НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

КУКЛІН Андрій Володимирович

УДК 577.245

Експресія генів вродженого імунітету в інтактних гепатоцитах і печінці щура під час її регенерації

03.00.03 – молекулярна біологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
Оболенська Марія Юріївна,
д.б.н., професор

КИЇВ - 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 6

ВСТУП 8

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 16

1.1. Інтерферони 16

1.1.1. Родина інтерферонів. Історія відкриття 16

1.1.2. Будова молекули IFNα 18

1.1.3. Структура рецептора IFNα 19

1.1.4. Внутрішньоклітинна передача регуляторного сигналу від рецептора інтерферону альфа 20

1.1.5. Гени-мішені-IFNα. 22

1.2. Характеристика відновлювального процесу в печінці 27

1.2.1. Загальні уявлення про регенерацію печінки 27

1.2.2. Ініціація регенерації печінки 30

1.2.3. Зміни профілю генної експресії в клітинах печінки під час регенерації 30

1.2.4. Ростові фактори 31

1.2.5. Додаткові мітогени 33

1.2.6. Завершення відновлювального процесу в печінці 34

1.2.7. Баланс між проліферативними та проапотичними сигналами під час регенерації печінки 36

1.3. Імунна система та регенерація органів 37

1.3.1. Участь імунної системи в регенерації органів 37

1.3.2. Участь системи вродженого імунітету в регенерації печінки 39

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 43

2.1. Об’єкт дослідження 43
2.2. Реактиви і обладнання, використані в роботі 43
2.4. Методи дослідження.....46
2.4.1.Техніка ізолювання печінки і виділення гепатоцитів і непаренхімних клітин 46
2.4.2. Виділення і характеристика РНК 48
2.4.3. Синтез РНК для зовнішнього контролю за ефективністю реакції ЗТ-кПЛР 49
2.4.3.1. Створення рекомбінантної плазміди з фрагментом гена люциферази світлячка.....49
2.4.3.2. Клонування фрагменту гена люциферази світлячка 50
2.4.3.3. Транскрипція рекомбінантної плазміди pGEM-3z+Luc 51
2.4.3.4. Характеристика РНК для зовнішнього контролю за ефективністю реакції ЗТ-кПЛР 52
2.4.4. Реакція зворотної транскрипції і кількісної ланцюгової полімеризації (ЗТ – кПЛР) 52
2.4.5. Культивування первинних гепатоцитів 54
2.4.6. Методологія експерименту з мікроареями ДНК 57
2.4.6.1. Перевірка якості РНК 58
2.4.6.2. Синтез дволанцюгової кДНК та її очистка 59
2.4.6.3. Зворотна транскрипція РНК.....60
2.4.6.4. Транскрипція кДНК і очищення кРНК 61
2.4.6.5. Фрагментація кРНК.....62
2.4.6.6. Гібридизація кРНК з мікроарейом ДНК 62
2.4.6.7. Промивка, забарвлення та сканування мікроареїв.....63

2.4.6.8. Первинна обробка результатів експерименту з мікроареями ДНК 64
2.4.6.9. Статистична обробка даних і визначення диференційно експресован их генів.....65
2.5.10. Аналіз промоторів диференційно експресованих генів 65
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....67
3.1. Рівень мРНК *Ifnα* в тканині печінки і в паренхімних і непаренхімних клітинах змінюється впродовж 12 годин після часткової гепатектомії і лапаротомії.....67
3.2. IFNα «включає» 24 диференційно експресовані гени після 3-х год і 128 диференційно експресованих генів після 6-и год з початку культивуваня первинних гепатоцитів.....72
3.3. Сигнальні шляхи, що активуються IFNα в первинних гепатоцитах ..87
3.4. Експресія IFNα-залежних генів системи ІСГілування змінюється в печінці у відповідь на часткову гепатектомію і лапаротомію 91
3.5. Два гени-мішені IFNα, *Pkr i Irf7*, по-різному реагують як на операцію часткової гепатектомії, так і лапаротомії 95
3.6. Концентрація *Tbp* мРНК і 18S рРНК відображає загальний рівень транскрипції і трансляції.....97
РОЗДІЛ 4 УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ 100
4.1. Закономірність змін в експресії генів у первинних гепатоцитах щура під впливом IFNα.....101
4.2. Процеси, що ініціюються IFNα та частковою гепатектомією частково перекриваються 103

4.3. Особливості початкової відповіді досліджених генів на часткову гепатектомію і лапаротомію 105
4.4. Аналіз механізму запуску синтезу IFNα після часткової гепатектомії 110
4.5. Резюме 112
ВИСНОВКИ 116
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 118
ДОДАТКИ 135

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ЗТ-кПЛР	зворотна транскрипція-кількісна полімеразна ланцюгова реакція
ЛАП	лапаротомія
ЧГЕ	часткова гепатектомія
ГМІ	гени-мішені IFNα
PKR	протеїнкіназа R (proteinkinase R)
HGF	фактор росту гепатоцитів (hepatocyte growth factor)
IRFs	Фактори, що регулюються інтерфероном (interferon regulated factors)
ISRE	стимульований інтерфероном респонсивний елемент (interferon-stimulated response element)
ISGF3	стимульований інтерфероном ростовий фактор 3 (interferon stimulated gene factor 3)
Jak	кінази Януса (Janus kinases)
JNK	Jun аміно-термінальна кіназа (jun N-terminal kinase)
МАРК	мітоген-активована протеїнкіназа (mitogen-activated protein kinase)
РІЗК	фосфатидил-інозитол-3-кіназа (phosphatidylinositol 3 kinase)
STAT	передавач сигналу та активатор транскрипції (signal transducer and activator of transcription)
TGF-α	трансформуючий фактор росту альфа (transforming growth factor alpha)

TNF-α	фактор некрозу пухлин альфа (tumor necrosis factor alpha)
VEGF	фактор росту ендотелію судин (vascular endothelium growth factor)
2'-5'OAS	2'-5' олігоаденілат синтетаза
Mx	резистентний до міксовірусів (mixovirus resistance)
GAS	сайт, що активується інтерфероном гамма (gamma-activated site)
ISG15	інтерферон-стимульований ген 15 (interferon stimulated gene 15)
UBE1l	убіквітин подібний модифікуючий ензим 1 (ubiquitin-like modifier activating enzyme 7)
Ube2l6	убіквітин коньюгуючий ензим (ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6)
TRIM25	білок із потрійним доменом 25 (tripartite motif containing 25)
USP18	убіквітин специфічна пептидаза (ubiquitin specific peptidase 18)
TBP	TATA зв'язуючи білок (TATA binding protein)
DAMP	молекулярні паттерни, що асоційовані з небезпекою (danger associated molecular patterns)
PAMP	молекулярні паттерни, що асоційовані з патогенами (patogen associated molecular pattern)
IL-6	інтерлейкін 6 (interleukine 6)
IFNα	інтерферон альфа (interferon alpha)
IFNAR	рецептор до інтерферону альфа (interferon alpha receptor)

ВСТУП

Актуальність теми. Регенерація печінки - це складний процес, що тонко регулюється в часі та просторі факторами різноманітної природи на внутрішньоклітинному, позаклітинному та системному рівнях. Хоча регенерація здебільшого не притаманна високодиференційованим тканинам, регенерація печінки є винятком із цієї закономірності. При моделюванні регенерації печінки шляхом видалення 2/3 органу біля 95% клітин печінки, які в інтактному органі не діляться і знаходяться у фазі G0 поза клітинним циклом, переходять з G0 в G1 фазу і поступово проходять всі наступні фази клітинного циклу, і вже за тиждень маса печінки відновлюється до початкового рівня. Клітини печінки, що регенерує, продовжують виконувати свої специфічні функції для забезпечення життєдіяльності всього організму [1].

На сьогоднішній день відомі численні фактори, які забезпечують перехід клітин печінки від стану спокою до поділу під час регенерації. До них відносяться як мітогени, такі як фактор росту гепатоцитів (Hepatocyte Growth Factor – HGF), епідермальний фактор росту (Epidermal Growth Factor – EGF), фактор росту ендотелію судин (Vascular Endotelium Growth Factor – VEGF), так і молекули, що підсилюють дію ростових факторів шляхом забезпечення компетентності клітин печінки до відповіді на мітогенні сигнали [2–5]. У цьому беруть участь багато факторів, які є компонентами системи вродженого імунітету, як наприклад, фактор некрозу пухлин (TNFα), інтерлейкін-6 і -4 (IL-6, -4), білки комплементу, а також активатори вродженого імунітету – ліпополісахариди [6–9]. Жоден із

факторів, які регулюють регенерацію печінки не є визначальним для успішної регенерації, оскільки нокаут за будь-яким із відповідних генів викликає лише в більшій чи меншій мірі затримку відновлення органу. Це свідчить про надлишковий характер дії регуляторних факторів, що забезпечують успішність відновлення органу навіть при пошкодженні окремих ланок регенераційного процесу, але в той же час не виключає участі інших ймовірних факторів в складній регуляторній мережі відновлення печінки. Дослідження механізмів регуляції регенерації печінки має не тільки фундаментальне, але й суттєве практичне значення, оскільки як хронічний гепатит, так і ушкодження печінки лікарськими та іншими токсичними речовинами призводять до порушення функцій клітин печінки і до регенерації печінки, яка завершується або відновленням функцій або загибеллю клітин в разі незадовільної регенерації [10]. Від процесу регенерації також залежить успішність проведення трансплантації печінки, при якій відбувається відновлення печінки як у донора, так і у реципієнта. .

Об’єктом дослідження в даній роботі був інтерферон альфа (IFNα) як найактивніший цитокін системи вродженого імунітету і потенційний регулятор регенерації печінки після її ушкодження. IFNα може бути залучений на початкових стадіях регенераційного процесу, де поряд із іншими компонентами системи вродженого імунітету IFNα може сприяти змінам у фенотипі клітин печінки, необхідним для відповіді на мітогенний сигнал. Раніше нами було показано, що на ранніх етапах після ушкодження печінки в ній зростає противірусна активність IFNα [11] і, крім того, в тотальній РНК тимчасово зростає вміст мРНК *Ifnα*. Отримані нами дані свідчать на користь припущення про участь IFNα в регенераційному процесі, проте залишається невідомим, яку саме роль виконує IFNα у

відновленні печінки. Дисертаційну роботу присвячено одержанню додаткових доказів щодо експресії *Ifnα* на початку регенераційного процесу в печінці, в паренхімних і непаренхімних клітинах печінки, а також дослідженню можливих функцій IFNα в регенерації через з'ясування особливостей експресії його генів-мішеней.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Зміст дисертації відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Робота виконувалася в рамках теми «Особливості функціонування та множинність форм фактора елонгації трансляції 1 вищих еукаріотів» (шифр теми – 2.2.4.9, № державної реєстрації 0105V005340, 2006-2010 рр.). Дослідження також підтримано грантом Українського Науково-Технологічного Центру (УНТЦ) № 4381 за темою «Новітні технології у вивченні функціональної активності інтерферону альфа» (2007-2009 рр.), короткостроковими грантами ЮНЕСКО для проведення досліджень в Інституті онкології імені М. Склодовської-Кюрі (м. Глівіце, Польща, 2009р.), грантом на виконання українсько-індійського науково-дослідного проекту "Роль модифікуючих ензимів родини TRIM в регуляції інтерферону альфа і виживання клітин печінки при регенерації" на 2015 – 2016 рр. за договором № М/208 -2015 і державною цільовою науково-технічною програмою з впровадження і застосування технологій ГРІД на 2009 - 2013 роки «Розробка нових високо-паралельних методів ГРІД для моделювання мереж генної регуляції для системного аналізу відповіді печінки на дію інтерферону альфа» № Г16-46.

Мета та завдання дослідження. Охарактеризувати експресію гена *Ifnα* та його генів-мішеней в печінці, що регенерує, впродовж пререплікативного періоду.

Відповідно до мети у роботі вирішували такі завдання:

1. Отримати додаткові докази щодо експресії гена *Ifnα* на рівні мРНК в тканині, ізольованих гепатоцитах і непаренхімних клітинах інтактної печінки і печінки після часткової гепатектомії (ЧГЕ) та лапаротомії (ЛАП).
2. Визначити профіль генної експресії в інтактних первинних гепатоцитах під впливом IFNα за умов максимально наближених до ситуації *in vivo* після ЧГЕ.
3. Верифікувати результати експерименту з мікроареями ДНК шляхом аналізу експресії вибіркових генів методом зворотної транскрипції і кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-кПЛР).
4. Ідентифікувати транскрипційні фактори, які в первинних гепатоцитах можуть опосередкувати дію IFNα.
5. Проаналізувати зміни профілю генної експресії в культивованих гепатоцитах залежно від часу культивування й ідентифікувати «ранні гени» для дослідження їх експресії в печінці після часткової гепатектомії і лапаротомії порівняно з інтактною печінкою.
6. Дослідити зміни рівня мРНК *Tbp* і рРНК *18S* як загальних показників рівня транскрипції і трансляції впродовж пререплікативного періоду регенераційного процесу та відповідного часового проміжку реакції гострої фази після лапаротомії.

Об'єкт дослідження: Стан первинних гепатоцитів щура, індукованих

IFNα, та клітин печінки на ранньому етапі відновлення, індукованого ЧГЕ, та на відповідному за часом етапі реакції гострої фази, зумовленої лапаротомією.

Предмет дослідження: Транскриптом в інтактних первинних гепатоцитах до та після впливу екзогенного IFNα, а також експресія «ранніх генів», визначених в експерименті з мікроареями ДНК, і генів, які кодують *Tbp* і *18S* в печінці щурів під час переходу від спокою до проліферації та на початковому етапі реакції гострої фази.

Методи дослідження: молекулярно-біологічні (виділення ДНК, РНК, ЗТ-кПЛР, зворотна транскрипція, молекулярне клонування, *in vitro* транскрипція, гібридизація з мікроареями ДНК); цитологічні методи (виділення та культивування первинних гепатоцитів, отримання фракцій паренхімних і непаренхімних клітин печінки); біоінформаційні методи (стандартний набір програм з аналізу результатів експериментів з мікроареями ДНК, визначення диференційно експресованих генів як збагачених функціональних категорій за тестом Фішера, визначення сайтів зв'язування транскрипційних факторів в промоторах диференційно-експресованих генів за використання позиційно-вагових матриць); операції часткової гепатектомії та лапаротомії.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше визначено особливості змін профілю генної експресії в первинних гепатоцитах щура із використанням мікроареїв олігонуклеотидів ДНК із високою щільністю зондів. Показано, що відповідь клітин печінки на квазіфізіологічну дозу IFNα за умов інкубування впродовж 3-х і 6-и год характеризується збалансованістю експресії генів, задіяних у інгібуванні й активації

запальних і відновлювальних процесів на відміну від токсичної дії IFNα в більшій концентрації при довготривалому інкубуванні.

Продемонстровано характерні зміни рівня мРНК *Ifnα* після ЧГЕ, у двох мажорних популяціях клітин печінки: гепатоцитах та непаренхімних клітинах. Показано, що після ЧГЕ рівень мРНК *Ifnα* стрімко зростає в непаренхімних клітинах із максимумом синтезу на 1год.

Показано, що після ЧГЕ транскрипційна відповідь з боку генів *Isg15, Ube1l, Ube2l6, Usp18* не співпадає у часі з такою з боку гена *Ifnα*. Натомість відповідь з боку гена *Pkr* асоціюється з експресією гена *Ifnα.*. Під час реакції гострої фази, що запускається лапаротомією, зміни рівня мРНК генів *Isg15, Ube1l, Ube2l6, Trim25, Usp18*, також не пов'язані із активацією експресії гена *Ifnα.*. Подібні до генів системи ІСГілування зміни в часі після обох операцій характерні для експресії гена-мішені IFNα – *Irf7*. Це засвідчує, що гени системи ІСГілування і ген *Irf7,* відомі як мішені IFNα, можуть регулюватися іншими, незалежними від IFNα, факторами.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведених досліджень із симуляції впливу ендогенного IFNα на клітини печінки під час регенерації печінки поглиблюють існуючі дані про участь цього цитокіну у відновлювальних процесах, а також у процесах, які не пов'язані із вірусною інфекцією. Визначений профіль експресії генів в первинних гепатоцитах під дією IFNα було включено у всесвітню базу даних GEO (Gene Expression Omnibus), звідки дані можуть бути використані іншими дослідниками для біоінформаційного дослідження різноманітних аспектів функціонування гепатоцитів під впливом IFNα. Отриманий в роботі екзогенний контроль Luc може використовуватися в інших дослідженнях експресії генів для оцінки ефективності реакції

зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції.

Особистий внесок здобувача. Результати, викладені у дисертації, одержано автором особисто або за безпосередньої участі у виконанні експериментів. Зокрема, автором самостійно виділено РНК, підібрано праймери до досліджуваних в роботі генів і умови їх ампліфікації, проведено аналіз специфічності ампліконів, реакції ЗТ-кПЛР, молекулярне клонування екзогенного контролю, підготовку зразків РНК (реакції зворотної транскрипції та *in vitro* транскрипції) для експерименту з мікроареями ДНК, біоінформатичний аналіз результатів експерименту з мікроареями ДНК і промоторів диференційно експресованих генів, а також аналіз онтології генів.

Планування та аналіз результатів експериментів, написання статей та операції ЧГЕ та ЛАП проведено спільно з науковим керівником, д.б.н. М.Ю. Оболенською. ЧГЕ і ЛАП були проведені спільно із студентами Мінею І.Й. (НАУКМА), Полєжаєвою Т.А. (КНУ ім. Т. Шевченка) та к.б.н. Перепелюк М.М. Проведення транскрипції для отримання екзогенного контролю проведено спільно із студенткою Жиряковою І.О. (КНУ ім. Т. Шевченка), Виділення та культивування первинних гепатоцитів для експерименту з мікроареями ДНК проведено разом із ст. наук. співр. Макогон Н.В. (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця). Гепатоцити та непаренхімні клітини з інтактної печінки та печінки після ЧГЕ та ЛАП виділено за участі студента Щерби Я. В. (КНУ ім. Т. Шевченка). Експеримент з мікроареями ДНК було проведено на базі Інституту онкології імені Марії-Склодовської-Кюрі, м. Глівіце, Польща, з к.б.н. М. Очко-Войчеховською і за організаційного сприяння проф. Барбари Яжомб. Обрахунки результатів експерименту з мікроареями ДНК були проведені

спільно з к.б.н. Токовенком Б.Т.

З усіма зазначеними колегами автор має спільні публікації.

Апробація результатів дисертації. Загальні положення роботи доповідались на поточних наукових семінарах Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та наукових конференціях: конференції молодих науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики (20 – 22 вересня 2007 р., Київ, Україна); 8-ій Парнасівській конференції (27 – 31 квітня 2011 р., Варшава, Польща); конференції «Запобігання раку- 2008» (6 – 8 березня 2008 р., Санкт-Галлен, Швейцарія); 4-й міжнародній конференції для молодих вчених «Молекулярна біології: поступ та перспективи» (14 – 17 вересня 2011 р., Київ, Україна); Тринадцятому міжнародному симпозіумі для аспірантів «Ритми життя: циклічність в біології» (17 – 19 листопада, Гейдельберг, Німеччина, 17 – 19 листопада, 2011); Одинадцятому Українському біохімічному конгресі (6 – 10 жовтня 2014, Київ, Україна).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 статей у наукових фахових журналах та тези 9 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій, а також один патент на корисну модель.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 154 сторінках машинописного тексту. Вона містить 19 рисунків, 10 таблиць та 3 додатки Список використаної літератури налічує 176 найменуван.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Інтерферони

1.1.1. Родина інтерферонів. Історія відкриття. У 1957 році опубліковано роботу, в якій описано інгібувальний ефект інактивованого теплом вірусу грипу на розвиток живого вірусу в хоріоаллантоїсній мембрані яйця курки. Alick Isaacs і Joan Lindenmann [12], дослідники, які опублікували цю статтю, виявили речовину, що вивільняється під дією інактивованого вірусу і назвали її інтерфероном (IFN). У 1960 році Atanasiu і Chany [13] показали, що введення хом'якам препаратів, що містили інтерферон, значно сповільнює розвиток пухлини після інфікування вірусом поліоми [13]. Згодом, у 1962 році Paucker показав, що мишачий інтерферон здатен інгібувати ріст клітин незалежно від вірусної інфекції, а Gresser у 1972 показав протипухлинні властивості інтерферону[14,15].

З часу відкриття IFN пройшло більше 50 років, і на сьогоднішній день відомо, що IFN - це не одна речовина, а ціла родина невеликих за розміром (15 – 27 кДа) білків та глікопротеїнів, більшість яких мають противірусн у, антипроліферативну та імуномоделюючу властивості [16].

Розрізняють інтерферони I-типу, II-типу та інтерферон-подібні цитокіни. До першого класу відносяться IFN альфа(α), -бета(β), -дельта(δ), -епсилон(ε), - каппа(κ), -тау(τ), -омега(ω). До II класу належить IFN гамма(γ), а до IFN подібних цитокінів – IL-28A, IL-28B, IL-29 та лімітин. Основою даної класифікації слугує здатність різних типів інтерферонів

зв'язуватися із певним типом рецепторів: інтерферони першого типу зв'язуються із рецептором першого типу (IFNAR1/IFNAR2), тоді як IFNγ та IFN подібні цитокіни зв'язуються із IFN-γR1/IFN-γR2 та IL28-R1/IL10-R2 відповідно [17].

Гени *Ifnα, -β, -ε, -κ, -ω, -γ, Il-28a*, *Il-28b*, *Il-29* присутні у геномі людини, тоді як *Ifnτ*, *-δ* та лімітин ні. IFNτ був вперше описаний у вівці як білок трофобласту 1 (Ovine trophoblast protein 1). У копитних IFNτ бере участь у імплантації яйцеклітини [18]. IFNδ, як і IFNτ, також залучений у ембріогенезі, де він разом із IFNγ експресуються на ранній стадії, під час імплантації яйцеклітини [19]. Лімітин був виявлений лише у мишей. Він має 30%-ну гомологію за амінокислотним складом з IFN–α, -β і –ω миші і людини і виявляє біологічну активність після зв'язування з рецептором IFN I типу. Серед усіх інтерферонів лімітин селективно здатен інгібувати ріст В-клітин [20].

У ссавців та птахів існує родина генів *Ifnα,* в той час як IFNβ та IFNγ – мають по одній ізоформі. Всі гени *Ifnα* є безінтронними. Білки IFNα є в різній мірі глікозильованими [17]. До IFNα I типу належать від 11 до 20 підтипів залежно від виду тварини [17,21]. Не беручи до уваги псевдоген *Ifnap*, у людини родина інтерферонів α представлена тринадцятьма генами, з яких експресується 12 різних білків (білок IFNα1 ідентичний до IFNα13): IFNα1, – α2, -α3, -α4, -α5, -α6, -α7, -α8, -α10, -α13, -α14, -α16, -α17, -α21. Всі гени *Ifnα* людини кластеризовані на 9-й хромосомі. У миші родина IFNα представлена чотирнадцятьма генами: *Ifnα1, Ifnα2, Ifnα4, Ifnα5, Ifnα6T, Ifnα7/10, Ifnα8/6, Ifnα9, Ifnα11, Ifnα12, Ifnα13, Ifnα14, IfnαA, IfnαB*, всі вони гомологічні більш ніж на 95% та розташовані на хромосомі 4 [21]. Члени родини генів *Ifnα* щура вивчені порівняно мало, відомо 11 різних послідовностей *Ifnα*, всі розміщені у кластері 5q31-q33 на 5-ій хромосомі [22]. Серед них найбільше охарактеризовано білок послідовності X00336, яка відповідає гену *IFNα* 1.

Зважаючи на високу ступінь гомології між підтипами IFNα, надалі в

роботі для позначення буде використовуватися просто IFNα.

