

Анализ миофибробластов крысы, полученных из структур порталных трактов печени методом эксплантации

О. Миянович, М.Н. Катина, А.А. Ризванов, А.П. Киясов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Characterization of rat myofibroblasts isolated from liver portal tracts using explantation technique

O. Miyanovich, M.N. Katina, A.A. Rizvanov, A.P. Kiyasov

Kazan Federal University, Kazan

На сегодняшний день не существует эффективных способов лечения фиброза печени и единственным выходом является пересадка донорского органа. Исследование молекулярно-клеточных механизмов развития фиброза в печени может способствовать выявлению новых способов замедления, а, возможно, и обращения вспять процессов фиброгенеза в печени. Длительное время клетки Ито незаслуженно считались основными виновниками развития фиброза печени, так как рассматривались как главные предшественницы миофибробластов, которые осуществляют синтез соединительнотканного внеклеточного матрикса. В данной работе методом эксплантации была выделена культура мезенхимальных клеток, окружающих желчные протоки. Показано, что полученные клетки являются порталными фибробластами, и, как и клетки Ито, в условиях повреждения печени способны *in vitro* дифференцироваться в миофибробласты, экспрессирующие α -гладкомышечный актин. При длительном культивировании показана возможность «перехода» порталных миофибробластов в фибробласты и наоборот на поздних пассажах. Таким образом, можно сделать вывод о потенциальной возможности обращения вспять процессов фиброгенеза в печени.

Ключевые слова: фиброз печени, порталные фибробласты, миофибробласты, клетки Ито.

Фиброз печени — это образование локальных или диффузных очагов соединительной ткани в печени. Фиброз развивается в исходе таких широко распространенных хронических заболеваний печени, как вирусные гепатиты, алкогольная болезнь печени, порталная гипертензия различной этиологии, врожденные и аутоиммунные заболевания печени. Расположение фиброзных септ во многом зависит от вида повреждения печени: они могут быть порто-портальными в случае хронического билиарного повреждения, порто-центрными при хроническом вирусном гепатите. При некоторых других патологических состояниях образуются и центрально-портальные септы [1].

На сегодняшний день единственным эффективным способом лечения фиброза и цирроза печени является пересадка донорского органа. Исследование молекулярно-клеточных механизмов развития фиброза в печени и происхождение профиброгенных клеток может способствовать выявлению новых патогенетически обоснованных способов замедления, а, возможно, и обращения вспять процессов фиброгенеза в печени.

Источником внеклеточного матрикса и соединительной ткани в печени являются миофибробла-

Today there is no effective approach to treat liver fibrosis and the only way is transplantation of donors' liver. Investigation of molecular-cellular mechanisms of liver fibrosis can help to discover new ways of slowing down or even reverse the process of fibrogenesis in liver. For a long time hepatic stellate cells were undeservingly blamed for being the major causer of liver fibrosis, because they were considered as the main source of myofibroblasts, that synthesize connective tissue extracellular matrix. In this particular work explantation approach was used to isolate cell culture from portal tracts. It was shown that received cells are portal fibroblasts, and, just as hepatic stellate cells, in case of liver alteration can differentiate in myofibroblasts, that express α -smooth muscle actin. During long-term cultivation it was shown that portal myofibroblasts can differentiate into fibroblasts and back on late passages. So, we can conclude, that there is a potency to reverse the process of fibrogenesis in liver.

Key words: liver fibrosis, portal fibroblasts, myofibroblasts, hepatic stellate cells.

сты, экспрессирующие α -гладкомышечный актин (α -SMA). Миофибробласты являются быстро пролиферирующими клетками, способными к сокращению и усиливающими процессы фиброгенеза за счет своего многогранного фенотипического ответа на травму [2]. На настоящий момент до конца не выяснены источники происхождения этих клеток. На протяжении последних 20 лет считалось, что клетки Ито являются источником большинства из них. Однако сейчас стало ясным, что миофибробласты способны образовываться и из других типов клеток печени [3]. Предполагаемые источники миофибробластов печени представлены резидентами печени (клетки Ито и порталные фибробласты), мультипотентными мезенхимными стромальными клетками костного мозга и клетками, образующимися в результате эпителиально-мезенхимального перехода (АФП+прогениторные клетки, из которых происходят гепатоциты и холангиоциты) [4].

