскопии. В режиме флуоресцентной микроскопии было проведено сравнение интенсивности флуоресцентного сигнала НАД(Ф)Н, полученного с поверхности среза ткани и через печеночную капсулу (с поверхности органа). Результаты показали, что интенсивность сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н при получении данных с поверхности среза в среднем была выше, чем при получении сигнала через печеночную капсулу, в  $2,12 \pm 0,07$  раза. Учитывая эти результаты, в дальнейшем исследование *ex vivo* образцов ткани печени с применением методов многофотонной микроскопии проводилось именно с поверхности среза.

Также были определены оптимальные сроки для анализа данных FLIM микроскопии, в течение которых энергетический метаболизм гепатоцитов в *ex vivo* образцах оставался стабильным, а значения исследуемых параметров FLIM соответствовали известным из литературы. Было установлено, что в течение трех часов энергетический метаболизм гепатоцитов в *ex vivo* образцах оставался неизменным.

Результаты анализа параметров FLIM при мониторинге в течение трёх часов представлены на Рисунке 8.



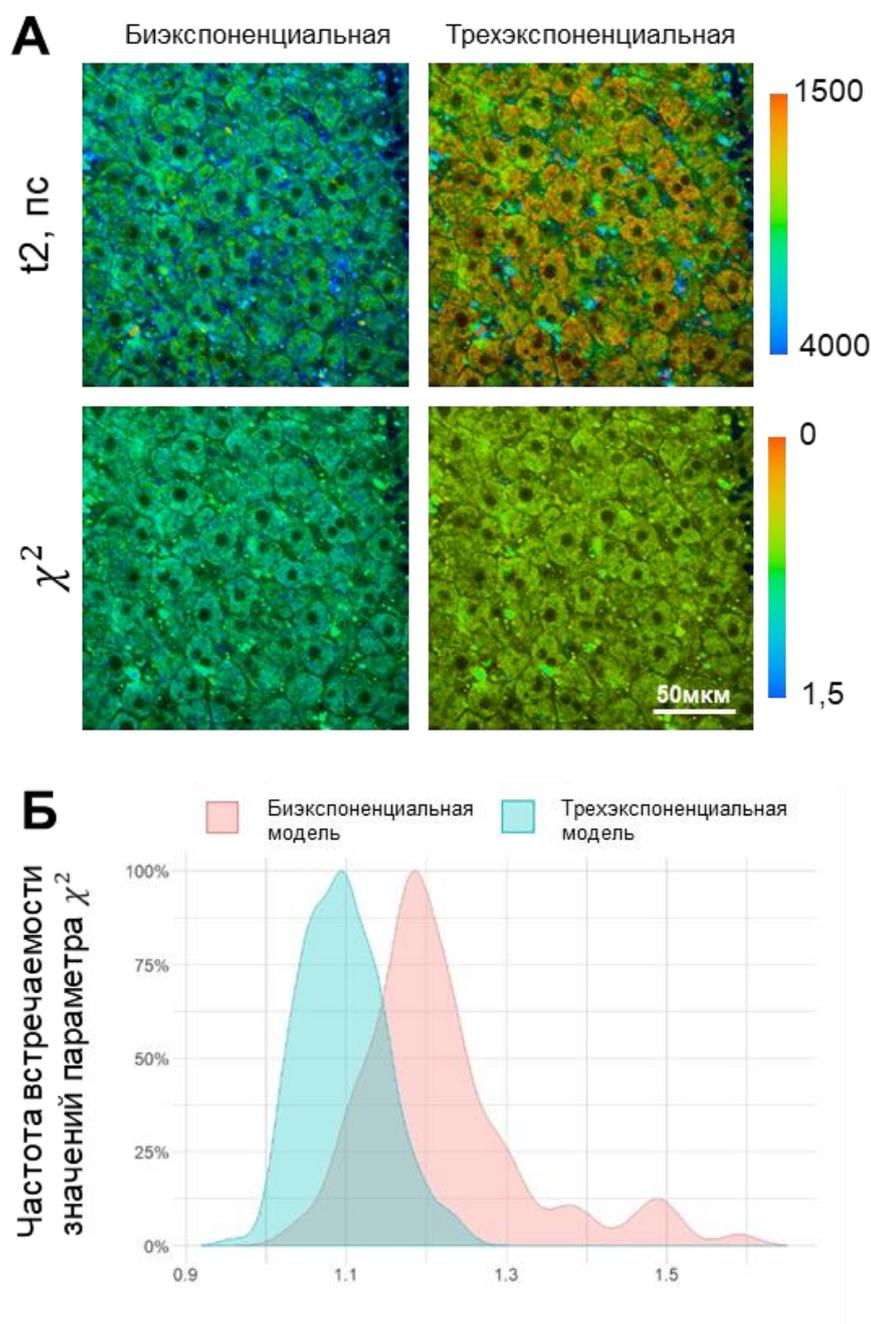
**Рисунок 8.** Значения параметров FLIM при мониторинге энергетического метаболизма гепатоцитов в *ex vivo* образцах в течение трёх часов. Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение.

Несмотря на то, что максимальный срок для выполнения исследований составляет три часа, в дальнейшем ходе работы исследования с применением FLIM микроскопии не превышали 30 мин.

### *3.1.5. Подбор адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н*

Был проведен подбор адекватной модели аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н для дальнейшего проведения анализа данных FLIM микроскопии гепатоцитов в ex vivo образцах ткани печени. При анализе данных FLIM микроскопии, полученных с применением биэкспоненциальной модели, были получены значения времен жизни флуоресценции связанной формы НАД(Ф)Н, которые в среднем составили  $3600 \pm 160$  пс (Рисунок 9А), что не соответствует известным из литературы значениям, находящимся в диапазоне 1500–2200 пс [173,174]. В связи с этим был сделан вывод, что фосфорилированная форма (третья компонента кривой затухания флуоресценции) вносит вклад во время жизни флуоресценции связанной формы НАД(Ф)Н. Анализ валидности выбранной модели проводился с учетом средних значений параметра  $\chi^2$ . Значения  $\chi^2$  составляли  $1,3 \pm 0,24$  и  $1,1 \pm 0,02$  для биэкспоненциальной и трехэкспоненциальной моделей аппроксимации кривой затухания флуоресценции НАД(Ф)Н, соответственно (Рисунок 9А, Б). Значения  $\Delta\chi^2$  были при использовании трехэкспоненциальной модели в среднем составило  $7,8 \pm 2$  %.

Такой результат показывает, что для трехэкспоненциальной модели отклонение экспериментальных данных от модельной функции меньше, чем для биэкспоненциальной модели.



**Рисунок 9.** 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  $\chi^2$ . (Б) Сравнение распределения значений параметров  $\chi^2$  для двух моделей аппроксимации кривой затухания флуоресценции. За 100% принимали количество наиболее часто встречаемого значения параметра  $\chi^2$ .

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

### 3.1.6. FLIM микроскопия

Были определены характерные значения параметров FLIM в гепатоцитах нормальной печени. Среднее значение средневзвешенного времени 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 составили  $67,81 \pm 4,84$  и  $24,34 \pm 3,37$ , соответственно. Среднее значение вклада времени жизни флуоресценции НАДФН составило  $7,8 \pm 1,74$ . Результаты представлены на Рисунке 11А, Б, В.

## 3.2. Оценка состояния нормальной печени при регенерации

Подсчет процента восстановленного веса печени показал, что при 30% ГЭ на третий день регенерации восстанавливается  $73,4 \pm 2,23\%$ , а на седьмой день  $88,4 \pm 43,3\%$  первоначального веса печени, для 70% ГЭ было показано, что на третий день регенерации восстанавливается  $80,9 \pm 3,3\%$ , а на седьмой день  $92,9 \pm 1,1\%$  веса печени. Результаты анализа представлены в Таблице 2.

**Таблица 2.** Данные контроля веса лабораторных животных и образцов печени в норме и на разных этапах регенерации.

Регенерация нормальной печени	Вес животного, г		Вес печени, г			Процент восстановления веса печени, %
	В момент резекции	На этапе регенерации	Резецируемая часть	Ремнант	Исходный вес	
30% ГЭ 3 дня	406,9	390	4,4	10,8	13,4	84,0
30% ГЭ 7 дней	400,7	385	3,3	9,7	10,9	92,6
70% ГЭ 3 дня	375	350,5	7,2	7,6	10,2	79,7
70% ГЭ 7 дней	401,6	374,1	7	8,5	10	91,2

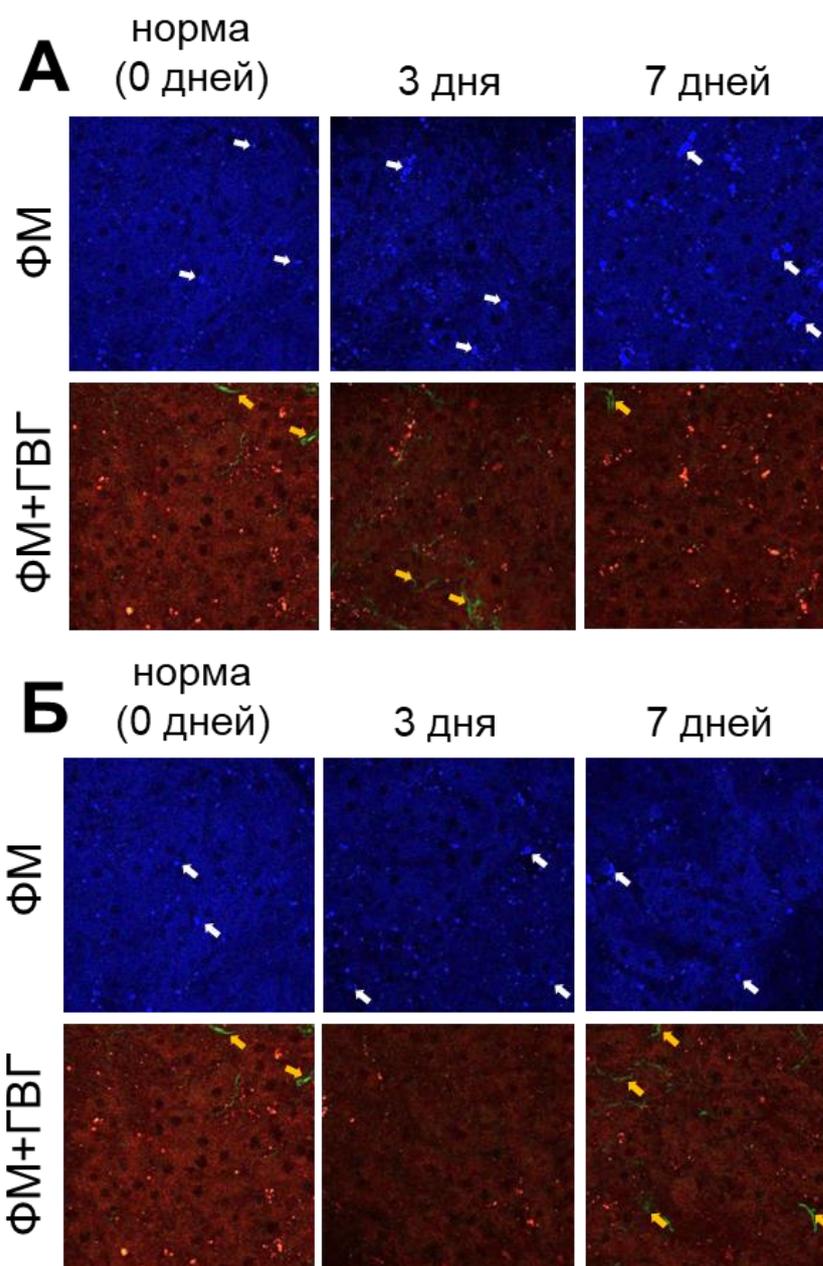
При проведении морфологического анализа ни в одном из исследованных образцов не было выявлено признаков воспаления: отека, клеточной инфильтрации или нарушения дольковой архитектуры ткани (Рисунок 6А, Б). При этом, в обеих моделях наблюдали накопление липидных капель в гепатоцитах, наиболее выраженное при 70% ГЭ. Такие морфологические изменения являются характерными для процесса регенерации печени [24,175]. При окрашивании по методу Ван-Гизона наблюдались тонкие волокна коллагена в межклеточном пространстве. Количество и структура коллагеновых волокон были в пределах нормы (Рисунок 6А, Б).

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

Был проведен анализ биохимических показателей крови в норме и в процессе нормальной регенерации. Все исследуемые показатели были в пределах нормы. Исключение составили значения АСТ на седьмой день после 70% ГЭ и значения ЩФ на третий день после 70% ГЭ, значения которых выходили за пределы нормальных значений. Результаты биохимического анализа крови для 30% ГЭ и 70% ГЭ представлены в Таблице 1.

### *3.2.1. Флуоресцентная микроскопия*

Было показано, что сигнал флуоресценции НАД(Ф)Н однороден по всей поверхности среза печени как на третий, так и на седьмой день регенерации после 30% и 70% ГЭ. В межклеточном пространстве наблюдались включения витамина А (Рисунок 10А, Б).



**Рисунок 10.** Флуоресцентная микроскопия (ФМ) и ГВГ микроскопия 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; белыми стрелками обозначены включения витамина А, желтыми стрелками обозначены волокна коллагена; x400.

В работе Wang et al. [25] авторы интерпретировали такие включения, как сигнал флуоресценции витамина А, который накапливается в клетках Ито. В данной работе показано увеличение количества ярких включений витамина А в процессе регенерации.

### 3.2.2. ГВГ микроскопия

С применением ГВГ микроскопии было показано отсутствие сигнала ГВГ от скоплений коллагена в печени как для 30% ГЭ ( $120,3 \pm 19,5$  усл. ед.) (Рисунок 10А), так и для 70% ГЭ ( $115,0 \pm 18,9$  усл. ед.) (Рисунок 10Б), что свидетельствует об отсутствии осложнений в виде фиброза.

### 3.2.3. FLIM микроскопия

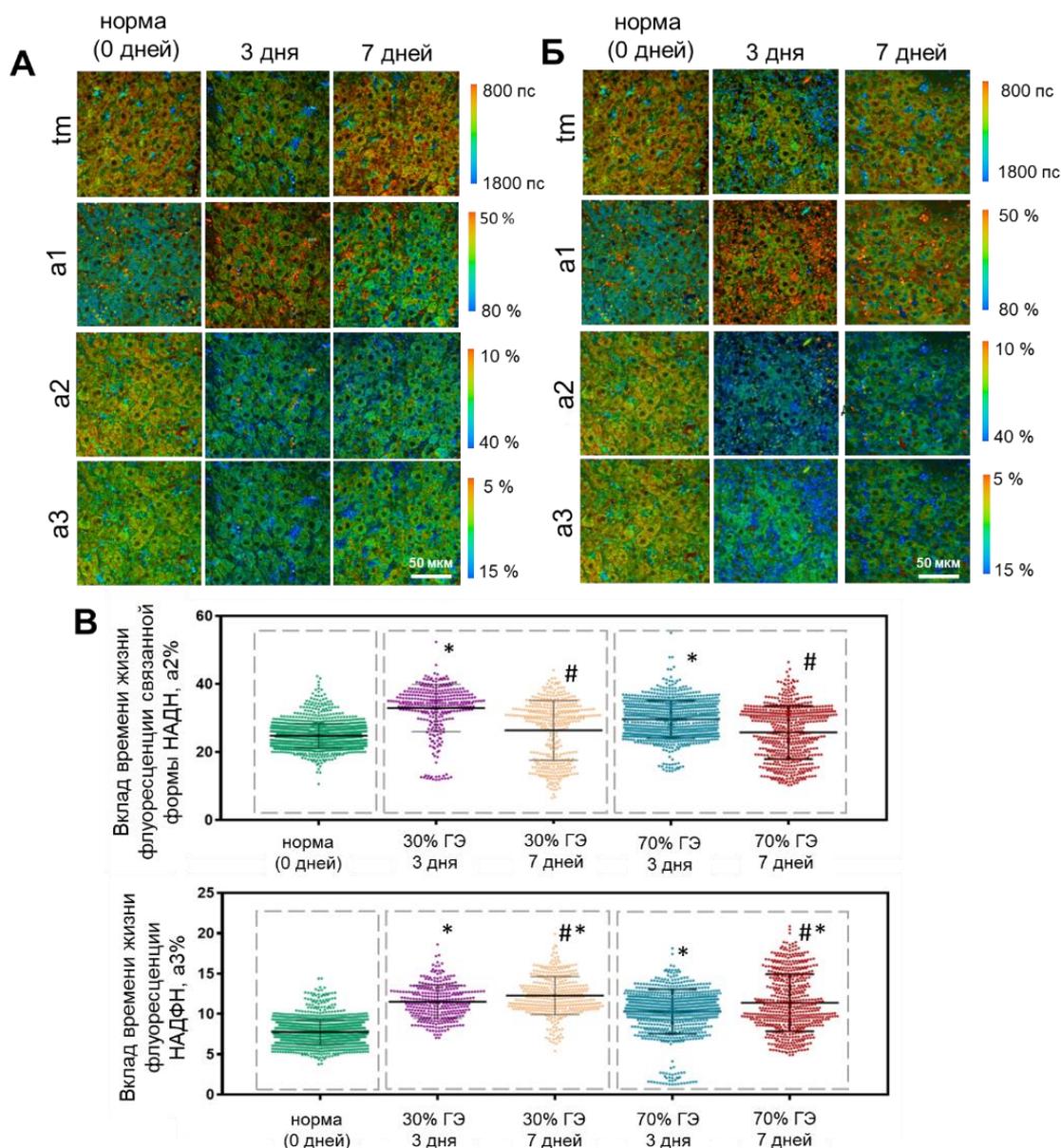
Были получены значения параметров FLIM для здоровой печени при регенерации. Для обеих моделей (30% и 70% ГЭ) было показано, что значения  $t_m$ ,  $t_2$ , и  $t_3$  значительно не отличаются для всех этапов регенерации нормальной печени. При анализе вкладов времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н ( $a_1$ ,  $a_2$  и  $a_3$ ) было обнаружено, что как для 30% ГЭ, так и для 70% ГЭ на третий день происходит статистически значимое увеличение вклада связанной формы НАДН и НАДФН. На седьмой день значения вкладов данных параметров достоверно снижались (Рисунок 11А, Б, В, Таблица 3).

**Таблица 3.** Значения параметров FLIM на разных этапах регенерации нормальной печени; \* - статистически значимое отличие от нормы (0 дней); # - статистически значимое отличие от 3 дня регенерации печени, значение  $p \leq 0,05$ . Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение.

<b>30% ГЭ</b>	<b>tm, пс</b>	<b>t2, пс</b>	<b>t3, пс</b>	<b>a1,%</b>	<b>a2,%</b>	<b>a3,%</b>
<b>норма (0 дней)</b>	1276±39	2276±101	4105±317	67,8±4	24,3±3,	7,8±2
<b>3 дня</b>	1387±43	2194±113	4130±421	51,2±4(*)	33,9±3(*)	14,5±1(*)
<b>7 дней</b>	1312±55	2094±96	3861±276	56,5±3(#*)	31,6±2(#*)	12,2±3(#*)
<b>70% ГЭ</b>	<b>tm, пс</b>	<b>t2, пс</b>	<b>t3, пс</b>	<b>a1,%</b>	<b>a2,%</b>	<b>a3,%</b>
<b>норма (0 дней)</b>	1276±39	2276±101	4105±317	67,8±4	24,3±3,	7,8±2
<b>3 дня</b>	1176±93	2000±118	3428±179	60,8±3(*)	29,6±3(*)	10,3±4(*)
<b>7 дней</b>	1295±57	1723±130	3705±181	62,9±3(#*)	25,7±2(#*)	11,4±3(#*)

Для обеих моделей 30% и 70% ГЭ было показано, что значения  $t_m$ ,  $t_2$ , и  $t_3$  значительно не отличались для всех этапов регенерации нормальной печени. Тогда как при анализе вкладов времен жизни флуоресценции НАД(Ф)Н ( $a_1$ ,  $a_2$  и  $a_3$ ) было показано, что как для 30% ГЭ, так и для 70% ГЭ на третий день наблюдалось статистически значимое увеличение вклада связанной формы НАДН и вклада НАДФН. На 7 день значения вкладов данных параметров достоверно снижались.