1.1.2. Будова молекули IFNα. Білки родини IFNα в середньому складаються з 192-х амінокислотних залишків і являють собою компактну структуру з п’яти антипаралельних лівозакручених альфа спіралей (A, B, C, D, E), які сполучаються між собою однією довгою (AB) та трьома короткими BC, CD, DE петлями. Петля AB складається з трьох коротких сегментів AB1, AB2, AB3. Молекула IFNα стабілізована двома дисульфідними зв’язками: один сполучає сегмент AB1 з спіраллю E, другий зв′язує N-кінець білкової молекули з C-спіраллю. Кількість та розташування дисульфідних зв’язків є консервативним для усіх підтипів IFNα. Спіралі A, B, C, D, E та AB2 сегмент AB петлі утворюють кор молекули IFNα. В альфа спіральній частині кору спостерігається висока структурна подібність між всіма підтипами IFNa на відміну від AB петлі і C-кінця спіралі B та BC петлі, які є варіабельними. Критично важливою є петля AB, оскільки вона взаємодіє з IFNAR2 рецептором та відповідає за спорідненість до нього (рис. 1.1). Відмінності в амінокислотній послідовності у цій ділянці є причиною різної біологічної активності різних підтипів IFNα [17].

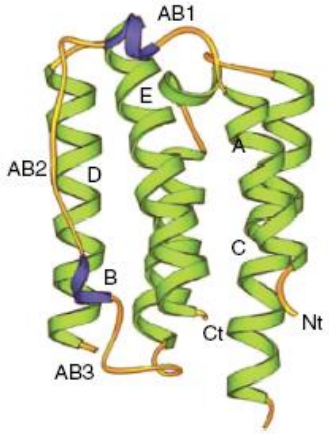


Рис 1.1. Структура молекули IFNα [17]

Деякі підтипи IFNα зазнають посттрансляційиої модифікації у вигляді N-глікозилювання в позиції 78, де міститься відповідний сайт (Asn-X-

Ser/Thr). Роль глікозилювання до кінця невідома, але є припущення, що воно скоріше необхідне для стабілізації циркулюючої молекули, ніж впливає на її активність, оскільки молекули без вуглеводної частини не відрізняються за своєю біологічною активністю від таких, що її мають [21].

1.1.3. Структура рецептора IFNα. Рецептор IFNα складається з двох субодиниць, IFNAR1 та IFNAR2, що відносяться до другого типу цитокінових рецепторів. Внаслідок альтернативного сплайсингу та використання альтернативних сайтів поліаденілювання можуть утворюватися різні форми IFNAR2: IFNAR2c – довга трансмембранна форма, IFNAR2a – розчинна форма, яка є зовнішньоклітинним доменом трансмембранної форми. У миші розчинна форма другої субодиниці представлена двома варіантами sIFNAR2A та sIFNAR2A', які утворюються в результаті альтернативного сплайсингу; серед них найбільш поширеною є перша форма, яка являє собою повний екстрацелюлярній домен. У людини поряд із попередніми двома формами присутня й третя, коротка трансмембранна форма – IFNAR2b. Альтернативний сплайсинг транскрипту IFNAR1 не встановлений. Основною формою, що передає сигнал всередину клітини, є IFNAR2c, тоді як функція короткої трансмембранної форми у людини залишається невідомою [23,24]. Достеменно функцію розчиннної форми IFNAR2a in vivo, ще не вивчено, проте відомо із експериментів in vitro, що IFNAR2a може інгібувати IFNα – індуковану передачу сигналу в нормальних клітинах, скоріш за все шляхом зв’язування з лігандом і блокування його, проте в первинних тимоцитах мишей, що нокаутовані за другою субодиницею рецептора (Ifnar2-/-), IFNAR2a може запускати антипроліферативний сигнал. Крім того, розчинна форма другої субодиниці рецептора інтерферону та рекомбінантна екстрацелюлярна частина першої субодиниці можуть індукувати противірусну відповідь в клітинах вівці за відсутності інтерферону [25].

Зовнішньоклітинний домен субодиниці IFNAR1 миші має 403 амінокислотні залишки і складається з 4-х субдоменів (SD1-SD4), кожен з яких містить по одному фібронектин-подібному домену (FBN III). Субдомени SD1 і SD2, а також SD3 і SD4, поєднані двома консервативними дисульфідними зв'язками. У функціональному відношенні субдомени SD1-SD3 відповідальні за зв'язування з лігандом, тоді як SD4 відповідальний за утворення потрійного комплексу між лігандом, IFNAR1 та IFNAR2. Структура екстрацелюлярного домену IFNAR2 подібна за будовою до першої субодиниці і містить два фібронектин-подібних домени (FBN III), а також два консервативні дисульфідні зв'язки. IFNAR2 має значно більшу спорідненість до ліганду, ніж перша субодиниця рецептору, і саме вона відіграє головну роль у зв'язуванні IFN першого типу. Перша субодиниця зв'язується з комплексом ліганд-IFNAR2 і бере участь у передачі регуляторного сигналу всередину клітини [24].

Цитоплазматичні частини обох субодиниць асоційовані з тирозинкіназами родини Janus (Jak); друга субодиниця IFNAR2 асоційована з кіназою Jak-1, а перша IFNAR1 з кіназою Tyk-2. IFNAR1 на своєму цитоплазматичному кінці також має два консервативні залишки тирозину – сайти зв'язування для SH-2 (Src homology) доменів білків STAT-1 і STAT-2 (Signal Transducer and Activator of Transcription), а також послідовність із 14 амінокислотних залишків, яка бере участь у негативній регуляції передачі сигналу від рецептору інтерферону першого типу шляхом приєднання до себе білків SOCS (Suppressor of cytokine signaling), а також Е3 убіквітин лігази [26]. Також було показано, що цистеїнова протеїназа USP18 може блокувати приєднання Jak1 до IFNAR2 і таким чином інгібувати передачу сигналу від рецептора [27].

1.1.4. Внутрішньоклітинна передача регуляторного сигналу від рецептора інтерферону альфа. IFNα є цитокіном плейотропної дії і здатен викликати різні, навіть протилежні ефекти залежно від типу клітин та інших сигналів, що діють на клітину. Так IFNα викликає апоптоз у

пухлинних клітин [28], проте може бути і супресором апоптозу в клітинах імунної системи [29,30].

Зв'язування IFNα зі своїм рецептором активує кінази Jak1 і Tyk2, які в свою чергу фосфорилюють залишки тирозину на цитоплазматичній частині рецептору. Фосфорильованний залишок тирозину слугує сайтом зв'язування для SH доменів різних молекул, які також фосфорилюються кіназами Jak1 і Tyk2, внаслідок чого активуються і передають сигнал далі в клітину. Одними з таких білків-передавачів сигналу є білки STAT. Серед шести вивчених STAT (STAT1–STAT6), IFNα здатен активувати чотири з них: STAT 1, 2, 3, 5 [17,31]. Активовані STAT формують гомо- і гетеродимери і транслокуються у ядро, де сполучаються з цис-елементами ДНК і регулюють експресію генів-мішеней IFNα, причому активація різних генів залежить від типу STAT, що входять до димеру (рис. 1.2).

Гомодимери фосфорильованих STAT-1, STAT-3, STAT-5 чи гетеродимери STAT-1–STAT-3 зв′язуються з GAS (gamma-activated site) елементом у промоторній ділянці генів-мішеней IFNα, що відповідальні за противірусний та антипроліферативний стан клітини (рис. 1,2).

Гетеродимер STAT1–STAT2 в сполученні із білком p48, відомий як ISGF3 (Interferon stimulated gene factor 3), зв'язується з послідовністю ISRE (Interferon stimulated response element) в промоторах багатьох генів мішеней інтерферону альфа, які також відповідальні за противірусну, антипроліферативну відповідь клітини та за імуномодуляцію [32]. Фосфорильований STAT3 може слугувати адаптером для залучення PI3' кінази (phosphatidylinositol-3′-kinase) до рецептору з подальшою її активацією, проте основним адаптерним білком, що зв'язує IFNAR з PI3 кіназою є IRS1 (Insulin receptor substrate 1) [33]. Фосфорильований внаслідок активації IFNAR IRS слугує сайтом зв'язування для SH2 домена регуляторної субодиниці PI3 кінази - p85. Як наслідок, активується каталітична субодиниця p110, яка фосфорилює фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат до фосфатідилінозитолу 3,4,5 трифосфату. Останній сприяє

активації ефекторної кінази цього шляху – Akt. Мішенями Akt є проапоптичні білки: BAD, каспаза-9, FKHRL1, які інактивуються після фосфорилювання [34]. Akt також активує транскрипційний фактор NF-kB шляхом фосфорилювання його інгібітора – IkB [35]. Фосфорильовані кіназою Akt білки TSC1, 2 (tuberous sclerosis complex 1, 2) інактивуються, що призводить до активації mTOR (Mammalian target of rapamicin) і, як наслідок, активується фактор ініціації трансляції eIF4e і кіназа рибосомального білка S6, в результаті чого посилюється трансляція білку і ріст клітин. Крім стимуляції росту, сигналінг через PI3 кіназу з активацією mTOR, проте без участі Akt, викликає апоптоз у клітинах мієломи [28] (рис.1.2).

CBL/Crk і Rac/p38 каскади, які активуються IFNα, також сприяють інгібуванню росту клітин та захисту проти вірусної інфекції. Залучення CBL/Crk шляху веде до активації ГТФзи Rap-1. Остання є антагоністом ГТФази Ras, що передає мітогенний сигнал при Map кіназному шляху. Точні мішені Rap-1 невідомі, проте її активація частково забезпечує супресію росту ракових клітин під дією IFNα. Крім того, CrkL формує гетеродимер зі STAT5, який активує транскрипцію з промоторів генів-мішеней інтерферону альфа, що мають GAS елемент у своєму складі. p38/Map кіназа, як і Rap-1, викликає пригнічення росту, проте точні її мішені невідомі [36,37] (рис.1.2).

1.1.5. Гени-мішені-IFNα. Плейотропна дія IFNα є результатом активації декількох каскадів внутрішньоклітинної передачі сигналу і багатьох генів-мішеней, що відповідальні за різноманітні функції IFNα: захист проти вірусної інфекції, передача внутрішньоклітинного сигналу, регуляція транскрипції і трансляції, апоптоз і багато інших. Незалежно від типу клітин, IFNα в першу чергу активує гени, відповідальні за противірусний захист та імуномодуляцію. Одними із найбільш вивчених генів-мішеней IFNα є гени, які кодують протеїнкіназу R (*Pkr*), 2′-5′ олігоаденілатсинтетазу (*2′-5′Oas*), Mx білки [38–40].

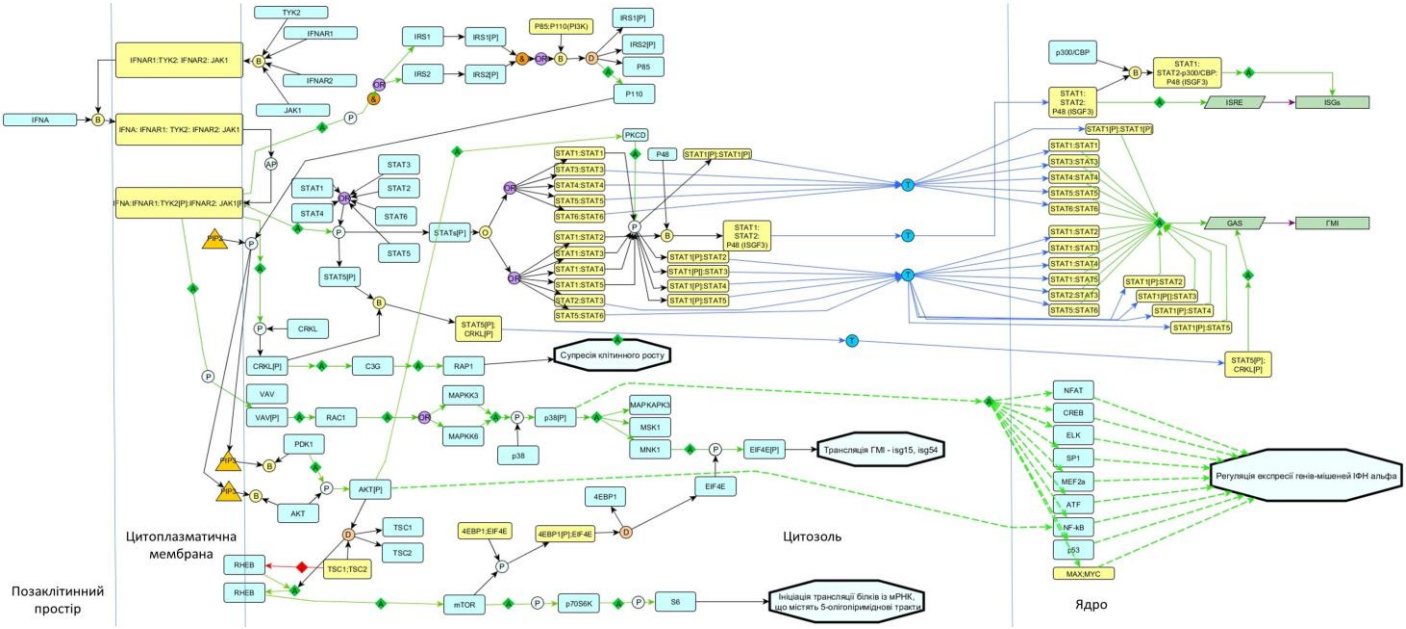
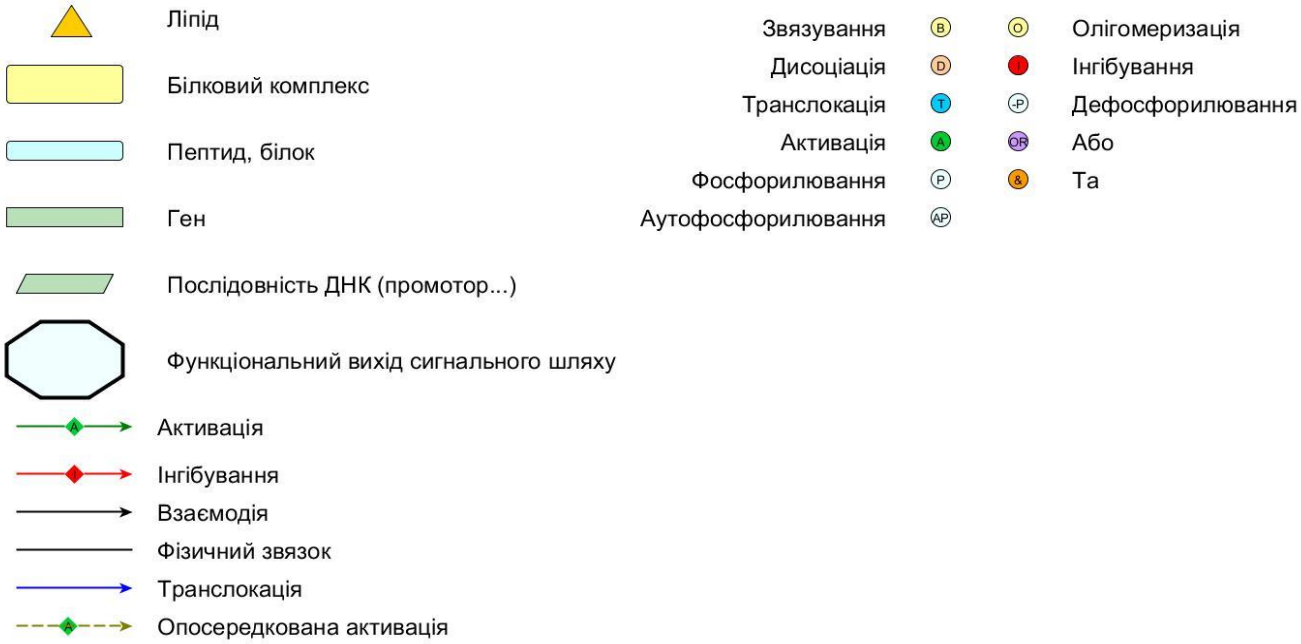


Рис. 1.2. Шляхи передачі сигналу, що активуються IFNα. Рисунок побудований автором на основі літературних даних у редакторі графів yED із використання умовних позначень, запропонованих [41]. Умовні позначення;



IFNα стимулює експресію *Pkr* і *Ifi56* (interferon inducible protein 56), які негативно регулюють трансляцію через фосфорилювання α субодиниці фактора ініціації трансляції eIF2 та інгібування eIF3, відповідно [42,43]. Фосфорильований протеїнкіназою R ,білок eIF2α зв'язується з великою спорідненістю з фактором eIF2, перешкоджає тим самим його взаємодії з іншими нефосфорильованими eIF2α і обміну їх ГДФ на ГТФ. Таким чином блокується трансляція більшості вірусних та клітинних мРНК, при цьому не зачипаючи трансляцію білків, що необхідні для відповіді на стрес, таких як транскрипційний фактор ATF3 та ATF4. Окрім регуляції трансляції ПКР також опосередковано активує транскрипційні фактори IRF1 (Interferon regulatory factor1) та NF-kB, що активують ряд генів, відповідальні за противірусний захист, розвиток імунного та запального процесів [43]. Крім інгібіторів трансляції, IFNα стимулює транскрипцію факторів ініціації трансляції EIF2A, EIF2B, EIF2S2, EIF3S10, EIF3S6, проте невідомо, чи транслюються мРНК цих генів [42].

2′-5′OAS разом з РНКазою L формують іще одну ланку захисту проти вірусної інфекції, що активується IFNα. РНКаза L експресується конститутивно майже у всіх (якщо не всіх) клітинах тоді, як 2′-5′OAS індукується інтерфероном. 2′-5′OAS синтезує короткі аденілові олігонуклеотиди, що поєднані між собою 2′-5′ фосфодіефірним зв'язком. Олігоаденілати індукують утворення активного димеру РНКази L, яка здатна вибірково розщеплювати вірусні мРНК [40]. Окрім цього, РНКаза L опосередковано здатна активувати стресову кіназу JNK (Jun N-terminal kinase), що може вести до апоптозу [44].

Додатковою ланкою захисту проти вірусної інфекції є інтерферон-індуковані ГТФази. Всі вони поділяються на чотири родини в залежності від їхнього розміру. Родину ГТФаз, що мають відношення до імунітету (immunity related GTPases, IRGs), складають невеличкі білки розміром 21 – 47 кДа. Більші за розміром (65-73кДа) білки належать до родини гуанілат зв'язувальних білків (guanilate binding proteins, GBPs), Найбільш

охарактеризовані ГТФази, які активуються IFNα, належать до родини Mx білків і мають розміри 72-82кДа. Представники родини ГТФаз найбільшого розміру (200-228 кДа) – дуже довгі індуковані ГТФази (very long inducible GTPases) [45]. ГТФази, що активуються інтерфероном, беруть участь у захисних реакціях проти патогенів всередині клітини. Представники родини IRG (immunity related guanosine triphosphatases) зв'язуються з цитоплазматичною частиною фагосоми, що містить патогени, та сприяють їх елімінації шляхом злиття фагосоми з лізосомою. IRGM (immunity related guanosine triphosphatases family M) зв'язується із фосфатідилінозитол 3,4 біфосфатом та фосфатідилінозитол 3,4,5 трифосфатом на поверхні вакуолей, що містять *Mycobacterum bovis* [46]. Хоча точний механізм, за яким відбувається регуляція елімінації патогенів під дією IRGM після його приєднання до везикул, малозрозумілий, проте наявність у патогенів білків, що дефосфорилюють фосфорильовані форми фосфатідилінозитолів на вакуолях свідчить про важливість протибактеріальної дії IRGM. Інший представник ГТФаз, що регулюються інтерфероном, із родини GBPs – GBP5, бере участь у формуванні NLRP3 інфламасом – мультибілкових комплексів, що активуються компонентами бактеріальних клітин та запускають подальшу імунну відповідь через секрецію IL-1β та IL-18 [47]. Mx білки беруть участь у захисті клітин проти вірусної інфекції, де вони інгібують транспорт вірусних білків всередині клітини [48].

Серед понад 300 генів-мішеней IFNα близько 50 відповідальні за передачу сигналу всередину клітини. Myd88, RELA, MAP2K1, MAP3K8, TRADD, RANBP, GEM - лише деякі з них [42]. Myd88 і TRADD передають сигнал від TLR (Toll like receptor) і TNFR (Tumor necrosis faktor receptor), відповідно, і беруть участь у захисті від мікроорганізмів і у TNF індукованому апоптозі [49]. MAP2K1 фосфорилює ERK і забезпечує ріст та проліферацію клітин, тоді як роль MAP3K8 невідома [50]. RANBP, GEM відносяться до регуляторних ГТФаз. Перша локалізована біля ядерного порового комплексу і відповідає за транспорт білків всередину ядра (в тому

числі і транскрипційних факторів), друга розташована біля цитоплазматичної мембрани і бере участь у передачі проліферативного сигналу від рецепторів на поверхні Т-клітин [51].

Інша група генів-мішеней інтерферону забезпечує імуномодулювальну функцію. Серед них є гени, що кодують хемокіни, а також адгезивні молекули (ICAM, CD47, селектин L, ALCAM). Активація генів, які кодують хемокіни, і експресія адгезивних молекул, як на судинному епітелії (ICAM, CD47), так і на клітинах імунної системи (селектин L, ALCAM), призводять до міграції клітин імунної системи до місця ураження і прискорює елімінацію патогенів чи видалення пошкодженої тканини [42].

IFNα також активує експресію генів головного комплексу гістосумісності I і каталітичної субодиниці протеасомного комплексу, який відповідає за процесинг антигена. IFNα активує гени, які кодують протеази, задіяні у розщепленні убіквітинованих молекул [52].

Одним із процесів, який регулюється IFNα, є апоптоз. Каспази 4, 8, 9, 7, TRAIL, Bak1, Fas, фосфоліпід скрамблаза, експресія яких активується під дією IFNα, сенсибілізують клітини, в основному, пухлинні, до дії апоптичних сигналів [53].

Низка транскрипційних факторів, експресія яких стимулюється IFNα, відповідають за вторинну відповідь на IFNα. До них належать STAT1, транскрипційні фактори родини IRF (1, 2, 3, 4, 5, 7) [54,55], причому перші чотири експресуються як у негемопоетичних, так і у гемопоетичних клітинах, тоді як IRF7 експресується здебільшого у гемопоетичних клітинах [56]. Цікавим є транскрипційний фактор HIF1A (Hypoxia induced factor 1A), який також активується IFNα і кисневим голодуванням і стимулює ангіогенез [57]. Таким чином, IFNα потенційно може стимулювати ангіогенез, проте даних *in vivo* поки що немає. Натомість існують дані, що IFNα є, навпаки, супресором ангіогенезу при печінкових метастазах раку прямої кишки [58].

На рівні мРНК, IFNα стимулює експресію низки факторів росту та їхніх рецепторів, VEGF, VEGFB, FGF, PDGFRL, ECGF, CTGT, проте чи має це значення для процесу росту клітин залишається невідомим [59].

Окрім білок-кодуючих генів IFNα регулює експресію ряду мікро РНК (miR). Серед них miR-1, miR-23a, miR-125b, miR-128, miR-30, miR-196, miR-296, miR-351, miR-431, miR-448 [60–62]. Багато з перелічених miR є негативними регуляторами реплікації вірусів. Біоінформатичними методами було знайдено сайти звязування для miR-196, miR-296, miR-351, miR-431, miR-448 в геномі віруса гепатиту С. Мутації у сайтах miR-196 в геномі віруса гепатиту С знімають інгібіторний ефект цих miR на реплікацію вірусу [61]. На відміну від інших, miR-23a, miR-125b беруть учать у регуляції диференціації дендритнних клітин із моноцитів під впливом IFNα. miR-23a та miR-125b є негативними регуляторами гена *PRDM-1*, що кодує Blimp-1 і відомий як регулятор диференціювання гематопоетичних іммунних клітин. Пригнічуючи експресію miR-23a та miR-125b IFNα активує екпресію Blimp-1, що і веде до диференціювання дендритних клітин. Серед miR, що регулюється IFNα є miR-122 [63]. Реплікація вірусу гепатиту С залежить від експресії miR-122, яка з'єднується з 5'-ділянкою геному вірусу і поки що нез'ясованим способом сприяє трансляції вірусних генів. Рівень miR-122 знижується під впливом IFNα, який таким чином виявляє свою противірусну активність [62]. Дещо інша ситуація спостерігається в пухлинних клітинах печінки, в яких знижений рівень miR-122 асоційований із несприятливим прогнозом при лікуванні. Гіперекспресія miR-122 в ракових клітинах печінки сприяє підвищенню чутливості ракових клітин до хіміотерапевтичних агентів [62].