Согласно литературным источникам, миофибробласты преимущественно происходят из клеток Ито и порталных фибробластов путем активации и трансдифференцировки [5, 6]. В последние годы особое внимание уделяется порталным фибробластам — клеткам, окружающим структуры порталного

e-mail: kiassov@mail.ru

тракта (портальная вена и артерия с их стенками, содержащими гладкомышечные клетки, и желчный проток с его базальной мембраной) и находящимся в непосредственном контакте с первым слоем гепатоцитов и непаренхимных клеток [7].

Другими потенциально фиброгенными клетками могут быть клетки второго слоя, расположенные вокруг центральных вен, а также гладкомышечные клетки сосудов (печеночной артерии и портальной вены) и клетки костномозгового происхождения [8–10].

Были выдвинуты две основные гипотезы. Первая из них говорит о том, что, возможно, портальные фибробласты, так же как и гладкомышечные клетки, происходят из дуктальной пластинки в процессе эмбриогенеза. По другой версии, клетки Ито и портальные фибробласты могут происходить из некоего общего источника в процессе раннего эмбриогенеза. Существует мнение, что во время роста эмбриональной печени мезотелий, состоящий из мезотелиоцитов и субмезотелиальных клеток, мигрирует с поверхности печени внутрь органа и дает начало клеткам Ито и периваскулярным мезенхимальным клеткам, включая портальные фибробласты, гладкомышечные клетки, окружающие портальную вену и фибробласты, расположенные вокруг центральной вены.

Портальные фибробласты как отдельный тип клеток были впервые описаны еще в 1961 г., когда Carruthers с соавт. исследовали с помощью световой и электронной микроскопии портальные тракты крыс после перевязки желчного протока. Исследователи обнаружили пролиферацию фибробластов вокруг вновь сформированных желчных протоков, и сообщили, что фибробласты пораженных портальных трактов имели длинные отростки и часто были окружены фибриллами, в том числе и эластическими волокнами.

Портальные фибробласты гетерогенны и им давали разные названия, что затрудняло их исследование. Портальные фибробласты были многократно идентифицированы и отдифференцированы от клеток Ито на основании экспрессии различных маркеров, но эти исследования не согласованы и не единообразны для разных исследовательских групп. Миофибробластам также давали различные названия по отношению их к портальным трактам. При исследовании цирроза печени у людей и в моделях на крысах D. Cassiman с соавт. (2002) выделяли три популяции миофибробластов: миофибробласты, однозначно происходящие из клеток Ито, портальные/септальные миофибробласты, предположительно происходящие из портальных фибробластов, и пограничные миофибробласты, с промежуточным фенотипом и неясным происхождением [10].

Миофибробласты желчных протоков способны замещать определенную субпопуляцию мезенхимных клеток портальных трактов, так же как и гладкомышечные клетки стенок ветвей портальных вен и артерий. Было сделано предположение, что миофибробласты желчных протоков способны пролиферировать и трансдифференцироваться в ответ на перевязку желчного протока, вызывающую перидуктальный и перипортальный (так называемый, «билиарный»), фиброз. Предполагалось, что при шистосомозе гладкомышечные клетки стенок портальных вен пролиферируют и трансдифференцируются в матрикс-продуцирующие миофибробласты, вызывая портальный фиброз. Активируемые, в основном, по-

вреждением печени, портальные фибробласты начинают пролиферировать (хотя и гораздо медленнее, чем клетки Ито) и продуцировать коллаген I типа вокруг портальных трактов [11].

Что касается антигенных свойств клеток, способных трансдифференцироваться в миофибробласты, то резидентные мезенхимальные клетки печени, представленные клетками Ито, характеризуются экспрессией десмина и GFAP (глиофибрилярный кислый белок), а также отсутствием гемопозитических маркеров (CD45, CD34) и Thy-1 (гликофосфатидилинозитол-связанный гликопротеин на наружной мембране клеток, который ранее был обнаружен в фибробластах некоторых органов, CD90). Главным маркером образующихся миофибробластов является наличие в их цитоплазме α -SMA. Миофибробласты, получаемые в результате эпителиально-мезенхимальной трансформации, характеризуются отсутствием экспрессии CD45 и продукцией маркеров гепатоцитов (альбумин, Alb) и холангиоцитов (цитокератин, CK19). Клетки, образующиеся из циркулирующих клеток костного мозга, представлены CD45⁺/Coll1⁺-фибробластами [12]. Портальные фибробласты отличаются от клеток Ито тем, что они могут экспрессировать эластин и Thy-1, не накапливают ретиноиды, не экспрессируют десмин, CD146 и нейральные маркеры (GFAP) [13].