На Рисунке 11А, Б представлены FLIM изображения, которые позволяют визуально оценить распределение значений параметров  $t_m$ ,  $a_1$ ,  $a_2$  и  $a_3$  в нормальной печени на разных этапах регенерации. На Рисунке 11В представлено распределение значений  $a_2$  и  $a_3$ .



**Рисунок 11.** FLIM микроскопия нормальной печени при регенерации для (А) 30%ГЭ и (Б) 70%ГЭ. FLIM изображения для параметров tm, a1 и a2; x400. (В) Значения вкладов связанной формы НАДН и НАДФН, каждая точка на графике соответствует одному измерению; tm (пс) - средневзвешенное по амплитуде время жизни флуоресценции; 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.

Полученные данные указывают на увеличение интенсивности окислительного фосфорилирования в гепатоцитах во время регенерации, что связано с возрастанием энергетических затрат делящихся клеток. Кроме того, рост вклада НАДФН в процессе регенерации свидетельствует об усилении липогенеза и синтеза нуклеиновых кислот.

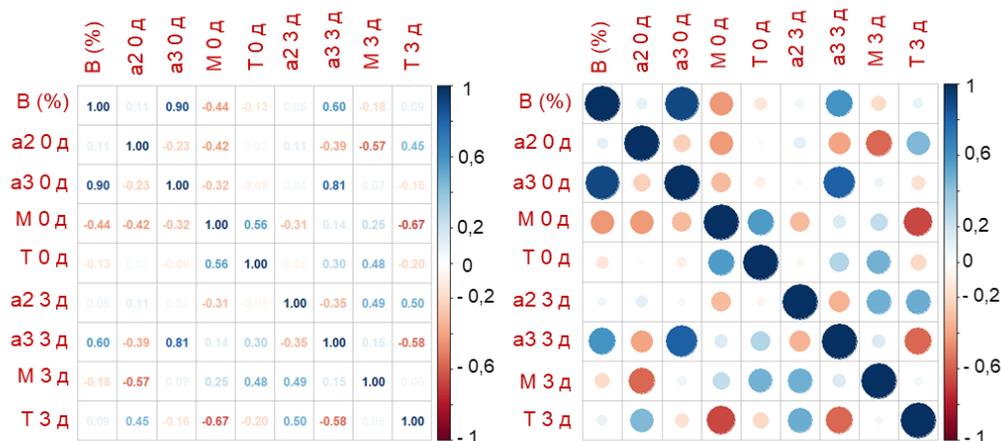
В ходе исследования не было обнаружено значительных различий в динамике изменения энергетического метаболизма гепатоцитов между моделями 30% и 70% гемигепатэктомии. Однако морфометрический анализ и оценка восстановления веса печени показали, что регенерация была более выраженной в модели 70% ГЭ, что делает её более подходящей для изучения различных аспектов регенераторного процесса.

Кроме того, стандартной практикой при лечении опухолей печени является правосторонняя гемигепатэктомия с удалением сегментов V-VIII или расширенная правосторонняя гемигепатэктомия с удалением сегментов IV-VIII, при которой средний объем удаляемой ткани составляет 50-80% (в зависимости от анатомических особенностей пациента) и в среднем равен 65% [176]. Таким образом, модель 70% более приближена к реальной клинической практике. В связи с этим дальнейшее моделирование регенерации при сопутствующей патологии проводилось с использованием модели 70% ГЭ.

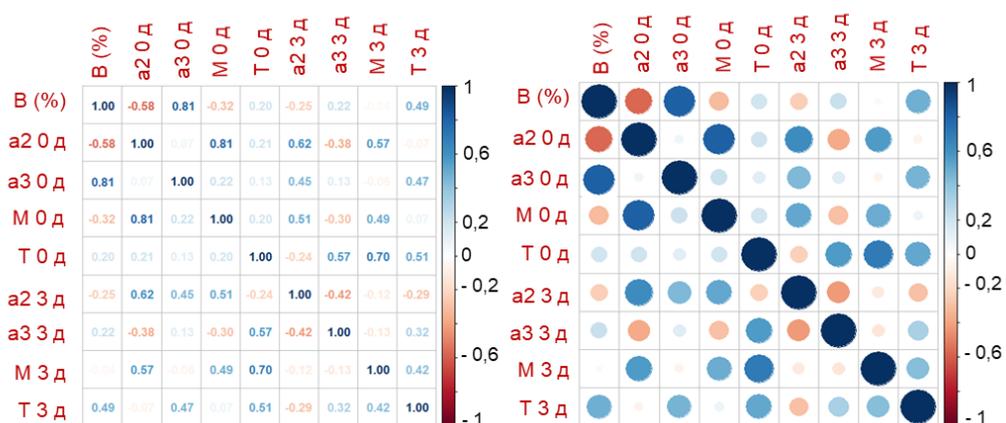
#### *3.2.4. Корреляционный анализ параметров состояния нормальной печени в момент резекции и при регенерации*

С целью выявления корреляции между анализируемыми параметрами исходного состояния печени в момент резекции и эффективностью регенерации был проведен корреляционный анализ на основе критерия Пирсона. Основным параметром, который достоверно отражает эффективность регенераторного процесса, является процент восстановления печени при регенерации. Результаты корреляционного анализа для обеих моделей гепатэктомии представлены на Рисунках 12 и 13.

### 30% ГЭ 3 дня



### 30% ГЭ 7 дней

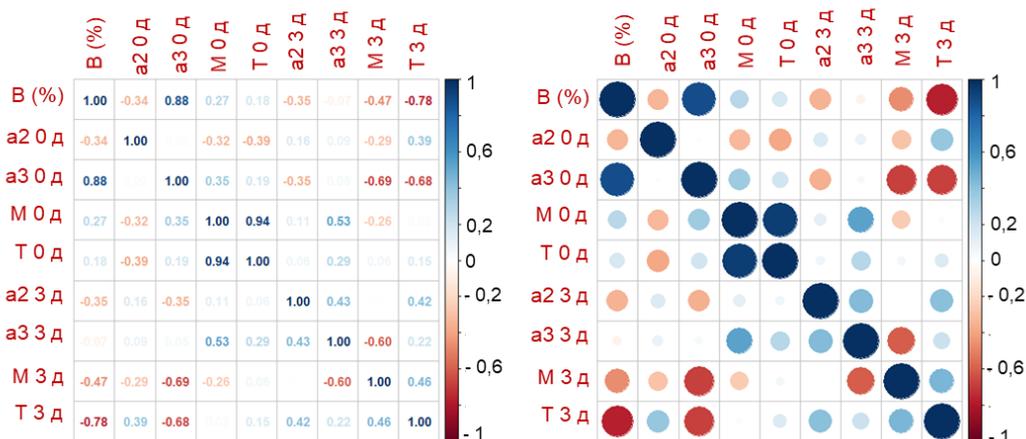


**Рисунок 12.** Результаты корреляционного анализа всех исследуемых параметров в момент резекции и после индукции регенерации нормальной печени для 30 % ГЭ; В – процент восстановления веса печени; М – количество митозов; Т – количество тетраплоидных клеток.

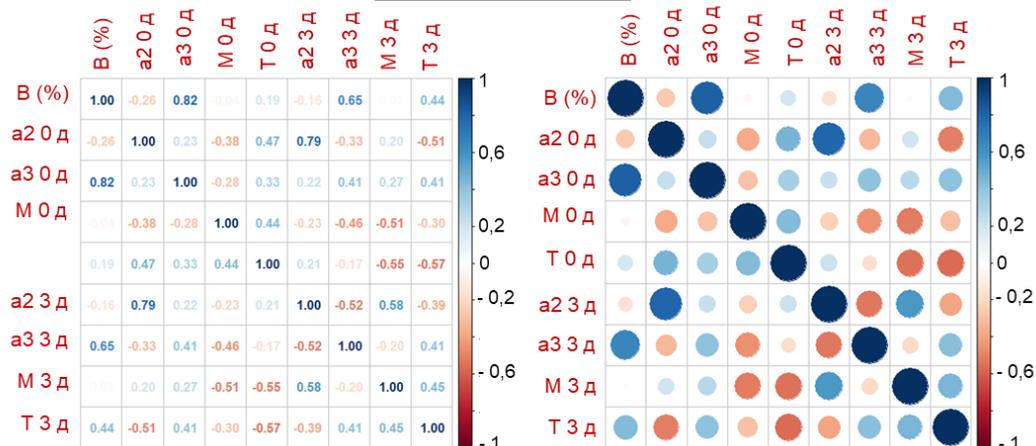
Было выявлено, что только параметр а3 показал высокую корреляцию (положительную) с параметром «процент восстановления печени» для обеих моделей 30% и 70% ГЭ на 3 и 7 день регенерации.

Для модели 30% ГЭ была показана высокая положительная корреляция параметра «процент восстановления печени» на третий и седьмой день регенерации и параметра а3 в момент резекции (0 дней). Коэффициент корреляции составил 0,9 ( $p \leq 0,05$ ). Коэффициент корреляции для «процента восстановления печени» на седьмой день регенерации и параметра а3 в момент резекции (0 дней) составил 0,81 ( $p \leq 0,05$ ).

### 70% ГЭ 3 дня



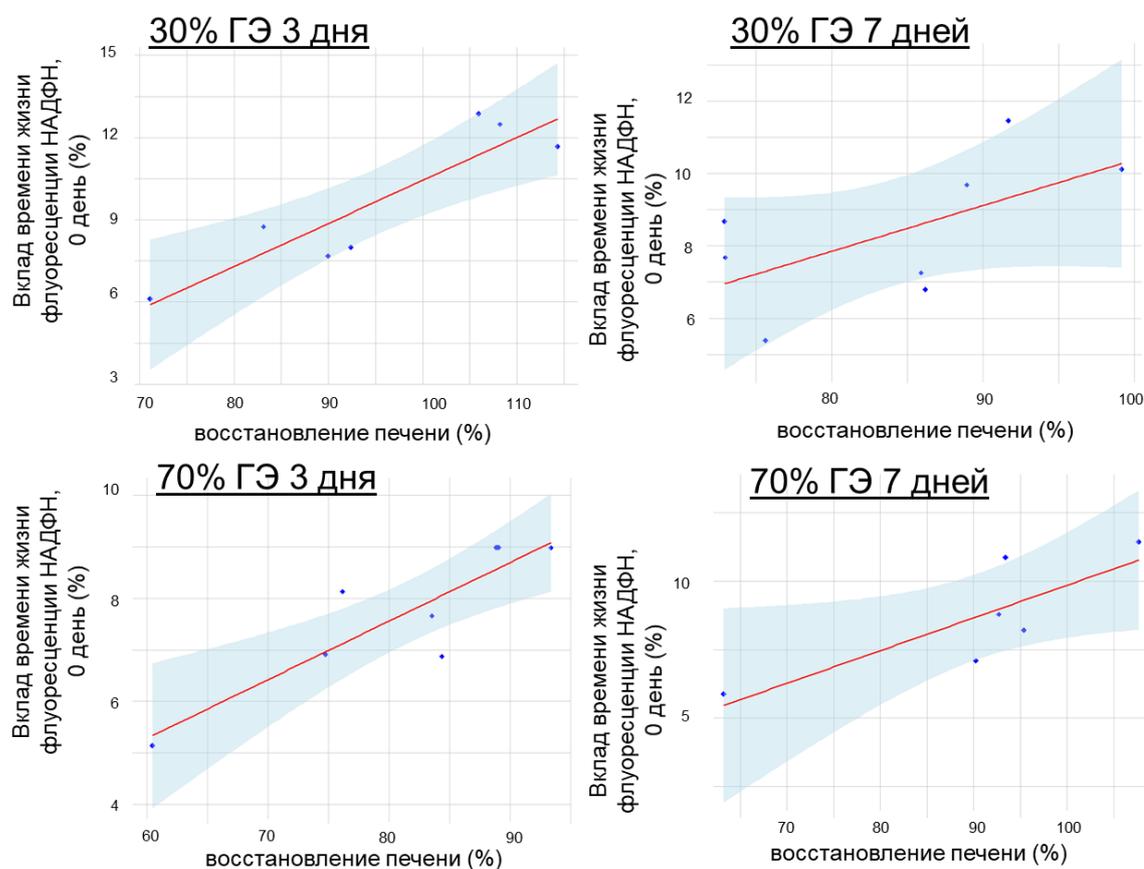
### 70% ГЭ 7 дней



**Рисунок 13.** Результаты корреляционного анализа всех исследуемых параметров в момент резекции и после индукции регенерации нормальной печени для 70% ГЭ; В – процент восстановления веса печени; М – количество митозов; Т – количество тетраплоидных клеток.

Для модели 70% ГЭ также была показана высокая положительная корреляция «параметра процента восстановления печени» на третий и седьмой день регенерации и параметра а3 в момент резекции (0 дней). Коэффициент корреляции составил 0,88 ( $p \leq 0,05$ ). Коэффициент корреляции для «процента восстановления печени» на седьмой день регенерации и параметра а3 в момент резекции (0 дней) составил 0,82 ( $p \leq 0,05$ ).

Далее нами была подтверждена линейная зависимость параметра  $a_3$  в момент резекции и параметра «процент восстановления печени», путем построения диаграммы рассеивания значений данных параметров (Рисунок 14).

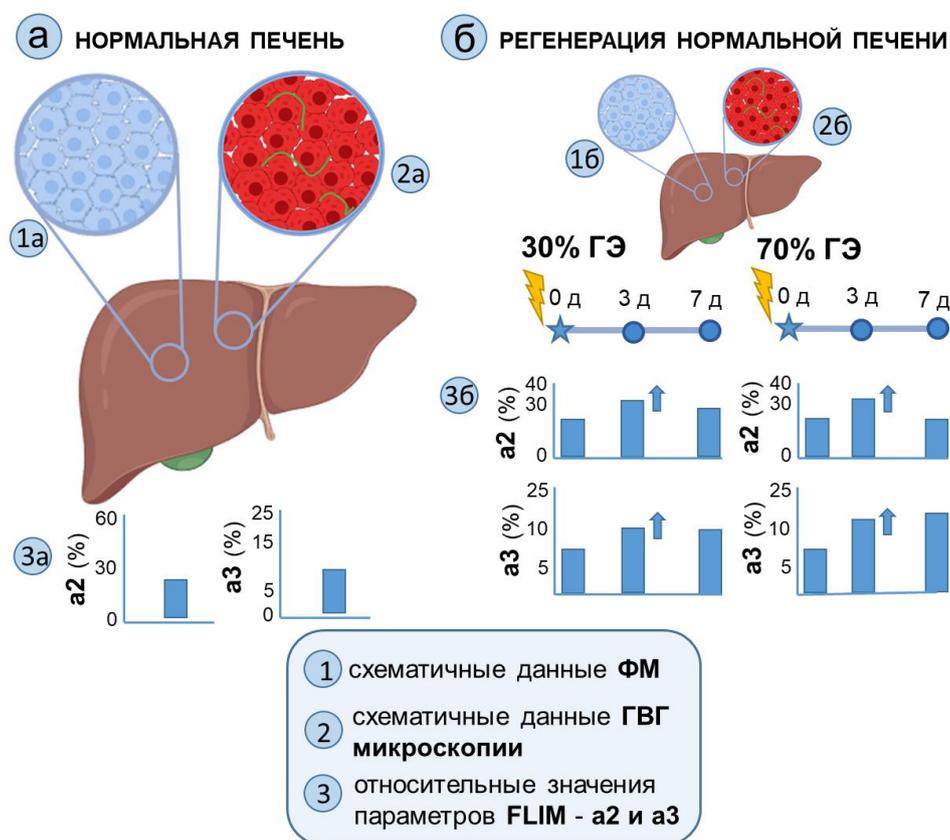


**Рисунок 14.** Диаграмма рассеивания значений параметра «абсолютный процент восстановления веса печени» относительно значений параметра  $a_3$  в момент резекции; голубым цветом изображен доверительный интервал 95% вероятности.

Проведенный корреляционный анализ показал, что высокие значения параметра  $a_3$  в момент резекции являются критерием эффективной регенерации печени.

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 (a2) и НАДФН (a3) (Рисунок 15).



**Рисунок 15.** Схема. Микроскопические признаки печени в норме (а) и при регенерации (б), полученные в режимах флуоресцентной микроскопии (1), ГВГ микроскопии (2) и FLIM микроскопии (3).

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 - высокие значения вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (a2) и НАДФН (a3), высокие значения a3 в момент резекции являются критерием эффективной регенерации печени (Рисунок 15).

### 3.3. Оценка состояния печени при стеатозе и фиброзе

Количество митотических и тетраплоидных клеток при стеатозе и фиброзе значительно снижалось, относительно нормы (Рисунке 18А, Б).

Морфологический анализ структуры печени при индуцированном стеатозе на стадии микростеатоза выявил выраженную липидную инфильтрацию гепатоцитов и единичные очаги фиброза (Рисунок 19). На стадии макростеатоза выявили выраженную липидную инфильтрацию гепатоцитов (липидные капли смещали ядро гепатоцитов) и единичные очаги фиброза (F0-F1 по шкале Metavir). Для обеих стадий патологии не было выявлено признаков воспаления (Рисунок 19) [21,22]. 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 20). Кроме того, на поздних стадиях F2-F3 по Metavir происходило нарушение архитектуры ткани за счет образования фиброзных септ (Рисунок 20).

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, были в пределах нормальных значений (Рисунок 21). При фиброзе ЩФ, АСТ и АЛТ имели высокие значения. Уровень мочевины, креатинина и общего белка, биохимические показатели крови, отражающие липидный обмен, были в пределах нормальных значений, отмечалось

незначительное повышение ЛПНП и ЛПВП на стадии F2-F3 по Metavir (Рисунок 22).

### *3.3.1. 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 19). Архитектура ткани при стеатозе значительно не нарушалась. При фиброзе наблюдались зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н на стадии F1 по Metavir, данные зоны преимущественно соответствовали очагам скопления коллагена. На стадии F2-F3 по Metavir наблюдалось нарушение общей архитектуры ткани (Рисунок 20): нарушение дольковой архитектуры печени и появление фиброзных септ.

Выявлено постепенное снижение площади зон с высокой интенсивностью сигнала НАД(Ф)Н в процессе развития стеатоза, что связано с расширением площади поврежденных гепатоцитов и зон липидной инфильтрации. Результаты представлены на Рисунке 23. В случае фиброза также происходит снижение площади зон с высоким сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н при прогрессировании патологии, наибольшее снижение наблюдали на 6 неделе на 7 день регенерации печени. Результаты представлены на Рисунке 24.