1.2. Характеристика відновлювального процесу в печінці

1.2.1. Загальні уявлення про регенерацію печінки. Вперше, детальні гістологічні дослідження регенерації печінки були проведені у

1894 році доктором В.А. Майстром із університету Св. Володимира (Київ). В цій роботі використано модель регенерації печінки, що індукувалася видаленням 4/5 частки органу [64]. Однак класичною моделлю, що використовується і досі, є операція видалення 2/3 печінки – часткова гепатектомія, запропонована у 1931 році Хіггінсом та Андерсоном [65] (рис. 1.3).

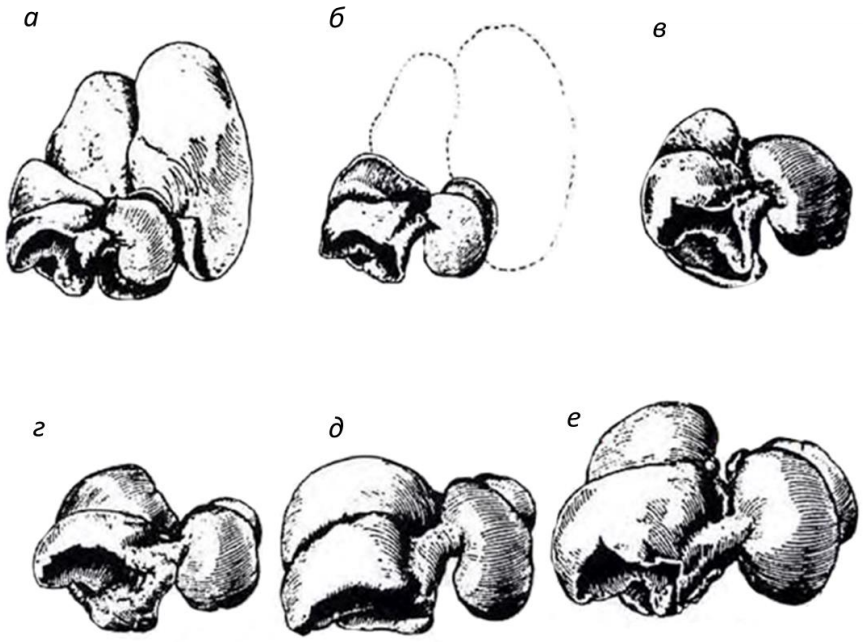


Рис. 1.3. Схематичне зображення печінки після ЧГЕ. *а* – інтактна печінка, *б* – печінка після ЧГЕ*; в, г, д, е* – печінка через один, два, три та чотири тижні після ЧГЕ відповідно. Адаптовано із [65]

В інтактній печінці абсолютна більшість клітин перебувають у «сплячому стані» або у фазі G0 клітинного циклу. Проте після ЧГЕ відбувається частково синхронізований перехід диференційованих гепатоцитив до фази G1 з подальшим проходженням всього клітинного циклу. Різні типи клітин печінки вступають у клітинний цикл у свій, строго визначений час. Синтез ДНК в гепатоцитах щура після ЧГЕ починає зростати вже на 12-ту годину і досягає максимального рівня до кінця першої доби. Пік синтезу ДНК в непаренхімних клітинах таких, як клітини

Купфера, Ito клітини та клітини епітелію жовчних протоків, припадає на 36 годину після ЧГЕ, а пік рівня синтезу ДНК в синусоїдальних епітеліальних клітинах припадає на четверту добу після ЧГЕ [7,10,66] (рис. 1.4).

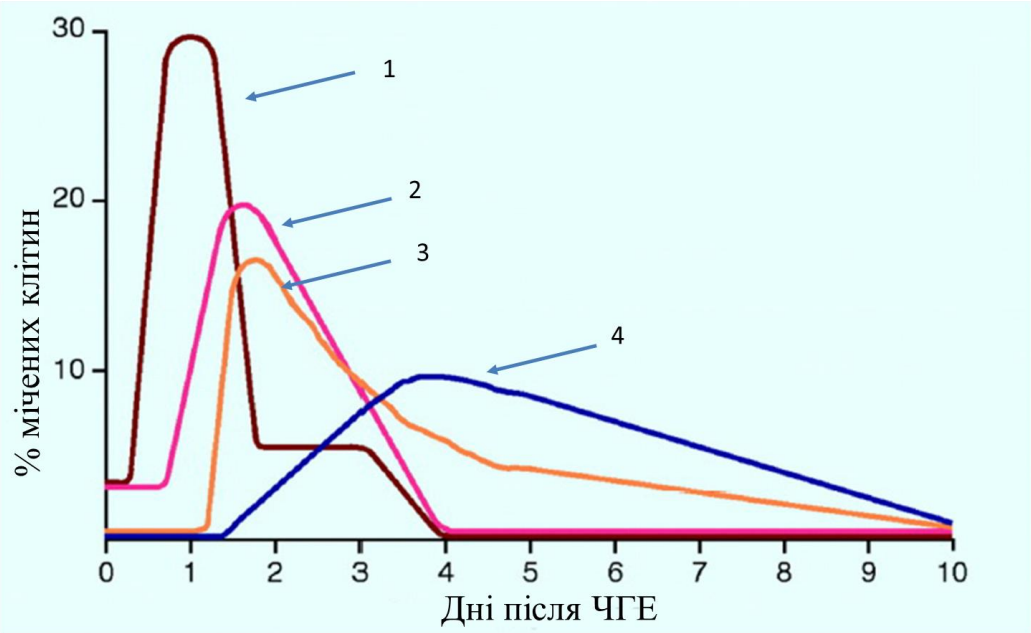


Рис.1.4. Схематичне зображення динаміки синтезу ДНК в різних популяціях клітин печінки після ЧГЕ. 1 – гепатоцити, 2 – епітелій жовчних протоків, 3 – клітини Купфера, 4 – ендотелій синусоїдів. Адаптовано із [66]

Окрім класичної ЧГЕ, регенерацію печінки в експерименті викликають введенням чотирихлористого вуглецю (CCl_4). Остання модель, через високу токсичність CCl_4, характеризується гострим запальним процесом та некрозом печінки, що ускладнює дослідження процесів, які відповідають суто за відновлення печінки [67]. Але ця модель є найчастіше вживаною для дослідження відновлювальних процесів при ураженні печінки токсинами.

Печінка у гризунів складається з 4-ох часток, кожна з яких має незалежну анатомічну структуру судин, жовчних протоків, нервів, завдяки чому модель після ЧГЕ є відносно «чистою», оскільки класичне видалення

медіальної і лівої латеральної долі не порушує циркуляцію та іннервацію в решті органу. Зміни у фенотипі печінки починаються одразу після ЧГЕ і регенерація не супроводжується запальними процесами, як це відбувається при введенні чотирихлористого вуглецю. Оскільки сама операція триває лише кілька хвилин, то досить легко вести відлік часу з моменту часткової гепатектомії.

1.2.2. Ініціація регенерації печінки. Одним із основних аспектів дослідження регенерації печінки залишається пошук факторів, що її запускають. В різні часи існували різні думки стосовно того як відбувається ініціація регенерації печінки, від існування одного, гуморального фактора, що запускає весь процес регенерації, до активації одного сигнального шляху, який контролює чисельні зміни в метаболізмі органу. Проте накопичені дані свідчать, що процес регенерації набагато складніший і включає активацію багатьох сигнальних каскадів, які в свою чергу активують/інактивують чисельні внутрішньоклітинні мішені.

Надалі будуть розглянуті сигнальні молекули, які регулюють відновлювальний процес в печінці, а також, закономірності, що лежать в основі цього процесу.

1.2.3. Зміни профілю генної експресії в клітинах печінки під час регенерації. Часткова гепатектомія ініціює системну відповідь у клітинах печінки, що добре простежується на транскрипційному рівні. В роботах із використанням мікроареїв ДНК в процесі відновлення печінки можна простежити закономірні зміни клітинного метаболізму. Печінка, як основна біохімічна лабораторія організму, синтезує велику кількість білків плазми крові, бере участь в обміні білків, вуглеводів та ліпідів, а також в процесах детоксикації ксенобіотиків. На ранніх етапах регенерації спостерігається пригнічення цілого кластеру генів, відповідальних за основні метаболічні функції печінки, наприклад, ген транспортерного білку глюкози – *Glut2*, гени, що беруть участь у транспорті ліпідів та холестеролу (*Slc27a5*, *NpeI*), а також оксигену (*Hba-a1*). Подібним чином знижується рівень експресії

ряду генів, які кодують ацетил-КоА ацетилтрансферазу 1, аденілаткіназу 1, аспарагінсинтазу, карбоангідразу 3, уридинфосфатазу, синтази жирних кислот, простагландин D2-синтазу та інші [68–70]. Детоксикаційні функції печінки також пригнічуються, оскільки експресія цитохромів P450 (Cyp4501a1, Cyp4502b9, Cyp4502f2) знижується після ЧГЕ, поряд із зниженням експресії генів родини глутатіон S трансфераз (Gsta2, Gsta2, Gstm6, Gstt1), які беруть участь у процесах детоксикації шляхом приєднання ксенобіотиків до глутатіону [71]. Знижується експресія гена *PARP1α*, який впливає на проліферацію пероксисом – органел, що беруть участь в основних метаболічних функціях печінки – у метаболізмі ліпідів, катаболізмі пуринів, поліамінів, амінокислот, синтезі холестерину та жовчних кислот [68].

На противагу вищезазначеній групі генів, на ранньому етапі після ЧГЕ індукується експресія генів, відповідальних за синтез, фолдинг, посттрансляційну модифікацію та експорт білків: фактор ініціації трансляції 1A, гамма субодиниця адаптерного білка Sec61, який бере участь у секреції білку, сіалілтрансфераза Sial4a, білки теплового шоку (Hsp105, Hspa5, Hsp86-1). Окрім трансляції та експорту білків змінюється набір транскрипційних факторів (C/EBPα, C/EBPΔ, JunB, Egfr, Lifr, Atf5) [68,71].

Як показали Cunshuan Xu та Hongpeng, під час регенерації зазнає змін експресія генів, які відповідають за захист клітин/організму від патогенів (*Mbl, Lbp CC2, CC20, IL-2, IL-4, IL-6, Myd88, TLR4, TNF, MBL2* та ін.), Експресія деяких з них підвищується, а деяких знижується [72–74]. Більш детально про участь елементів імунної системи, до яких відносять вищезазначені гени, буде йтися в подальших розділах.

1.2.4. Ростові фактори. В експерименті із параболічним кровообігом, в якому кровоносні системи двох щурів були поєднані між собою, індукція регенерації в одному із щурів вела до проліферації клітин печінки у іншого. Даний експеримент засвідчив гуморальну природу ініціюючого сигналу. В

ході подальших робіт в цьому напрямку вдалося визначити фактор росту гепатоцитів (Hepatocyte growth factor –HGF) [2,3]. В периферійній крові рівень HGF зростає вже через 1 год після часткової гепатектомії і тримається на високому рівні перші 48 год, а фосфорилювання рецептора HGF – MET, спостерігається вже через 30 хв після початку регенерації. Раннє підвищення HGF тісно пов'язане із перебудовою позаклітинного матриксу печінки після часткової гепатектомії, що в свою чергу пов'язане з активацією металопротеїназ та активатора плазміногена урокіназного типу uPA, які розщеплюють білки позаклітинного матриксу і вивільняють приєднані до нього молекули, в тому числі і HGF [75].

HGF синтезується як один неактивний поліпептид і для активації потребує протеолітичного розщеплення, після якого утворюється функціональний гетеродимер. В даному контексті роль uPA не обмежується лише розщепленням позаклітинного матриксу, з яким зв'язується HGF; uPA також активує HGF, розщеплюючи неактивний білок-попередник до функціональної форми. HGF синтезується в печінці здебільшого зірчастоподібними клітинами та ендотелієм судин. Рівень мРНК *Hgf* в печінці починає збільшуватися через 3 год після часткової гепатектомії, а максимуму досягає через 24 год, коли вже більшість гепатоцитів пройшла перший клітинний цикл, тому значення новосинтезованого HGF є не до кінця зрозумілим. Зважаючи на той факт, що HGF слугує мітогеном не лише для гепатоцитів, а й для епітелію жовчних протоків та ендотелію судин, то новосинтезований HGF може бути потрібним для активації поділу клітин цих типів [76]. Наразі точно невідомо, який(і) фактор(и) стимулює(ють) синтез HGF після часткової гепатектомії, проте є дані, що вказують на участь деяких цитокінів та факторів росту у цьому процесі, зокрема, інтерлейкіну-1 та-6 (IL-1, IL-6), фактора росту ендотелію судин (VEGF) і норадреналіну. Так відомо, що VEGF в процесі регенерації виробляється гепатоцитами і стимулює синтез HGF ендотеліальними клітинами [4].

Окрім HGF, мітогенний вплив на гепатоцити здійснюють ліганди рецептору епідермального фактора росту (Epidermal Growth Factor Receptor– EGFR): EGF, TGFα, амфірегулін. EGF синтезується у вигляді білка-попередника багатьма типами клітин, і його рецептор EGFR присутній також на більшості типів клітин організму. Місцями найбільш інтенсивного синтезу EGFє екзокринні залози - слинні та залози Брунера в кишківнику. Рівень EGF та фосфорильованого EGFR збільшується швидко після часткової гепатекмії. Припускають, що основний шлях, через який EGF потрапляє після часткової гепатекмії до портального кровообігу, починається від залоз Брунера, де його синтез стимулюється норадреналіном, рівень якого зростає після часткової гепатекмії [77].

TGFα є іще одним лігандом EGFR. TGFα, як HGF і EGF, синтезується у вигляді неактивного попередника, який з'єднується з цитоплазматичною мембраною клітин. TGFα продукується більшістю епітеліальних клітин, а також гепатоцитами як в культурі, так і *in vivo* під час регенерації. Рівень мРНК *TGFα* в гепатоцитах зростає через 3-5 год після часткової гепатекмії із максимумом на 24 год. Оскільки гепатоцити також мають рецептор EGFR, припускають, що TGFα діє автокринно на гепатоцити та паракринно на зірчастоподібні та ендотеліальні клітини, для яких TGFα є також мітогеном. Інші ліганди EGFR – амфірегулін та фактор росту гепатоцитів, що з'єднується з гепарином (HB-HGF), є мітогенами в культурі гепатоцитів. Важко виокремити, які саме молекули формують основний мітогенний сигнал через EGFR. Хоча в літературі більша увага приділяється TGFα та EGF, скоріше за все має місце спільний вплив всіх лігандів EGFR [77].

1.2.5. Додаткові мітогени. Всі перелічені в попередньому розділі сигнальні молекули мають прямий мітогенний вплив на відповідні клітини мішені як в культурі, так і *in vivo*. На відміну від них, додаткові мітогени не мають прямого мітогенного впливу, проте здатні підсилювати дію прямих

мітогенів, тим самим забезпечуючи більш тонку регуляцію відновлювального процесу.

Найбільш дослідженими із додаткових мітогенів є TNFα та IL-6. TNFα в печінці продукується, в основному, клітинами Купфера і після ЧГЕ його експресія швидко зростає [7]. Експерименти із використанням тварин нокаутних за рецептором TNFα показали затримку регенерації після ЧГЕ [8]. Попередня обробка гепатоцитів TNFα значно підвищувала проліферацію гепатоцитів після стимуляції HGF та EGF, на основі чого було зроблено висновок, що TNFα підготовлює гепатоцити до сприйняття мітогенних сигналів. Окрім прямого впливу на гепатоцити, вплив TNFα опосередковується через інші типи клітин. Так TNFα індукує синтез IL-6 клітинами Купфера. IL-6 є основним індуктором синтезу білків гострої фази у відповідь на гостре системне запалення чи інфекцію. Окрім того, що IL-6 підсилює проліферацію гепатоцитів, він є прямим мітогеном для епітелію жовчних протоків [76].

Норадреналін діє на різні типи клітин, серед них гепатоцити, що експресують на своїй поверхні α-адренергічний рецептор. Як і TNFα та IL6, норадреналін не є мітогеном для гепатоцитів, проте значно підвищує мітогенні властивості HGF та EGF шляхом гетерологічної активації MET та EGFR α-адренергічним рецептором. До того ж норадреналін частково інгібує антипроліферативний ефект TGFβ на гепатоцити. Крім модуляторних властивостей, норадреналін безпосередньо індукує синтез HGF та EGF фібробластами та залозами Брунера. Також на проліферацію клітин печінки після ЧГЕ впливають інсулін, простагландини і естрогени [78].

1.2.6. Завершення відновлювального процесу в печінці. Коли маса печінки досягає початкового рівня, відновлювальний процес завершується. Механізми, що сприяють завершенню процесу, вивчені значно менше в порівнянні із механізмами ініціації регенерації. На сьогоднішній день відомі декілька супресорів росту клітин печінки. Найбільш вивченими

серед інших є TGFβ та активін. Основним місцем синтезу TGFβ в печінці є зірчастоподібні клітини. Новосинтезований TGFβ зв'язується з декорином в позаклітинному матриксі. Збільшення рівня TGFβ після ЧГЕ спостерігають вже через 5 год. і зберігається на підвищеному рівні до кінця регенерації. У підвищенні (вивільненні) TGFβ після часткової гепатектомії провідну роль відіграє позаклітинний матрикс, а точніше його розщеплення. Незважаючи на те, що рівень TGFβ підвищується вже через 5 год після часткової гепатектомії, одночасна присутність інгібіторів TGFβ та шляхів передачі сигналу від його рецепторів запобігають завчасній термінації регенерації. Передача сигналу від рецептора TGFβ відбувається за посередництва білків SMAD, які при зв'язуванні ліганда фосфорилюються та утворюють мультибілкові комплекси, які беруть участь у регуляції транскрипції генів-мішеней TGFβ. Паралельно із підвищенням рівня TGFβ в печінці після ЧГЕ також збільшується рівень білків-інгібіторів SMAD, SKI-Like Proto-Oncogene та SKI Proto-Oncogene, які перешкоджають активації TGFβ-залежних генів. Поряд з тим до кінця регенерації інгібування білків SMAD знімається, що веде до термінації регенераційного процесу [79]. Певний інгібуючий ефект здійснює і α2-макроглобулін, який з'єднується з вільним TGFβ та перешкоджає його активності [80].

Хоча нокаут гена рецептора TGFβ в гепатоцитах не впливає на ефективність термінації регенерації, паралельний нокаут гена рецептора активіну призводить до інгібування термінації і наступного раунду синтезу ДНК в гепатоцитах [81,82].

В контексті регуляції ініціації/термінації регенерації під дією HGF/TGFβ, перебудова позаклітинного матриксу відіграє провідну роль. Розщеплення матриксу на початку регенерації веде до звільнення та активації HGF, а під час завершення регенерації новосинтезований матрикс зв'язує і блокує HGF, що поряд із дією TGFβ та активіну призводить до термінації регенерації. Позаклітинний матрикс є не лише місцем зберігання

факторів росту та цитокінів, компоненти матриксу самі по собі здатні передавати регуляторний сигнал. Дослідження, в яких було інактивовано інтегрин-звязуючу кіназу, тим самим перервано передачу сигналу від інтегрину, засвідчили підвищену проліферацію гепатоцитів та епітелію жовчних протоків. Це свідчить на користь антипроліферативного впливу позаклітинного матриксу на гепатоцити [83].

Сигнальний шлях JAK/STAT є дуже важливим для ініціації регенерації печінки, через який, зокрема, діє IL-6. Інгібування даного шляху (за механізмом негативного зворотнього зв'язку) також вносить свій вклад у термінацію регенерації печінки. Даний механізм забезпечується білками SOCS (Suppressors of Cytokin Signaling), експресія яких зростає після ЧГЕ під дією IL-6 [84]. Білки SOCS можуть блокувати передачу сигналу від IL-6 і інших цитокінів. Крім того, IL-6 через індукцію білка PAI, який блокує перетворення про-HGF в активний HGF, може приймати участь в зупинці проліферативної відповід [85].

1.2.7. Баланс між проліферативними та проапотичними сигналами під час регенерації печінки. Під час регенерації спостерігається певний баланс між проліферативними та антипроліферативними (проапоптичними) сигналами. Порушення балансу між цими факторами призводить до серйозних ушкоджень печінки, які можуть бути несумісними з життям всього організму.

Оскільки регуляторні процеси в печінці, у тому числі за умов регенерації досить складні, нерідко дія одного і того ж фактора може змінюватися на протилежну. І це залежить від активості його позитивних або негативних регуляторів. Наприклад, TNFα викликає апоптоз у культивованих гепатоцитах, проте на початку регенерації такого не відбувається [86]. Це залежить від того, чи буде активуватися транскрипційний фактор NF-kB під дією TNFα. Активований NF-kB, окрім регуляції експресії генів, веде до збільшення NO синтази. Оксид азоту має протекторні властивості для гепатоцитів [87]. Під час регенерації активація

NF-kB залежить не лише від індукції TNFα, а й від Akt кіназного шляху, який в свою чергу активується рецепторами MET та EGFR після зв'язування із своїми лігандами [88]. Експерименти з нокаутними тваринами за даними рецепторами показали, що, на відміну від виживання гепатоцитів, відбувається індукція експресії проапоптичних та супресія антиапоптичних генів [89]. Це наводить на думку, що сигнали HGF та лігандів EGFR захищають клітини печінки від TNFα-індукованого апоптозу під час регенерації. В нормі рецептор HGF – MET зв'язується із Fas на поверхні мембрани і не дає йому утворювати функціональний тример. Навпаки, зниження рівня MET, , призводить до активації Fas. Крім того, TNFα безпосередньо індукує експресію MET в клітинних лініях гепатоцитів, що також залежить від активації NF-kB [90].

1.3. Імунна система та регенерація органів

1.3.1. Участь імунної системи в регенерації органів. Відновлення тканин і органів у різних організмів, від гідри до ссавців, супроводжується активним залученням імунної системи. Ушкодження тканини супроводжується активацією вродженого імунітету, що захищає організм проти інфекційних агентів. Після ідентифікації ушкодженої ділянки, тромбоцити та лейкоцити мігрують в зону ураження, де вивільняють прозапальні цитокіни та ростові фактори, які діють на наступних етапах процесу відновлення і сприяють руйнуванню позаклітинного матриксу, ангіогенезу та проліферації. Численні дослідження вказують на те, що участь імунної системи у відновлювальних процесах не обмежується захисними реакціями проти патогенів або продуктів ушкодженої тканини. Компоненти імунної системи відіграють важливу роль у самому процесі

регенерації. Характер участі імунної системи у регенерації задежить від виду організму, органу, що пошкоджений. Наприклад, регенерація крищталика ока у тритона після пошкодження відбувається через елімінацію пошкодженої тканини та її заміщення клітинами, які походять від пігментних клітин. Процес регенерації супроводжується системною відповіддю і залежить від міграції активованих дендритних клітин до селезінки [91]. Важливим етапом у відновленні кришталика також є міграція макрофагів до сайту ураження. Участь макрофагів важлива і для регенераційних процесів інших органів. Так, зниження рівня макрофагів при регенерації кінцівок у водяної саламандри призводить до затягування рани із утворенням фіброзних шрамів, проте не до утворення нових функціональних тканин[92].