Большинство существующих исследований, посвященных фиброзу печени, проводились на клетках Ито и именно они длительное время незаслуженно считались основными «виновницами фиброза» печени.

Наше исследование было нацелено на идентификацию других видов клеток печени, способных дифференцироваться в фибробластическом направлении и, следовательно, вовлеченных в процессы фиброза.

Материал и методы

Жёлчные протоки выделяли из печени здоровых четырёхдневных новорожденных крыс (*Rattus norvegicus*, линия Wistar, Питомник лабораторных животных «Пущино»). Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в КФУ, рекомендациям Локального этического комитета и национальным законам [14]. Эксперимент был проведен на 187 крысах. Животные были умерщвлены декапитацией. Под бинокулярным микроскопом Stemi DV4 Carl Zeiss (Германия) создавали операционный доступ (срединный и поперечные разрезы передней брюшной стенки) и далее, не извлекая печень, выделяли желчный проток. Выделенный жёлчный проток механически очищали от паренхимы печени под микроскопом с помощью стерильных инструментов. Выделенный желчный проток помещали целиком в отдельную лунку 6-луночного планшета в питательную среду DMEM с добавлением 10% FBS, 200 mM L-глутамин и антибиотика. В других экспериментах желчные протоки, измельченные на фрагменты размером около 3 мм³, помещали в 24-луночные планшеты. При добавлении питательной среды следили за тем, чтобы образец желчного протока был наполовину погружен в питательную среду, а на другую половину оставался на поверхности для улучшения адгезии фрагмента ткани к культуральному пластику за счет сил поверхностного натяжения, а также для того, чтобы дать возможность всем клеткам, обладающим свойствами

адгезии, мигрировать (эксплантироваться) из фрагмента на культуральный пластик и начать активное деление [15]. В 6- и 24-луночных планшетах на 3 сут. убирали фрагменты тканей и заливали их по стандартной методике в парафин или среду для заморозки тканей NEG 50 (ThermoScientific). Помещенные в NEG 50 образцы сразу замораживали при -80°C и использовали для изготовления тонких срезов (5 мкм) на микротоме-криостате HM560 Cryo-Star (Carl Zeiss, Германия). В оставшихся чашках меняли среду на свежую. Последующие замены питательной среды проводили каждый второй день. В 24-луночных планшетах проводили иммуноцитохимические реакции культур клеток с антителами, указанными в таблице, на 3, 5, 7, 12 сут. Для визуализации результатов использовали систему Novolink (Novocastra, Великобритания) с колориметрическим субстратом аминотилкарбазол (АЭК). Ядра окрашивали гематоксилином по стандартной методике. Анализ препаратов проводили на микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия). В 6-луночных планшетах на 3, 5, 7 и 12 сут. клетки лизировали для получения образцов общего белка для последующего анализа экспрессии белков с помощью вестерн блоттинга. Визуализацию иммунного преципитата проводили с помощью набора для хемилюми-

несцентной детекции белка Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Детекцию люминесценции проводили на приборе ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, Сингапур). Часть клеток в 6-луночных планшетах после удаления фрагмента ткани (3 сут.) продолжали культивировать (пассаж 0) и на 7 сут. клетки пассивировали и рассевали в 25 см² чашки на стандартную питательную среду. Каждый второй день проводили замену питательной среды на свежую. При достижении 80% конfluenceности монослоя клетки пассивировали. Клетки каждого пассажа рассевали в 24-луночные планшеты и проводили иммуноцитохимические реакции с антителами, указанными в таблице, на 3, 5, 7 и 12 сут. Клетки нулевого пассажа (первичную культуру) на 7 сут. также собирали для изучения методом проточной цитофлуориметрии. Для выявления внутриклеточных антигенов клетки фиксировали в коммерческом реактиве CellFix (Becton Dickinson) на основе формальдегида 30 мин при 4°C, пермобилизовали мембрану 0,1% раствором Tween-20 в PBS в течение 10 мин. Для окрашивания мембранных антигенов пермобилизацию мембраны не проводили, а фиксация клеток осуществлялась после всей процедуры окраски (постфиксация). Результаты анализировали на проточном цитофлуориметре Guava