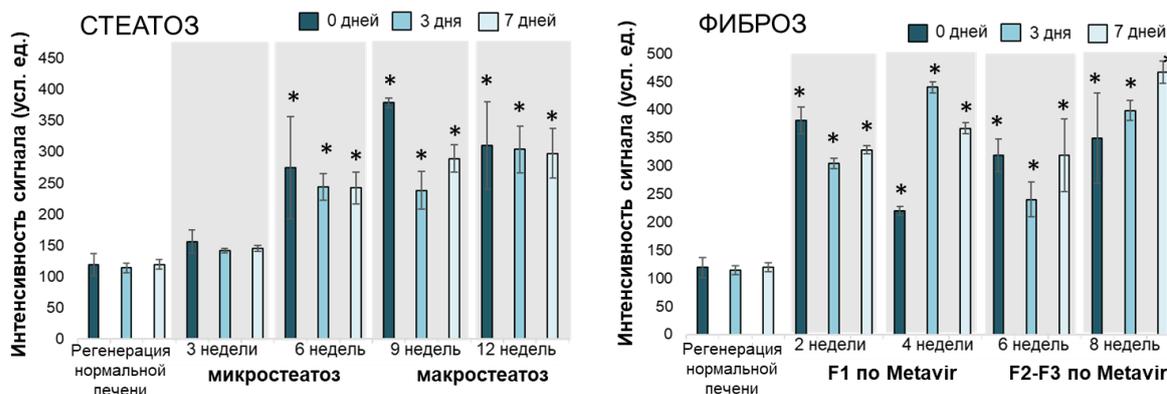
### *3.3.2. ГВГ микроскопия*

В модели стеатоза с использованием ГВГ микроскопии выявлены единичные зоны интенсивного сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена ( $286,4 \pm 24,4$  усл. ед.), что морфологически соответствуют данным гистологического анализа, где на всех стадиях были показаны единичные очаги фиброза (Рисунок 19).

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.), что морфологически соответствует данным

гистологического анализа, где на стадии F2-F3 по Metavir были выявлены очаги фиброза с септами (Рисунок 20).

Результаты количественной оценки интенсивности сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена при регенерации на фоне стеатоза и фиброза представлены на Рисунке 16.



**Рисунок 16.** Количественная оценка интенсивности сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена на разных стадиях стеатоза и фиброза при индукции регенерации. \* - статистически значимые различия по сравнению с соответствующей временной точкой регенерации нормальной печени. Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение.

### 3.3.3. FLIM микроскопия

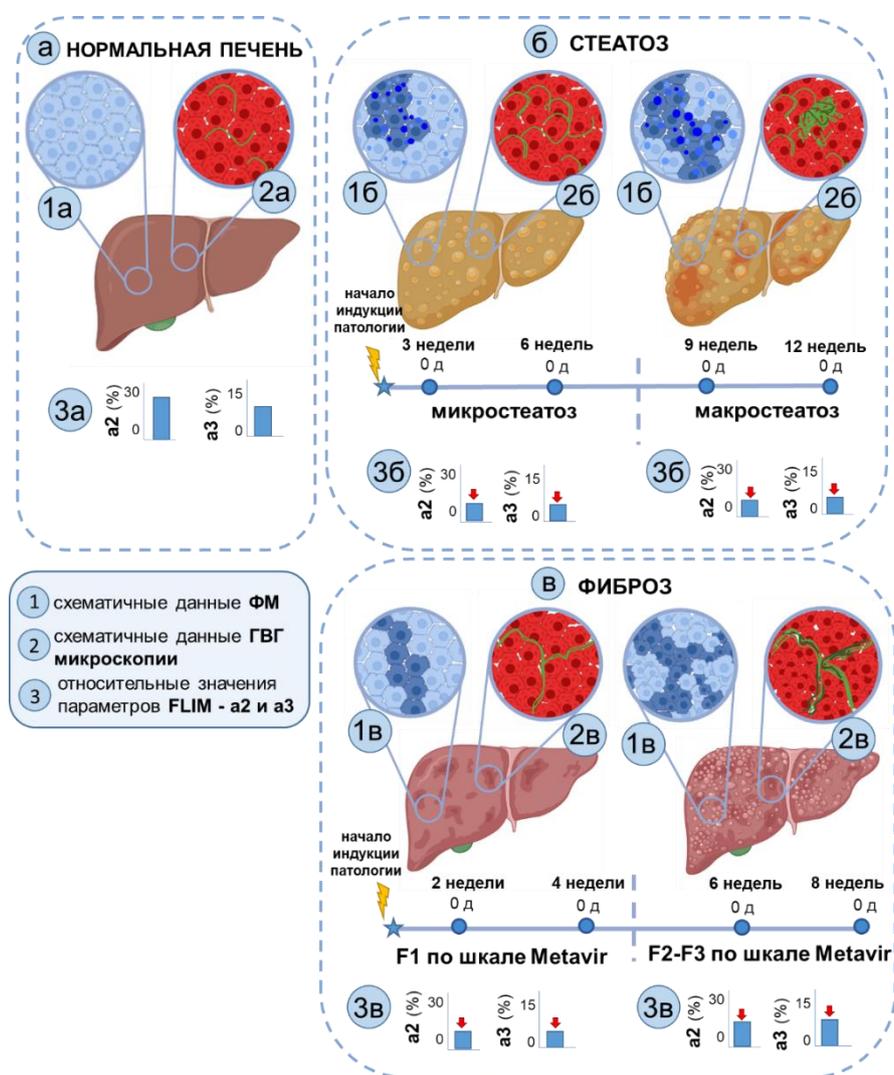
Были получены значения средневзвешенного по амплитуде времени жизни флуоресценции ( $t_m$ , пс) на разных стадиях стеатоза и фиброза. При стеатозе не наблюдалось значимых отличий значений  $t_2$  и  $t_3$  на всех стадиях патологии. При этом значения  $t_m$  значительно снижались уже на стадии микростеатоза в сравнении с нормальной печенью. При индукции фиброза значимое снижение значений  $t_2$  и  $t_3$  наблюдали уже на стадии F1 по Metavir, исключение составили значения  $t_3$  на стадии F2 по Metavir (6 неделя), которые значительно не отличались от нормальной печени. Значения  $t_m$  также

значительно снижались относительно нормальной печени уже на стадии F1 по Metavir.

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 снижался (12 недель), что свидетельствовало об уменьшении интенсивности ОКФОСа в гепатоцитах, вероятно, связанного с развитием митохондриальной дисфункции. Значения 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 25А, Б.

При фиброзе на стадии F1 по шкале Metavir наблюдалось постепенное снижение значений вклада времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН ( $a_2$ ,%) (Рисунок 26А, Б). Такой результат свидетельствует о снижении интенсивности ОКФОСа 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 26А, Б). Так как НАДФН участвует в реакциях липогенеза и пентозофосфатном пути [177], 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 антиоксидантного ответа, 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 – регистрировались единичные обширные зоны сигнала второй гармоники от фибрилл коллагена; 3. FLIM микроскопия - значимое уменьшение значений вкладов времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН (а2) и НАДФН (а3), относительно соответствующих значений в норме (Рисунок 17).



**Рисунок 17.** 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).

Микроскопические признаки развития фиброза: 1. Флуоресцентная микроскопия - зоны со сниженным сигналом интенсивности флуоресценции НАД(Ф)Н; 2. ГВГ микроскопия – регистрировались 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 17).

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.

#### **3.4. Оценка состояния печени при индукции регенерации на фоне сопутствующей патологии**

Был проведен анализ восстановления веса печени после 30% и 70% гепатэктомии на различных этапах регенерации при стеатозе и фиброзе. В результате индукции стеатоза было обнаружено увеличение как абсолютного, так и относительного процента восстановления веса печени на стадии микростеатоза. Однако на стадии макростеатоза наблюдалось постепенное снижение этих показателей как на третий, так и на седьмой день регенерации, за исключением временной точки в 6 недель 7 дней. Следует отметить, что увеличение веса и объема печени на стадии микростеатоза происходит не только за счет деления клеток, но и за счет накопления липидных капель и коллагена в ткани. Результаты представлены в Таблице 4.

**Таблица 4.** Данные контроля веса лабораторных животных и печени на разных стадиях стеатоза при регенерации. \*- статистически значимое различие по сравнению с соответствующей временной точкой для регенерации нормальной печени, р-значение  $\leq 0,05$ .

Стеатоз	Вес животного, г		Вес печени, г			Абсолютный процент, %	Относительный процент, %
	В момент резекции	На этапе регенерации	Резецируемая часть	Ремнант	Исходный вес		
регенерация нормальной печени 3 дня	250,2	282,8	5,7	7,5	8,2	80,9	-
регенерация нормальной печени 7 дней	245,7	246,1	5,0	6,7	7,2	92,9	-
микростеатоз 3 недели 3 дня	247,5	251,3	4,6	6,7	5,7	88,0*	108,8
микростеатоз 3 недели 7 дней	253,8	270,0	4,8	7,8	7,0	106,3*	114,5
микростеатоз 6 недель 3 дня	225,0	265,0	4,9	5,2	7,0	71,5*	88,4
микростеатоз 6 недель 7 дней	275,0	267,5	6,6	9,9	9,4	106,3*	114,4
макростеатоз 9 недель 3 дня	338,8	332,5	6,1	8,0	7,4	73,9*	91,3
макростеатоз 9 недель 7 дней	321,3	331,3	6,3	8,5	8,3	79,3*	85,4
макростеатоз 12 недель 3 дня	307,5	310,0	6,6	8,3	8,2	73,0	90,2
макростеатоз 12 недель 7 дней	315,0	317,5	6,1	8,6	7,9	85,3*	91,9

На всех этапах фиброза наблюдалось снижение как абсолютного, так и относительного процента восстановления веса печени, за исключением 4 недели 3 дня и 8 недель 3 дня. Результаты представлены в Таблице 5.

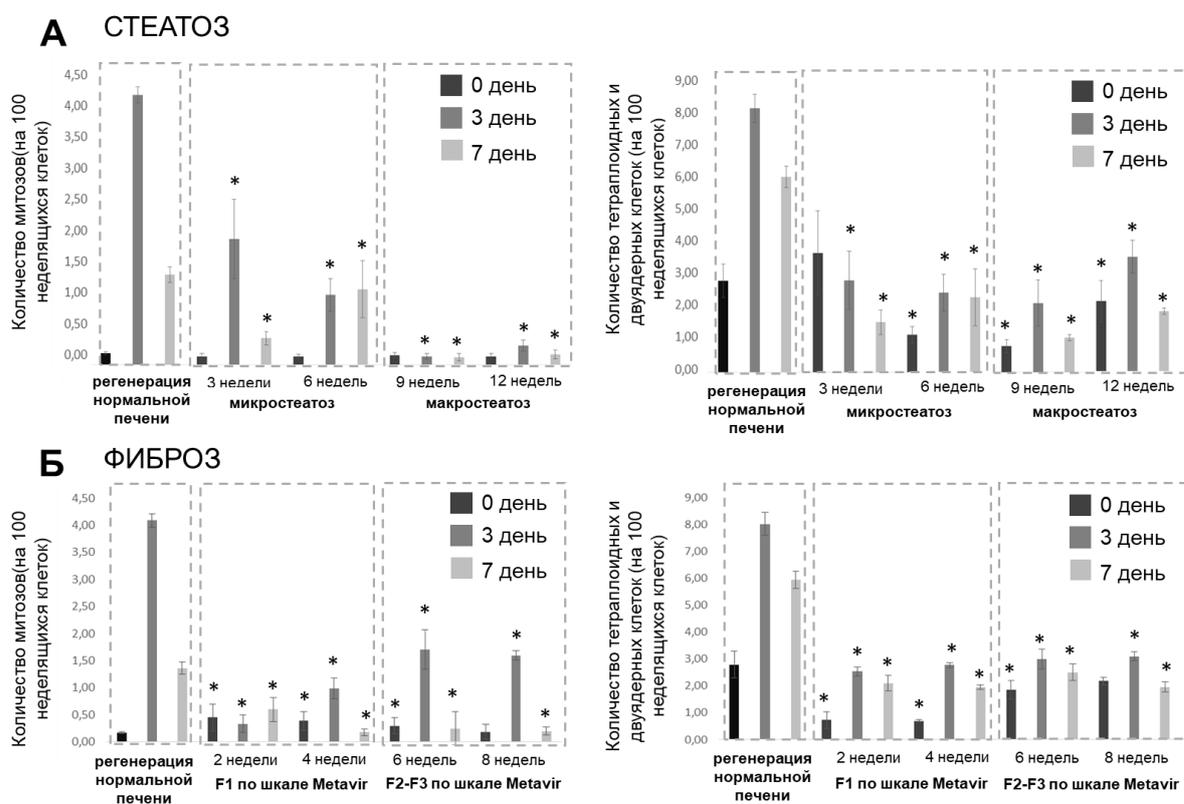
**Таблица 5.** Данные контроля веса лабораторных животных и печени на разных стадиях фиброза при регенерации. \*- статистически значимое различие по сравнению с соответствующей временной точкой для регенерации нормальной печени, р-значение  $\leq 0,05$ .

Фиброз	Вес животного, г		Вес печени, г			Абсолютный процент, %	Относительный процент, %
	В момент резекции	На этапе регенерации	Резецируемая часть	Ремнант	Исходный вес		
регенерация нормальной печени 3 дня	250,2	282,8	5,7	7,5	8,2	80,9	-
регенерация нормальной печени 7 дней	245,7	246,1	5,0	6,7	7,2	92,9	-
F1 по Metavir 2 недели 3 дня	247,6	243,8	5,5	6,8	6,8	76,6	94,7
F1 по Metavir 2 недели 7 дней	240,2	245,2	5,8	4,9	8,2	61,0*	65,7
F1 по Metavir 4 недели 3 дня	229,8	240,1	6,4	8,2	7,1	81,5	100,7
F1 по Metavir 4 недели 7 дней	270,1	280,0	6,2	8,6	9,2	89,1	95,9
F2-F3 по Metavir 6 недель 3 дня	282,1	273,8	6,6	8,7	8,6	77,6	95,9
F2-F3 по Metavir 6 недель 7 дней	260,2	278,9	6,5	8,2	9,1	77,6*	83,6
F2-F3 по Metavir 8 недель 3 дня	290,2	297,6	6,6	10,0	8,5	91,2*	112,7
F2-F3 по Metavir 8 недель 7 дней	293,9	287,5	7,7	10,2	9,5	74,4*	80,0

Стоит учитывать, что оценка веса печени не позволяет точно оценить регенераторный потенциал печени и не отражает функцию ремнанта печени [18].

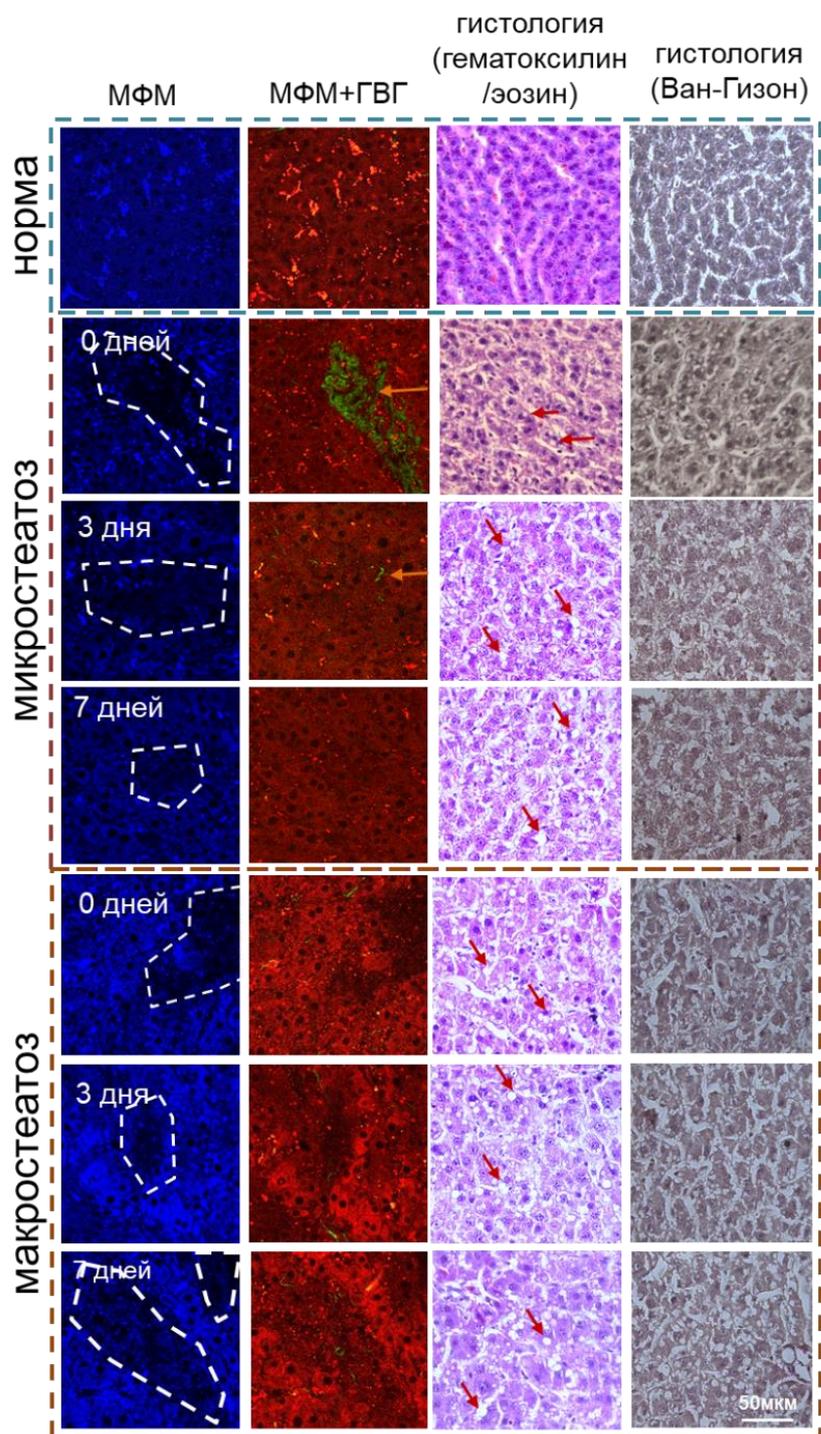
Важно отметить, что оценка веса печени не позволяет точно определить регенераторный потенциал органа и не отражает функцию оставшейся части печени [18].

При развитии стеатоза наблюдается постепенное снижение пролиферативной активности гепатоцитов по сравнению с регенерацией здоровой печени (Рисунок 18А), что обусловлено липотоксичностью и повреждением клеток печени. На ранних стадиях фиброза фиксируется резкое снижение пролиферативной активности гепатоцитов, за которым следует увеличение числа делящихся клеток на поздних стадиях (Рисунок 18Б). Это может быть связано с образованием участков патологической пролиферации гепатоцитов (регенераторные узлы), характерных для фиброза.