Як було показано на моделі регенерації тканин у ембріонів ссавців, здатність до регенерації знижується із дозріванням імунної системи під час онтогенезу. Дослідження на мишах, нокаутних за транскрипційним фактором Pu1, який необхідний для розвитку нейтрофілів та макрофагів із клітин попередників, засвідчили, що при пошкодженні шкіри зниження запальних процесів в зоні ураження призводить до дещо сповільненої елімінації пошкодженої тканини, проте в такому випадку відбувається загоювання рани без утворення фіброзного шраму [93,94].

Активація імунної системи впливає не лише на якість відновлювальних процесів, а також на потенціал до регенерації. Під час рефрактивного періоду розвитку пуголовка відбувається тимчасове пригнічення регенерації хвоста після його ампутації, а саме - не утворюється бластема в зоні ураження. Особливістю даного періоду є активація розвитку імунної системи та експресія Т-клітинного рецептора. Поряд з тим застосування імуносупресорів повертає здатність до регенерації під час цього періоду, що свідчить про негативний вплив імунної системи на регенерацію в цій системі [95].

1.3.2. Участь системи вродженого імунітету в регенерації печінки. Ранній етап регенерації печінки характеризується активацією системи вродженого імунітету. TNFα та IL-6, які описано раніше в даній роботі, є одними з найбільш охарактеризованих цитокінів імунної системи при регенерації печінки. TNFα продукується активованими макрофагами, CD4+лімфоцитами, NK клітинами і бере участь у системному запаленні і реакції гострої фази. TNFα є пірогеном – індукує лихоманку, також запускає апоптоз, має протипухлинні і противірусн і властивості [96]. IL-6, цитокін імунної системи, секретується Т-клітинами і макрофогами і відіграє важливу роль у запальних реакціях і стимулює імунну відповідь, впливає на зміну температури тіла під час інфекції. IL-6 має також протизапальні властивості через інгібування TNFα і IL-1, а також активує IL-10 [97]. Важливість TNFα та IL-6 для регенерації печінки не викликає сумнівів, проте, як відбувається їхня активація? Ситуація з IL-6 більш-менш зрозуміла – активація експресії відбувається під дією TNFα. У свою чергу, активація TNFα може регулюватися білками системи комплементу, точніше продуктами їх розщеплення, зокрема C3a і C5a, рівень яких також зростає після ЧГЕ. У нокаутних тварин за білками C3 і C5 після ЧГЕ не спостерігають підвищення рівня TNFα та IL-6, а також активації залежних від них генів [9]. Одним із активаторів системи комплементу після ЧГЕ є IL-4, що є також цитокіном імунної системи. IL-4 продукується NKT клітинами, кількість яких збільшується в печінці після ЧГЕ. Було показано, що активація комплементу під дією IL-4 в значній мірі опосередковується накопиченням IgM в паренхімі печінки. Таким чином, IL-4 опосередковано впливає на активацію TNFα та IL-6 після ЧГЕ [6].

Ліпополісахариди, що входять до складу клітинної стінки мікрофлори кишківника, можуть також робити внесок в активацію системи вродженого імунітету в печінці після ЧГЕ. Печінка, як орган, що постійно зазнає впливу ліпополісахаридів, має певний рівень толерантності до них [98]. Проте, після ЧГЕ частка портального кровообігу на одиницю маси печінки

зростає і відповідно концентрація ліпополісахаридів також підвищується, що може бути причиною зниження толерантності з боку печінки. Хоча у тварин, в яких спостерігається точкова мутація в рецепторі TLR4, і які не чутливі до дії ліпополісахаридіа, регенерація проходить нормально. Проте нокаут за геном Myd88, що кодує адаптерний білок передачі сигналу від TLR4, блокує активацію TNFα і IL-6 та експресію залежних від них генів, що вказує на те, що, можливо інші ліганди/сигнальні каскади, які діють на даний адаптерний білок, беруть участь у регуляції регенерації [99].

Активація імунної системи на ранній стадії регенерації печінки є важливою умовою дедиференціації гепатоцитів та проходження ними клітинного циклу. Наразі існує багато даних стосовно залучення імунної системи у відновленні печінки, проте, ми ще далекі від повного розуміння механізму її дії і взаємодії з іншими факторами регенераційного процесу. Незважаючи на те, що IL-6, TNFα, IL-4, C3a, C5a синтезуються різними клітинами, мають різні механізми передачі сигналів та різні кінцеві ефектори, їх поєднує здатність регулювати, точніше стимулювати, запальні процеси. Серед факторів вродженого імунітету IFNα відомий як один із найпотужніших. Беручи до уваги підвищення активності IFNα впродовж перших 3-х год після ЧГЕ, можна припустити, що він також залучений у регуляції відновлення печінки. Проте як IFNα може впливати на регенерацію? IFNα реалізує свій вплив на клітини-мішені здебільшого шляхом регуляції експресії генів. З однієї сторони можна припустити, що знаючи гени-мішені IFNα, можна спрогнозувати відповідь клітин на нього. Проте з іншого боку, IFNα регулює експресію великої кількості генів, продукти яких беруть участь у різноманітних клітинних процесах, а функціональні наслідки впливу IFNα на клітини можуть бути діаметрально протилежними, наприклад, від апоптозу клітин до сприяння проліферації. Даний феномен залежить від типу клітин, на які діє IFNα, від концентрації IFNα та триваласті дії, що в кожному випадку веде до експресії унікального

набору генів, що і забезпечує конкретний фенотип... Для того, щоб оцінити участь IFNα у регенерації печінки, потрібно знати набір генів, що регулюються ним після часткової гепатектомії. Дослідження генів, що безпосередньо регулюються IFNα в печінці, яка регенерує, дуже ускладнюється тим, що після операції в тканині печінки та плазмі крові присутні різноманітні цитокіни, фактори росту, які також діють на клітини печінки і ускладнюють виокремлення складової IFNα із загальної регуляторної мережі. Як варіант, можна дослідити вплив IFNα на окремі популяції клітин печінки *in vitro* за умови дотримання клітин в стані, наближеному до квазіфізіологічного, тобто з використанням концентрації IFNα, аналогічної тій, яка визначається в печінці, що регенерує, і тривалості культивування, яка відповідає тривалості активності IFNα після операції.

Приймаючи до уваги літературні дані щодо участі системи вродженого імунітету у регуляції регенерації печінки і IFNα як потужного цитокіна цієї системи, ми поставили питання про участь IFNα у відновленні тканини. На наш погляд літературні дані з цього питання обмежені з двох причин. По-перше, IFNα у терапевтичних (високих) дозах відомий як антиполіферативний фактор і тому призначається при лікуванні деяких онкозахворювань. Цей факт не спонукав науковців до дослідження участі IFNα в ініціації регенераційного процесу. По-друге, надлишковий характер дії численних цитокінів і ростових факторів, ускладнює інтерпретацію результатів експериментів на нокаутних тваринах. Однак, ключова роль печінкових макрофагів у ініціації регенерації давно відома. В попередній роботі лабораторії системної біології спостерігали підвищену біологічну активність IFNα після операції часткової гепатектомії, а в роботі дослідницької групи з Китаю, показано активацію внутрішньоклітинних шляхів передачі сигналів від рецептору IFNα/β [74]. Зважаючи на клітиноспецифічну відповідь на дію IFNα, а також на залежність характеру відповіді від концентрації IFNα та тривалості його дії, припустили, що дія

IFNα на початкових стадіях регенерації може відрізнятися від усталеної антипроліферативної. Для отримання доказів залучення IFNα у регуляції регенерації печінки планувалося дослідили вміст мРНК *Ifnα* у зразках печінки, гепатоцитах і непаренхімних клітинах впродовж перших 12-ти годин після часткової гепатектомії та реакції гострої фази після лапаротомії. Як було зазначено, функції IFNα опосередковуються його генами-мішенями. Для з'ясування генів-мішеней IFNα під час відновлення печінки ми вирішили спочатку дослідити зміни у транскриптомі первинних гепатоцитів в умовах короткочасного впливу (не більше 6 годнн) IFNα в концентрації, яку було визначено в печінці в попередній роботі, За результатами дослідження транскриптому планувалось обрати групу генів ранньої відповіді і визначити їхню експресію у печінці після часткової гепатектомії і лапаротомії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об’єкт дослідження

Об’єктом дослідження була печінка після часткової гепатектомії і лапаротомії, гепатоцити та непаренхімні клітини печінки, а також первинна культура гепатоцитів від інтактних щурів. В дослідах використовували білих безпородних щурів 4-х -5-и місячного віку масою 200 – 250 г. Тварин утримували у віварії на стандартному харчовому раціоні для гризунів і в умовах стандартного світлового режиму. На кожну експериментальну точку ми брали від 3-х до 5-и щурів. Для моделювання регенераційного процесу в печінці проводили класичну операцію часткової гепатектомії, а для моделювання реакції гострої фази – операцію лапаротомії (розрізання та зашивання черевної порожнини). Частка печінки, що виділялася в процесі часткової гепатектомії, слугувала контролем для тієї ж печінки печінки через певний час після ЧГЕ, таким чином ми враховували індивідуальну особливість кожної із тварин. Клітини виділяли із печінки інтактних та прооперованих тварин через 1, 3, 6 і 12 год після хірургічного втручання. З огляду на циркадні ритми тварин після обох операцій забивали вранці (8 – 10 год).

2.2. Реактиви і обладнання, використані в роботі

Використані реактиви. Під час дослідження було використано солі KCl, NaCl, MgCl2, CaCl2, MnCl2, натрію фосфат одно- та двозаміщений,

калію ацетат, натрію ацетат, етилендиамінтетраацетату динатрієва сіль (Sigma, США), гуанідину ізотіоционат (Merck, Швейцарія); буферні сполуки трис-оксиметиламінометан (Merck, Швейцарія), HEPES, MOPS (Sigma-Aldrich, США); детергенти додецилсульфат натрію (SDS); кислоти оцтову, соляну, ортофосфорну (Реахім, Україна) борну (Helicon, Росія); спирти етанол, метанол, ізоаміловий спирт (Реахім, Україна), гліцерол, фенол з буфером (pH 8,0) (Merck, Швейцарія), гідрохінон (Sigma, США); дитіотриетол (ДТТ), гідроксид натрію, гідроксид калію.

Ензими: колагеназа IV типу (Seromed, Німеччина), проназа (Merck, Німеччина), РНК-аза А, Т4 ДНК-лігаза, лужна фосфатаза з креветки «SAP», Т4 полінуклеотид кіназа «Т4-PNK» ендонуклеази рестрикції HindIII та XbaI від MBI Fermentas (Литва).

Для електрофорезу були використані: агароза, вільна від РНКаз, (Gibco BRL, США), агароза з високою роздільною здатністю “TopVision™ Agarose” (MBI Fermentas, Литва), етідію бромід, буфер для внесення зразків ДНК “5x Loading Dye”, буфер для внесення зразків РНК “2x RNA Loading Dye” маркер молекулярних мас ДНК “Gene ruller™ 50 bp DNA Ladder”, маркер молекулярних мас ДНК “Gene ruller™ 100 bp DNA Ladder”, маркер молекулярних мас ДНК “Gene ruller™ 1 kb DNA Ladder” (MBI Fermentas, Литва); буфер для електрофорезу ДНК (ТВЕ pH 8,0); 50-кратний буфер для електрофорезу РНК (1М MOPS, 50 мМ Na2-ЕДТА).

Для виділення РНК використовували реагент TriZOL® (Invitrogen, США), набір реактивів для очищення ДНК із реакційних сумішей «QIAquick® Spin DNA Purification Kit» (Quiagen, США), набір реактивів для виділення ДНК із агарозного гелю «GeneJet Gel Extraction Kit» (MBI Fermentas, Литва), набір для виділення плазмідної ДНК «GeneJet Plasmid Isolation Kit» (MBI Fermentas, Литва).

Для проведення реакції зворотної транскрипції використовували набір «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific, Литва)

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції були використані термофільна ДНК полімераза «Taq-polymerase», 10х буфер для ПЛР «10х CoralLoad PCR Buffer», 25 mM MgCl2, розчин чотирьох дезоксирибонуклеозидтрифосфатів «10mM dNTPs Mix» (MBI Fermentas, Литва). Для полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі використовували набір реактивів для ПЛР у реальному часі з SybrGreen у присутності референтного барвника Rox 2,5х «Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ с Taq ДНК-полимеразой и ингибирующими активность ензима антителами в присутствии SYBR Green I и референтного красителя ROX», а також олігонуклеотиди для ПЛР (Синтол, Росія).

У роботі також використовували вектори pUC19, pGL3basic pGEM-3z (Promega, США).

Для отримання компетентних клітин використовували розчини TFBI (30 мМ CH3COOK, 50 мМ MnCl2, 10 мМ CaCl2, 100 мМ KCl, 15 % гліцерол, pH 5,8) та TFBII (10 мМ MOPS, 75 мМ CaCl2, 10 мМ KCl, 15 % гліцерол, pH 6,5).

Під час дослідження також використовували таке обладнання:

-вимірювальні прилади: спектрофотометри «Biomate 5» (Thermo Scientific, США), «NanoDrop» (NanoDrop technologies, США), pH-метр «Ионометр универсальный ЭВ-74» (СРСР);

-центрифуги: настольна центрифуга «MiniSpin®» (Eppendorf, Німеччина), центрифуга з охолодженням «5804R» (Eppendorf, Німеччина), мікроцентрифуга-вортекс «FV-2400» (Biosan, Латвія);

-термостати: електричний термостат сухоповітряний «ТС-80М-2» (Медлабортехніка, Україна), твердотільний термостат «Bio TDB-100» (Biosan, Латвія), твердотільний термостат-струшувач «Bio TS-100» (Biosan, Латвія), термостат-орбітальний струшувач S150 (Stuart, США), термоміксер EppendorfThermomixerComfort (Німеччина);

-прилади для ПЛР: ампліфікатор «MasterCycler» (Eppendorf) та прилад для ПЛР у реальному часі «CFX96» (Bio-Rad, США);

-обладнання для електрофорезу та електроперенесення: джерело живлення для електрофорезу «PowerPac Basic Power Supply», камери для горизонтального електрофорезу «Wide Mini-Sub GT Cell»Bioanalizer 2100 (Agilent , США);

-інше обладнання: магнітні мішалки з підігрівом «ММ6» (Polmed, Польща).

-станція для гібридизації (Hybridization oven 640, Affymetrix, США) і промивки мікроареїв (FluidicStation 450, Affymetrix, США), сканер для мікрареїв (Affymetrix, США).

2.4. Методи дослідження

2.4.1.Техніка ізолювання печінки і виділення гепатоцитів і непаренхімних клітин. Операції ЧГЕ і ЛАП проводили за модифікованою методикою Хіггінса та Андерсона [65]. Обидві операції проводили під ефірним наркозом. Протоколи всіх маніпуляції з тваринами було погоджено з комітетом з біоетики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ (Протокол № 8 від 20.09.2016 р.). Вексперименах, де використовували зразки тканини печінки, тварин наркотизували ефіром і декапітували. Печінку видаляли після промивки її фізіологічним розчином через портальну вену, щоб видалити клітини крові. Як контроль використовували печінку інтактних тварин і частки інтактної печінки, що видаляли в процесі ЧГЕ.

Клітини печінки виділяли і розділели методом перфузії органу через портальну вену розчином колагенази з подальшим розділенням гепатоцитів та непаренхімних клітин шляхом диференційного центрифугування. Тварин анестезували в/м кетаміном і ксилазіном. Перфузію печінки проводили

розчином 1 в складі 140 мМ NaCl, 4,5 мМ KCl, 9,2 мМ HEPES, 0,5 мМ EGTA, pH 7,6, протягом 5 хв, в подальшому розчин 1 міняли на розчин 2 (140 мМ NaCl, 4,5 мМ KCl, 9,2 мМ HEPES, 5 мМ $CaCl_2$, 0,05% колагеназа, pH 7,6) і перфузію продовжували протягом 20 хв до появи ознак деструкції міжклітинних зв'язків. Температура розчинів для перфузії підтримувалася на рівні 37 ºС. З самого початку перфузії печінку виокремлювали від зв'язок з іншими органами і обережно виділяли із тіла тварини, весь час продовжуючи перфузію. Після закінчення перфузії розривали Глісонову капсулу гострими пінцетами та "випотрошували" клітини в середовище RPMI 1640 з 5 % ЕТС. Суспензію клітин фільтрували через 300 мкм нейлоновий фільтр у дві 50 мл центрифужні пробірки і центрифугували 30 сек при 150 g. Надосадову рідину, що містить непаренхімні клітини, відбирали у 500 мл колбу. Осад кожної пробірки ресуспендували в 50 мл середовища RPMI 1640 із 5 % ЕТС і повторювали центрифугування. Осад гепатоцитів із кожної пробірки суспендували у 5 мл середовища RPMI 1640 з 5 % ЕТС, нашаровували на градієнт перколу – 73 % (4 мл), 57% (6 мл), 30 % (4 мл) і центрифугували при 1000 g, 30 хв. Шар гепатоцитів, який утворювався між шарами перколу 73 % – 57 %, відбирали, суспендували у 40 мл середовища RPMI 1640 з 5 % ЕТС і центрифугували 30 сек при 150 g. Життєздатність клітин оцінювали пробою з трипановим синім (рис, 2.1 *а*), кількість клітин визначали в гемоцитометрі, користуючись формулою: Кількість клітин в 1мл = середня кількість клітин в одному квадраті * 2 * 10000. Клітини аліквотували та заморожували при – 80 °С.

До суспензії з непаренхімними клітинами додавали ДНКазу І та проназу Е до кінцевої концентрації обох ензимів 0,005 % та інкубували суміш 20 хв при 37 ºС в термостаті при постійному перемішуванні. Кожні 2 хв pH контролювали лакмусовим папером та при необхідності доводили до pH 7,3 - 7,6. Після цього суспензію фільтрували через 70 мкм нейлоновий фільтр у 50 мл центрифужні пробірки. Суспензію центрифугували 7 хв при 750 g в центрифузі К-23. Надосадову рідину відбирали, осад суспендували

у середовищі RPMI 1640 загальним об’ємом 3 мл. Кількість життєздатних клітин оцінювали за здатністю клітин сприймати трипановий синій івизначали за формулою, що наведена вище. Суспензію клітин аліквотували, центрифугували 2 хв при 750 g, відбирали надосадову рідину, а клітини заморожували і зберігали до подальшого використання при – 80 ºС (рис 2.1. *а*).

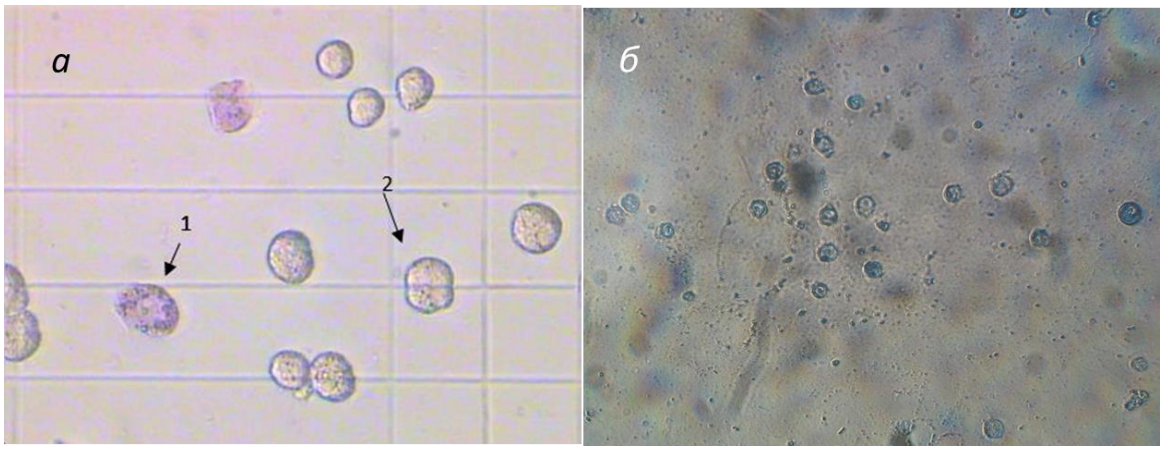


Рис. 2.1. Мікроскопія у світлому полі ізольованих клітин печінки. *а* – гепатоцити, пофарбовані трипановим синім: 1 - мертвий гепатоцит, 2 - живий гепатоцит. *б* – непаренхімні клітини. Збільшення 225х

2.4.2. Виділення і характеристика РНК. Для виділення РНК із тканини печінки 100 мг тканини розтирали у рідкому азоті до стану порошку і лізували в 1 мл реагенту TRIzol®, залишки тканини видаляли шляхом центрифугування протягом 10 хв при 12000 g і 4 °С. До гепатоцитів та непаренхімних клітини у кількості $2*10^6$ клітин додавали 1 мл реагенту TRIzol®. Отримані лізати інкубували 5 хв за кімнатної температури, після чого додавали 200 мкл хлороформу, ретельно перемішували та інкубували на льодяній бані 3 хв, після чого фази розділяли центрифугуванням 15 хв при 12000 g за 4°С. Водну фазу переносили до нової пробірки і осаджували РНК додаванням 50 мкл ізопропанолу. Після інкубації впродовж 10 хв за температури 15 °С пробірки центрифугували 15 хв при 12000 g за 4 °С. Осад РНК промивали

75 % етанолом, висушували та розчиняли у 100 мкл стерильної дейонізованої води, вільної від РНКаз. Кількість виділеної РНК і наявність в ній домішків білків і вуглеводів визначали за оптичною густиною розчинів при 260 нм і за співвідношенням А260/А280 та А260/230. Цілісність РНК – за співвідношенням інтенсивності смуг 28S/18S рРНК на електрофореграмі після форезу в 1 % агарозному гелі.

Якість РНК, призначену для експерименті з мікроареями ДНК, визначали на Bioanalyzer-2001 (Agilent, США) (див. нижче).

2.4.3. Синтез РНК для зовнішнього контролю за ефективністю реакції ЗТ-кПЛР. Важливим моментом при визначенні концентрації досліджених мРНК методом ЗТ-кПЛР є контроль за ефективністю реакцій зворотної транскрипції та ланцюгової полімеризації. Щоб контролювати ці два етапи було використано зовнішній контроль – РНК транскрипт фрагменту гена люциферази світлячка (Luc). Для цього було заклоновано фрагмент гена люциферази у вектор pGEM-3z під промотор Sp6 полімерази, провели транскрипцію і отриману РНК використовували в якості зовнішнього контролю в реакції ЗТ-кПЛР.

2.4.3.1. Створення рекомбінантної плазміди з фрагментом гена люциферази світлячка. Для контролю за ефективністю реакції ЗТ-кПЛР використовували фрагмент гена люциферази світлячків (Luc). Його послідовність відсутня в геномі щура за даними NCBI, які проаналізовано нами з використанням програми BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Фрагмент гена *Luc* вирізали із плазміди pGL3-Basic за рестрикційними сайтами HindIII та XbaI у 40мкл реакційної суміші, що містила 2 мкг плазміди, 4 мкл 10х реакційного буфера (Thermo Scientific) для відповідних рестриктаз, деіонізовану воду, та 20 Од активності кожної з рестриктаз (Thermo Scientific). Вектор pGEM-3z розрізали тими ж рестриктазами за аналогічних умов. Продукти рестрикції розділяли електрофорезом у 1 % агарозному гелі. Смуги, що відповідали лінеарізованому вектору та вставці (довжина 1690 п.н.)

вирізали із гелю та очищали за допомогою GeneJet Gel Extraction KIt (Thermo Scientific) згідно інструкції виробника.