Антитела, использованные в работе

Антиген	Фирма-производитель (номер каталога), разведение
Десмин – белок промежуточных филаментов цитоскелета мышечных клеток, маркер звёздчатых клеток печени	Santa Cruz (SC14026), 1:100, Dako (M076001), 1:30
α-SMA – α-гладкомышечный актин, маркер миофибробластов, гладкомышечных клеток	Santa Cruz (SC130616), 1:100, Dako (M0851), 1:50
Цитокератин 18 – белок промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток (гепатоциты, холангиоциты)	Dako (M7010), 1:20
Цитокератин 19 – белок промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток (холангиоциты, гепатобласты, овальные клетки)	Dako (M0888), 1:20
β-актин – участвует в клеточной подвижности, поддержании структуры и целостности	Sigma Aldrich (Mab-A2228), 1:2000
Thy-1 (CD90) – поверхностный белок, считается маркером стволовых клеток	Abcam (ab225), ICC 1:200

easyCyte 8HT (Millipore).

Результаты и обсуждение

Наше исследование было посвящено миофибробластам портальных трактов, образующимся из портальных фибробластов при альтерации печени. В здоровой печени портальные фибробласты с точки зрения морфологии и антигенной структуры идентичны другим фибробластам. Это веретенновидные клетки мезенхимального происхождения, присутствующие в портальных трактах. В нормальных условиях они участвуют в физиологическом обмене компонентов внеклеточного матрикса и не экспрессируют α-SMA [13]. Происхождение портальных фибробластов, как и клеток Ито, по-прежнему до конца не определено и вызывает много дискуссий. Считается, что портальные фибробласты, точно так же, как это было показано для клеток Ито, в условиях хронического повреждения печени способны

дифференцироваться в миофибробласты, экспрессирующие α-SMA, и это может быть воспроизведено in vitro при культивировании портальных фибробластов на культуральном пластике или стекле [5].

В данной работе описано получение портальных миофибробластов из портальных фибробластов, которые, в свою очередь, были получены методом эксплантации из структур жёлчных протоков. Другие авторы описывают иные методы получения культуры портальных миофибробластов, основанные преимущественно на ферментативной очистке структур желчного протока от фрагментов паренхимы печени [16]. Объектом большинства исследователей традиционно является гепатоцит, однако сейчас становится ясно, что другие клетки негепатоцитарного ряда играют огромную роль в функции печени в норме и при патологии. В последние годы возрос интерес к пониманию эмбрионального происхождения этих

клеток и механизмов их развития [17]. Именно поэтому для данного исследования использовались молодые животные (крысы в возрасте 4 сут.), что связано с тем, что эмбриональное развитие печени у этих животных длится до 2 нед. после рождения.

Мы показали, что *in vitro* при повреждении (в данном конкретном случае — при механическом повреждении в процессе выделения протока) активируются портальные фибробласты и другие фибробласты, полученные нами в культуре, образовавшиеся из различных предшественников, которые также могли сохраняться в фрагменте ткани вокруг желчного протока. Активированные фибробласты способны к образованию миофибробластов до 3 сут. культивирования. Методом проточной цитометрии было показано, что в популяции клеток, выделенных нами из желчных протоков, встречалось лишь немного десмин-позитивных клеток (7%), что свидетельствует о том, что желчный проток был тщательно очищен от паренхимы печени и миофибробласты, образующиеся из клеток Ито (МФ-Ито), не попали в культуру (рис. 1Б). Об этом же свидетельствует и иммуноцитохимическое исследование на десмин культур клеток нулевого, первого и второго пассажей, где только единичные клетки являлись МФ-Ито (рис. 2).