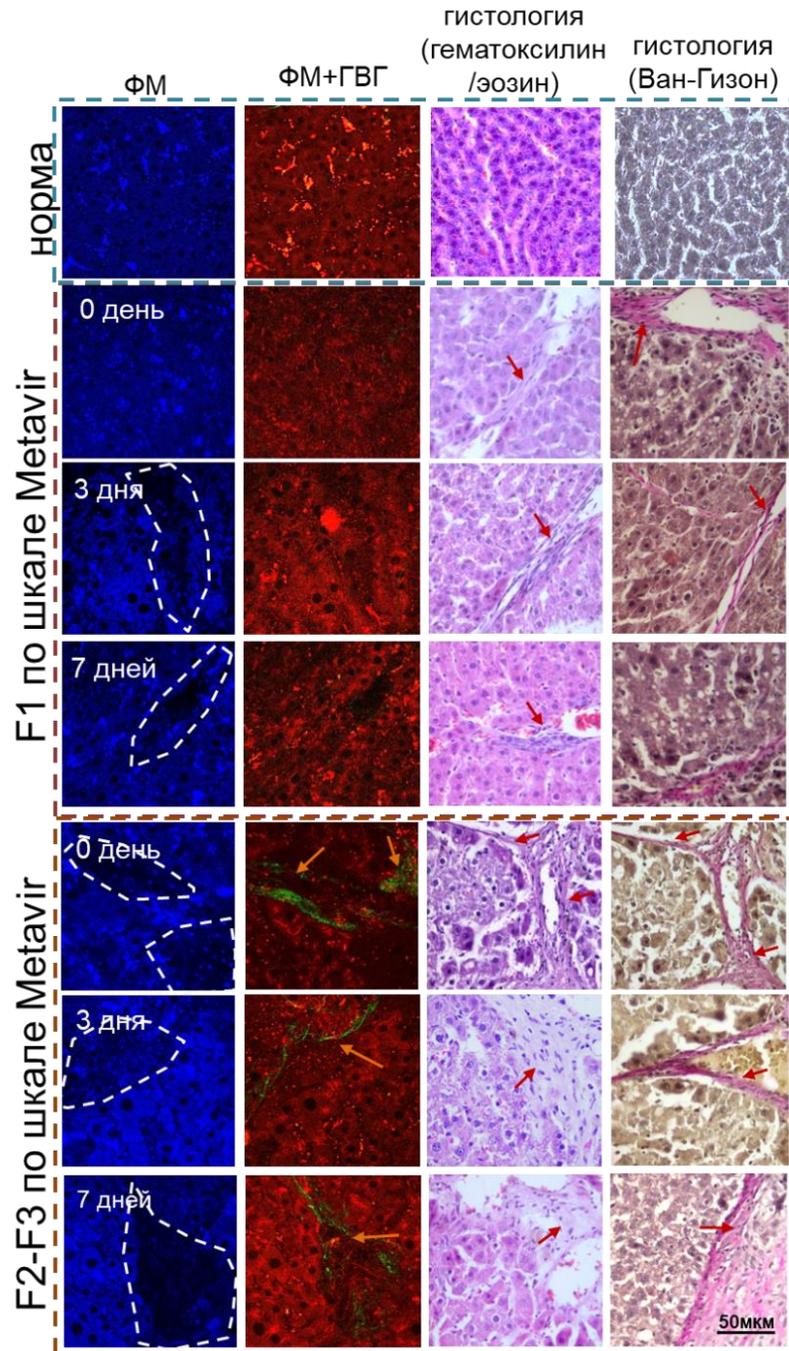
**Рисунок 18.** Морфометрический анализ ткани печени. На графиках представлены значения количества митотических клеток и количества тетраплоидных и двуядерных клеток при регенерации на разных стадиях (А) стеатоза и (Б) фиброза. Мониторинг проводили на разных стадиях патологии в момент резекции (0 дней) и на третий и седьмой дни регенерации. Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение. \*- статистически значимое различие по сравнению с соответствующей временной точкой для регенерации нормальной печени, р-значение  $\leq 0,05$ .

Морфологический анализ печени при индукции регенерации на всех стадиях стеатоза на третий и седьмой день регенерации выявил выраженную липидную инфильтрацию гепатоцитов (Рисунок 19). После индукции регенерации выявляли нарушение структуры ткани, связанное с несоответствием скорости пролиферации гепатоцитов и скорости восстановления межклеточного вещества [60,178].



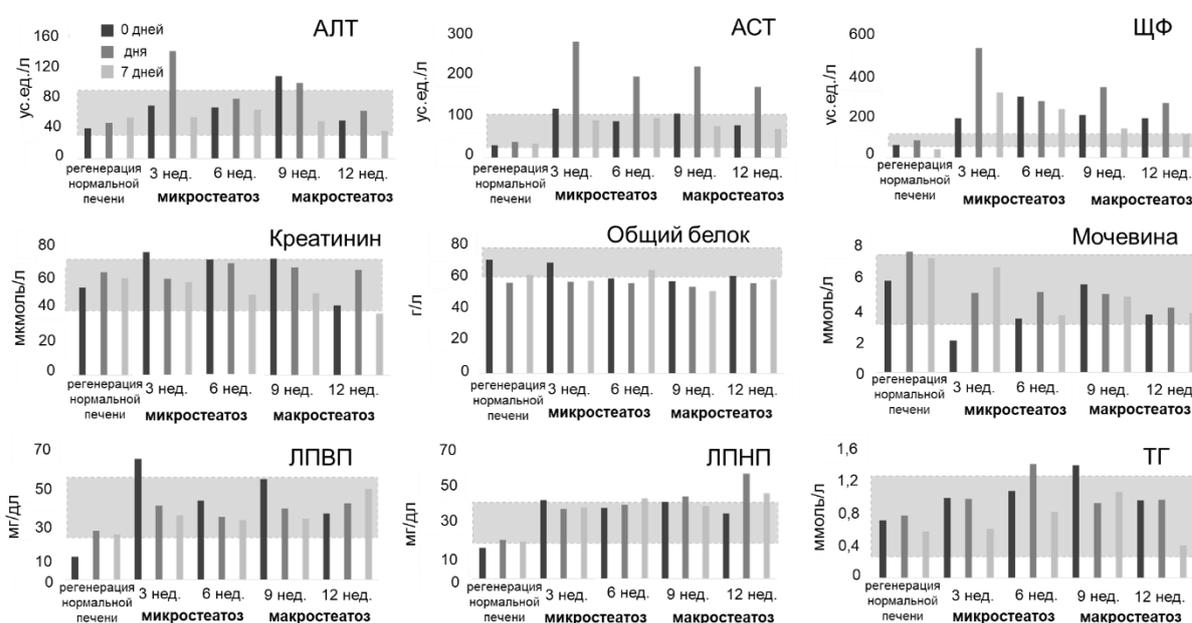
**Рисунок 19.** Анализ структуры ткани печени на разных стадиях стеатоза при регенерации. Флуоресцентные изображения в канале НАД(Ф)Н при возбуждении на длине волны 750 нм. Регистрация сигнала ГВГ от коллагена (зеленый цвет) и флуоресценции клеток (красный цвет) при возбуждении на длине волны 800 нм; оранжевые стрелки указывают на коллаген. Гистологические изображения, окраска гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона; красные стрелки указывают на липидные капли в гепатоцитах; х400.

Процесс регенерации на разных стадиях фиброза характеризовался выраженным микровезикулярным стеатозом на третий и седьмой день регенерации (Рисунок 20). Также было выявлено нарушение дольковой архитектуры при регенерации для всех стадий патологии, что связано со скоплением коллагена, формирующего фиброзные септы.



**Рисунок 20.** Анализ структуры ткани печени на разных стадиях фиброза при регенерации. Флуоресцентные изображения в канале НАД(Ф)Н при возбуждении на длине волны 750 нм. Регистрация сигнала ГВГ от коллагена (зеленый цвет) и флуоресценции клеток (красный цвет) при возбуждении на длине волны 800 нм; оранжевые стрелки указывают на коллаген. Гистологические изображения, окраска гематоксилином и эозином и по методу Ван Гизона; красные стрелки указывают на коллаген; х400.

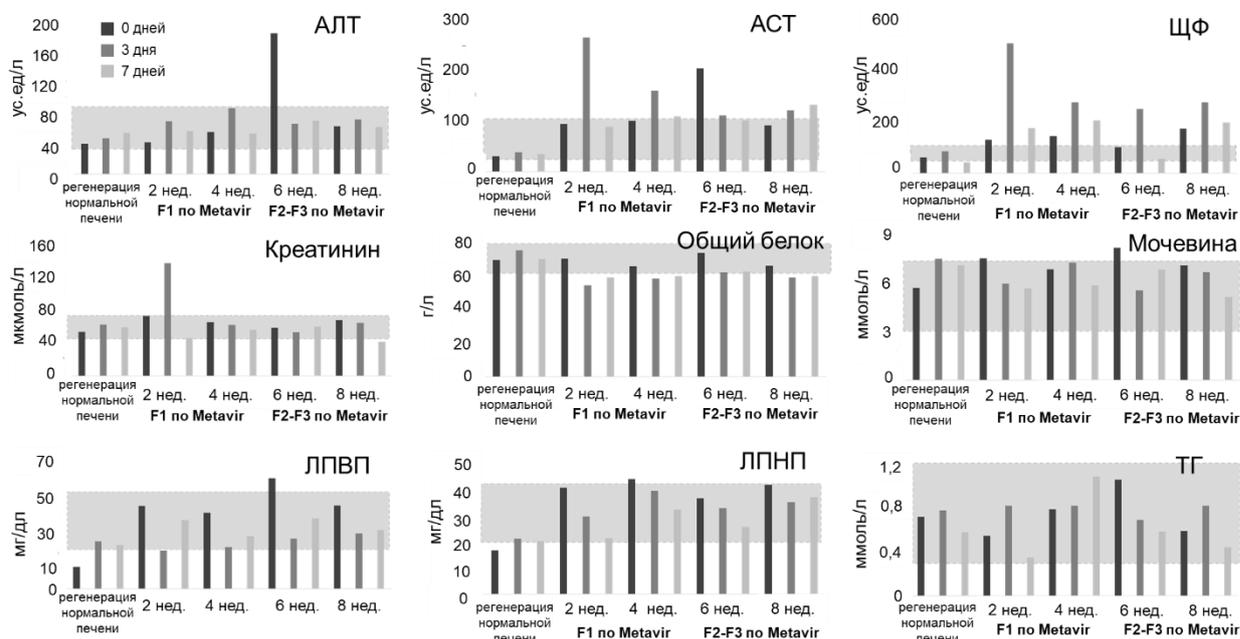
Во время регенерации на различных стадиях стеатоза уровни щелочной фосфатазы (ЩФ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) превышали нормальные показатели. В то же время уровни креатинина и мочевины оставались в пределах нормы на протяжении всего периода наблюдения. Общий белок, как правило, был снижен, что указывает на ухудшение синтетической функции печени. Биохимические параметры, связанные с липидным обменом, незначительно превышали нормальные значения. Результаты представлены на Рисунке 21.



**Рисунок 21.** Анализ биохимических показателей в сыворотке крови лабораторных животных на разных стадиях стеатоза и на разных этапах регенерации при сопутствующем стеатозе. Область, отмеченная пунктиром, отражает диапазон физиологических значений каждого биохимического показателя.

Во время регенерации на различных стадиях фиброза уровни щелочной фосфатазы (ЩФ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) были повышенными. Показатели мочевины и креатинина в основном оставались в пределах нормы. Уровень общего белка был снижен как на третий, так и на седьмой день регенерации на всех стадиях заболевания, что указывает

на нарушение синтетической функции печени. Биохимические параметры крови, связанные с липидным обменом, находились в нормальных пределах. Результаты представлены на Рисунке 22.



**Рисунок 22.** Анализ биохимических показателей в сыворотке крови лабораторных животных на разных стадиях фиброза и на разных этапах регенерации при сопутствующем фиброзе. Область, отмеченная пунктиром, отражает диапазон физиологических значений каждого биохимического показателя.

### 3.4.1. Флуоресцентная микроскопия

При регенерации при стеатозе в канале флуоресценции НАД(Ф)Н были обнаружены области с пониженным сигналом флуоресценции, которые преимущественно соответствовали зонам с высокой липидной инфильтрацией (Рисунок 19). Также отмечалось нарушение тканевой архитектуры. При фиброзе наблюдались участки с низким сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, преимущественно связанные с очагами накопления коллагена (Рисунок 20). Кроме того, происходило нарушение дольковой структуры ткани, что связано с образованием фиброзных септ и несоответствием между скоростью пролиферации гепатоцитов и синтезом межклеточного вещества [60,177].

На различных стадиях стеатоза и фиброза, как до, так и после индукции регенерации, была проведена количественная оценка интенсивности сигнала флуоресценции в канале НАД(Ф)Н в двух выделенных областях: в зонах, связанных с поврежденными гепатоцитами, очагами липидной инфильтрации и фиброзом (зоны с низкой интенсивностью сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н), а также в зонах метаболически активных гепатоцитов (зоны с высокой интенсивностью сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н). Результаты представлены в Таблицах 6 и 7.

**Таблица 6.** Интенсивность сигнала флуоресценции в канале НАД(Ф)Н в печени на разных этапах регенерации при сопутствующем стеатозе. Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение. (\*) - статистически значимое отличие от соответствующей временной точки для регенерации нормальной печени, (#) - статистически значимое отличие от зоны с высокой интенсивностью сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н,  $p \leq 0.05$ .

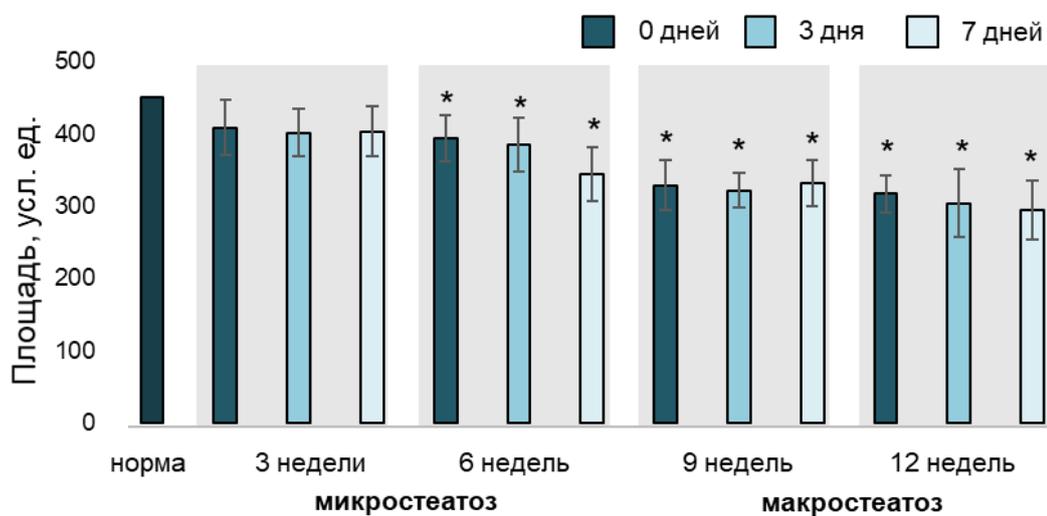
		<b>высокая интенсивность (усл.ед.)</b>	<b>низкая интенсивность (усл.ед.)</b>	<b>отношение</b>
<b>регенерация нормальной печени</b>	<b>0 дней</b>	310,57±3,15	-	-
	<b>3 дня</b>	351,28±4,73	-	-
	<b>7 дней</b>	320,84±3,41	-	-
<b>3 недели</b>	<b>0 дней</b>	208,62±2,78 (*)	57,55±2,16 (#)	3,73±1,46
	<b>3 дня</b>	197,87±1,93 (*)	49,25±7,59 (#)	4,18±1,28
	<b>7 дней</b>	150,12±1,68 (*)	50,73±3,81 (#)	3,20±1,76
<b>6 недель</b>	<b>0 дней</b>	196,14±4,66 (*)	59,63±2,41 (#)	3,90±1,48
	<b>3 дня</b>	178,94±4,05 (*)	44,43±1,43 (#)	4,24±1,71
	<b>7 дней</b>	208,16±4,97 (*)	62,37±2,24 (#)	3,55±1,17
<b>9 недель</b>	<b>0 дней</b>	247,86±5,23 (*)	64,51±2,08 (#)	3,81±1,21
	<b>3 дня</b>	258,24±5,66 (*)	56,41±2,48 (#)	6,24±2,68
	<b>7 дней</b>	328,59±4,98	93,94±2,71 (#)	3,66±1,24
<b>12 недель</b>	<b>0 дней</b>	280,42±3,39 (*)	76,60±3,32 (#)	4,32±1,19
	<b>3 дня</b>	350,97±4,84	113,64±3,64 (#)	3,39±1,54
	<b>7 дней</b>	344,64±6,59	147,76±1,06 (#)	3,33±2,04

При стеатозе отношение интенсивности сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н в обеих выявленных зонах варьировало 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 варьировало от  $2,96 \pm 1,33$  у.е. до  $4,49 \pm 2,37$  у.е.

**Таблица 7.** Интенсивность сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н в печени на разных этапах регенерации при сопутствующем фиброзе. Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение. (\*) - статистически значимое отличие от соответствующей временной точки для регенерации нормальной печени, (#) - статистически значимое отличие от зоны с высокой интенсивностью сигнала флуоресценции НАД(Ф)Н,  $p \leq 0.05$ .

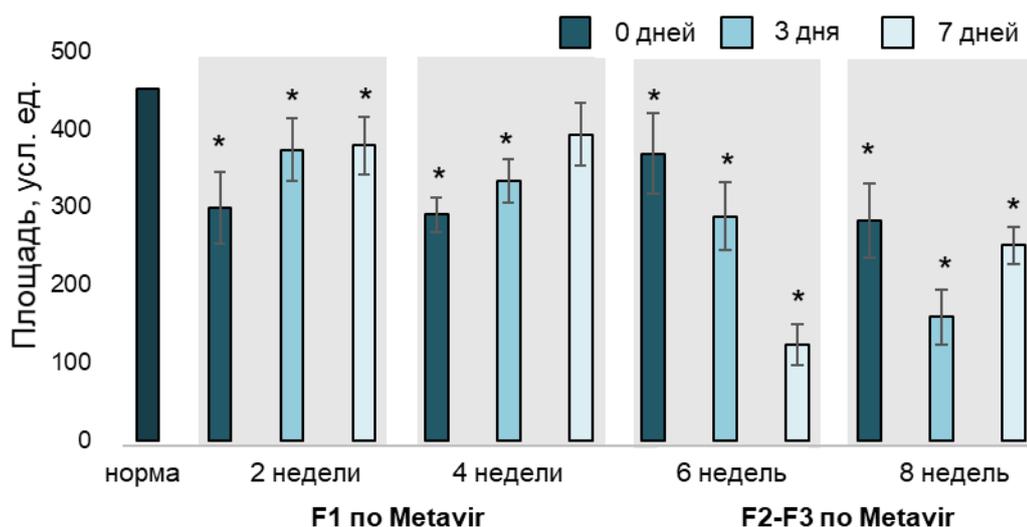
		<b>высокая интенсивность (усл.ед.)</b>	<b>низкая интенсивность (усл.ед.)</b>	<b>отношение</b>
<b>регенерация нормальной печени</b>	<b>0 дней</b>	310,57±3,15	-	-
	<b>3 дня</b>	351,28±4,73	-	-
	<b>7 дней</b>	320,84±3,41	-	-
<b>2 недели</b>	<b>0 дней</b>	225,53±6,54 (*)	52,43±2,23 (#)	4,66±2,00
	<b>3 дня</b>	197,02±5,51 (*)	52,73±1,94 (#)	3,60±1,11
	<b>7 дней</b>	216,19±4,68 (*)	71,72±1,64 (#)	3,36±0,85
<b>4 недели</b>	<b>0 дней</b>	117,38±3,91 (*)	31,69±1,49 (#)	4,04±1,66
	<b>3 дня</b>	137,11±2,94 (*)	36,11±1,09 (#)	4,49±2,37
	<b>7 дней</b>	73,29±1,87 (*)	21,33±7,26 (#)	4,93±2,37
<b>6 недель</b>	<b>0 дней</b>	192,52±4,36 (*)	70,68±4,36 (#)	3,54±2,05
	<b>3 дня</b>	177,65±5,56 (*)	46,68±5,29 (#)	3,66±2,21
	<b>7 дней</b>	298,56±3,28 (*)	87,74±2,83 (#)	3,99±1,57
<b>8 недель</b>	<b>0 дней</b>	218,46±5,88 (*)	52,80±2,69 (#)	4,19±1,67
	<b>3 дня</b>	223,58±6,01 (*)	92,96±2,62 (#)	2,96±1,33
	<b>7 дней</b>	283,69±3,24 (*)	62,06±7,05 (#)	4,07±1,31

Выявлено постепенное снижение площади зон с высокой интенсивностью сигнала НАД(Ф)Н в процессе развития стеатоза, что связано с расширением площади поврежденных гепатоцитов и зон липидной инфильтрации. Результаты представлены на Рисунке 23.