Вектор і вставку лігували у суміші об'ємом 20 мкл, що містили 100 нг векторної ДНК, 200 нг ДНК вставки, 10х T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Scientific), деіонізовану воду та 1 мкл (5 U) T4 DNA Ligase. Суміш інкубували при 22 °С 1 годину.

2.4.3.2. Клонування фрагменту гена люциферази світлячка. Для підготовки компетентних клітин E. coli до трансформації 100 мл 3-годинної культури центрифугували впродовж 10 хв при 2000 g за 0 ˚С, осад ресуспендували у 25 мл холодного розчину TFBI, іще раз центрифугували і осад ресуспендували у 5 мл холодного розчину TFBII. Суспензію розподіляли по 200 мкл у холодні стерильні пробірки та заморожували у рідкому азоті. Заморожені клітини зберігали для подальшого використання за температури – 70 ˚С.

Компетентні клітини E. Coli Xl-Blue, 200 мкл, разом з 10 мкл лігазної суміші інкубували 30 хв на льоду, проводили тепловий шок, 90 сек 42 °С, охолоджували 2 хв на льоду, додавали 800 мкл середовища SOC та інкубували 30 хв, 37 °С і по 200 мкл висівали на чашки Петрі із 100 мкг/мл ампіциліну.

На скринінг за допомогою ПЛР брали 10 колоній бактеріальних клітин. Скринінг проводили з праймерами до фрагменту гена Luc. На 15 мкл ПРЛ суміші брали по 3 пмоль кожного із праймерів (Luc_a та Luc_s), 1,5 мкл 10х буфера для Taq полімерази (Thermo Scientific), 1,2 мкл 25 мМ $MgCl_2$, 1,2 мкл 2 мМ dNTP та 1,5 Од активності Taq полімерази (Thermo Scientific). Ампліфікація складалася з первинної денатурації, 4 хв, 94 °С, та 30 циклів з денатурацією 15 сек при 94 °С, і відпалюванням/полімеризацією 30 сек при 60 °С,

Отриману конструкцію – pGEM-3z+Luc виділяли у препаративній кількості із 60 мл бактеріальної суспензії. Клітини осаджували та промивали 30 мл холодного STE буфера (0,1 М NaCI, 10 мМ Tpic-HCI pH

8,0, 1 мМ EDTA, pH 8,0). Осад суспендували у 4,5 мл розчину Р-1 (50 мМ глюкоза, 25 мМ Tpic-HCI, pH 8,0, 10 мМ EDTA), клітини лізували додаванням 10 мл розчину Р-2 (0,2 М NaOH, 1 % SDS) та інкубували 5 хв при кімнатній температурі. Потім додавали 7,5 мл холодного розчину Р-3 (3 М ацетат калію, 10 % оцтова кислота) та інкубували 15 хв на льоду. Суміш центрифугували 10 хв 10000 g, 4 ˚С. Надосадову рідину фільтрували через два шари фільтрувального паперу, додавали 25 мл ізопропанолу, інкубували 10 хв при кімнатній температурі та центрифугували 10 хв при 4 ˚С і 15000 g,. Осад суспендували в 3 мл холодного ізопропанолу, переносили в 1,5 мл пластикові пробірки та центрифугували в настільній центрифузі 5 хв при 10000 g. Осад розчиняли в 400 мкл ТЕ буфера (10 мМ Tpic-HCI pH 8,0, 1 мМ EDTA pH 8,0) та додавали 400 мкл холодного 5 М LiCI, добре перемішували та центрифугували 10 хв при 10000 g і 4 °С. До надосадової рідини додавали 3 обєму 96 % етанолу та 1/9 частину 3 М ацетату натрію та центрифугували при 10000 g 10 хв при 4 °С. Осад розчиняли у 200 мкл ТЕ буфера, додавали 200 мкл суміші фенол:хлороформ:ізоаміловий спирт (25:24:1), перемішували та центрифугували 3 хв при 10000 g. Водну фазу відбирали, додавали до неї 600 мкл холодного 96 % етанолу, 1/9 частину 3 М ацетату натрію та центрифугували в настільній центрифузі 10 хв при 10000 g. Осад розчиняли у 200 мкл 10 мМ Tpic-HCI pH 8,0. Концентрацію ДНК визначали за оптичною густиною при λ=260 нм, а чистоту препарата за співвідношенням А260/А280 та А260/А230. 1 мкл препарату плазміди аналізували електрофорезом в1 % агарозному гелі (рис. 2.2. *б*).

2.4.3.3. Транскрипція рекомбінантної плазміди pGEM-3z+Luc. 10 мкг конструкції pGEM-3z+Luc лінеарізували за допомогою рестриктази EcoRI (Thermo Scientific). Після рестрикції додавали 3 обєму 96 % етанолу та 1/9 частину 3 М ацетату натрію та центрифугували 10000 g 10 хв 4 °С. Осад розчиняли у 20 мкл води, що оброблена ДЕПК. На реакцію *in vitro* транскрипції у 50 мкл суміші брали 1 мкг рестриктованої pGEM-

3z+Luc, 10 мкл 10 мМ dNTP, 10 мкл 5х IVT буфера (Thermo Scientific), 1,25 мкл інгібітора рибонуклеаз – Ribolock (Thermo Scientific) та 30U SP6 РНК-полімерази. Суміш інкубували 2 год при 37 °С, після чого додавали 2 Од активності ДНКази І та інкубували впродовж 15 хв при 37 °С. Продукт транскрипції *in vitro* очищали додаванням 80 мкл води, що оброблена ДЕПК, 15 мкл 3 М ацетату натрію, 5 мкл лінійного поліакриламіду, та 1 об'єм суміші фенол:хлороформ:ізоамілового спирту (25:24:1), перемішували та центрифугували 5 хв при 4 °С і 10000 g . До водної фази додавали 1 об'єм хлороформу і повторювали центрифугування. До водної фази додавали 3 об'єми 96 % етанолу, 1/9 частину 3 М ацетату натрію та центрифугували в настільній центрифузі 10 хв при 10000 g і 4 °С. Осад розчиняли у 30 мкл води, обробленої ДЕПК.

2.4.3.4. Характеристика РНК для зовнішнього контролю за ефективністю реакції ЗТ-кПЛР. Після *in vitro* транскрипції цілісність отриманого транскрипту було перевірено в агарозному гелі (рис 2.2. *б*). Як видно із результатів наведених електрофореграм, після *in vitro* транскрипції довжина транскрипту Luc відповідає довжині фрагменту відповідного гена, що був заклонований у вектор pGEM-3z (рис. 2.2. *а, б*). Внаслідок ампліфікації кДНК транскрипту Luc утворюється амплікон з очікуваною довжиною, 154 п.н. (рис. 2.2. *г*).

2.4.4. Реакція зворотної транскрипції і кількісної ланцюгової полімеризації (ЗТ – кПЛР). Суміш для реакції зворотної транскрипції містила 4 мкг РНК у 10 мкл, 3 мкл (200 нг) екзогенного контролю *Luc* та 0,2 мкг випадкових праймерів (Укрмедспілка). Суміш інкубували 5 хв при 70 ºС і охолоджували для відпалювання праймерів. Потім послідовно додавали 4 мкл 5х реакційного буферу M-MuLv (250 мМ Трис-HCI, pH 8,3, 250 мМ KCI, 250 мМ $MgCI_2$, 50 мМ ДТТ) (Fermentas), 1 мкл 10 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів і 20 Од. активності інгібітора РНКази. Суміш інкубували 10 хв при 25 ºС, потім додавали 1 мкл (200 Од. активності) ревертази Revert-Aid M-MuLv (Thermo Scientific, США),

залишали при кімнатній температурі на 10 хв і потім інкубували 1 год при 42 °С. Ензим інактивували шляхом нагрівання 10 хв при 70 °С; кДНК аліквотували і заморожували при – 80 °С.

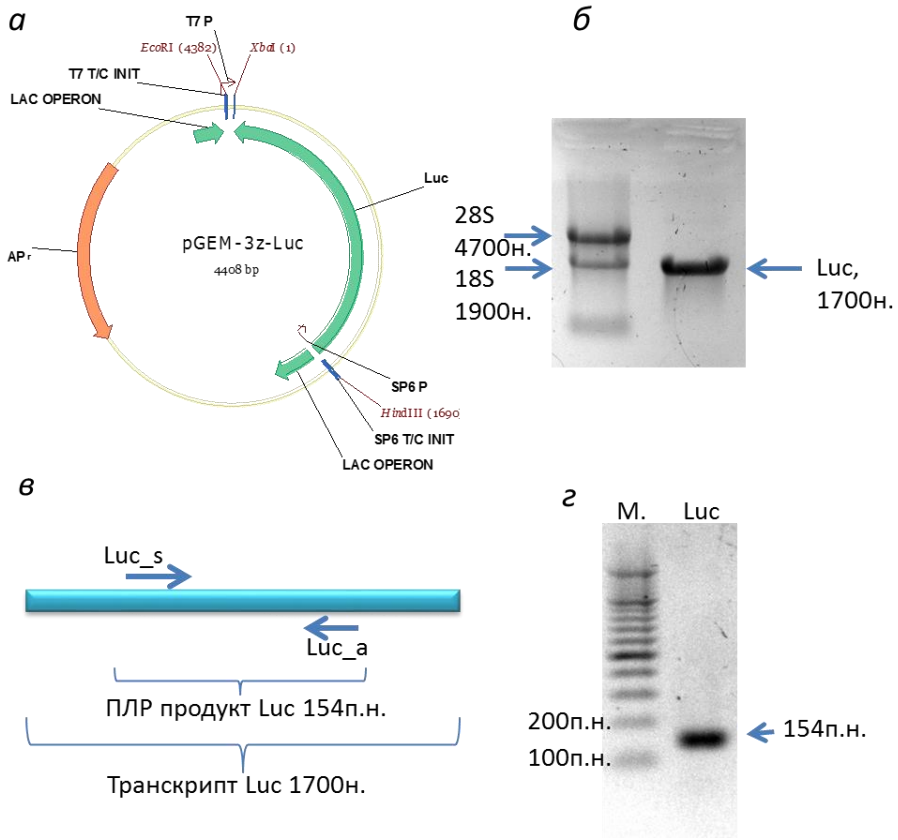


Рис. 2.2. Конструкція рекомбінантної плазміди з фрагментом *Luc* і характеристика *Luc* транскрипту і його амплікону. *а*) Конструкція pGEM-3z-Luc; XbaI та HindIII – сайти клонування фрагмента гена *Luc:* EcoRI – сайт лінеаризації плазміни перед *in vitro* транскрипцією. *б*) Транскрипт фрагменту гена *Luc* (1700 н.) нанесений на гель поряд із тотальною РНК із печінки щура, (28S – 4700 н., 18S – 1900 н.). *в*) Схематичне зображення транскрипту *Luc* та розташування на ньому праймерів. *г*) Електрофореграма амплікону *Luc* ; М – маркер розмірів ДНК

Праймери підбирали до кодуючих регіонів генів у програмі Vector NTI Advence Suite 10.0 таким чином, щоб хоч один із праймерів перекривав стик двох екзонів, щоб уникнути ампліфікації ДНК.

Реакцію ПЛР у реальному часі проводили у 25 мкл суміші, що містила 1х реакційну суміш для проведення кПЛР з Taq ДНК-полімеразою за присутності SYBR Green I і референтного барвника ROX, 5 пмолів кожного з праймерів та 2 мкл (50 - 100 нг) препаратів кДНК. Реакція ПЛР складалась з початкової денатурації 4 хв, 94 ˚С та дво- або трьох етапних циклів ампліфікації та подовженої кінцевої елонгації, 4 хв, 60 ˚С.

Початкову кількість кДНК обраховували за методом стандартної кривої. Для цього використовували амплікони відповідних генів, які після ПЛР було очищено за допомогою набору GeneJet PCR purification Kit (Thermo Scientific, США). Специфічность ампліконів перевіряли за допомогою рестрикційного аналізу, враховуючи відповідність теоретично передбачених рестриктів отриманим в експерименті (табл. 2.I, Рис. 2.3).

Після вимірювання концентрації кожного з ампліконів готували серійні розведення у концентрації 5 амоль, 0,5 амоль, 0,05 амоль, 0,005 амоль і 0,0005 амоль. На ПЛР брали по 2 мкл кожного із стандартів. Обрахунки результатів проводили за допомогою програми CFX95 (Bio-Rad), графіки було побудовано в програмі Microsoft Excel. Для контролю ефективності реакції зворотної транскрипції та ПЛР між зразками використовували значення порогових циклів екзогенного контролю *Luc.*

Специфічність реакції полімеризації підтверджували наявністю одного максимуму поглинання на кривих плавлення ампліконів і однієї смуги на електрофореграмі (рис. 2.3).

2.4.5. Культивування первинних гепатоцитів. Гепатоцити виділяли із печінки інтактних щурів за протоколом, описаним вище. Після останнього центрифугування надосадову рідину відбирали, осад ресуспендували у 4 мл повного середовища для культивування (Williams E, 50 Од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину, 10 % ЕТС, 10 нМ інсулін,

Таблиця 2.1

Характеристика праймерів і ампліконів

мРНК (Refseq)	Послідовності працмерів	Місце амплікону на кДНК, по	Рестрикційний аналіз ампліконів	
			Фермент п.о.	Рестрикційні фрагменти п.о.
Tbp (NM_001004198.1)	F 5'- TCAGTCCAATGATGCCTTACG - 3' R 5'- CTGCTGCTGCTGTCTTTGTT - 3'	348 - 448	*Hpy 1881*	50; 51
18 S (NR_046237.1)	F 5'- GTTCCGACCATAAACGATGC-3' R5'- CGCTCCACCAACTAAGAACG -3'	1078 - 1341	*HinfI*	175; 67; 24
*Ifna**	F 5' - CTGCTGTCTAGGATGTGACCTGC -3' R 5' - TTGAGCCTTCTGGATCTGCTG - 3'	57 - 225	*HinfI*	81; 46; 42
Isg15 (NM_001106700.1)	F 5′ - CCTCTGAGCATCCTGGTGAG- 3' R5′ - CAGTGGCTCTTT GTCCTCCA - 3'	376 – 546	*PvuII*	58; 113
Ube1l (NM_001106856)	F 5′ - GGGCCTGGGAGTTAGGGATAATGG- 3' R 5′ - CGTCCACCCTGGAGAAGAAGTCGT - 3'	1492 - 1730	*Ear I*	90; 149
Ube2L6 (NM_001024755.1)	F 5′ -ACCAACTTCCCTATCGCCTCAAGG- 3' R 5′ - GAGGTCAGCTAGTTCCAAACGCACA-	591 - 850	*Bgl II*	95; 165
Trim25 (NM_001009536.1)	F 5′ - CGCAAATGTTCCAGGCACAACC- 3' R 5′ -CATCCTCCAGTGCTTTGCTCGCT - 3'	521 - 725	*Rsal*	10; 195
Usp18 (NM_001014058.1)	F 5′ - ATACAACGTGC CATTGTTTGTCC- 3' R 5′ - TCGGTCCAGATTGTGAACAGATC- 3'	496 - 627	*EarI*	48; 84
Irf7 (NM_001033691.1)	F 5'- GCTGAGCGAAGAGGCTGGAAGA - 3' R 5'- CCAGAAAGCAGAGGGCTTGG - 3'	650 - 918	*HaeII*	58; 213
Luc (*In vitro* transcript from pGEM-3z-Luc)	F 5'- AACCCTATTCTCCTTCTTCG - 3' R 5'- ATATCCTTGCCTGATACCTG - 3'	867 - 1020		154

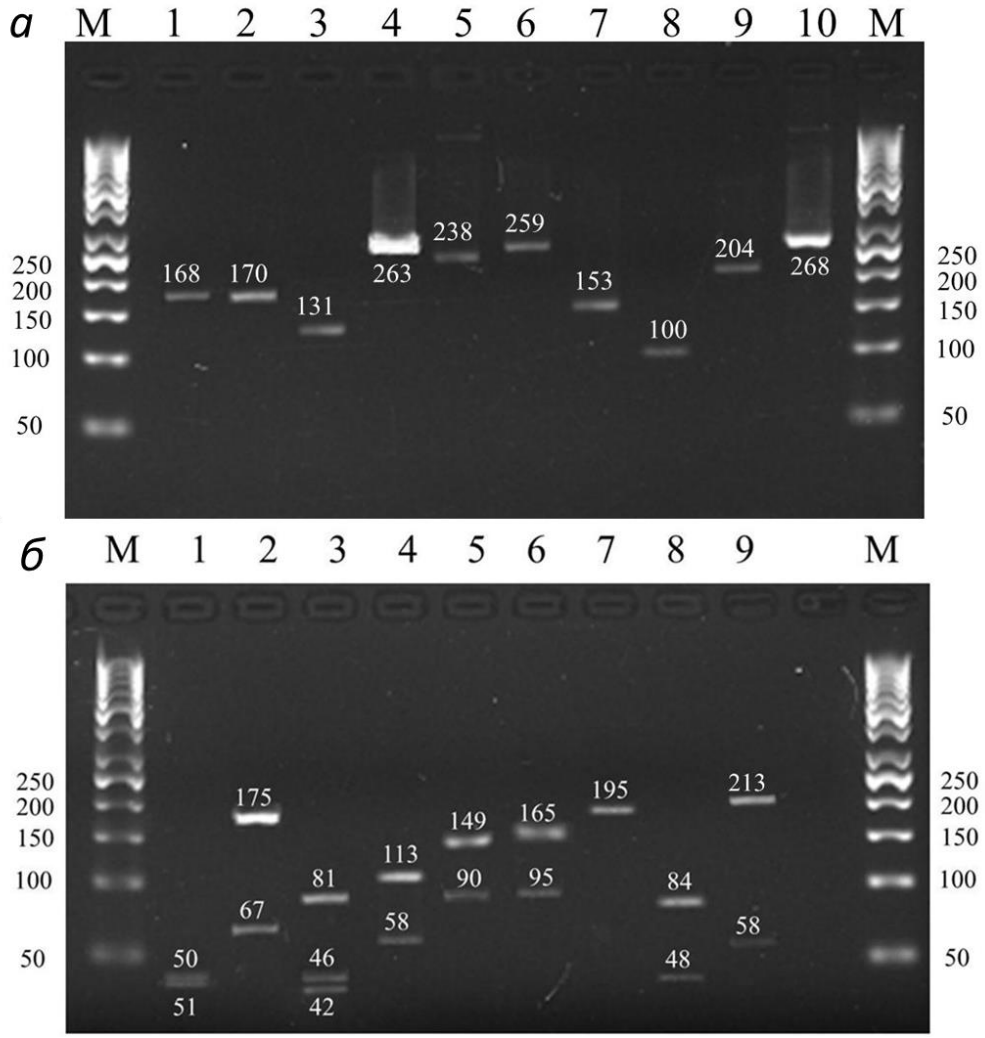


Рис. 2.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації (*а*) та рестрикційних фрагментів ампліконів (*б*). М – маркер молекулярних мас ДНК (50 bp DNA Ledder (Thermo Scientific, Литва)); А) 1 – *Ifna*, 2 – *Isg15*, 3 – *Usp18*, 4 – *18S*, 5 – *Ube1*l, 6 – *Ube2l6*, 7 – *Luc*, 8 – *Tbp*, 9 – *Trim25*, 10 – *Irf7*; Б) 1 – *Tbp*, 2 – *18S*, 3 – *Ifna*, 4 – *Isg15*, 5 – *Ube1l*, 6 – *Ube2l6*, 7 – *Trim25*, 8 – *Usp18*, 9 – *Irf7*

10 нМ дексаметазон, 15 мМ HEPES pH 7,4).

Після підрахування кількості клітин їх розводили повним середовищем Williams E до концентрації $0{,}6\times10^6$ клітин/мл. В кожну чашку Петрі, вкриту колагеном, вносили по $1{,}9\times10^6$ клітин у 3 мл середовища.

Клітини культивували при 37 °С у зволоженій атмосфері з 5 % CO_2. Клітини, що прикриіпилися до колагена, промивали 3 мл ФСБ, додавали 3 мл повного середовища Williams E та інкубували 16 год при 37 °С у зволоженій атмосфері з 5 % CO_2. На наступний день клітини повторно промивали 3 мл ФСБ та додавали свіже середовище Williams E, але яке не містило інсуліну, дексаметазону та ЕТС. У чашки з експериментальними зразками додавали IFNα щура до кінцевої концентрації 250 Од/мл середовища, а у чашки з контрольними зразками рівний об'єм ФСБ. Всі клітини інкубували протягом 3-х та 6-и год у зволоженій атмосфері з 5 % CO_2 при 37 °С. РНК виділяли за допомогою RNEasy mini kit (Quiagen, США) згідно інструкції виробника.

2.4.6. Методологія експерименту з мікроареями ДНК-. Експермент з мікроареями ДНК-– це багатоступеневий процес, в якому принципове значення має якість РНК, що береться на аналіз, а також контроль проходження кожного із етапів підготовки зразків. Схему проведення експерименту з мікроареями ДНК зображено на рис 2.4. Вихідним матеріалом для аналізу була тотальна РНК. Внаслідок реакції зворотної транскрипції із використання олігодТ праймерів відбувається синтез одноланцюгових кДНК лише з поліаденільованих мРНК. Після синтезу другого ланцюга кДНК проводиться *in vitro* транскрипція, під час якої ампліфікується антисенсовий ланцюг. *In vitro* транскрипція здійснюється за допомогою Т7 РНК полімерази із відповідного промотора, який був пришитий до олігодТ праймера під час синтезу першого ланцюга кДНК. В реакційну суміш також додаються біотинільовані УТФ та ЦТФ, тому утворені транскрипти будуть біотинілованими. Отримана кРНК фрагментується та гібридизується із мікроареями ДНК. Після гібридизації мікроареї промивають, обробляють стрептавідином, що кон'югований із фікоеритрином, і сканують. Інтенсивність сигналу пропорційна до кількості фрагментованої кРНК, що зв'язалась із відповідним зондом.