После окрашивания на Thy-1 клеток, получаемых из эксплантов желчного протока, получили две морфологически различные популяции клеток — кубовидные и веретеновидные клетки (рис. 2Д) [18]. Методом проточной цитометрии было показано, что около 40% клеток первичной культуры, полученной методом эксплантации из фрагмента желчного протока, были Thy-1-позитивными. В ряде исследований Thy-1 описывается как маркер клеток желчных протоков и печеночных прогениторных клеток, в то время как другие исследователи считают, что популяция Thy-1 позитивных клеток гетерогенна. Также

имелись сообщения об экспрессии маркеров мезенхимальных клеток, таких как α -SMA и десмин, в группе Thy-1-позитивных клеток. Исследование популяции клеток, выделенных из тканей желчных протоков, подтвердило, что портальные миофибробласты являются Thy-1-позитивными клетками, в то время как гепатоциты, клетки Ито и печеночные макрофаги не экспрессировали этот маркер на своей поверхности. Таким образом, Thy-1 можно назвать основным поверхностным маркером для идентификации портальных миофибробластов *in vivo* и *in vitro* [19]. На 7 сут. культивирования первичные культуры клеток, полученные методом эксплантации, окрашивали методом иммуноцитохимии и проводили проточную цитометрию на α -SMA. Было показано, что к этому времени уже 67% клеток экспрессировали маркер миофибробластов — α -SMA (рис. 1А). При дальнейшем культивировании (первый, второй пассаж) α -SMA не экспрессировался, что говорит о том, что все клетки превратились в фибробласты (рис. 2Ж). Интересные результаты были получены при длительном культивировании клеток желчных протоков. Так, было показано, что на четвертом пассаже все клетки в культуре по морфологическим и антигенным свойствам являлись фибробластами. В то же время, при более длительном культивировании клетки начинали экспрессировать α -SMA, что говорит о процессе их дифференцировки в миофибробласты. Полученные данные подтверждают ранее выдвинутую теорию о возможности дифференцировки фибробластов в миофибробласты (рис. 3А, Б). Экспрессии цитокератина 18 и 19 не было выявлено, что позволяет утверждать, что полученные клетки были неэпителиального происхождения (рис. 2З, И). Отсутствие экспрессии альбумина и α -фетопротеина было показателем того, что полученные клетки не были зрелыми гепатоцитами [20].