**Рисунок 23.** Анализ изменения площади зон с высоким сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н. На всех этапах регенерации нормальной печени площадь зон была одинаковой (максимальной), усредненные данные были объединены в один столбец графика и обозначены как «норма». Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение. \* - статистическое значимое отличие от нормы.

В случае фиброза также происходит снижение площади зон с высоким сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н при прогрессировании патологии, наибольшее снижение наблюдали на 6 неделе на 7 день регенерации печени. Результаты представлены на Рисунке 24.



**Рисунок 24.** График изменений площади зон с высоким сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н. На всех этапах регенерации нормальной печени площадь зон была одинаковой (максимальной), усредненные данные были объединены в один столбец графика, и обозначены как «норма». Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение. \* - статистическое значимое отличие от нормы.

#### 3.4.2. 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 согласуется с данными морфологического анализа, где были выявлены единичные очаги скопления коллагена (Рисунок 19). 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 20).

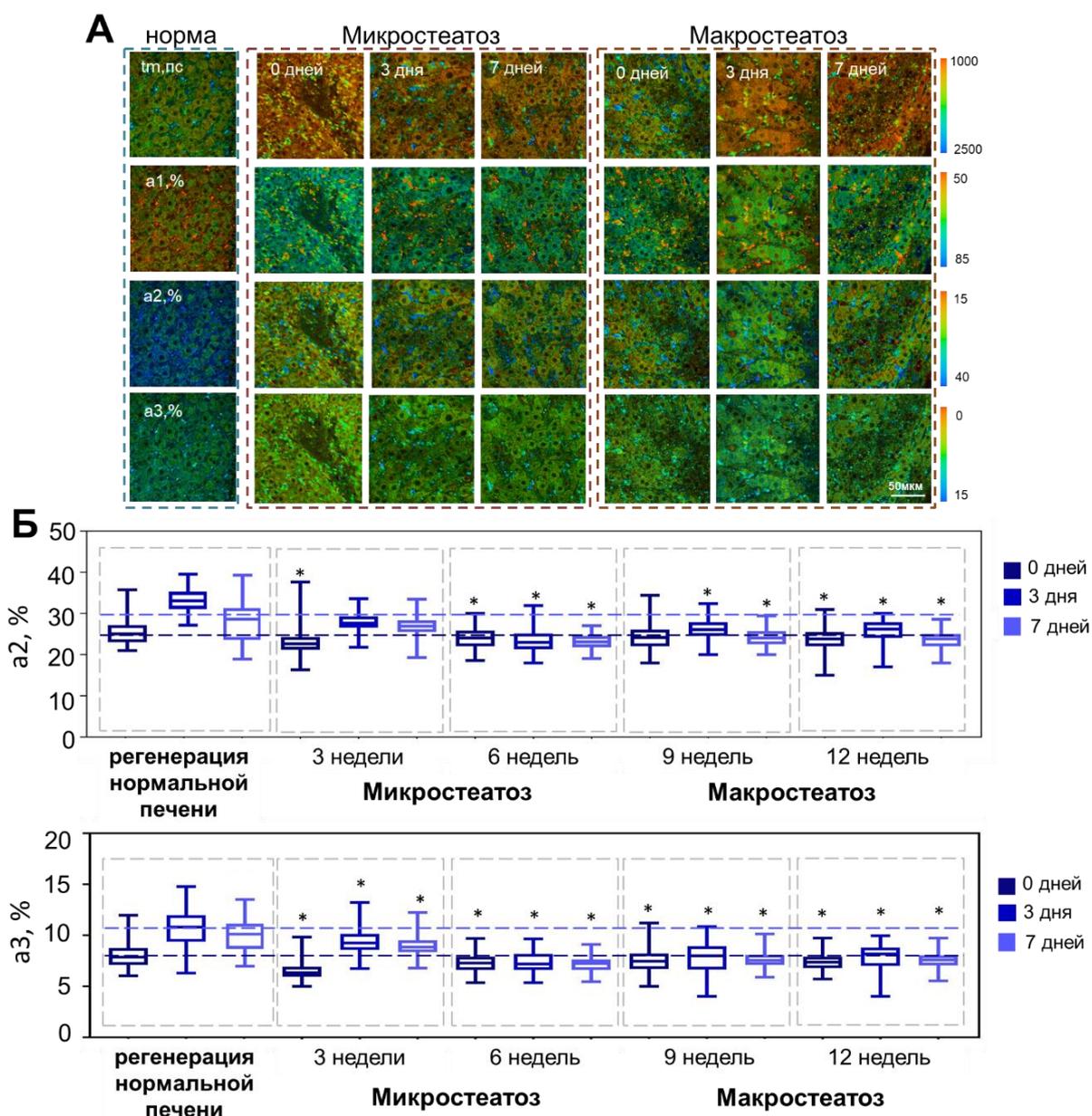
### 3.4.3. FLIM микроскопия

При индукции стеатоза не наблюдали значимых отличий значений  $t_2$  и  $t_3$ , в сравнении с соответствующим этапом регенерации нормальной печени, исключение составило значимое снижение значений  $t_3$  для временной точки 3 недели на 3 день регенерации. Значения  $t_m$  значительно снижались в сравнении с соответствующим днем нормальной регенерации уже на стадии микростеатоза. При индукции фиброза уже на стадии F1 по Metavir было выявлено значимое снижение значений  $t_2$ , в сравнении с соответствующим днем нормальной регенерации, исключение составили значения  $t_2$  для временной точки 4 недели на 7 день регенерации. Результаты представлены в Таблице 8.

**Таблица 8.** Значения параметров FLIM на разных стадиях стеатоза и фиброза при запуске регенеративного процесса. Данные представлены как  $M \pm \sigma$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $\sigma$  — стандартное отклонение. (\*) - статистически значимое отличие от соответствующей временной точки для нормальной печени,  $p \leq 0.05$ .

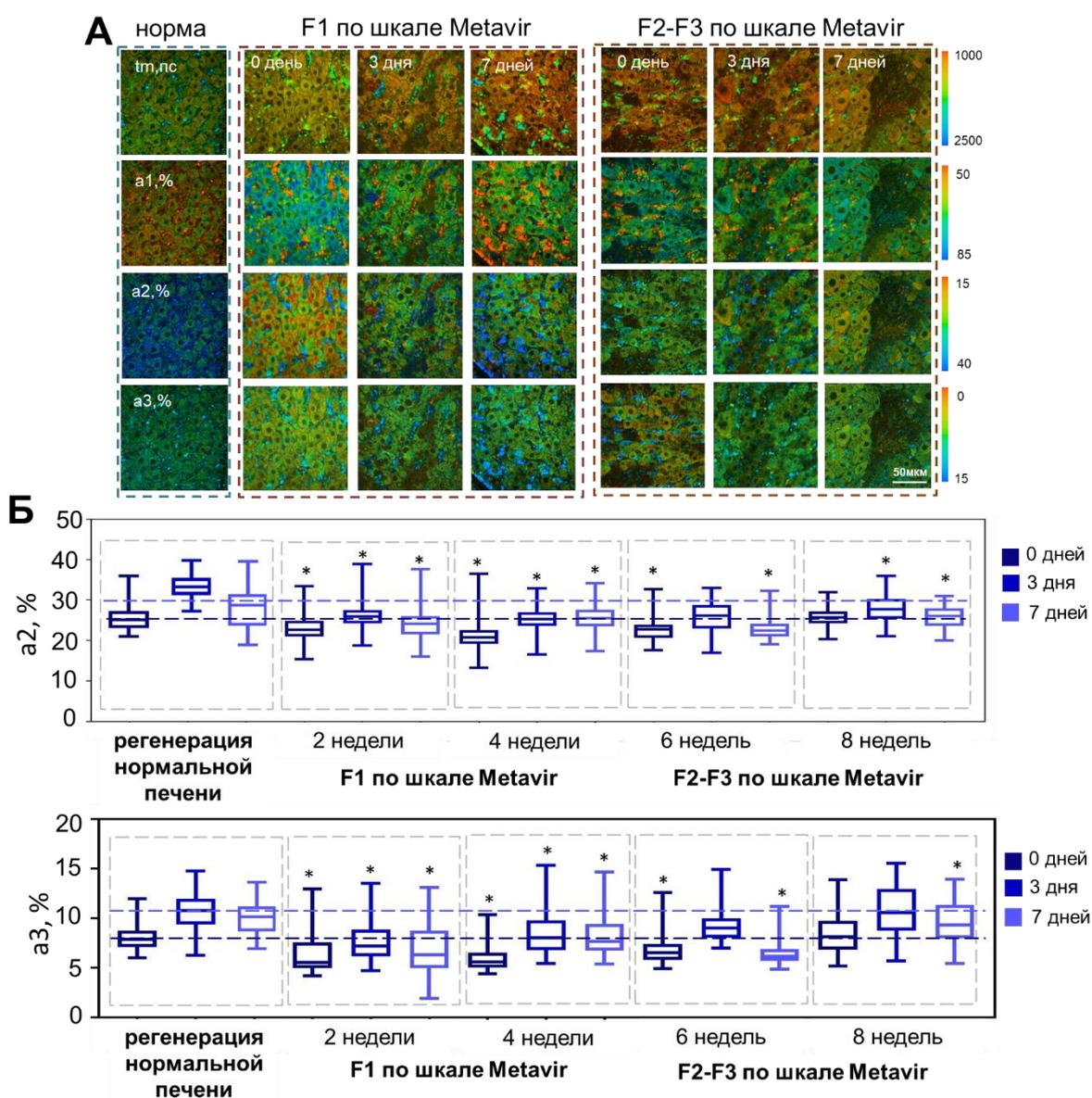
Стеатоз		$t_2$ , пс	$t_3$ , пс	$t_m$ , пс	Фиброз		$t_2$ , пс	$t_3$ , пс	$t_m$ , пс
регенерация нормальной печени	0 дней	2276 ± 101	4105 ± 317	1276 ± 39	регенерация нормальной печени	0 дней	2276 ± 101	4105 ± 317	1276 ± 39
	3 дня	2194 ± 113	4130 ± 421	1387 ± 43		3 дня	2194 ± 113	4130 ± 421	1387 ± 43
	7 дня	2094 ± 96	3861 ± 276	1312 ± 55		7 дня	2094 ± 96	3861 ± 276	1312 ± 55
микростеатоз 3 недели	0 дней	1968 ± 108	3931 ± 287	973 ± 40*	микростеатоз 2 недели	0 дней	1928 ± 160	3742 ± 327*	985 ± 78*
	3 дня	2031 ± 134	3660 ± 257*	1167 ± 51*		3 дня	1825 ± 220	3546 ± 328*	1030 ± 70*
	7 дня	1997 ± 115	3761 ± 304	1130 ± 49*		7 дня	1723 ± 232	3705 ± 385	951 ± 61*
микростеатоз 6 недель	0 дней	2054 ± 129	4071 ± 337	1068 ± 60*	микростеатоз 4 недели	0 дней	1973 ± 149*	3703 ± 311*	948 ± 79*
	3 дня	2022 ± 149	4156 ± 245	1079 ± 58*		3 дня	1886 ± 179*	3445 ± 427*	1027 ± 50*
	7 дня	2023 ± 111	4063 ± 482	1036 ± 45*		7 дня	2005 ± 193	3498 ± 406*	1078 ± 67*
макростеатоз 9 недель	0 дней	1992 ± 115	4220 ± 368	1079 ± 59*	макростеатоз 6 недель	0 дней	1889 ± 141*	3868 ± 285	983 ± 45*
	3 дня	1999 ± 120	4065 ± 305	1129 ± 55*		3 дня	1708 ± 200*	3491 ± 169*	1126 ± 55*
	7 дня	1992 ± 95	4202 ± 245	1078 ± 86*		7 дня	1903 ± 183*	3929 ± 237	974 ± 55*
макростеатоз 12 недель	0 дней	1987 ± 132	4220 ± 582	1055 ± 46*	макростеатоз 8 недель	0 дней	1797 ± 207*	3564 ± 186*	1029 ± 68*
	3 дня	2038 ± 100	4068 ± 290	1163 ± 56*		3 дня	1702 ± 201*	3536 ± 227*	1113 ± 65*
	7 дня	2004 ± 127	4494 ± 687	1099 ± 44*		7 дня	1656 ± 211*	3504 ± 203	1039 ± 46*

Во время регенерации на стадии микростеатоза (3 недели) на 3 день регенерации наблюдалось значительное увеличение вклада времени жизни флуоресценции связанной формы НАДН ( $a_2$ ,%) и вклада НАДФН ( $a_3$ ,%), после чего на 7 день произошло снижение этих показателей. Данная тенденция схожа с процессом регенерации в нормальной печени. Однако на стадии макростеатоза резкого увеличения значений  $a_3$  на третий день регенерации не наблюдалось. Таким образом, значения  $a_2$  и  $a_3$  до и после ГЭ были практически одинаковыми (Рисунок 25А,Б).



**Рисунок 25.** Анализ энергетического метаболизма гепатоцитов на разных стадиях стеатоза при регенерации. (А) FLIM изображения для параметров tm, a1, a2 и a3; x400; (Б) Значения параметров FLIM a2 и a3 на разных этапах регенерации при стеатозе. Линией обозначена медиана значений, планки погрешности обозначают максимальное и минимальное значение соответствующего параметра. Пунктирной линией обозначены значения медиан вкладов связанной формы НАДН и НАДФН для нормальной печени и для 3 дня регенерации нормальной печени. \* - статистически значимые отличия по сравнению с соответствующей временной точкой регенерации нормальной печени.

При индукции регенерации при фиброзе на стадии F1 по Metavir значения  $a_2$  и  $a_3$  до и после ГЭ практически не изменялись. Такой результат, соответствует метаболическим изменениям, характерным для фиброза, таким как развитие митохондриальной дисфункции, снижение синтетической активности гепатоцитов и снижение интенсивности ОКФОСа в гепатоцитах при патологической пролиферации [43,178-181]. На стадии F2-F3 по Metavir такая тенденция сохранялась для параметра  $a_2$ , однако наблюдалось увеличение параметра  $a_3$  на третий день регенерации с последующим снижением на 7 день (Рисунок 26А,Б), что может быть связано с усилением липогенеза и интенсивности глутатионового цикла в ответ на окислительный стресс [182].

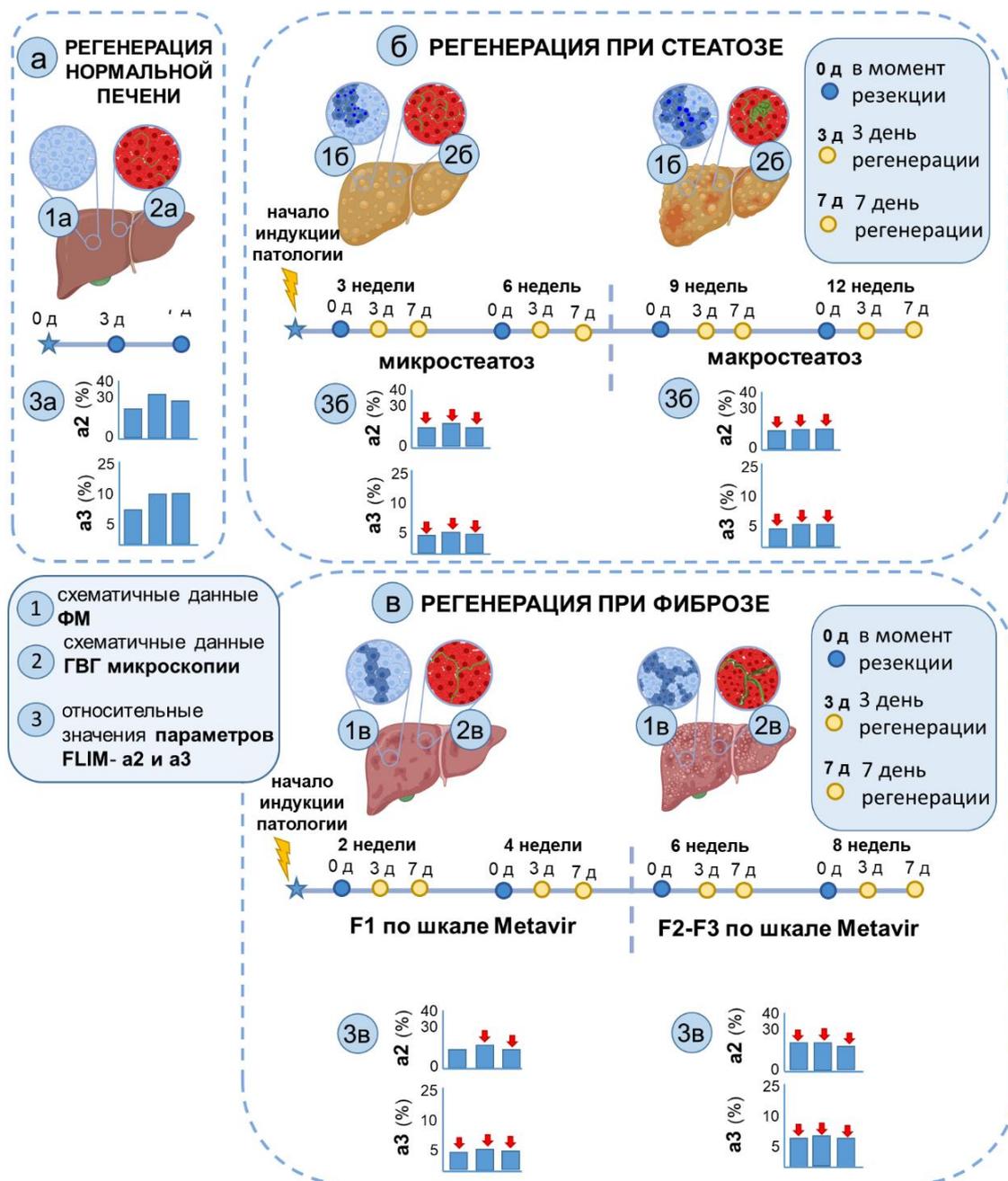


**Рисунок 26.** Анализ энергетического метаболизма гепатоцитов на разных стадиях стеатоза при регенерации. (А) FLIM изображения для параметров  $t_m$ ,  $a_1$ ,  $a_2$  и  $a_3$ ;  $\times 400$ ; (Б) Значения параметров FLIM  $a_2$  и  $a_3$  на разных этапах регенерации при фиброзе. Линией обозначена медиана значений, планки погрешности обозначают максимальное и минимальное значение соответствующего параметра. Пунктирной линией обозначены значения медиан вкладов связанной формы НАДН и НАДФН для нормальной печени и для 3 дня регенерации нормальной печени. \* - статистически значимые отличия по сравнению с соответствующей временной точкой регенерации нормальной печени.