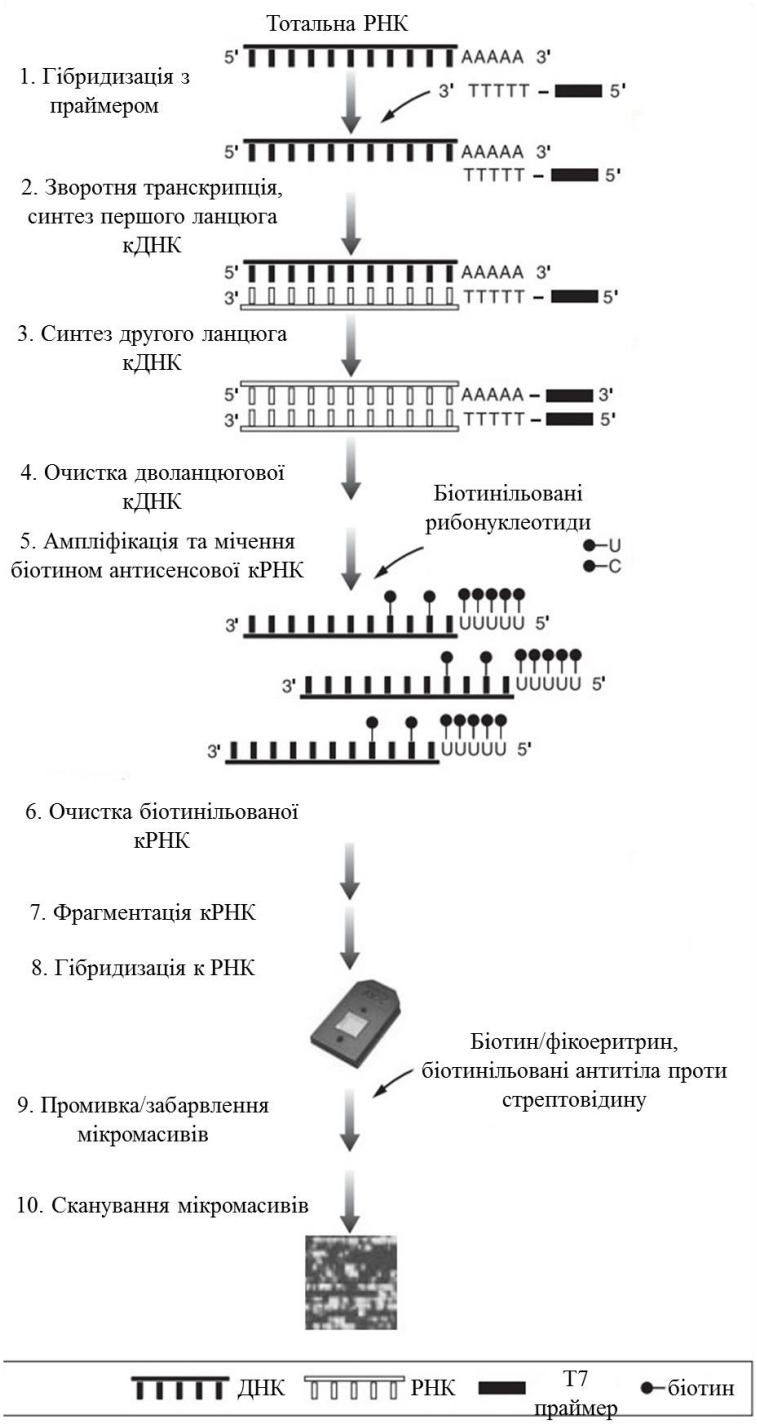


Рис. 2.4. Схематичне представлення послідовних етапів експерименту з мікроареями ДНК

2.4.6.1. Перевірка якості РНК. Якість РНК, призначеної для експерименту з мікроареями ДНК, визначали на Bioanalyzer 2100 (Agilent) згідно інструкції виробника. Для цього, до 65 мкл гелю «RNA 6000 nano gel mix» додавали 1 мкл барвника RNA 6000 nano dye concentrate, ретельно

перемішували і центрифугували 10 хв при 13000g. У відповідну лунку на чипі вносили 9 мкл гелю та заповнювали систему капілярів чипа. У решту лунок вносили по 5 мкл RNA 6000 nano marker. По 1,2 мкл кожного зразку РНК та маркеру РНК денатурували 2 хв при 70 °С на термоблоці, охолоджували на льоду та вносили у лунки чипу, що попередньо були заповнені RNA 6000 nano marker. Після внесення зразків чип вортексували 1 хв при 2400 об/хв та аналізували на платформі Bioanalyzer 2100.

В результаті аналізу можна виявити співвідношення інтенсивностей смуг 28S/18S рРНК і вміст частково деградованої РНК між цими смугами. Результат аналізу видається у безрозмірних одиницях RIN (RNA integrity number) у діапазоні 0 – 10. Чим більше значення RIN, тим більш якісною є РНК. Всі виділені зразки РНК мали значення RIN в межах 8,9 - 9,7, що свідчить про інтактність і високу якість РНК, які в подальшому були використані в роботі (рис. 2.5).

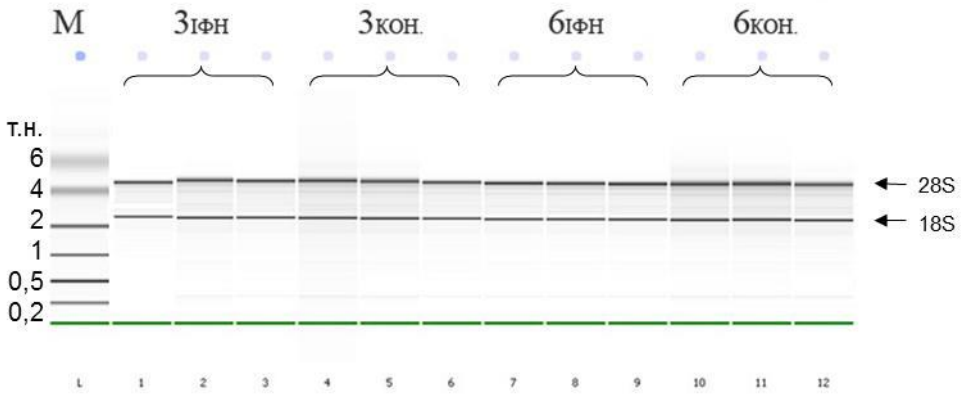


Рис. 2.5. Електрофореграма зразків РНК: М-маркер молекулярних мас РНК; 3IFN і 6IFN – РНК, виділена з гепатоцитів після 3-х і 6-и год культивування з IFNα; 3кон. і 6кон. – РНК, виділена із клітин, які культивували без IFNα; т.н. – тисячі нуклеотидів

2.4.6.2. Синтез дволанцюгової кДНК та її очистка. Синтез всіх дволанцюгових кДНК проводили в одній реакційній суміші, використовуючи як матрицю РНК, отриману із гепатоцитів, і суміш

індивідуальних контрольних РНК, кожна із яких присутня в різних концентраціях. Контрольну РНК додають з подвійною метою – для контролю за процесом підготовки зразків до гібридизації і для визначення діапазону інтенсивності гібридизаційних сигналів, в якому результат може вважатися за надійний. Перед змішуванням всіх компонентів реакційної суміші стоковий розчин кожної з контрольних РНК послідовно розводили буфером до кінцевого розведення 1:5000.

2.4.6.3. Зворотна транскрипція РНК. На реакцію зворотної транскрипції із отриманих розчинів РНК відбирали об'єм, який містив 5 мкг РНК, виділеної із первиних гепатоцитів до і після обробки IFNα, ліофілізували і доводили до об'єму 8 мкл, додавали 2 мкл кожної з контрольних РНК в розведенні 1:5000 та 2 мкл оліго(дТ) праймерів (50 мкМ), до 5'-кінця яких приєднували послідовність промотора фага Т7. Для відпалу праймерів цю **су**міш інкубували 10 хв при 70 °С та охолоджували 2 хв на льоду, а потім для синтезу першого ланцюга кДНК додавали 4 мкл 5-кратної реакційної суміші, 2 мкл 0,1 М дитіотрейтолу (ДТТ), 1 мкл 10 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ). Реакційну суміш інкубували 2 хв при 42 °С, додавали 1 мкл ревертази SuperScript II і продовжували інкубувати при 42°С 1 год. Після інкубації проби охолоджували на льоду протягом 2 хв.

Для синтезу другого ланцюга кДНК у суміш додавали 30 мкл 5х реакційної суміші One cycle cDNA synthesis kit, 3 мкл 10 мМ дНТФ, 1 мкл ДНК лігази *E.coli,* 4 мкл ДНК полімерази 1 *E.coli,* 1 мкл РНКази Н і воду до кінцевого об'єму 150 мкл. Суміш інкубували 2 год при 16 °С і додавали 2 мкл Т4 ДНК полімерази для добудови дволанцюгових 3'- та 5'-виступаючих кінців. Суміш інкубували 5 хв при 16 °С, реакцію зупиняли, додаючи 10 мкл 0,5 М ЕДТА.

Новосинтезовану дволанцюгову кДНК очищали за допомогою модуля для очистки зразків кДНК. Для цього до кожного зразка додавали 600 мкл зв'язувального буферу, перемішували, наносили на колонки з діоксидом

кремнію та центрифугували 1 хв при 10000 g. Колонку промивали 750 мкл промивального буфера, центрифугували 1 хв 10000 g. Елюцію проводили 14 мкл елюційного буфера, центрифугуючи колонку 1 хв при 25000 g (Affymetrixmanual).

2.4.6.4. Транскрипція кДНК і очищення кРНК. Отриману кДНК піддавали транскрипції для синтезу кРНК. До 8 мкл кДНК кожного зразка додавали 4 мкл 10х буферу для *in vitro* транскрипції, 4 мкл біотинилованих НТФ, 4 мкл суміші ензимів для мічення та 12 мкл стерильної деіонізованої води. Суміш інкубували 16 год при 37 °С на термоблоці Eppendorf thermomixer comfort; кожної години зразки перемішували 15 сек при 1400 об/хв.

Синтезовану кРНК очищали за допомогою набору реагентів для очистки кРНК згідно інструкції виробника. До кожного зразка додавали 60 мкл стерильної деіонізованої води, 350 мкл кРНК зв'язуючого буферу, 250 мкл 96 % етанолу, перемішували та наносили на колонку з діоксидом кремнію. Колонку центрифугували 15 сек при 10000 g і послідовно промивали 500 мкл промивальним буфером та 500 мкл 80 % етанолом, кожного разу центрифугуючи колонку 15 сек при 10000g. Для підсушування мембрани колонку центрифугували 5 хв при 25000 g без додавання розчинів. Елюцію кРНК проводили 21 мкл стерильної деіонізованої води при центрифугуванні протягом 1 хв при 25000 g. Концентрацію РНК в елюаті вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop (Thermo Scientific, США) при довжині хвилі 260 нм.

Оскільки крім синтезованої кРНК в елюаті присутні кДНК, а також може бути присутня вихідна РНК і контрольна РНК, то для вирахування частки саме кРНК ми використали формулу:

[кРНК] = А - В*С;

де [кРНК] – концентрація кРНК, А – концентрація НК за даними спектрофотометра, В – кількість тотальної РНК, що бралася на синтез кДНК, С – фракція кДНК, що бралася для *in vitro* транскрипції.

2.4.6.5. Фрагментація кРНК. Середня довжина синтезованих кРНК складає приблизно 850 нуклеотдів, тоді як довжина кожного зонду на мікроареї дорівнює 25 нуклеотидам. Через надзвичайно велику щільність зондів, які нанесено на мікроарей , при гібридизації між коротким зондом та довгою молекулою кРНК виникатимуть просторові перешкоди, які в кінцевому результаті негативно впливатимуть на інтенсивність сигналів, а отже і на чутливість методу. Щоб цього уникнути, перед гібридизацією з мікроарейюм, фрагментували кРНК за допомогою метал-опосередкованого гідролізу. Буфер для фрагментації збалансований для отримання фрагментів довжиною 35 - 200 нуклеотидів.

Для фрагментації кРНК відбирали елюат в об'ємі, який містив 16 мкг кРНК, до нього додавали 8 мкл 5х буферу для фрагментації та дистильовану воду до кінцевого об'єму 40 мкл. Суміш інкубували 35 хв при 94°С та охолоджували 2 хв на льоду. Для аналізу на Bioanalyzer 2100 брали по 1,2 мкл зразків, розведених у 6 разів (0,4 мкл зразку та 2 мкл дистльованої води). На електрофореграмі, що наведена на рис. 2.6, показано різницю між нефрагментованою і фрагментованою кРНК. Останню було використано на наступному етапі експерименту.

2.4.6.6. Гібридизація кРНК з мікроарейом ДНК. До кожного зразку фрагментованої кРНК (16 мкг у 39 мкл) додавали 5 мкл олігорибонуклеотидів B2 в концентрації 3 нМ, 15 мкл 20х розчину фрагментованої РНК, зчитаної зДНК локусів Bio B, C, D *E.coli* та послідовності Cre фагу P1, які використовують для визначення ефективності гібридизації з мікроареями ДНК. До суміші додавали 3 мкл ДНК із спермііів креветки в концентрації 10 мг/мл, 3 мкл бичого сироваточного альбуміну (БСА) в концентрації 50 мг/мл (Invitrogen), 150 мкл 2х буферу для гібридизації, 30 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) і 55 мкл води.

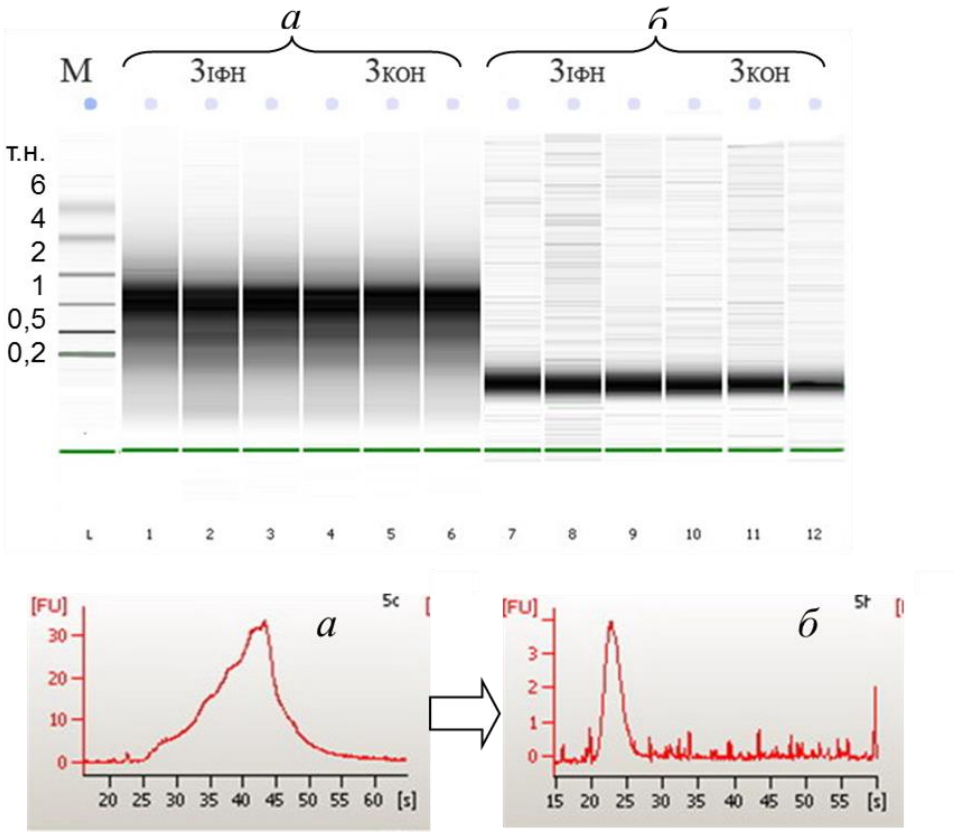


Рис. 2.6. Електрофореграма кРНК до (*а*) і після фрагментації (*б*): 3IFN і 3КОН позначені проби кРНК після 3 год культивування клітин з IFNα і без нього, відповідно; т. н. – тисячі нуклеотидів

Перед реакцією гібридизації кРНК з мікромасивом олігонуклеотидів на кожний чип наносили 200 мкл 1х буфера для гібридизації та інкубували 5 хв при 45 °С у гібридизаційній камері при швидкості обертання 60 об/хв. Раніше приготовану гібридизаційну суміш інкубували 5 хв при 99 °С на термоблоці, потім 5 хв при 45 °С в термостаті і центрифугували 4,5 хв при 20 °С, 16000 g. З мікроарею відбирали буфер і наносили 200 мкл гібридизаційної суміші, заклеювали септи мікроарею наліпками, щоб попередити випаровування, та інкубували 16,5 год у гібридизаційній камері при 45 °С і швидкості обертання ротора 60 об/хв.

2.4.6.7. Промивка, забарвлення та сканування мікроареїв. Для забарвлення продуктів гібридизації готували 1,2 мл розчину кон'югату

стрептавідин-фікоеритрин. Для цього до 600 мкл 2х буферу для забарвлення (200 мМ MES, 2 М NaCl, 0,1% Tween-20) додавали 48 мкл БСА (50 мг/мл), 12 мкл розчину стрептавідин-фікоеритрин (1мг/мл) та 540 мкл води. Отриману суміш (розчин 1) розподіляли на дві пробірки. Також готували 600 мкл розчину антитіл (розчин 2): до 300 мкл 2 х буферу для забарвлення додавали 24 мкл БСА (50 мг/мл), 6 мкл імуноглобулінів G козла (10 мг/мл), 3,6 мкл біотинільованих антистрептавідин антитіл (0,5 мг/мл) та 266 мкл дистильованої води.

Після гібридизації з кожного чипу відбирали гібридизаційну суміш та наносили 250 мкл буферу А (3 М NaCl, 0,2 М NaH_2PO_4, 0,02 М EDTA, 0,01 % Tween-20), чипи вкладали до промивальної станції (Fluidic Station 450) та промивали за протоколом EukGE-WS2v5-450 10 разів буфером А (3 М NaCl, 0,2 М NaH_2PO_4, 0,02 М EDTA, 0,01 % Tween-20) при 25 °С, потім 4 рази буфером Б (100 мМ MES, 0,1 М NaCl, 0,01% Tween-20) при 50 °С. Забарвлення проводили розчином 1 протягом 10 хв при 25 °С, після чого чип промивали буфером А протягом 10 хв при 25 °С і обробляли розчином 2 протягом 10 хв при 25 °С. Процедуру забарвлення повторяли розчином 1 впродовж 10 хв при 25 °С, після чого чип промивали 15 разів розчином А при 30 °С і потім наносили на нього 250 мкл буфера А, щоб уникнути утворення бульбашок повітря. мікроареї сканували на конфокальному сканері (Scanner 3000, Affymetrix, США) при довжині хвилі 580 нм.

2.4.6.8. Первинна обробка результатів експерименту з мікроареями ДНК. Первинна обробка результатів експерименту з мікроареями ДНК полягає у перетворенні інтенсивностей флуоресцентного сигналу у нормалізовані числові значення, які можна порівняти між різними зразками. Первинна обробка включає корекцію фонового сигналу, нормалізацію сигналів між мікроареями в групі зразків та між групами зразків, перетворення значення інтенсивності до логарифму значень з основою 2. Ідентифікацію кожного транскрипту на мікроарей і здійснють за допомогою набору зондів, які комплементарні різним ділянкам

транскриптів. Процес нормалізації дозволяє підсумувати значення інтенсивностей сигналів від всіх зондів і визначити рівень представленості конкретної мРНК. Більш детально етапи первинної обробки описані в додатку А.

2.4.6.9. Статистична обробка даних і визначення диференційно експресован их генів. Використовували програму BRB Array Tools [100], яка є додатком до Microsoft Excel і має графічний інтерфейс. Диференційну експресію визначали за допомогою парного Т-тесту. За диференційно експресовані гени вважали ті, експресія яких змінюється щонайменше в 2 рази порівняно з експресією генів у контрольній групі і з рівнем статистичної значущості $p<0.005$.

Онтологію генів визначали за допомогою інструменту Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), доступного за адресою [101]. Серед трьох загальних біологічних категорій - біологічні процеси, молекулярні функції і місцезнаходження в клітині, аналіз диференційно експресованих генів проводили лише в категорії «біологічні процеси».

2.5.10. Аналіз промоторів диференційно експресованих генів. Промоторні послідовності диференційно експресованих генів отримано з бази даних Ensembl 57 і проведено пошук сайтів зв’язування транскрипційних факторів, які приймають участь у внутрішньоклітинній передачі регуляторного сигналу від рецептора IFNα/β після його зв’язування з лігандом. Пошук проводили в ділянці 2000 пар нуклеотидів зліва від 5'-UTR (untranslated region) за допомогою інструменту COTRASIF (conservation-aided transcription-factors-binding-sites-finder) [102]. Матриці сайтів зв’язування для транскрипційних факторів були запозичені з баз даних JASPAR та TRANSFAC. У випадку, якщо у базах даних не було відповідних матриць сайтів зв’язування транскрипційних факторів для щура, то аналізували наскільки схожі послідовності транскрипційного фактора щура з відповідним транскрипційним фактором організму, чия

матриця була в базі даних. Якщо схожість транскрипційного фактору щура з аналогічним транскрипційним фактором іншого організму перевищувала 75 %, то матрицю від іншого організму використовували у подальшому аналізі промоторів генів щура.

Гени, в промоторних ділянках яких були знайдені відповідні сайти зв'язування, були проаналізовані на ступінь їх збагаченості серед диференційно експресованих генів шляхом порівняння з їх представленістю в геномі щура.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження можливої участі IFNα у відновленні печінки проводилося за наступною схемою: визначення експресії гена *Ifnα* в інтактній печінці, в печінці і в ізольованих паренхімних і непаренхімних клітинах впродовж перших 12 год після часткової гепатектомії і лапаротомії. Цей період відповідає пререпликативному періоду після часткової гепатектомії і реакції гострої фази після лапаротомії і періоду відповіді з боку генів вродженого імунітету в обох випадках; визначення генів-мішеней IFNα в експерименті з первинними гепатоцитами із інтактної печінки, які культивували з IFNα за умов, наближених до ситуації *in vivo* після ЧГЕ*;* відбір «ранніх генів», які відповідають на дію IFNα у культивованих гепатоцитах, і аналіз їх експресії в печінці після ЧГЕ і ЛАП у порівнянні з інтактною печінкою.

3.1. Рівень мРНК *Ifnα* в тканині печінки і в паренхімних і непаренхімних клітинах змінюється впродовж 12 годин після часткової гепатектомії і лапаротомії

Залежно від індивідуальних особливостей тварин (індивідуальна здатність до синтезу IFNα, наявність фонових інфекцій і т.п.), здатність до синтезу IFNα у відповідь на часткову гепатектомію і лапаротомію досить відрізняється. Тому для кожного дослідного зразка після часткової

гепатектомії використали контрольний зразок із тієї самої тварини, який був вилучений впродовж операції часткової гепатектомії. Значення для зразків після лапаротомії порівнювали із середніми значеннями, отриманими на частках печінки, вилучених під час операції ЧГЕ всіх дослідних тварин. Використання екзогенної чужорідної РНК Luc дозволило враховувати ефективність зворотної транскрипції та ПЛР в зразках, що також підвищило точність отриманих результатів.

Концентрацію *Ifna* мРНК в тотальній РНК із зразків тканини, паренхімних і непаренхімних клітин печінки наведено в абсолютних одиницях в таблиці 3.1. Концентрація *Ifna* мРНК підвищується на першу годину після часткової гепатектомії, потім залишається на рівні, трохи вищому за початковий рівень, але значно не відрізняється від нього. Лапаротомія викликає зовсім іншу відповідь – концентрація мРНК *Ifna* поступово підвищується впродовж 12 год і досягає рівня, що перевищує вихідний рівень (рис. 3.1). Слід зазначити, що отримані дані не є статистично достовірними і характеризуєть лише тенденцію у зміні рівня мРНК *ifnα*.

Таблиця 3.1.

Концентрація *Ifnα* мРНК в тотальній РНК, виділеній із зразків тканини, паренхімних і непаренхімних клітин печінки

Концентрація *Ifnα* мРНК (кількість копій/нг тотальної РНК, M ± m)		
Непаренхімні клітини	Гепатоцити	Тканина печінки
23,7 ± 1,73	10,0 ± 1,09	19,7 ± 3,29

Для того, щоб з'ясувати які клітини відповідають за ці зміни, було ізольовано гепатоцити і непаренхимні клітини, виділено з них тотальну РНК і методом ЗТ – кПЛР визначено концентрацію в ній індивідуальної мРНК *Ifnα* (рис. 3.2).