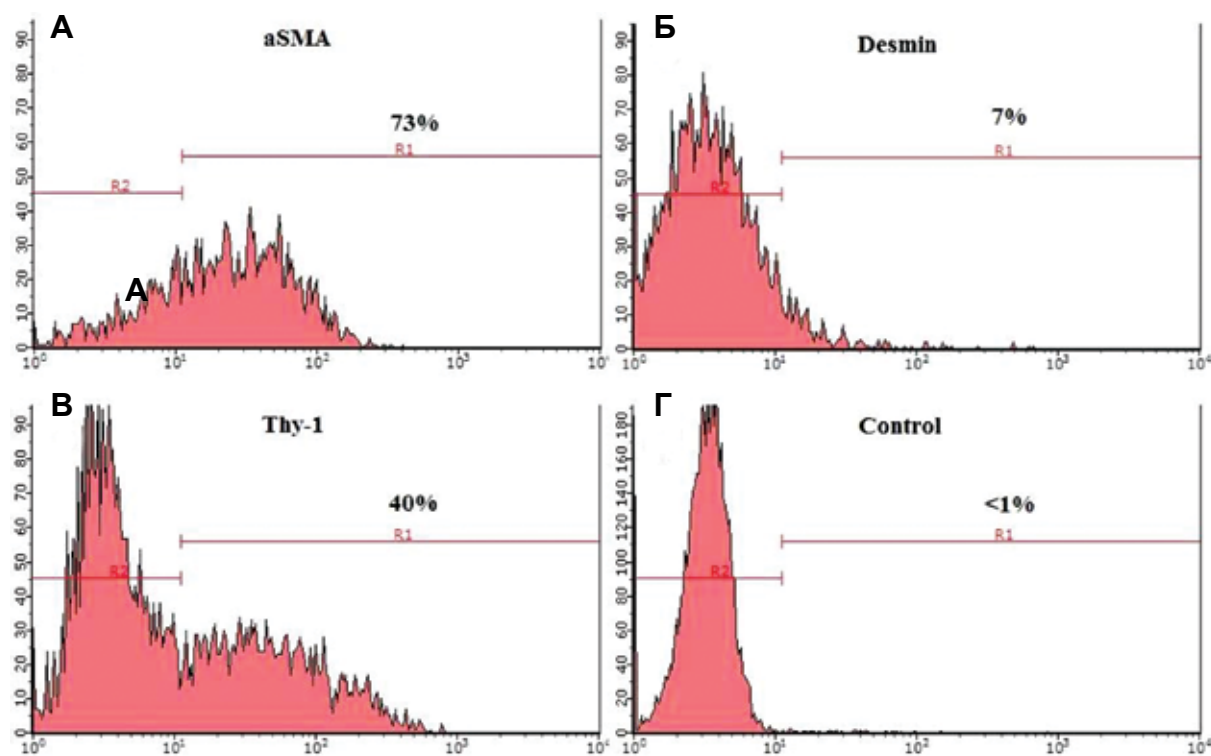


Рис. 1. Иммунофенотип первичной культуры клеток, выделенных из желчного протока: R1 — клетки, экспрессирующие маркер; R2 — клетки, не экспрессирующие маркер. Проточная цитометрия