Связанная форма НАДН и НАДФН участвуют 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.

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 рост значений вкладов связанной формы НАДН и НАДФН на третий 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 третий день регенерации на всех стадиях патологии (Рисунок 27).



**Рисунок 27.** Схема. Микроскопические признаки печени при регенерации в норме (а) и на фоне сопутствующего стеатоза (б) и фиброза (в), полученные в режимах флуоресцентной микрокопии (1), ГВГ микрокопии (2) и FLIM микрокопии (3).

Микроскопические признаки снижения регенераторного потенциала печени при фиброзе: 1. Флуоресцентная микрокопия - 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 (а2) и НАДФН (а3) на 3 день регенерации на стадии F1 по Metavir, с последующим ростом значений а3 на 3 день регенерации на стадии F2-F3 по Metavir (Рисунок 27).

Признаки, полученные с помощью FLIM микроскопии, позволят прогнозировать эффективность регенерации печени при наличии сопутствующих заболеваний. Это особенно важно для интраоперационной оценки состояния печени на втором этапе двухэтапной резекции. При достаточном развитии технологии все выявленные признаки, полученные с использованием многофотонной микроскопии, включая флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию, смогут быть применены для быстрой интраоперационной оценки состояния печени и определения стадии патологии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данный момент хирургическое лечение печени остается наиболее эффективным методом терапии злокачественных новообразований. Однако при наличии сопутствующей патологии печени регенераторные способности органа значительно ухудшаются. Важную роль в патогенезе печеночной патологии и нарушении регенерации играют изменения в энергетическом метаболизме гепатоцитов.

В данной работе впервые была предложена методика оценки состояния печени с использованием многофотонной микроскопии, которая включает флуоресцентную микроскопию, ГВГ микроскопию и FLIM микроскопию. Были выявлены характерные микроскопические признаки печени как в норме, так и при регенерации. В режиме многофотонной микроскопии наблюдалось равномерное распределение флуоресцентного сигнала НАД(Ф)Н по поверхности среза *ex vivo* образца печени как в норме, так и при регенерации. В режиме ГВГ микроскопии наблюдали низкий сигнал второй гармоники от коллагеновых фибрилл, что соответствовало отсутствию коллагеновых скоплений в печеночной ткани. В режиме FLIM микроскопии на 3 день регенерации было зафиксировано резкое увеличение значений  $a_2$  и  $a_3$ , что служит критерием успешной регенерации. Эти микроскопические признаки были подтверждены с помощью стандартных методов оценки.

Также были выявлены характерные микроскопические признаки печени при индуцированной патологии. При стеатозе в режиме флуоресцентной микроскопии обнаружены области со сниженной интенсивностью флуоресценции НАД(Ф)Н, преимущественно связанные с очагами липидной инфильтрации, площадь которых увеличивалась по мере прогрессирования патологии. Появление зон со сниженной интенсивностью флуоресценции НАД(Ф)Н при разного рода печеночной патологии также было показано в работах научной группы под руководством М. S. Roberts [24,25]. В режиме ГВГ микроскопии фиксировались единичные обширные зоны сигнала второй гармоники от коллагена, соответствующие очагам фиброза. При

помощи FLIM микроскопии на всех стадиях патологии было выявлено статистически значимое снижение значений  $a_2$  и  $a_3$  по сравнению с нормой, что указывает на уменьшение интенсивности ОКФОСа в гепатоцитах. Такой результат связан с митохондриальной дисфункцией и снижением синтетической активности гепатоцитов, характерными для данной патологии. Значения  $a_3$  на всех стадиях стеатоза были ниже, чем у нормальной печени, что свидетельствует о снижении синтетической активности гепатоцитов. В отличие от данной работы, в работе Barkauskas et al. [183] не было выявлено значимых отличий значений  $a_2$  в норме и на ранних стадиях стеатоза, однако такой результат связан с тем, что авторы использовали биэкспоненциальную модель аппроксимации кривой затухания флуоресценции, не учитывая при этом вклад времени жизни флуоресценции кофактора НАДФН ( $a_3$ ), который участвует в реакциях липогенеза.

При фиброзе в режиме флуоресцентной микроскопии также были обнаружены зоны со сниженной интенсивностью флуоресценции НАД(Ф)Н, связанные с очагами фиброза. В режиме ГВГ микроскопии фиксировались множественные зоны сигнала второй гармоники от коллагеновых фибрилл, что соответствовало фиброзным септам, что согласуется с работами других авторов [24,25]. В режиме FLIM микроскопии на стадии F1 по Metavir было отмечено значительное снижение значений  $a_2$  и  $a_3$  по сравнению с нормальными показателями, что указывает на снижение интенсивности ОКФОСа и синтетической активности гепатоцитов на ранних стадиях фиброза. Полученные результаты согласуются с данными, представленными в работе Barkauskas et al. [183], где было показано снижение значений  $a_2$  при фиброзе (через 5 недель после начала индукции патологии). На стадиях F2-F3 по Metavir значения  $a_2$  и  $a_3$  не отличались от значений в нормальной печени.

Были обнаружены характерные микроскопические признаки печени во время регенерации на фоне сопутствующей патологии. В случае стеатоза, в режиме FLIM микроскопии на всех стадиях патологии не наблюдалось резкого увеличения значений  $a_2$  и  $a_3$  на 3 день регенерации, что не соответствует

критериям успешной регенерации и указывает на повреждение гепатоцитов. Такие результаты также свидетельствуют о снижении интенсивности ОКФОСа, ассоциированного с митохондриальной дисфункцией, и об уменьшении биосинтетической активности в гепатоцитах. При фиброзе в режиме FLIM микроскопии на стадии F1 по Metavir также не было отмечено резкого увеличения значений  $a_2$  и  $a_3$  на третий день регенерации, на стадиях F2-F3 по Metavir резкое увеличение наблюдалось только для параметра  $a_2$ . Увеличение значения параметра  $a_3$  указывает на активацию компенсаторных процессов, таких как антиоксидантная защита, с усилением глутатионового цикла, в котором участвует НАДФН.

Признаки, полученные с помощью флуоресцентной и ГВГ микроскопии, были связаны только с соответствующими стадиями патологии, что имеет значение для интраоперационной оценки состояния печени при проведении одноэтапных резекций. При этом, в режиме FLIM микроскопии были выявлены изменения на промежуточных этапах регенерации печени, что актуально для интраоперационной оценки состояния печени на втором этапе двухэтапной резекции.

При достаточном развитии технологий все выявленные микроскопические признаки могут быть использованы для быстрой интраоперационной оценки состояния печени и определения степени патологии, что повысит безопасность и эффективность хирургических вмешательств.

## 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 ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramos E. et al. The influence of steatosis on the short-and long-term results of resection of liver metastases from colorectal carcinoma / E. Ramos, J. Torras, L. Lladó, A. Rafecas, T. Serrano, S. Lopez-Gordo, J. Busquets, J. Fabregat //Hpb. – 2016. – Vol. 18. – №. 4. – P. 389-396.
2. Mohammadian M. et al. Liver cancer in the world: epidemiology, incidence, mortality and risk factors/ M. Mohammadian, N. Mahdavifar, A. Mohammadian-Hafshejani, H. Salehiniya //World cancer research journal. – 2018. – Vol. 5. – №. 2.
3. Алиханов Р.Б. Пострезекционная печеночная недостаточность. Прогнозирование, профилактика и лечение.: дис. ... докт. мед. наук: 3.1.9. – Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, 2023 - 208 с.
4. De Meijer V. E. et al. Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection/ V. E. De Meijer, B. T. Kalish, M. Puder, J. N. M. IJzermans //Journal of British Surgery. – 2010. – Vol. 97. – №. 9. – P. 1331-1339.
5. Su C. W. et al. Impact of steatosis on prognosis of patients with early-stage hepatocellular carcinoma after hepatic resection/ C. W.Su MD, G. Y. Chau, H. H. Hung, Y. C. Yeh, H. J. Lei, C. Y. Hsia, C. R. Lai, H. C. Lin, J. C. Wu //Annals of Surgical Oncology. – 2015. – Vol. 22. – №. 7. – P. 2253-2261.
6. Cheng Z. Mitochondria and metabolic homeostasis/ Cheng Z., Ristow M. //Antioxidants & redox signaling. – 2013. – Vol. 19. – №. 3. – P. 240-242.
7. Koves T. R. et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance/ T. R. Koves, J. R. Ussher, R. C. Noland, D. Slentz, M. Mosedale, O. Ilkayeva, J. Bain, R. Stevens, J. R. B. Dyck, C. B. Newgard, G. D. Lopaschuk, D. M. Muoio //Cell metabolism. – 2008. – Vol. 7. – №. 1. – P. 45-56.
8. Sookoian S. et al. Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  promoter/ S. Sookoian, M. S. Rosselli, C.

Gemma, A. L. Burgueño, T. Fernández Gianotti, G. O. Castaño, C. J. Pirola //Hepatology. – 2010. – Vol. 52. – №. 6. – P. 1992-2000.

9. Neuschwander-Tetri B. A. et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial/B. A. Neuschwander-Tetri, R. Looma, A. J. Sanyal, J. E. Lavine, M. L. Van Natta, M. F. Abdelmalek, N. Chalasani, S. Dasarathy, A. M. Dieh, B. Hameed, K. V. Kowdley, A. McCullough, N. Terrault, J. M. Clark, J. Tonascia, E. M. Brunt, D. E. Kleiner, E. M. Doo //The Lancet. – 2015. – Vol. 385. – №. 9972. – P. 956-965.

10. Nassir F. et al. Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis/ F. Nassir, R. S. Rector, G. M. Hammoud, J. A. Ibdah, //Gastroenterology & hepatology. – 2015. – Vol. 11. – №. 3. – P. 167.

11. Veteläinen R. et al. Steatosis as a risk factor in liver surgery/ R. Veteläinen, A. van Vliet, D. J. Gouma, T. M. van Gulik //Annals of surgery. – 2007. – Vol. 245. – №. 1. – P. 20.

12. Marsman H. A. et al. Hepatic regeneration and functional recovery following partial liver resection in an experimental model of hepatic steatosis treated with omega-3 fatty acids/ H. A. Marsman, W. De Graaf, M. Heger, R. F. Van Golen, F. J. W. Ten Kate, R. Bennink, T. M. Van Gulik //Journal of British Surgery. – 2013. – Vol. 100. – №. 5. – P. 674-683.

13. Dahlke M. H. et al. Liver regeneration in a retrorsine/CCl4–induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute?/ M. H. Dahlke, F. C. Popp, F. H. Bahlmann, H. Aselmann, M. D. Jäger, M. Neipp, P. Piso, J. Klempnauer, H. J. Schlitt //Journal of hepatology. – 2003. – Vol. 39. – №. 3. – P. 365-373.

14. Hafez M. M. et al. Association between paraoxonases gene expression and oxidative stress in hepatotoxicity induced by CCl4/ M. M. Hafez, O. A. Al-Shabanah, N. O. Al-Harbi, M. M. Al-Harbi, S. S. Al-Rejaie, S. M. Alsurayea, M. M. Sayed-Ahmed //Oxidative medicine and cellular longevity. – 2014. – Vol. 2014.

15. Wang S. et al. Puerarin protects against CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice: possible role of PARP-1 inhibition/ S. Wang, X. L. Shi, M. Feng, X. Wang, Z. H. Zhang, X. Zhao, B. Han, H. C. Ma, B. D. Ding //International Immunopharmacology. – 2016. – Vol. 38. – P. 238-245.
16. Nyblom H. et al. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking/ H. Nyblom, U. Berggren, J. Balldin, R. Olsson //Alcohol and alcoholism. – 2004. – Vol. 39. – №. 4. – P. 336-339.
17. Thomas M. N. et al. Intraoperative simulation of remnant liver function during anatomic liver resection with indocyanine green clearance (LiMON) measurements/ M. N. Thomas, E. Weninger, M. Angele, F. Bösch, S. Pratschke, J. Andrassy, M. Rentsch, M. Stang, W. Hartwig, J. Werner, M. Guba //Hpb. – 2015. – Vol. 17. – №. 6. – P. 471-476.
18. De Gasperi A. Indocyanine green kinetics to assess liver function: ready for a clinical dynamic assessment in major liver surgery?/ De Gasperi A., Mazza E., Prospero M. //World journal of hepatology. – 2016. – Vol. 8. – №. 7. – P. 355.
19. Wei W. et al. Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration/ W. Wei, O. Dirsch, A. L. Mclean, S. Zafarnia, M. Schwier, U. Dahmen //European Surgical Research. – 2015. – Vol. 54. – №. 3-4. – P. 97-113.
20. Kuznetsova D. S. et al. Metabolic imaging and secondary ion mass spectrometry to define the structure and function of liver with acute and chronic pathology/ D. S. Kuznetsova, S. A. Rodimova, A. Gulin, D. Reunov, N. Bobrov, A. V. Polozova, A. Vasin, V.I. Shcheslavskiy, N. Vdovina, V. E. Zagainov, E. V. Zagaynova //Journal of biomedical optics. – 2019. – Vol. 25. – №. 1. – P. 014508.
21. Schuppan, D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies/ D. Schuppan// Clinics and research in hepatology and gastroenterology. – 2015. – Vol. 39. – P. S51-S59.
22. Roehlen N., Crouchet E., Baumert T. F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives/ N. Roehlen, E. Crouchet, T. F. Baumert// Cells. – 2020. – Vol. 9. – №. 4. – P. 875.

23. Skala M. C. et al. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia/ M. C. Skala, K. M. Ricking, D. K. Bird, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K. W. Eliceiri, P. J. Keely, N. Ramanujam //Journal of biomedical optics. – 2007. – Vol. 12. – №. 2. – P. 024014.
24. Wang H. et al. Real-time histology in liver disease using multiphoton microscopy with fluorescence lifetime imaging/ H. Wang, X. Liang, Y. H. Mohammed, J. A. Thomas, K. R. Bridle, C. A. Thorling, J. E. Grice, Z. P. Xu, X. Liu, D. H. G. Crawford, M. S. Roberts //Biomedical optics express. – 2015. – Vol. 6. – №. 3. – P. 780-792.
25. Wang H. et al. Two-photon dual imaging platform for in vivo monitoring cellular oxidative stress in liver injury/ H. Wang, R. Zhang, K. R. Bridle, A. Jayachandran, J. A. Thomas, W. Zhang, J. Yuan, Z. P. Xu, D. H. G. Crawford, X. Liang, X. Liu, M. S. Roberts //Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – №. 1. – P. 1-11.
26. Michalopoulos G. K. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance/ G. K. Michalopoulos //Hepatology. – 2017. – Vol. 65. – №. 4. – P. 1384-1392.
27. Laconi E. Principles of hepatocyte repopulation/ E. Laconi, S. Laconi //Seminars in cell & developmental biology. – Academic Press, 2002. – Vol. 13. – №. 6. – P. 433-438.
28. Michalopoulos G. K., Khan Z. Liver stem cells: experimental findings and implications for human liver disease/ G. K. Michalopoulos, Z. Khan //Gastroenterology. – 2015. – Vol. 4. – №. 149. – P. 876-882.
29. Tanaka M. et al. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms/ M. Tanaka, T. Itoh, N. Tanimizu, A. Miyajima //The Journal of Biochemistry. – 2011. – Vol. 149. – №. 3. – P. 231-239.
30. Pranke P. et al. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood/ P. Pranke, R. R. Failace, W. F. Allebrandt, G. Steibel, F. Schmidt, N. B. Nardi //Acta haematologica. – 2001. – Vol. 105. – №. 2. – P. 71-76.

31. Higgins G. M., Anderson R. M. Experimental pathology of the liver/ G. M. Higgins, R. M. Anderson //Arch pathol. – 1931. – T. 12. – P. 186-202.
32. Forbes S. J., Newsome P. N. Liver regeneration—mechanisms and models to clinical application/ S. J. Forbes, P. N. Newsome //Nature reviews Gastroenterology & hepatology. – 2016. – Vol. 13. – №. 8. – P. 473-485.
33. Forbes S. J., Rosenthal N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy/ S. J. Forbes, N. Rosenthal //Nature medicine. – 2014. – Vol. 20. – №. 8. – P. 857-869.
34. Bhushan B. et al. Pro-regenerative signaling after acetaminophen-induced acute liver injury in mice identified using a novel incremental dose model/ B. Bhushan, C. Walesky, M. Manley, T. Gallagher, P. Borude, G. Edwards, S. P. S. Monga, U. Apte //The American journal of pathology. – 2014. – Vol. 184. – №. 11. – P. 3013-3025.
35. Nishiyama K. et al. Mouse CD11b+ Kupffer cells recruited from bone marrow accelerate liver regeneration after partial hepatectomy/ K. Nishiyama, H. Nakashima, M. Ikarashi, M. Kinoshita, M. Nakashima, S. Aosasa, S. Seki, J. Yamamoto //PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – №. 9. – P. e0136774.
36. Yoshiya S. et al. Blockade of the apelin–APJ system promotes mouse liver regeneration by activating Kupffer cells after partial hepatectomy/S. Yoshiya, K. Shirabe, D. Imai, T. Toshima, Y. Yamashita, T. Ikegami, S. Okano, T. Yoshizumi, H. Kawanaka, Y. Maehara //Journal of gastroenterology. – 2015. – Vol. 50. – №. 5. – P. 573-582.
37. Butcher R. L. Factors affecting luteal regulation following parabiosis in the rat/ R. L. Butcher //Endocrinology. – 1966. – T. 79. – №. 2. – C. 457-460.
38. Böhm F. et al. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines/ F. Böhm, U. A. Köhler, T. Speicher, S. Werner //EMBO molecular medicine. – 2010. – Vol. 2. – №. 8. – P. 294-305.
39. Fajardo-Puerta A. B. et al. Gene of the month: HGF/ A. B. Fajardo-Puerta, M. M. Prado, A. E. Frampton, L. R. Jiao //Journal of clinical pathology. – 2016. – Vol. 69. – №. 7. – P. 575-579.