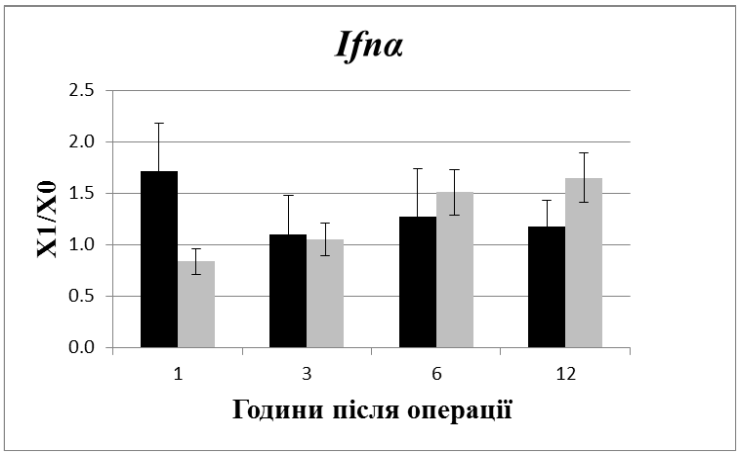


Рис. 3.1. Зміни концентрації *Ifna* мРНК в тотальній РНК, виділеній з тканини печінки в різні години після часткової гепатектомії і лапаротомії. Хі/Хо – відношення кількості копій мРНК зразку після операційного втручання до контрольного значення зі стандартною похибкою середнього арифметичного. Чорні стовпчики - часткова гепатектомія; сірі – лапаротомія

Виділені непаренхимні клітини були переважно представлені клітинами Купфера з домішками ендотеліальних і зірчастих клітин. Після часткової гепатектомії концентрація мРНК *Ifna* в тотальній РНК із непаренхімних клітин припадає, як і в тканині на першу післяопераційну годину з подальшим поверненням рівня мРНК до вихідного. Це підвищення є статисично достовірним при $p \leq 0.05$ на відміну від підвищення в інтактній печінці. В гепатоцитах, навпаки, концентрація *Ifna* мРНК максимально знижувалась до 3-ої год, а потім підвищувалась до 12-ої год, коли перевищувала початковий рівень (рис. 3.2 *а*). Підвищення до 12-ї години також статистично достовірне при $p \leq 0.05$ на відміну від підвищення в

інтактній печінці. При цьому концентрація *Ifna* мРНК в тотальній РНК з непаренхімних клітинах була значно вищою, ніж в гепатоцитах, що свідчить про спеціалізацію непаренхімних клітин щодо синтезу IFNα. В той же час необхідно враховувати, що мРНК гепатоцитів за масою складає левову частку від мРНК в тканині печінки, тому значна різниця у відносному вмісті компенсується переважною більшістю гепатоцитів, і клітини обох типів вносять вклад у загальні зміни концентрації мРНК *Ifna* в тканині. Лапаротомія супроводжується зниженням концентрації мРНК *Ifna* в непаренхімних клітинах, а в гепатоцитах вона знаходиться майже на межі визначення (рис. 3.2 *а*, *б*).

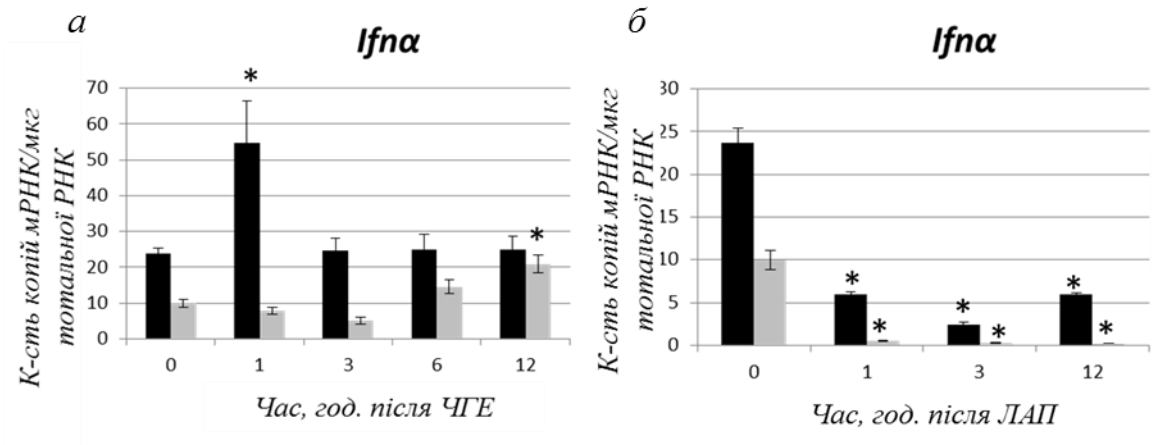


Рис. 3.2. Зміни вмісту мРНК *Ifna* в непаренхімних клітинах печінки і гепатоцитах після часткової гепатектомії (*а*) та лапаротомії (*б*). Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного. Зірочкою (*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при $p \leq 0.05$. Чорні стовпчики – непаренхімні клітини; сірі – гепатоцити

В цілому, тенденція в змінах вмісту мРНК *Ifnα* в зразках печінки після часткової гепатектомії підтверджуються даними на популяції непаренхімних клітин. Розбіжності та більш виражений приріст рівня мРНК *Ifnα* у непаренхімних клітинах, на нашу думку, є результатом

відсутності «шуму», який виникає через присутність левової частки РНК із гепатоцитів у препаратах тотальної РНК із зразків печінки у порівнянні із препаратами із непаренхімних клітин. Наразі важко пояснити більш суттеві розбіжності між даними після лапаротомії.

Зважаючи на відповідність експресії гена *Ifnα* в непаренхімних клітинах із даними противірусної активності отриманих нами раніше [11], в подальших обговореннях ми будемо робити акцент саме на дані, отримані в непаренхімних кілтинах.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

1. Інтерферон-альфа та протеїнкіназа Р в процесі відновлення печінки щурів після часткової гепатектомії / М. Перепелюк, А.Куклін, Я.Щерба, Б.Токовенко, Н.Макогон, А.Гоглер, С.Шале, М.Ю. Оболенська // Biopolymers and cell. - 2009. – Т.25, №2. – С.145 – 149.
2. Endogeneous interferon alpha during liver transition from quiescence to proliferation / A. Kuklin, M. Perepelyuk, Ya. Tsherba, M. Obolenska // European Journal of Cancer Supplement. – 2008, – Vol.6, #3, – P.50
3. Novel technologies in the study of IFN alpha activity / B. Tokovenko, A. Kuklin, M. Perepeluyk, M. Obolenskaya // Abstract book of Gliwice Scientific Meetings. – 16 – 17 November 2007. – Gliwice, Poland. – P.46.

3.2. IFNα «включає» 24 диференційно експресовані гени після 3-х год і 128 диференційно експресованих генів після 6-и год з початку культивуваня первинних гепатоцитів

Виходячи з уявлення про “доцільність” багатьох процесів, що відбуваються в клітині, можна сформулювати два ключові питання – «чому» і «навіщо», тобто чому і завдяки яким факторам підвищується концентрація *Ifnα* мРНК після часткової гепатектомії і знижується після лапаротомії і навіщо це потрібно або які наслідки цих змін.

Для того, щоб наблизитися до відповіді на друге питання, ми вирішили з’ясувати, експресія яких генів змінюється в гепатоцитах під впливом IFNα в концентрації, подібній до тієї, що визначається в печінці після часткової гепатектомії, і за умов короткочасної дії IFNα, як це відбувається *in vivo*.

Концентрацію IFNα було обрано на підставі активності гомогената печінки проти вірусу везикулярного стоматиту (VSV). Середній титр противірусної дії визначався в межах 1:320 – 1:640 для печінки через 0,5, 1 і 3 години після часткової гепатектомії і в 2 – 4 рази менше для контрольної тканини і тканини через 6 і 12 год після операції. Після стандартизації за використання IFNα з відомою активністю, вміст IFNα визначений як 10,000–20,000 Од на 1 г тканини печінки або на ~ 10^8 клітин [11]. Ми культивували 1,8 х 10^6 клітин в 3,0 мл середовища з 250 од. IFNα на 1,0 мл середовища. Згідно з ситуацією *in vivo* після часткової гепатектомії гепатоцити інкубували впродовж 3-х і 6-и год. За концентрацією і за тривалістю культивування з IFNα експеримент суттєво відрізнявся від найчастіше використовуваного 1.0 тис одиниць IFNα впродовж доби [42].

Після інкубації первинних гепатоцитів з IFNα протягом 3-х і 6-и год було визначено 28 і 124 диференційно експресованих гени, з них 73 мали відомі функції. Повний перелік диференційно експресованих генів наведений у додатку Б1 і Б2. Необроблені дані експерименту з мікроареями доступні у базі даних Gene Expression Omnibus (GEO) під ідентифікатором GSE43723.

Верифікація даних гібридизації з мікроаоеями ДНК більш точними методами є обов'язковим етапом перед початком інтерпретації результатів. Верифікацію проводили за допомогою ЗТ-кПЛР на довільно взятих п'яти генах (*Eif2ak2, Irf1, Irf7, Cnp, Isg15).* Порівнювали кратність змін у вмісті мРНК в тотальній РНК в експерименті по відношенню до контроля, отриманих двома методами, і обраховували коефіцієнти кореляції Спірмена. За даними, наведеними в таблиці 3.2, результати, отримані двома різними методами, корелюють між собою (коефіцієнт Спірмена $r_s = 0.69$, $p = 0.05$).

Всі диференційно експресовані гени були розподілені по восьми групах відповідно до функції їх білків (таблиця 3.3). До першої групи увійшли гени, чиї продукти є прямими ефекторами проти різних патогенів або білки, що беруть участь в утилізації «непотрібних» молекул в клітині. Декілька ГТФаз, що беруть участь у аутофагії, везикулярному транспорті та екзоцитозі, підвищуються на ранньому етапі відповіді на IFNα. Білки, що знаходяться у аутофагосомах, зливаються з фагосомами, де вони гідролізуються. Пептиди, що утворилися, використовуються для синтетичних потреб, або представляються на поверхні клітин у зв'язаному із МНС (головний комплекс гістосумісності) стані [103,104]. Інші продукти із цієї группи генів перешкоджають складанню вірусів на поверхні мембрани (Rsad2) та розщеплюють одноланцюгову РНК РНК-вмісних вірусів (Isg20) [105].

Два гени (*Ifit2, Eif2ak2)* кодують білки, які задіяні у регуляції трансляції. Ген ранньої відповіді *Ifit2* інгібує здатність еукаріотичного

Таблиця 3.2

Порівняння результатів експерименту з мікроареями з даними ЗТ-кПЛР на рандомізованій вибірці генів

мРНК	Кратність змін в концентрації мРНК в експерименті по відношенню до контролю			
	3-х год культивування з IFNα		6-и год. культивування з IFNα	
	Експеримент з мікроареями	ЗТ-кПЛР	Експеримент з мікроареями	ЗТ-кПЛР
Eif2ak2	н.д.е.	н.д.е.	3.91	3.74
Irf1	4.71	4.12	4.65	4.37
Irf7	3.76	6.16	8.6	13.1
Cnp	н.д.е.	н.д.е.	3.0	3.25
Isg15	3.15	4.33	6.41	12.25

Примітка: н.д.е. – не диференційно експресовані гени на 3-ю год культивування. коефіцієнт Спірмена – 0.69, p = 0.05.

фактора ініціації 3 до стабілізації потрійного комплекса eIF3-GTP-Met-tRNA та формування 48S преініціативного комплексу [106]. Пізніше, на 6 год, підвищується рівень експресії гена *Eif2ak2*, продукт якого фосфорилює EIF2-α, що веде до інгібування трансляції та перемикання трансляції від 5'-кепованих мРНК до тих, що мають внутрішній сайт зв’язування рибосом (таких як XIAP) [107].

Процеси посттрансляційної модифікації білків, убіквітинування та ІСГілування, реалізуються за подібним механізмом: трьома послідовними реакціями, що каталізуються активувальним ензимом (E1), кон’югувальним ензимом (E2) та лігазою (E3) [108,109]. Серед диференційно експресованих генів представлені ті, що кодують ISG15, E1 активувальний ензим (Ube1l), ензим USP18, який може від’єднувати як Ub, так і ISG15, та декілька E3 лігаз. Останні представлені членами родини білків із тристороннім

доменом (tripartite domain family) (*Trim6, Trim21, Trim25*) [110]; білками з HECT доменом, що включають підродини HERC (*Herc3, Herc6*) та NEDD (*N4bp1*); білком з родини інгібіторів апоптозу, що пов'язані з X-хромосомою (*Xiap*) [111]. XIAP також модулює передачу внутрішньоклітинних сигналів, є сильним інгібітором термінальних каспаз [112] і таким чином протидіє каспазі 8, експресія якої також підвищується. E3 молекули, що позбавлені каталітичниих властивостей (гени *Rnf19b, Rnf114*), слугують адаптерними білками між E2 молекулами та субстратом [113]. Продукти трьох інших генів (*Fbxw17, Mitd1, Fbxo39*) кодують білки, які мають F-бокси, і є компонентами лігазних комплексів [114]. E3 лігази можуть поліубіквітинувати білки за лізином-48, що веде до подальшої деградації білків у протеасомах, або моно- чи поліубіквітинувати білки за залишком лізину-63, яке не супроводжується деградацією [113]. Серед усіх ензимів Ube1l може активувати ISG15, а Trim25 з Hecr6 є лігазами для ISG15 і Ub. Хоча USP18 може від'єднувати Ub та ISG15, проте його специфічність більша до ISG15. Хоча білки-мішені Ub та ISG15 в гепатоцитах після стимуляції IFNα невідомі, проте білки, що передають сигнал від рецептора IFNα (RIG1, Jak1, STAT1, IRF3) можуть бути потенційними мішенями [108].

Три гени, що кодують поліАДФ-рибозилполімерази (*Parp9, Parp12, Parp14*), також зараховані до цієї групи через їх здатність модифікувати білки. Кожен із даних білків має на своєму С-кінці типовий для PARP каталітичний домен, проте на відміну від найбільш вивченого члена родини — PARP1, більшість із біохімічних властивостей перелічених трьох генів родини поки що не досліджено [115].

Наступна група включає гени, продукти яких беруть участь у транскрипції. Фактор, що регулюється IFNα - Irf7, зв'язується у промоторі гена *Ifnα* із консенсусною послідовністю, що дуже подібна до ISRE, і таким чином забезпечує позитивний зворотній зв'язок [116]. STAT1, STAT2 разом із IRF9 утворюють транскрипційний фактор ISGF3, який зв'язується

із ISRE в промоторах генів-мішеней IFNα [117]. Три ко-активатори ядерних рецепторів (гени *Pric 285, Ncoa7, Sp110*) активують транскрипцію, що залежить від рецептору активатора проліферації пероксисом α (PARPα)

Таблиця 3.3

Функціональна анотація диференційно експресованих генів

#	Ідентифікатор зондів Affymetrix	Опис гена	Символ гена (синонім)	Кратність зміни експресії	
				Інкубація з IFNα протягом 3 годин	Інкубація з IFNα протягом 6 годин
Протипатогенні ефектори					
1	1391489_at	immunity-related GTPase family, M	*Irgm*	3	7.2
2	1396163_at	interferon gamma induced GTPase	*Igtp*	9.15	13.12
3	1371015_at	myxovirus (influenza virus) resistance 1	*Mx1*	3.77	20.07
4	1387283_at	myxovirus (influenza virus) resistance 2	*Mx2*		4.69
5	1377950_at	similar to interferon-inducible GTPase	*RGD1309362*	6.4	32.52
6	1373992_at	similar to interferon-inducible GTPase	*MGC108823*	5.8	15.1
7	1370913_at	radical S-adenosyl methionine domain	*Rsad2*	6.4	8.8

Продовження таблиці 3.3

		containing			
8	1390507_at	interferon stimulated exonuclease 20	*Isg20*		4.02
Сенсори та передавачі сигналу					
9	1394352_at	interferon induced with helicase C domain 1	*Ifih1 (Mda5)*		4.4
10	1391463_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	*Ddx58(RIG)*		3.41
11	1376908_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	*Ifit3*	8.52	22.54
12	1385277_at	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	*Dhx58 (LPG2)*		2.81
13	1381556_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	*Ddx60*		19.17
14	1373757_at	TRAF type zinc finger domain containing 1	*Trafd1*		2.59
15	1394940_at	family with sequence similarity 46, member A	*Fam46a*		3.55
16	1394340_at	inositol polyphosphate-1-phosphatase	*Inpp1*		3.44
Транскрипційні фактори та коактиватори транскрипції					

Продовження таблиці 3.3

17	1368073_at	interferon regulatory factor 1	*Irf1*	4.72	4.66
18	1383564_at	interferon regulatory factor 7	*Irf7*	3.77	8.62
19	1383448_at	interferon regulatory factor 9	*Irf9*		2.3
20	1387354_at	signal transducer and activator of transcription 1	*Stat1*		4.17
21	1373670_at	signal transducer and activator of transcription 2	*Stat2*		2.91
22	1374551_at	interferon-induced protein 35	*Ifi35*		2.45
23	1390531_at	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	*Pric285*	2.41	2.98
24	1383938_at	nuclear receptor coactivator 7	*Ncoa7 (ERAP 140)*	8.24	5.27
24	1379538_at	centromere protein J	*Cenpj*		2.85
25	1372930_at	SP110 nuclear body protein	*Sp110*		4.28
26	1387495_at	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)	*Tle4*		2.14
27	1392544_at	rcd1 (required for cell differentiation)	*Rqcd1*		2.72

Продовження таблиці 3.3

		homolog 1 (S. pombe)			
28	1377497_at	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	*Oasl*	3.03	
29	1371152_a_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A	*Oas1a*		3.05
30	1383863_at	LIM domain only 2	*Lmo2*		4.84
Фактори модифікації і деградація білків					
31	1382314_at	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	*G1p2 (ISG15)*	3.15	6.41
32	1379633_a_at	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7 (UbE1L)	*Uba7 (Ub E1L)*	2.75	5.6
33	1385502_at	tripartite motif-containing 21	*Trim21*		4.27
34	1377726_at	tripartite motif-containing 25 (K-63-linked Ub & ISG 15 to DDX58)	*Trim25*		2.1
35	1389164_at	hect domain and RLD 3	*Herc3*		3.41
36	1382902_at	potential ubiquitin ligase	*Herc6*	2.2	4.15
37	1391222_at	Nedd4 binding protein 1	*N4bp1*		2.12

Продовження таблиці 3.3

38	1374718_at	deltex 3-like (Drosophila) (Ub ligase for His4)	*Dtx3l*		4.78
39	1369248_a_at	X-linked inhibitor of apoptosis	*Xiap*		2.32
40	1382074_at	ring finger protein 19B	*Rnf19b*		2.72
41	1385658_at	ring finger protein 114	*Rnf114*		2.1
42	1384457_at	F-box and WD-40 domain protein 17 (компонент Е3 лігазного комплексу)	*Fbxw17*		3.84
43	1381228_at	F-box protein 39 (компонент Е3 лігазного комплексу)	*Fbxo39*		15.04
44	1393085_at	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1(компонент Е3 лігазного комплексу)	*Mitd1*	2.7	6.1
45	1389034_at	ubiquitin specific peptidase 18	*Usp18*		4.64
46	1376144_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	*Parp9*		3.94
47	1380071_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	*Parp12*		3.81

Продовження таблиці 3.3

48	1379613_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14 (modification of histones for survival)	*Parp14*		4.4
49	1385252_at	tripartite motif-containing 6	*Trim6*		2.56
Фактори системи презентації антигенів у МНС I комплексі					
50	1388149_at	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	*Tap1*	2.09	5.08
51	1370400_at	RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (N3)	*RT1-N3*		3.66
52	1371078_at	RT1 class Ib, locus Aw2	*RT1Aw2*		2.33
53	1381014_at	interferon-induced protein 44 (microtubule-associated)	*Ifi44*	2.88	5.87
54	1379748_at	histocompatibility 28	*H28*		5.34
55	1370186_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)	*Psmb9 (b1i/LMP2)*		2.52

Продовження таблиці 3.3

Молекули міжклітинної взаємодії					
56	1387969_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10	31.56	20.52
57	1379365_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Cxcl11		6.49
58	1379631_at	colony stimulating factor 1 (macrophage)	Csf1		2.23
59	1382314_at	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	G1p2 (ISG15)	3.15	6.41
60	1382603_at	programmed cell death 1 ligand 2	Pdcd1lg2		4.86
Ензими метаболізму нуклеїнових кислот					
61	1368973_at	adenosine deaminase, RNA-specific	Adar		2.22
62	1374725_at	Moloney leukemia virus 10 (RNA degradation)	Mov10		2.08
63	1391754_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 1I	Oas1i	2.33	5.34
64	1371152_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A	Oas1a		3.05
65	1383424_at	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	Cmpk2	7.53	32.86
66	1373412_at	5'-nucleotidase, cytosolic III	Nt5c3		2.68

Продовження таблиці 3.3

67	1378257_at	three prime repair exonuclease 1	Trex1		3.51
Регуляторні фактори трансляції білків					
68	1379568_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	Ifit2 (ISG54)	5.81	11.42
69	1387242_at	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	Eif2ak2 (PKR)		3.92
70	1374725_at	Moloney leukemia virus 10 (may inhibit translation)	Mov10		2.08
Інші					
71	1370693_ at	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	Cnp		3.08
72	1370875_at	Ezrin	Ezr		2.11
73	1369262_at	caspase 8 (initiator)	Casp8		2.01
74	1376496_at	apolipoprotein L 9a	Apol9a	2.1	5.44

[118], естрогенового рецептора (ER) [119], рецептора ретиноєвої кислоти (RAR) відповідно [120]. Інші білки слугують ко-активаторами для STAT5 та NF-kB (Cenpj), а також для ATP-залежної транскрипції (*Ifi35*) [121,122]. Негативні регулятори транскрипції представлені геном, що кодує Tle4, який є корепрессором для когорти транскрипційних факторів [123]; Rgcd1 є репрессором для процесів транскрипції, що залежить від транскрипційних факторів MYB та JUN [124]; Oas1 є інгібітором фактора, що зв'язується із метильованими CpG мотивами [125]. Lim Domain Only (LMO2), може брати

участь як у активації, так і у репресії транскрипції, оскільки має як два активуючих, так і два репрессорних домени [126].

Декілька генів відповідають за комунікації гепатоцитів із непаренхімними клітинами. Так *Psb9* кодує β1i субодиницю імунопротеасоми, яка на відміну від звичайної протеасоми підвищує презентацію антигенів на поверхні клітини і активує Т-клітини [127]. Транспортер, асоційований із транспортом антигенів (*Tap*), приймає участь у презентації антигенів шляхом перенесення пептидів (після розщеплення білків у протеасомах) всередину ендоплазматичного ретикулуму, де вони з'єднуються з білками головного комплексу гістосумісності 1 (MHC1), і в такому вигляді вони презентуються непаренхімним клітинам печінки [127]. Хемокіни Cxcl10 та Cxcl11 обидва взаємодіють з рецептором CxcR3 і беруть участь у залученні моноцитів/макрофагів, Т-клітин, NK-клітин, та дендритних клітин до епітелію синусоїдів [128]. Один ген із цієї групи кодує Programmed cell death 1 ligand 2 (*Pdcd1lg2*), що взаємодіє з негативним рецептором PD1 на поверхні активованих Т і В клітин, та інгібує проліферацію Т клітин, вивільнення ними цитокінів, знижує адгезію та запалення [129]. У позаклітинному просторі ISG15 може діяти як хемо-/цитокін [108].

Наступна група генів відповідальна за процесинг та метаболізм нуклеїнових кислот. Специфічна до РНК аденозин деаміназа (*Adar*) каталізує перетворення аденозину до інозину в дволанцюговій РНК, взаємодіє зі стресовими гранулами, які формуються внаслідок тимчасового інгібування трансляції та необхідні для виживання клітин [130]. РНК-геліказа Moloney leukemia virus 10 (*Mov10*) локалізується у цитопзматичних П-тільцях (тільця процесингу мРНК), в яких відбувається гідроліз РНК, та бере участь у деградації мРНК шляхом інтерференції [131]. Оліго-А синтетази (*Oas1i, Oas1a*) опосередковано впливають на гідроліз РНК через синтез коротких олігоаденілатів, які сполучені між собою 2'-5' зв'язком і які в свою чергу активують латентну РНКазу L [107]. Білки, що кодуються

генами 5’-nucleotidase, cytosolic III (*Nt5C3*) та cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial (*Cmpk2*) утворюють регуляторний субстратний цикл у мітохондріальному резервному шляху метаболізму нуклеотидів. Перший ензим каталізує дефосфорилювання цитозольних піримідин 5’-монофосфатів (ЦМФ, УМФ) до відповідних нуклеозидів, які транспортуються в мітохондрії, де вони фосфорилюються Cmpk2 та використовуються для анаболічних потреб органели [132]. Ген *Trex1* кодує головну 3'-5'екзонуклеазу в клітині. Даний білок не тільки забезпечує корегуючу активність для ДНК полімерази, а також запобігає активації внутрішньоклітинних сенсорів вродженого імунітету надлишком ДНК, що може призвести до аутоімунних реакцій [133].