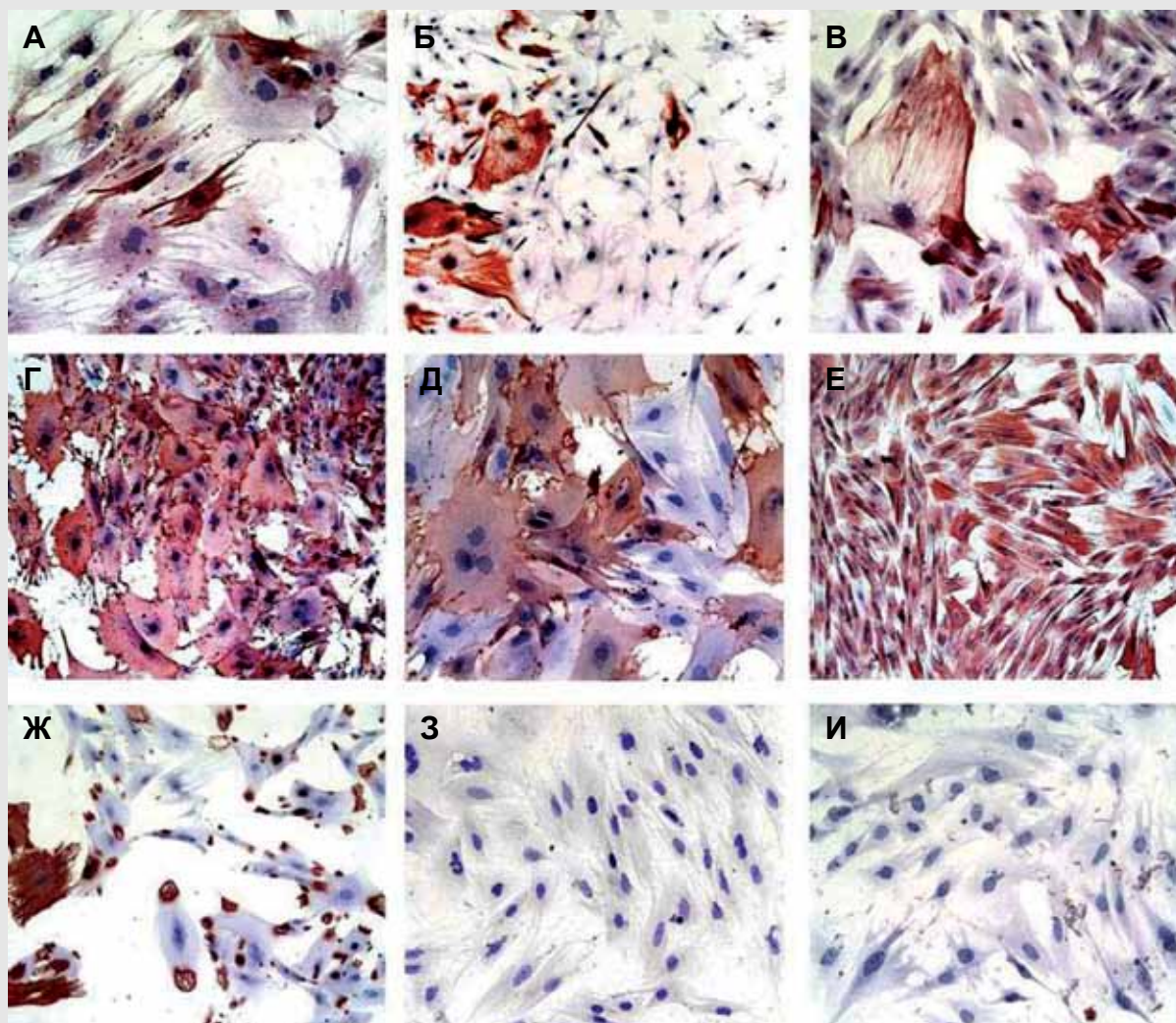


Рис. 2. Культуры клеток, полученных из желчного протока:
 А – первичная культура, 7 сут. культивирования;
 Б, З, И – культура первого пассажа, 5 сут. культивирования;
 В – культура второго пассажа, 5 сут. культивирования;
 Г, Е – первичная культура, 12 сут. культивирования;
 Д, Ж – культура второго пассажа, 7 сут. культивирования.
 А–В – экспрессия десмина; Г, Д – экспрессия Thy-1;
 Е, Ж – экспрессия α -SMA; З – экспрессия цитокератина 19; И – экспрессия цитокератина 18.
 Иммуноцитохимическая реакция, ядра докрашены гематоксилином.
 Ув.: А–Г, Е, Ж $\times 10$, Д $\times 20$, З, И $\times 40$

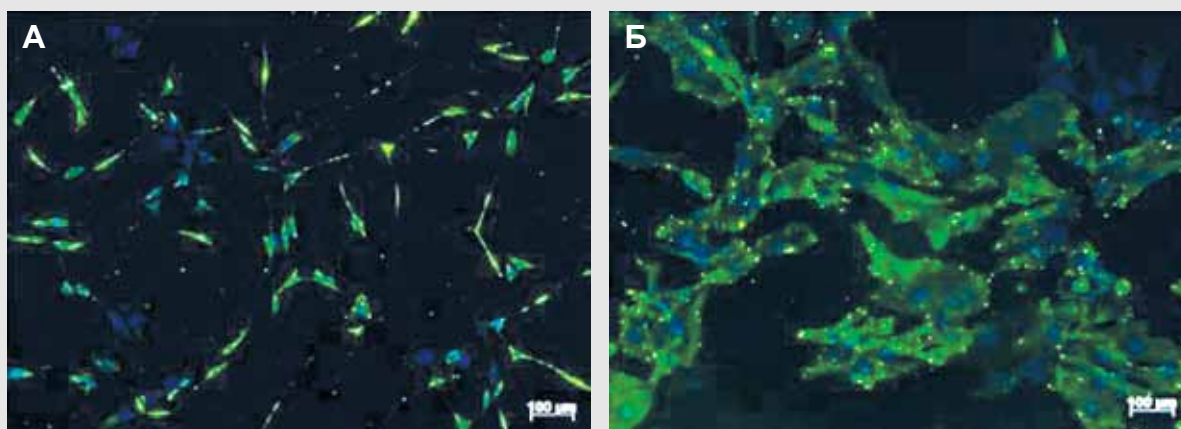


Рис. 3. Культура клеток, полученных из желчного протока:
 А – 5 пассаж, экспрессия α -SMA; Б – 9 пассаж, экспрессия Thy-1.
 Визуализация ядер DAPI (синий цвет). Флуоресцентная микроскопия

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что использованным методом можно получить портальные миофибробласты и исследовать их. При культивировании фрагмента желчного протока происходит экскреция из него различных биологически активных веществ, синтезируемых различными типами клеток, паракринным и аутокринным путями способствующих активации клеток желчного протока, их эксплантации на культуральный пластик и дифференцировке портальных фибробластов в миофибробласты [21]. Непонятно, существуют ли различные стадии дифференцировки/активации одной и той же клеточной популяции или же существуют клеточные типы с частично перекрывающимся фенотипом [22]. По литературным данным, в культуре портальных миофибробластов, так же как миофибробластов из клеток Исто, клетки способны возвращаться в исходное состояние, однако остается неизвестным, происходит ли это в сколько-нибудь значимых масштабах *in vivo* (например, при регрессе фиброза печени) [23–25]. Во-первых, необходимо

исследовать гетерогенность популяции портальных мезенхимных клеток; во-вторых, необходимо лучше разобраться в различиях между клетками Исто и портальными фибробластами, чтобы определить вклад каждого типа клеток в развитие фиброза печени, что позволит разрабатывать методы лечения фиброза на основе влияния на клеточно-молекулярные механизмы его развития [23].