40. Tao Y. et al. Liver regeneration: analysis of the main relevant signaling molecules/ Y. Tao, M. Wang, E. Chen, H. Tang //Mediators of inflammation. – 2017. – Vol. 2017.
41. Paranjpe S. et al. Combined systemic elimination of MET and EGFR signaling completely abolishes liver regeneration and leads to liver decompensation/ S. Paranjpe, W. C. Bowen, W. M. Mars, A. Orr, M. M. Haynes, M. C. DeFrances, S. Liu, G. C. Tseng, A. Tsagianni, G. K. Michalopoulos //Hepatology (Baltimore, Md.). – 2016. – Vol. 64. – №. 5. – P. 1711.
42. Padrisa-Altes S. et al. Control of hepatocyte proliferation and survival by Fgf receptors is essential for liver regeneration in mice // Gut. – 2015. – Vol. 64. – №. 9. – P. 1444–1453.
43. Michalopoulos G. K., Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications // Nature reviews Gastroenterology and hepatology. – 2021. – Vol. 18. – №. 1. – P. 566-584.
44. Пальцев М. А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии/ М. А. Пальцев //Медицина. – 2009. – Т. 1. – С. 272.
45. Michalopoulos G. K. Liver regeneration/ G. K. Michalopoulos //The Liver: Biology and Pathobiology. – 2020. – P. 566-584.
46. Guglielmi A. et al. How much remnant is enough in liver resection?/ A. Guglielmi, A. Ruzzenente, S. Conci, A. Valdegamberi, C. Iacono //Digestive surgery. – 2012. – Vol. 29. – №. 1. – P. 6-17.
47. Golse N. et al. New paradigms in post-hepatectomy liver failure/ N. Golse, P. O. Bucur, R. Adam, D. Castaing, A. Sa Cunha, E. Vibert //Journal of Gastrointestinal Surgery. – 2013. – Vol. 17. – №. 3. – P. 593-605.
48. Nilsson H. et al. The inhomogeneous distribution of liver function: possible impact on the prediction of post-operative remnant liver function/ H. Nilsson, S. Karlgren, L. Blomqvist, E. Jonas //Hpb. – 2015. – Vol. 17. – №. 3. – P. 272-277.
49. Truant S. et al. Liver function following extended hepatectomy can be accurately predicted using remnant liver volume to body weight ratio/ S. Truant, E.

Boleslawski, G. Sergent, E. Leteurtre, A. Duhamel, M. Hebbbar, F. R. Pruvot //World journal of surgery. – 2015. – Vol. 39. – №. 5. – P. 1193-1201.

50. Moris D. et al. Mechanistic insights of rapid liver regeneration after associating liver partition and portal vein ligation for stage hepatectomy/ D. Moris, S. Vernadakis, A. Papalampros, M. Vailas, N. Dimitrokallis, A. Petrou, D. Dimitroulis //World journal of gastroenterology. – 2016. – Vol. 22. – №. 33. – P. 7613.

51. Hamano M. et al. Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis/ M. Hamano, H. Ezaki, S. Kiso, K. Furuta, M. Egawa, T. Kizu, N. Chatani, Y. Kamada, . Yoshida, T. Takehara //Journal of gastroenterology. – 2014. – Vol. 49. – №. 2. – P. 305-316.

52. Allaire M., Gilgenkrantz H. The impact of steatosis on liver regeneration/ M. Allaire, H. Gilgenkrantz //Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation. – 2020. – Vol. 41. – №. 1.

53. Kele P. G. et al. The impact of hepatic steatosis on liver regeneration after partial hepatectomy/ P. G. Kele, E. J. van der Jagt, A. S. Gouw, T. Lisman, R. J. Porte, M. T. de Boer, //Liver International. – 2013. – Vol. 33. – №. 3. – P. 469-475.

54. Chu M. J. J. et al. The impact of hepatic steatosis on hepatic ischemia-reperfusion injury in experimental studies: a systematic review / M. J. Chu, A. J. Hickey, A. R. Phillips, A. S. Bartlett //BioMed Research International. – 2013. – Vol. 2013.

55. Day C. P. Steatohepatitis: a tale of two “hits”?/ C. P. Day, O. F. W. James // Gastroenterology. – 1998. – Vol. 114. – №. 4. – P. 842-845.

56. Chitturi S. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis/ S. Chitturi, G. C. Farrell //Seminars in liver disease. – 2001. – Vol. 21. – №. 01. – P. 027-042.

57. Neuschwander-Tetri B. A., Caldwell S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference/ B. A. Neuschwander-Tetri, S. H. Caldwell //Hepatology. – 2003. – Vol. 37. – №. 5. – P. 1202-1219.

58. Krawczyk M. Nonalcoholic fatty liver disease/ M. Krawczyk, L. Bonfrate, P. Portincasa//Best practice & research Clinical gastroenterology. – 2010. – Vol. 24. – №. 5. – P. 695-708.
59. Veteläinen R. et al. Steatosis as a risk factor in liver surgery/ R. Veteläinen, A. van Vliet, D. J. Gouma, T. M. van Gulik //Annals of surgery. – 2007. – Vol. 245. – №. 1. – P. 20.
60. Michalopoulos G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas/ G. K. Michalopoulos //The American journal of pathology. – 2010. – Vol. 176. – №. 1. – P. 2-13.
61. Hijona E. et al. Inflammatory mediators of hepatic steatosis/ E. Hijona, L. Hijona, J. I. Arenas, L. Bujanda //Mediators of inflammation. – 2010. – Vol. 2010.
62. Wei Y. et al. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction/ Y. Wei, R. S. Rector, J. P. Thyfault, J. A. Ibdah //World journal of gastroenterology: WJG. – 2008. – Vol. 14. – №. 2. – P. 193.
63. van Zutphen T. et al. Malnutrition-associated liver steatosis and ATP depletion is caused by peroxisomal and mitochondrial dysfunction/ T. Zutphen, J. Ciapaite, V. W. Bloks, C. Ackereley, A. Gerding, A. Jurdzinski, R. A. Moraes, L. Zhang, J. C. Wolters, R. Bischoff, R. J. Wanders, S. M. Houten, D. Bronte-Tinkew, T. Shatseva, G. F. Lewis, A. K. Groen, D. J. Reijngoud, B. M. Bakker, R. H. J. Bandsma//Journal of hepatology. – 2016. – Vol. 65. – №. 6. – P. 1198-1208.
64. Ferraioli G., Monteiro L. B. S. Ultrasound-based techniques for the diagnosis of liver steatosis / G. Ferraioli, L. B. S. Monteiro // World journal of gastroenterology. – 2019. – Vol. 25. – №. 40. – P. 6053.
65. Ibdah J. A. et al. A fetal fatty-acid oxidation disorder as a cause of liver disease in pregnant women/ J. A. Ibdah, M. J. Bennett, P. Rinaldo, Y. Zhao, B. Gibson, H. F. Sims, A. W. Strauss //New England Journal of Medicine. – 1999. – Vol. 340. – №. 22. – P. 1723-1731.
66. Friedman S. L. Hepatic fibrosis—overview/ S. L. Friedman //Toxicology. – 2008. – Vol. 254. – №. 3. – P. 120-129.

67. Bataller R. et al. Liver fibrosis/ R. Bataller, D. A. Brenner //The Journal of clinical investigation. – 2005. – Vol. 115. – №. 2. – P. 209-218.
68. Karsdal M. A. et al. Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis/ M. A. Karsdal, T. Manon-Jensen, F. Genovese, J. H. Kristensen, M. J. Nielsen, J. M. B. Sand, N. U. B. Hansen, A. C. Bay-Jensen, C. L. Bager, A. Krag, A. Blanchard, H. Krarup, D. J. Leeming, D. Schuppan //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2015. – Vol. 308. – №. 10. – P. 807-830.
69. Liang S., Kisseleva T., Brenner D. A. The role of NADPH oxidases (NOXs) in liver fibrosis and the activation of myofibroblasts/ S. Liang, T. Kisseleva, D. A. Brenner // The Frontiers in physiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 17.
70. Crespo Yanguas S. et al. Experimental models of liver fibrosis //Archives of toxicology. – 2016. – Vol. 90. – №. 5. – P. 1025-1048.
71. Chang P. E. et al. Second harmonic generation microscopy provides accurate automated staging of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease / P. E. Chang, G. B. B. Goh, W. Q. Leow, L. Shen, K. H. Lim, C. K. Tan // PLoS One. – 2018. – Vol. 13. – №. 6. – P. 1-14.
72. Song M. et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) gene therapy attenuates CCl4-induced liver injury and fibrosis in rats/ M. Song, X. Yi, W. Chen, Y. Yuan, X. Zhang, J. Li, M. Tong, G. Liu, S. You, X. Kong //Biochemical and biophysical research communications. – 2011. – Vol. 415. – №. 1. – P. 152-156.
73. Gilgenkrantz H., de l'Hortet A. C. Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine/ H. Gilgenkrantz, A. C. de l'Hortet // The American journal of pathology. – 2018. – Vol. 188. – №. 6. – P. 1316-1327.
74. McNaughton D. A., Abu-Yousef M. M. Doppler US of the liver made simple/ D. A. McNaughton, M. M. Abu-Yousef //Radiographics. – 2011. – Vol. 31. – №. 1. – P. 161-188.
75. Will O. M. et al. Longitudinal micro-computed tomography monitoring of progressive liver regeneration in a mouse model of partial hepatectomy/ O. M. Will, T. Damm, G.M. Campbell, W. von Schönfels, Y. Açil, M. Will, A. Chalaris-

- Rissmann, M. Ayna, C. Drucker, C. C. Glüer //Laboratory animals. – 2017. – Vol. 51. – №. 4. – P. 422-426.
76. McCollough C. H. et al. Radiation dose to patients from cardiac diagnostic imaging/ A. J. Einstein, K. W. Moser, R. C. Thompson, M. D. Cerqueira, M. J. Henzlova //Radiol Clin. – 2009. – Vol. 47. – P. 27-40.
77. Spouse E., Gedroyc W. M. MRI of the claustrophobic patient: interventionally configured magnets/ E. Spouse, W. M. Gedroyc //The British Journal of Radiology. – 2000. – Vol. 73. – №. 866. – P. 146-151.
78. Изранов В. А., Казанцева Н. В., Белецкая М. А. Измерение объема печени с помощью визуализационных методов различной модальности/ В. А. Изранов, Н. В. Казанцева, М. А. Белецкая //Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. – 2017. – №. 2. – С. 52-64.
79. Чаплыгина Е. В., Губарь А. С. Значения объемных показателей печени в связи с типом телосложения и половой принадлежностью обследованных лиц/ Е. В. Чаплыгина, А. С. Губарь //Журнал анатомии и гистопатологии. – 2017. – Т. 6. – №. 1. – С. 101-104.
80. Wagener G. Assessment of hepatic function, operative candidacy, and medical management after liver resection in the patient with underlying liver disease/ G. Wagener //Seminars in liver disease. – Thieme Medical Publishers, 2013. – Vol. 33. – №. 03. – P. 204-212.
81. Cieslak K. P. et al. New perspectives in the assessment of future remnant liver/ K. P. Cieslak, J. H. Runge, M. Heger, J. Stoker, R. J. Bennink, T. M. Van Gulik //Digestive Surgery. – 2014. – Vol. 31. – №. 4-5. – P. 255-268.
82. Assy N., Minuk G. Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications/ N. Assy, G. Y. Minuk //Journal of hepatology. – 1997. – Vol. 26. – №. 4. – P. 945-952.
83. Di Martino M. et al. Imaging features of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescents/ M. Di Martino, K. Koryukova, M. Bezzi, C. Catalano //Children. – 2017. – Vol. 4. – №. 8. – P. 73.

84. Childs J. T., Thoirs K. A., Esterman A. J. The development of a practical and uncomplicated predictive equation to determine liver volume from simple linear ultrasound measurements of the liver/ J. T. Childs, K. A. Thoirs, A. J. Esterman // *The Radiography*. – 2016. – Vol. 22. – №. 2. – P. 125-130.
85. Goceri E. et al. Quantification of liver fat: a comprehensive review/ E. Goceri, Z. K. Shah, R. Layman, X. Jiang, M. N. Gurcan // *Computers in biology and medicine*. – 2016. – Vol. 71. – P. 174-189.
86. Zhang Y. N. et al. Liver fat imaging—a clinical overview of ultrasound, CT, and MR imaging/ Y. N. Zhang, K. J. Fowler, G. Hamilton, J. Y. Cui, E. Z. Sy, M. Balanay, J. C. Hooker, N. Szeverenyi, C. B. Sirlin // *The British journal of radiology*. – 2018. – Vol. 91. – №. 1089. – P. 20170959.
87. Wu J. et al. Value of gadoxetate biliary transit time in determining hepatocyte function/ J. Wu, H. Li, Y. Lin, Z. Chen, Q. Zhong, H. Gao, L. Fu, K. Sandrasegaran // *Abdominal imaging*. – 2015. – Vol. 40. – №. 1. – P. 95-101.
88. Herrmann E. et al. Assessment of biopsy-proven liver fibrosis by two-dimensional shear wave elastography: An individual patient data-based meta-analysis/ E. Herrmann, V. de Lédinghen, C. Cassinotto, W. C. W. Chu, V. Y. F. Leung, G. Ferraioli, C. Filice, L. Castera, V. Vilgrain, M. Ronot, J. Dumortier, A. Guibal, S. Pol, J. Trebicka, C. Jansen, C. Strassburg, R. Zheng, J. Zheng, S. Francque, T. Vanwolleghem, L. Vonghia, E. K. Manesis, P. Zoumpoulis, I. Sporea, M. Thiele, A. Krag, C. Cohen-Bacrie, A. Criton, J. Gay, T. Deffieux, M. Friedrich-Rust // *Hepatology*. – 2018. – Vol. 67. – №. 1. – P. 260-272.
89. Srinivasa Babu A. et al. Elastography in chronic liver disease: modalities, techniques, limitations, and future directions/ A. S. Babu, M. L. Wells, O. M. Teytelboym, J. E. Mackey, F. H. Miller, B. M. Yeh, R. L. Ehman, S. K. Venkatesh // *Radiographics*. – 2016. – Vol. 36. – №. 7. – P. 1987-2006.
90. de Oliveira P. G. et al. Characterization of joint disease in mucopolysaccharidosis type I mice/ P. G. de Oliveira, G. Baldo, F. Q. Mayer, B. Martinelli, L. Meurer, R. Giugliani, U. Matte, R. M. Xavier // *International Journal of Experimental Pathology*. – 2013. – Vol. 94. – №. 5. – P. 305-311.

91. Lai J. P. et al. Immunohistochemical stains of proliferating cell nuclear antigen, insulin-like growth factor 2 and clusterin help distinguish malignant from benign liver nodular lesions/ J. P. Lai, Z. M. E Chen, T. Lok, O. T. M. Chan, E. Himmelfarb, Q. Zhai, F. Lin, H. L. Wang //Journal of Clinical Pathology. – 2014. – Vol. 67. – №. 6. – P. 464-469.
92. Shibuya M. et al. Histochemical study of pituitary adenomas with Ki-67 and anti-DNA polymerase  $\alpha$  monoclonal antibodies, bromodeoxyuridine labeling, and nucleolar organizer region counts/ M. Shibuya, F. Saito, T. Miwa, R. L. Davis, C. B. Wilson, T. Hoshino //Acta neuropathologica. – 1992. – Vol. 84. – №. 2. – P. 178-183.
93. Li H. H. et al. Effect of KI-67 positive cellular index on prognosis after hepatectomy in Barcelona Clinic Liver Cancer stage A and B hepatocellular carcinoma with microvascular invasion/ H. H. Li, L. N. Qi, L. Ma, Z. S. Chen, B. D. Xiang, L. Q. Li //OncoTargets and therapy. – 2018. – Vol. 11. – P. 4747.
94. Popescu R. et al. Histological and morphometrical studies in liver regeneration in mice/ R. Popescu, M. N. Filimon, G. Dumitrescu, L. Petculescu-Ciochina, V. Dumitrascu, D. Vlad, D. Verdes // Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies. – 2012. – Vol. 2. – №. 45. – P. 203-203.
95. Selzner M., Clavien P. A. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway/ M. Selzner, P. A. Clavien //Hepatology. – 2000. – Vol. 31. – №. 1. – P. 35-42.
96. Shamban A. T. Special Topic: Combination Hand Rejuvenation Procedures/ A. T. Shamban //Aesthetic Surgery Journal. – 2009. – Vol. 29. – №. 5. – P. 409-413.
97. Fukuda T. et al. Immunohistochemical analyses of cell cycle progression and gene expression of biliary epithelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy of the mouse/ T. Fukuda, T. Fukuchi, S. Yagi, N. Shiojiri //Experimental animals. – 2016. – Vol. 65. – №. 2. – P. 135-146.
98. Hoekstra L. T. et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review/ L. T. Hoekstra, W. de Graaf, G. A. Nibourg, M. Heger, R.

J. Bennink, B. Stieger, T. M. van Gulik //Annals of surgery. – 2013. – Vol. 257. – №. 1. – P. 27-36.

99. Stockmann M. et al. The LiMAx test: a new liver function test for predicting postoperative outcome in liver surgery/ M. Stockmann, J. F. Lock, M. Malinowski, S. M. Niehues, D. Seehofer, P. Neuhaus //Hpb. – 2010. – Vol. 12. – №. 2. – P. 139-146.

100. Дзидзава И. И. и др. Количественная оценка функции печени методом клиренс-теста с индоцианином зеленым/ И. И. Дзидзава, Б. Н. Котив, Д. П. Кашкин, А. А. Кочаткова, С. А. Бугаев, А. В. Смородский, А. В. Слободяник //Трансплантология. – 2010. – №. 1. – С. 30-37.

101. Helmke S., Colmenero J., Everson G. T. Non-invasive assessment of liver function/ S. Helmke, J. Colmenero, G. T. Everson // Non Current opinion in gastroenterology. – 2015. – Vol. 31. – №. 3. – P. 199.

102. Aalami O. O., Allen D. B., Organ Jr C. H. Chylous ascites: a collective review/ O. O. Aalami, D. B. Allen, C. H. Organ Jr. //Surgery. – 2000. – Vol. 128. – №. 5. – P. 761-778.

103. Sumiyoshi T. et al. 99mTc-GSA SPECT/CT fusion imaging for hepatectomy candidates with extremely deteriorated ICG value/ T. Sumiyoshi, T. Okabayashi, Y. Negoro, Y. Hata, Y. Noda, K. Sui, J. Iwata, M. Matsumoto //Japanese Journal of Radiology. – 2018. – Vol. 36. – №. 9. – P. 537-543.

104. Ge P. L., Du S. D., Mao Y. L. Advances in preoperative assessment of liver function/ P. L. Ge, S. D. Du, Y. L. Mao //Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International. – 2014. – Vol. 13. – №. 4. – P. 361-370.

105. Forner A. et al. Lack of arterial hypervascularity at contrast-enhanced ultrasound should not define the priority for diagnostic work-up of nodules < 2 cm/ A. Forner, R. Vilana, L. Bianchi, C. Rodríguez-Lope, M. Reig, M. Á. García-Criado, J. Rimola, M. Solé, C. Ayuso, C. Bru, J. Bruix //Journal of Hepatology. – 2015. – Vol. 62. – №. 1. – P. 150-155.

106. Iimuro Y. ICG clearance test and 99mTc-GSA SPECT/CT fusion images/ Y. Iimuro //Visceral medicine. – 2017. – Vol. 33. – №. 6. – P. 449-454.

107. Shi F. et al. Molecular properties, functions, and potential applications of NAD kinases/ F. Shi, Y. Li, Y. Li, X. Wang //Acta Biochim Biophys Sin. – 2009. – Vol. 41. – №. 5. – P. 352-361.
108. Xia W. et al. Roles of NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cell death/ W. Xia, Z. Wang, Q. Wang, J. Han, C. Zhao, Y. Hong, L. Zeng, L. Tang, W. Ying, //Current Pharmaceutical Design. – 2009. – Vol. 15. – №. 1. – P. 12-19.
109. Heikal A. A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies/ A. A. Heikal //Biomarkers in medicine. – 2010. – Vol. 4. – №. 2. – P. 241-263.
110. Folmes C. D. L. et al. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation/ C. D. Folmes, P. P. Dzeja, T. J. Nelson, A. Terzic //Cell stem cell. – 2012. – Vol. 11. – №. 5. – P. 596-606.
111. Corpas F. J., Barroso J. B. NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions/ F. J. Corpas, J. B. Barroso //Frontiers in Environmental Science. – 2014. – Vol. 2. – P. 55.
112. Chakraborty S. et al. Quantification of the metabolic state in cell-model of Parkinson's disease by fluorescence lifetime imaging microscopy/ S. Chakraborty, F. S. Nian, J. W. Tsai, A. Karmenyan, A. Chiou //Scientific reports. – 2016. – Vol. 6. – №. 1. – P. 1-9.
113. Cairns R. A., Harris I. S., Mak T. W. Regulation of cancer cell metabolism/ R. A. Cairns, I. S. Harris, T. W. Mak //Nature Reviews Cancer. – 2011. – Vol. 11. – №. 2. – P. 85-95.
114. Cannon T. M., Shah A. T., Skala M. C. Validation and characterization of optical redox ratio measurements with a microplate reader in breast cancer cells/ T. M. Cannon, A. T. Shah, M. C. Skala //Photonic Therapeutics and Diagnostics XI. – SPIE, 2015. – Vol. 9303. – P. 329-334.
115. Kunz W. S., Kunz W. Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria/ W. S. Kunz, W. Kunz //Biochimica

et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 1985. – Vol. 841. – №. 3. – P. 237-246.

116. Saks V. A. et al. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo/ V. A. Saks, V. I. Veksler, A. V. Kuznetsov, L. Kay, P. Sikk, T. Tiivel, L. Tranqui, J. Olivares, K. Winkler, F. Wiedemann, W. S. Kunz //Bioenergetics of the cell: quantitative aspects. – Springer, Boston, MA, 1998. – P. 81-100.

117. Ying W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences/ W. Ying //Antioxidants & redox signaling. – 2008. – Vol. 10. – №. 2. – P. 179-206.

118. Chorvat Jr D., Chorvatova A. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues/ D. Chorvat Jr, A. Chorvatova //Laser Physics Letters. – 2009. – Vol. 6. – №. 3. – P. 175-193.

119. Smeitink J., van den Heuvel L., DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation/ J. Smeitink, L. van den Heuvel, S. DiMauro //Nature Reviews Genetics. – 2001. – Vol. 2. – №. 5. – P. 342-352.

120. Gautheron D. C. Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain/ D. C. Gautheron //Organic Acidurias. – Springer, Dordrecht, 1984. – P. 57-61.

121. Rueck A. C. et al. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging to investigate cell metabolism in malignant and nonmalignant oral mucosa cells/ A. C. Rueck, C. Hauser, S. Mosch, S. Kalinina //Journal of Biomedical Optics. – 2014. – Vol. 19. – №. 9. – P. 096005.

122. Blacker T. S. et al. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM/ T. S. Blacker, Z. F. Mann, J. E. Gale, M. Ziegler, A. J. Bain, G. Szabadkai, M. R. Duchon //Nature communications. – 2014. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1-9.

123. Meleshina A. V. et al. Probing metabolic states of differentiating stem cells using two-photon FLIM/ A. V. Meleshina, V. V. Dudenkova, M. V. Shirmanova, V.

- I. Shcheslavskiy, W. Becker, A. S. Bystrova, E. I. Cherkasova, E. V. Zagaynova //Scientific reports. – 2016. – Vol. 6. – №. 1. – P. 1-11.
124. Becker W. et al. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting/ W. Becker, A. Bergmann, M. A. Hink, K. König, K. Benndorf, C. Biskup //Microscopy research and technique. – 2004. – Vol. 63. – №. 1. – P. 58-66.
125. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis/ R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca //Annual review of physical chemistry. – 1996. – Vol. 47. – №. 1. – P. 555-606.
126. Patterson G. H. et al. Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD (P) H responses in pancreatic islet  $\beta$  cells/ G. H. Patterson, S. M. Knobel, P. Arkhammar, O. Thastrup, D. W. Piston //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – Vol. 97. – №. 10. – P. 5203-5207.
127. Liu Z. et al. Mapping metabolic changes by noninvasive, multiparametric, high-resolution imaging using endogenous contrast / Z. Liu, C. A. Alonzo, A. Varone, S. Karaliota, K. P. Quinn, K. Münger, K. P. Karalis, I. Georgakoudi // Science advances. – 2018. – Vol. 4. – №. 3. – P. 1-14.
128. Chance B., Williams G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra / B. Chance, G. R. Williams// Journal of Biological Chemistry. – 1955. – Vol. 217. – P. 395–407.
129. Chorvat D., Chorvatova A. Spectrally resolved time-correlated single photon counting: a novel approach for characterization of endogenous fluorescence in isolated cardiac myocytes/ D. Chorvat, A. Chorvatova //European Biophysics Journal. – 2006. – Vol. 36. – №. 1. – P. 73-83.
130. Diaspro A. et al. Multi-photon excitation microscopy/ A. Diaspro, P. Bianchini, G. Vicidomini, M. Faretta, P. Ramoino, C. Usai //Biomedical engineering online. – 2006. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1-14.
131. Dunn K. W., Young P. A. Principles of multiphoton microscopy/ K. W. Dunn, P. A. Young //Nephron Experimental Nephrology. – 2006. – Vol. 103. – №. 2. – P. 33-40.

132. Tsai T. H. et al. Multiphoton microscopy in dermatological imaging/ T. H. Tsai, S. H. Jee, C. Y. Dong, S. J. Lin //Journal of dermatological science. – 2009. – Vol. 56. – №. 1. – P. 1-8.
133. Xu C. et al. Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorophores/ C. Xu, R. M. Williams, W. Zipfel, W. W. Webb //Bioimaging. – 1996. – Vol. 4. – №. 3. – P. 198-207.
134. Benninger R. K., Piston D. W. Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues / R. K. Benninger, D. W. Piston // Current protocols in cell biology. – 2013. – Vol. 59. – №. 1. – P. 4-11.
135. Ustione A., Piston D. W. A simple introduction to multiphoton microscopy/ A. Ustione, D. W. Piston //Journal of microscopy. – 2011. – Vol. 243. – №. 3. – P. 221-226.
136. Hoover E. E., Squier J. A. Advances in multiphoton microscopy technology/ E. E. Hoover, J. A. Squier //Nature photonics. – 2013. – Vol. 7. – №. 2. – P. 93-101.
137. Tauer U. Advantages and risks of multiphoton microscopy in physiology/ U. Tauer //Experimental physiology. – 2002. – Vol. 87. – №. 6. – P. 709-714.
138. Williams R. M., Zipfel W. R., Webb W. W. Multiphoton microscopy in biological research/ R. M. Williams, W. R. Zipfel, W. W. Webb //Current opinion in chemical biology. – 2001. – Vol. 5. – №. 5. – P. 603-608.
139. Ranjit S. et al. Imaging fibrosis and separating collagens using second harmonic generation and phasor approach to fluorescence lifetime imaging/ S. Ranjit, A. Dvornikov, M. Stakic, S. H. Hong, M. Levi, R. M. Evans, E. Gratton //Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1-10.
140. Gailhouste L. et al. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis/ L. Gailhouste, Y. LeGrand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Désille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Frémin, N. Theret, G. Baffet //Journal of hepatology. – 2010. – Vol. 52. – №. 3. – P. 398-406.
141. Williams R. M., Zipfel W. R., Webb W. W. Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils/ R. M. Williams, W. R. Zipfel, W. W. Webb //Biophysical journal. – 2005. – Vol. 88. – №. 2. – P. 1377-1386.

142. Georgiou E. et al. Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region/ E. Georgiou, T. Theodossiou, V. Hovhannisyan, K. Politopoulos, G. S. Rapti, D. Yova //Optics Communications. – 2000. – Vol. 176. – №. 1-3. – P. 253-260.
143. Hall G. et al. Experimental and simulation study of the wavelength dependent second harmonic generation of collagen in scattering tissues/ G. Hall, K. B. Tilbury, K. R. Campbell, K. W. Eliceiri, P. J. Campagnola //Optics letters. – 2014. – Vol. 39. – №. 7. – P. 1897-1900.
144. Cox G. et al. 3-dimensional imaging of collagen using second harmonic generation/ G. Cox, E. Kable, A. Jones, I. Fraser, F. Manconi, M. D. Gorrell //Journal of structural biology. – 2003. – Vol. 141. – №. 1. – C. 53-62.
145. Wu P. C. et al. In vivo quantification of the structural changes of collagens in a melanoma microenvironment with second and third harmonic generation microscopy/ P. C. Wu, T. Y. Hsieh, Z. U. Tsai, T. M. Liu //Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – №. 1. – P. 1-7.
146. Weigelin B., Bakker G. J., Friedl P. Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion: Principles of interface guidance and microvesicle dynamics/ B. Weigelin, G. J. Bakker, P. Friedl //IntraVital. – 2012. – Vol. 1. – №. 1. – P. 32-43.
147. Witte S. et al. Third-Harmonic Generation Microscopy For Label-Free Brain Imaging/ S. Witte, N. V. Kuzmin, A. Negrean, J. C. Lodder, G. T. Silva, C. P. J. de Kock, H. D. Mansvelder, M. L. Groot //Biomedical Optics. – Optica Publishing Group, 2012. – P. BSu4B. 4.
148. Shcheslavskiy V. I. et al. Third-harmonic Rayleigh scattering: theory and experiment/ V. I. Shcheslavskiy, S. M. Saltiel, A. Faustov, G. I. Petrov, V. V. Yakovlev //JOSA B. – 2005. – Vol. 22. – №. 11. – P. 2402-2408.
149. Shcheslavskiy V. I. et al. How to measure  $\chi(3)$  of a nanoparticle/ V. I. Shcheslavskiy, S. M. Saltiel, A. R. Faustov, G. I. Petrov, V. V. Yakovlev //Optics letters. – 2006. – Vol. 31. – №. 10. – P. 1486-1488.

150. Goh G. B. B. et al. Quantification of hepatic steatosis in chronic liver disease using novel automated method of second harmonic generation and two-photon excited fluorescence / G. B. B. Goh, W. Q. Leow, S. Liang, W. K. Wan, T. K. H. Lim, C. K. Tan, P. E. Chang // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9. – №. 1. – P. 2975.
151. Gailhouste L. et al. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis / L. Gailhouste, Y. L. Grand, C. Odin, D. Guyader, B. Turlin, F. Ezan, Y. Désille, T. Guilbert, A. Bessard, C. Frémin, N. Theret, G. Baffet // *Journal of Hepatology*. – 2010. – Vol. 52. – №. 3. – P. 398–406.
152. Becker W. Advanced time-correlated single photon counting techniques/ W. Becker // *Springer Science and Business Media*. – 2005. – Vol. 81.
153. Becker W. Fluorescence lifetime imaging–techniques and applications // *Journal of microscopy*. – 2012. – Vol. 247. – №. 2. – P. 119-136.
154. Владимиров Ю. А. и др. Биофизика. Рошупкин, Д. И., Потапенко, А. Я., & Деев, А. И. (1983).
155. Borst J. W., Visser A. J. W. G. Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences/ J. W. Borst, A. J. W. G. Visser // *Measurement Science and Technology*. – 2010. – Vol. 21. – №. 10. – P. 102002.
156. Щеславский В. И., Ширманова М. В., Ельцов А. Люминесцентная микроскопия на основе многопараметрического время-коррелированного счета фотонов / В. И. Щеславский, М. В. Ширманова, А. Ельцов // *Успехи биологической химии*. – 2019. – Vol. 59. – P. 103-138.
157. De Beule P. A. A. et al. A hyperspectral fluorescence lifetime probe for skin cancer diagnosis/ P. A. A. De Beule, C. Dunsby, N. P. Galletly, G. W. Stamp, A. C. Chu, U. Anand, P. Anand, C. D. Benham, A. Naylor, P. M. W. French // *Review of scientific instruments*. – 2007. – Vol. 78. – №. 12. – P. 123101.
158. Tleugabulova D., Brennan J. D. Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Applied to Silica Sol-Gel Growth and Surface Modification/ D. Tleugabulova, J. D. Brennan // *Reviews in Fluorescence 2006*. – Springer, Boston, MA, 2006. – P. 277-309.

159. Lakowicz J. R. et al. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH/ J. R. Lakowicz, H. Szmecinski, K. Nowaczyk, M. L. Johnson //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – Vol. 89. – №. 4. – P. 1271-1275.
160. Duncan R. R. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein–protein interactions inside cells/ R. R. Duncan– 2006.
161. Paul R. J., Schneckenburger H. Oxygen concentration and the oxidation-reduction state of yeast: determination of free/bound NADH and flavins by time-resolved spectroscopy/ R. J. Paul, H. Schneckenburger //Naturwissenschaften. – 1996. – Vol. 83. – №. 1. – C. 32-35.
162. Walsh A. J. et al. Optical metabolic imaging identifies glycolytic levels, subtypes, and early-treatment response in breast cancer/ A. J. Walsh, R. S. Cook, H. C. Manning, D. J. Hicks, A. Lafontant, C. L. Arteaga, M. C. Skala //Cancer research. – 2013. – Vol. 73. – №. 20. – P. 6164-6174.
163. Lukina M. M. et al. Metabolic cofactors NAD (P) H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel/ M. M. Lukina, V. V. Dudenkova, N. I. Ignatova, I. N. Druzhkova, E. S. Lyubov, E. V. Zagaynova, M. V. Shirmanova //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2018. – Vol. 1862. – №. 8. – P. 1693-1700.
164. Ouyang Y. et al. FLIM as a promising tool for cancer diagnosis and treatment monitoring/ Y. Ouyang, Y. Liu, Z. M. Wang, Z. Liu, M. Wu //Nano-Micro Letters. – 2021. – Vol. 13. – №. 1. – P. 1-27.
165. Meleshina A. V. et al. Two-photon FLIM of NAD (P) H and FAD in mesenchymal stem cells undergoing either osteogenic or chondrogenic differentiation/ A. V. Meleshina, V. V. Dudenkova, A. S. Bystrova, D. S. Kuznetsova, M. V. Shirmanova, E. V. Zagaynova //Stem cell research & therapy. – 2017. – Vol. 8. – №. 1. – P. 1-10.
166. Kashirina A. S. et al. Monitoring membrane viscosity in differentiating stem cells using BODIPY-based molecular rotors and FLIM/ A. S. Kashirina, I. López-Duarte, M. Kubánková, A. A. Gulin, V. V. Dudenkova, S. A. Rodimova, H. G.

Torgomyan, E. V. Zagaynova, A. V. Meleshina, M. K. Kuimova //Scientific reports. – 2020. – Vol. 10. – №. 1. – P. 1-12.

167. Suhling K. et al. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments/ K. Suhling, L. M. Hirvonen, J. A. Levitt, P. H. Chung, C. Tregidgo, A. L. Marois, D. A. Rusakov, K. Zheng, Simon A. B., S. Poland, S. Coelho, R. Henderson, N. Krstajic // Medical photonics. – 2015. – Vol.27. – P. 3-40.

168. Mannam V. et al., Convolutional neural network denoising in fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) // V. Mannam, Y. Zhang, X. Yuan, T. Hato, P. C. Dagher, E. L. Nichols, C. J. Smith, K. W. Dunn, S. Howard. – 2021. – Vol. 1862. – P. 101-108.

169. Karadeniz E. et al. Assessment of effect of intraperitoneal tacrolimus on liver regeneration in major (70%) hepatectomy model after experimental pringle maneuver in rats/ E. Karadeniz, M. Ozbilgin, T. Egeli, C. Agalar, A. D. Cevlik, A. Aysal, H. Ellidokuz, T. Unek, I. Astarcioglu //Transplantation proceedings. – Elsevier, 2019. – Vol. 51. – №. 4. – P. 1172-1179.

170. Brockman D. A., Chen X., Gallaher D. D. High-viscosity dietary fibers reduce adiposity and decrease hepatic steatosis in rats fed a high-fat diet/ D. A. Brockman, X. Chen, D. D. Gallaher //The Journal of nutrition. – 2014. – Vol. 144. – №. 9. – P. 1415-1422.

171. Fortea J. I. et al. Comparison of two protocols of carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats–Improving yield and reproducibility/ J. I. Fortea, C. Fernández-Mena, M. Puerto, C. Ripoll, J. Almagro, J. Bañares, J.M. Bellón, R. Bañares, J. Vaquero //Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – №. 1. – P. 1-10.

172. Sanchez W. Y., et al. Analysis of the metabolic deterioration of ex vivo skin from ischemic necrosis through the imaging of intracellular NAD(P)H by multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging microscopy/ W. Y. Sanchez, T. W. Prow, W. H. Sanchez, J. Grice, M. S. Roberts// Journal of Biomedical Optics. – 2010. – Vol. 15. – №. 4. – P. 046008.

173. Wakita M., Nishimura G., Tamura M. Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridine nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes, and perfused rat liver in situ/ M. Wakita, G. Nishimura, M. Tamura //The Journal of Biochemistry. – 1995. – Vol. 118. – №. 6. – P. 1151-1160.
174. Lakowicz J. R. (ed.). Principles of fluorescence spectroscopy/ J. R. Lakowicz – Boston, MA : springer US, 2006.
175. Champion P. A. D. G. et al. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in Mycobacterium tuberculosis/ P. A. D. Champion, S. A. Stanley, M. M. Champion, E. J. Brown, J. S. Cox //Science. – 2006. – Vol. 313. – №. 5793. – P. 1632-1636.
176. Khan A. S. et al. Assessment and optimization of liver volume before major hepatic resection: Current guidelines and a narrative review/A. S. Khan, S. Garcia-Aroza, M. A. Ansari, S. M. Atiq, M. Senter-Zapata, K. Fowler, M. B. Doyle, W. C. Chapman //International journal of surgery. – 2018. – Vol. 52. – P. 74-81.
177. Chen L. et al. NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism/ L. Chen, Z. Zhang, A. Hoshino, H. D. Zheng, M. Morley, Z. Arany, J. D. Rabinowitz// Nature metabolism. – 2019. – Vol. 1. – №. 3. – P. 404-415.
178. Duarte S. et al. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis/ S. Duarte, J. Baber, T. Fujii, A. J. Coito //Matrix Biology. – 2015. – Vol. 44. – P. 147-156.
179. Li X., et al. Mitochondrial dysfunction in fibrotic diseases/ X. Li, W. Zhang, Q. Cao, Z. Wang, M. Zhao, L. Xu, Q. Zhuang// Cell death discovery. – 2020. – Vol. 6. – №. 1. – P. 80.
180. Laursen T. L. Time-dependent improvement of liver inflammation, fibrosis and metabolic liver function after successful direct-acting antiviral therapy of chronic hepatitis C/ T. L. Laursen, C. B. Siggaard, K. Kazankov, T. D. Sandahl, H. J. Møller, B. Tarp, L. H. Kristensen, A. L. Laursen, P. Leutscher, H. Grønbaek // Journal of viral hepatitis . – 2020. – Vol. 27. – №. 1. – P. 28-35.

181. Cordero-Espinoza L., Huch M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis / L. Cordero-Espinoza, M. Huch// *The Journal of clinical investigation*. – 2018. – Vol. 128. – №. 1. – P. 85-96.
182. Lu S.C. Dysregulation of glutathione synthesis in liver disease / S.C. Lu // *Liver Research*. – 2020. – Vol. 4. – №. 2. – P. 64-73.
183. Barkauskas D. S., et al. Using in vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging to unravel disease-specific changes in the liver redox state / D. S. Barkauskas, G. Medley, X. Liang, Y. H. Mohammed, C. A. Thorling, H. Wang, M. S. Roberts // *Methods and Applications in Fluorescence* . – 2020. – Vol. 8. – №. 3. – P. 1-39.