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского Фонда Фундаментальных Исследований 12-04-97088-р_поволжье_а и Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых докторов наук МД-433.2013.4. Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ramadori G. and Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab. Invest.* 2004; 84(2): 153–9.
2. Novo E., di Bonzo L.V., Cannito S. et al. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009; 41(11): 2089–93.
3. Bosselut N., Housset C., Marcelo P. et al. Distinct proteomic features of two fibrogenic liver cell populations: hepatic stellate cells and portal myofibroblasts. *Proteomics* 2010; 10(5): 1017–28.
4. Iwaisako K., Brenner D.A., Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27(Suppl 2): 65–8.
5. Forbes S.J., Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin. Gastroenterol.* 2011; 25(2): 207–17.
6. Novo E., Povero D., Busletta C. et al. The biphasic nature of hypoxia-induced directional migration of activated human hepatic stellate cells. *J. Pathol.* 2012; 226(4): 588–97.
7. Katalin D. Architectural and immunohistochemical characterization of small bile ducts harboring hepatic adult stem cells. In: Doctoral School of Pathology. Budapest: Semmelweis University; 2011.
8. Ye Z., Houssein H.S., Mahato R.I. Bioconjugation of oligonucleotides for treating liver fibrosis. *Oligonucleotides* 2007; 17(4): 349–404.
9. Parola M. and Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogen. Tissue Repair.* 2009; 2(1): 4.
10. Cassiman D., Libbrecht L., Desmet V. et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J. Hepatol.* 2002; 36(2): 200–9.
11. Asahina K. Hepatic stellate cell progenitor cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27(Suppl 2): 80–4.
12. Brenner D.A., Kisseleva T., Scholten D. et al. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012; 5(Suppl 1): S17.
13. Kisseleva T., Brenner D.A. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2011; 25(2): 305–17.
14. Генин А.М., Капланский А.С. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине. *Авиакосмическая и экологическая медицина* 2001; 4: 14–20.
15. Gordana Vunjak-Novakovic R.I.F. Culture of cells for tissue engineering. John Wiley & Sons, Inc.; 2006.
16. Clouzeau-Girard H., Guyot C., Combe C. et al. Effects of bile acids on biliary epithelial cell proliferation and portal fibroblast activation using rat liver slices. *Lab. Invest.* 2006; 86(3): 275–85.
17. Zhao R., Duncan S.A. Embryonic development of the liver. *Hepatology* 2005; 41(5): 956–67.
18. Kamo N., Yasuchika K., Fujii H. et al. Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate *in vitro* maturation of hepatic progenitor cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007; 292(2): G526–34.
19. Dudas J., Mansuroglu T., Batusic D. et al. Thy-1 is an *in vivo* and *in vitro* marker of liver myofibroblasts. *Cell Tissue Res.* 2007; 329(3): 503–14.
20. Миянович О., Ризванов А.А., Киясов А.П. Выделение и культивирование миофибробластов печени крыс методом эксплантации. *Клеточная трансплантология и клеточная инженерия* 2012; 7(3): 112–15.
21. Bataller R., Brenner D.A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(2): 209–18.
22. Dezso K., Jelnes P., Laszlo V. et al. Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-mediated liver regeneration. *Am. J. Pathol.* 2007; 171(5): 1529–37.
23. Dranoff J.A., Wells R.G. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology* 2010; 51(4): 1438–44.
24. Gaca M.D., Zhou X., Issa R. et al. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol.* 2003; 22(3): 229–39.
25. Sohara N., Znoyko I., Levy M.T. et al. Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate. *J. Hepatol.* 2002; 37(2): 214–21.

Поступила 02.09.2013