Декілька генів кодують білки, що є внутрішньоклітиними сенсорами РНК та регулюють передачу внутрішньоклітинного сигналу. АТФ-залежна геліказа (retinoid-inducible gene, *Rig1*) та білок Mda5 (melanoma differentiation associated gene 5, *Mda5*) впізнають вірусну РНК. Після активації вони сприяють утворенню мітохондріального противірусного сигнального комплексу (MAVS), який в свою чергу передає сигнал до транскрипційних факторів IRF3, IRF7, NF-kB (через TANK-звязуючу кіназу – TBK) [134]. Дві мРНК кодують білок з тетратрикопептидним повтором, який індукується IFNα (*Ifit3*), та поліпептид із DEAD боксом (*Ddx60*), Обидва активують передачу сигналу від MAVS до TBK1. В той же час *Lgp2* та *Trafd1* кодують специфічні інгібітори білка RIG1, які перешкоджають надлишковій активації імунної системи та пошкодженню тканин [134,135]. OAS1i і OAS1a також впізнають дволанцюгову РНК та опосередковано впливають на її деградацію [107]. Інший представник цієї групи генів – інозитолполіфосфат-1-фосфатаза (*Inpp1*) може опосередковано впливати на передачу сигналу від фосфатидилінозитолу.

IFNα впливає на структуру клітинної поверхні та цитоскелету шляхом позитивної регуляції езрину (*Ezr*) – білка, що поєднує цитоплазматичну мембрану та актинові мікрофіламенти, а також білка 2', 3'-cyclic nucleotide

3' phosphodiesterase (Cnp), що зв'язується з мікротрубочками [136]. Знаючи диференціційно експресовані гени в гепатоцитах, культивованих з IFNα, і кратність змін в концентрації їх мРНК в транскриптомі, ми побудували відповідну діаграму (рис.3.3).

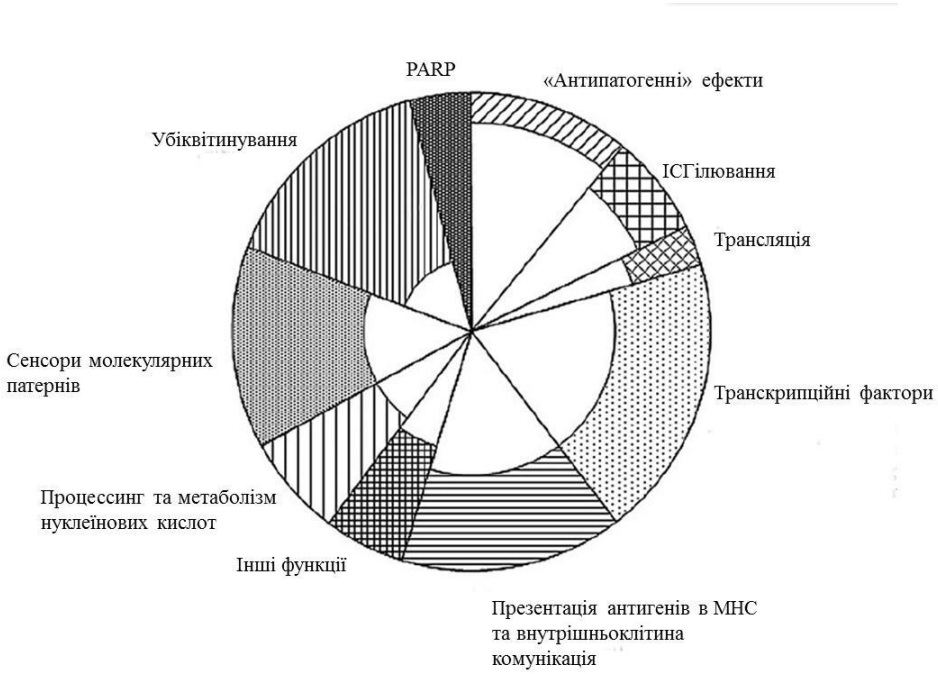


Рис.3.3. Зміни в представленості диференційно експресованих генів в транскриптомі залежно від часу культивування гепатоцитів з IFNα. Площа великих секторів (заштриховані плюс не заштриховані їх частини) – пропорція генів відповідної функціональної категорії в загальній кількості диференційно експресованих генів після 6 год інкубації з IFNα. Незаштрихована площа внутрішніх секторів–пропорція диференційно-експресованих генів після 3 год інкубації з IFNα в загальній кількості генів відповідної функціональної категорії. Найпершими реагують на дію IFNα гени антипатогенної відповіді, за ними гени системи ІСГілування. Останніми активуються гени системи убіквітинування і PARP.

Ця діаграма наочно демонструє, в якій послідовності активується експресія різних генів під дією IFNα. Найпершими активуються гени, які зумовлюють припинення дії патогенів, за ними - гени, які належать до

системи ІСГілування. Цікаво, що гени, які належать до системи ІСГілування, передують тим, які відносяться до убіквітинування. Обидва процеси схожі за послідовністю реакцій, що призводять до модифікації білків, але принципово різняться за тимчасовістю ІСГілування і спрямованістю білків на деградацію внаслідок убіквітинування.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

1. Критерії оцінки мікромасив-експерименту з дослідження транскриптому гепатоцитів щура під впливом інтерферону альфа 3 / А. Куклін Б. Токовенко, М. Оболенська // Biopolymers and cell. – 2013. – Т. 29, №6. – С.521 – 526.
2. Hepatocytes response to interferon alpha levels recorded after liver resection / A. Kuklin, B. Tokovenko, N Makogon, M Oczko-Wojciechowska, B Jarząb, M. Obolenskaya // J Interferon Cytokine Res. - 2014. - Vol.34, №2. - P. 90-99.
3. Changes in gene expression profile in primary culture of rat hepatocytes treated with interferon alpha / A. Kuklin, B. Tokovenko, N Makogon, B Jarząb, M. Obolenskaya // Abstract of the 6th Parnas Conference. – 27 – 31 August 2011. – Warsaw, Poland. – P.20.

3.3. Сигнальні шляхи, що активуються IFNα в первинних гепатоцитах

За даними літератури передача сигналу від рецептору IFNα всередину клітини здійснюється декількома сигнальними шляхами. Серед них найбільш вивченим є Jak/STAT/ISGF3 шлях, який забезпечується

транскрипційним фактором ISGF3, що складається з білків STAT1, STAT2 і IRF9. Сигнал може передаватися також через: Jak/STAT шлях, що діє через гомо- та гетеродимери STAT1 та STAT3-6; PI3K/AKT, який діє через NF-kB, а також p38/MAPK шлях, на якому активується когорта транскрипційних факторів (CREB, C/EBP, MAX/MYC, ELK1, SP1, MEF2a, NFAT, ATF, p53, HBP1, та NF-kB) [117]. Гени, які кодують відповідні транскрипційні фактори в нашому експерименті були або серед диференційно експресованих, або експресувалися на значному рівні, що дозволяє припустити наявність даних транскрипційних факторів в первинних гепатоцитах.

Ми проаналізували промотори диференційно експресованих генів на наявність сайтів зв'язування до перелічених транскрипційних факторів. Матрицю ISRE для сайта зв'язування транскрипційного фактору ISGF3 наведено нижче:

A 1 12 0 0 0 0 0 7 1 1 0 0 0 2 1
C 8 0 0 0 0 0 13 1 7 0 0 3 8 7 8
G 2 1 13 0 0 0 0 1 2 0 0 0 0 2 3
T 2 0 0 13 13 13 0 4 3 12 13 10 5 2 1

Інші матриці для транскрипційних факторів, що беруть участь у передачі сигналу IFNα (IRF1, NF-kB, Max/Myc, STAT4, STAT3-6, NFAT, C/EBP, CREB, ELK1, MEF2a, ATF, p53, HBP1) були взяті із баз даних JASPAR та TRANSFAC (табл. 3.4).

Гени, які мали в своїх промоторах сайти зв'язування до перелічених транскрипційних факторів, були перевірені на збагаченість серед диференційно експресованих генів, тобто чи вони зустрічаються частіше серед диференційно експресованих генів, ніж в цілому геномі (табл. 3.5). Цілком очікувано, що коефіцієнт збагачення найвищий для генів, в промоторній ділянці яких знаходяться сайти зв'язування для фактору ISGF3, який вважається найчастішим передавачем сигналу від IFNα. Таких

генів в геномі найменша кількість, але їх представленість серед диференційно експресованих генів зростає майже у 9 разів.

Таблиця 3.4

Матриці сайтів зв'язування транскрипційних факторів

Транскрипційний фактор	Ідентифікатор в базі даних	База даних
MEF2A	MA0052.1	Jaspar
NFATC2	MA0152.1	Jaspar
CREB1	MA0018.2	Jaspar
NFkB	MA0061.1	Jaspar
MAX/Myc	MA0059.1	Jaspar
SP1	MA0079.2	Jaspar
C/EBP	MA0102.2	Jaspar
IRF1	MA0050.1	Jaspar
STAT1	MA0137.2	Jaspar
STAT3	MA0144.1	Jaspar
STAT5B	M00459	Transfac
STAT6	M00500	Transfac
STAT4	M00498	Transfac
ELK1	MA0028.1	Jaspar

Гени з іншими сайтами зв'язуванням наведені в таблиці в низхідній послідовності їх коефіцієнтів збагачення. Збагачення диференційно експресованих генів генами з сайтами зв'язування NF-kB, MAX/MYC і NFAT факторами свідчить про можливу участь PI3K/AKT та p38/MAPK сигнальних шляхів,

тоді як збагачення за сайтом зв'язування STAT4 може бути результатом активації JAK/STAT сигнального шляху.

Всі диференційно експресовані гени з сайтами зв'язування до опробованих транскрипційних факторів наведені в додатку В. Необхідно звернути увагу і на те, що декілька з перерахованих сайтів зв'язування зустрічаються в промоторах одних і тих же генів. Найбільшу частку в складі диференційно експресованих генів складають збагачені гени з

Таблиця 3.5

Збагачення диференційно експресованих генів генами з певними сайтами зв'язування транскрипційних факторів в промоторах (точний критерій Фішера).

Транскрипційний фактор	Кількість генів із СЗТФ/кількість генів в геномі щура	Обробка IFNα, 3 год.			Обробка IFNα, 6 год.		
		К	Кількість ДЕГ із СЗТФ/ кількість ДЕГ	Рівень значущості - p	К	Кількість ДЕГ із СЗТФ/ кількість ДЕГ	Рівень значущості - p
ISGF3	708/25646	8.62	5/21	0.000206	7.32	20/99	2.53E-12
IRF1	2188/25646	3.35	6/21	0.005475	2.25	19/99	0.00040
NF-κB	2975/25646	2.05	5/21	0.053727	1.64	19/99	0.00688
MAX/MYC	1754/25646	0.70	1/21	0.348329	1.62	11/99	0.03776
STAT4	2796/25646	2.18	5/21	0.049399	1.48	16/99	0.03099
NFAT	17251/25646	1.20	17/21	0.081171	1.16	77/99	0.00666

Примітка: СЗТФ – сайти зв'язування транскрипційних факторів; ДЕГ – диференційно експресовані гени; К - коефіцієнт збагачення, $K = \frac{А*Б}{В*Г}$, де А – диференційно експресовані гени з певним сайтом зв'язування в промоторах; Б - Загальна кількість генів в геномі щура; В – Загальна кількість диференційно експресованих генів; Г – Кількість генів, що мають в промоторах даний сайт зв'язування серед всіх генів щура.

сайтом зв'язування з фактором NFAT, а найменшу – гени з сайтом зв'язування з фактором MAX/MYC; збагачені гени з іншими сайтами розподілені приблизно нарівно серед диференційно експресованих.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

1. Changes in gene expression profile in primary culture of rat hepatocytes treated with interfern alpha / A. Kuklin, B. Tokovenko, N Makogon, B Jarząb, M. Obolenskaya // Abstract of the 6th Parnas Conference. – 27 – 31 August 2011. – Warsaw, Poland. – P.20.
2. Hepatocytes response to interferon alpha levels recorded after liver resection / A. Kuklin, B. Tokovenko, N Makogon, M Oczko-Wojciechowska, B Jarząb, M. Obolenskaya // J Interferon Cytokine Res. - 2014. - Vol.34, №2. - P. 90-99.
3. Визначення генів-мішеней транскрипційного фактора ISGF-3 / Б. Токовенко, О. Драгущенко, А. Куклін, М. Оболенська // Biopolymers and cell. – 2009. – Т. 25, №8. – С.398 – 402.

3.4. Експресія IFNα-залежних генів системи ІСГілування змінюється в печінці у відповідь на часткову гепатектомію і лапаротомію

Як було зазначено вище, культивування первинних гепатоцитів із IFNα підвищує концентрацію різних мРНК певній часовій послідовності. Серед диференційно експресованих генів мРНК системи ІСГілування займають друге місце за тим, як скоро, через 3 або 6 годин, зафіксоване зростання їх концентрацій (рис. 3.4). На початку роботи ми ставили

завдання перевірити, як в інтактній печінці, печінці після часткової гепатектомії і лапаротомії експресуються гени, які регулюються IFNα в первинних гепатоцитах, сподіваючись, що через мішені IFNα ми отримаємо ключ до вирішення ролі цього цитокіну у відновлювальному процесі.

Гени системи ІСГілування і білки, які вони кодують, відповідають за посттрансляційну тимчасову модифікацію білків шляхом приєднання білку ISG15. До білків цієї системи належать: білок ISG15, білок UBE1L, який активує ISG15; білок UBE2L6, який кон'югує ISG15; і білок TRIM25, який переносить і зв'язує ISG15 з білком-мішенню [137–140]. Активність цільових білків внаслідок модифікації змінюється. Ген *Usp18* кодує ензим, що відщеплює ISG15 від білків-мішеней [113,141]. Всі гени, які кодують перелічені білки (окрім UBE2L6), були надекспресовані в первинних гепатоцитах внаслідок дії IFNα (Див. підрозділ 3.2).

Концентрацію мРНК системи ІСГілування визначали методом ЗТ-кПЛР в тотальній РНК, виділеній із зразків печінки. В інтактній печінці найменш представленою виявляється мРНК *Ube1L*, інші мРНК визначаються в межах від 1,1, до 2.1 тис. копій на нг тотальної РНК (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Концентрація мРНК системи ІСГілування у тотальній РНК з інтактної печінки

мРНК	Число копій РНК/нг тотальної РНК,(M ± m)
Isg15	1493,0 ± 330,12
Ube1L	212,8 ± 27,50
Ube2L6	1107,4 ± 117,15
Trim25	2190,0 ± 166,9
Usp18	2670,8 ± 538,13

Часткова гепатектомія і лапаротомія призводять до суттєвих змін в концентрації цих мРНК (рис. 3.4), які дещо умовно можна поділити на ті, що спостерігаються через 1 – 3 год після операцій, і ті, що відбуваються через 6 – 12 год. Адже за часовою періодизацією частково синхронізованого відновлювального процесу після часткової гепатектомії виділяють стадію праймування або активації, коли клітини переходять від спокою в проліферативному відношенні до клітинного циклу (приблизно впродовж перших 3-х годин) і пресинтетичний період першого клітинного циклу гепатоцитів - від – 3 – 4 годин до 12 годин, коли починається стадія синтезу ДНК [142–144]. Після лапаротомії також принципово різні зміни спостерігаються в період 1 – 3 год і 6 – 12 год.

Рання стадія регенерації печінки (1 – 3 год) характеризується незмінним рівнем мРНК всіх досліджених генів. (рис. 3.4). Інша ситуація спостерігається після лапаротомії. Концентрація *Isg15, Trim25* та *Usp18* мРНК зростає, тоді як рівень мРНК *Ube1L* і *Ube2L6* виявляє деяку теденцію до підвищення, але статистично не достовірну (рис. 3.4).

На наступному етапі, що відповідає пререплікативному періоду після часткової гепатектомііт, концентрація мРНК *Isg15* і решти мРНК залишається на низькому рівні, за виключенням *Trim25,* рівень якої підвищується до 12 год після часткової гепатектомії. Ситуація після лапаротомії значно відрізняється. Концентрація мРНК *Isg15, Trim25* і *Usp18* повертається до початкового рівня, вміст *Ube1L* стає нижчим за контрольний, а вміст мРНК *Ube2L6* достовірно не змінюється впродовж дослідженого періоду (рис. 3.4).

Отриманий результат виявився несподіваним. Адже гени системи ІСГілування є генами-мішенями IFNα, що експериментально доведено у дослідах *in vivo* за умов противірусної відповіді [145] і в нашому експерименті з культивованими гепатоцитами в умовах, за концентрацією IFNα і строком його дії наближених до умов після часткової гепатектомії.

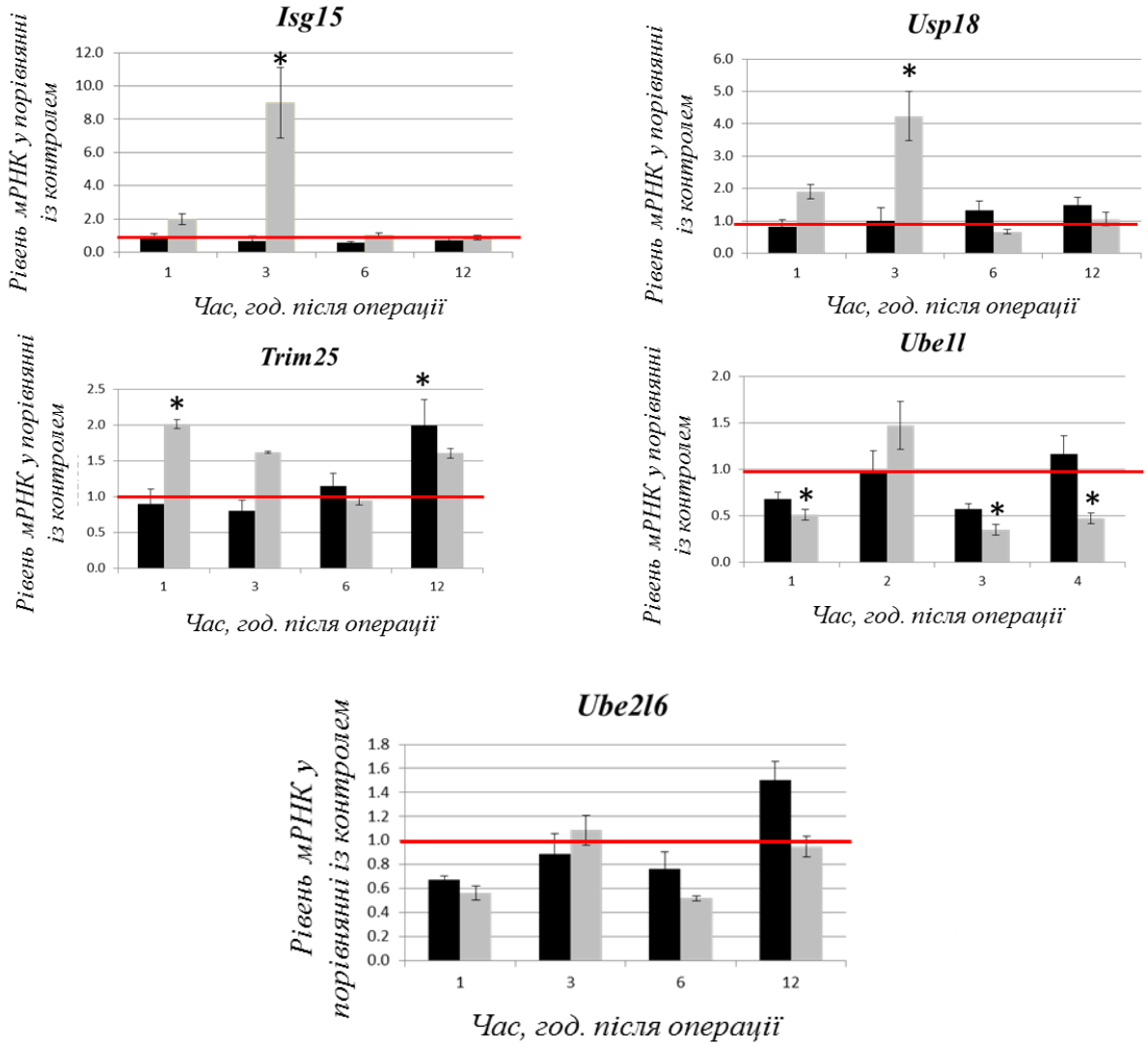


Рис. 3.4. Зміни вмісту мРНК в печінці після часткової гепатектомії і лапаротомії. Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного. Зірочкою (*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при $p \leq 0.05$. Чорні стовпчики - часткова гепатектомія; сірі – лапаротомія

Після проведення часткової гепатектомії короткочасний сплеск в концентрації *Ifnα* мРНК не асоціюється із регуляцією генів системи ІСГілування.

Для з'ясування природи цієї неочікуваної відповіді ми вирішили перевірити наскільки інші класичні гени-мішені IFNα зберігають свою характерну властивість відповідати на дію цитокіна в умовах, відмінних від

противірусної відповіді. З цією метою ми обрали два гени – *Pkr* і *Irf7,* які кодують відповідно протеїнкіназу R (PKR), відому також як кіназа-2 еукаріотичного фактору ініціації трансляції 2 (EIF2AK2), і регульований інтерфероном фактор 7 (Irf7), який є транскрипційним фактором родини регульованих інтерфероном транскрипційних факторів.

3.5. Два гени-мішені IFN*α, Pkr і Irf7,* по-різному реагують як на операцію часткової гепатектомії, так і лапаротомії

Паренхімні і непаренхімні клітини суттєво відрізняються за рівнем мРНК *Pkr* – в гепатоцитах її коцетрація приблизно на порядок вища, ніж в непаренхимних клітинах (табл. 3.6). Часткова гепатектомія викликає поступовий підйом мРНК Pkr до 12 години в гепатоцитах і спад в непарехімних клітинах (рис. 3.5). Цей факт співвідноситься з літературними даними, які констатують подібну динаміку у клітинах гліобластоми при переході від G0 до стадії G1 клітинного циклу [146]. Після лапаротомії рівень мРНК Pkr в цілому знижується в клітинах обох типів крім підвищення на 6 год. в непарнехімних клітинах (рис. 3.5).

Таблиця 3.7

Рівень Irf7 та Pkr мРНК в печінці, гепатоцитах і непаренхімних клітинах

Кількість копій індивідуальної мРНК в нг тотальної РНК (M ± m)			
Індивідуальні мРНК	Непаренхімні клітини	Гепатоцити	Тканина печінки
Pkr	16,4 ±1,09	208,0±11,90	–
Ifr7	–	–	320,0±70

У непаренхімних клітинах як після ЧГЕ, так і після ЛАП спостерігається підйом з наступним спадом вмісту мРНК *Pkr*. При цьому чітко видно, що вміст цієї мРНК в гепатоцитах після ЧГЕ превалює над вмістом у непаренхімних клітинах тоді, як після ЛАП в клітинах обох типів він нижчий за вміст після ЧНЕ і в непаренхімних клітинах він або перевищує вміст в гепатоцитах, або несуттєво відрізняється від нього (рис. 3.5).

Експресія іще одного гена-мішені IFNα – транскрипційного фактора IRF7, ми визначали у нефракціонованій тканині печінки. Загальна динаміка його експресії подібна до такої для генів системи ІСГілування: після ЧГЕ відбувався спад рівня його мРНК до 12 год, тоді як під час реакції гострої фази відбувалась значна індукція його експресії на третю годину з подальшим зниженням рівня мРНК до 6 - 12 год (рис. 3.6).

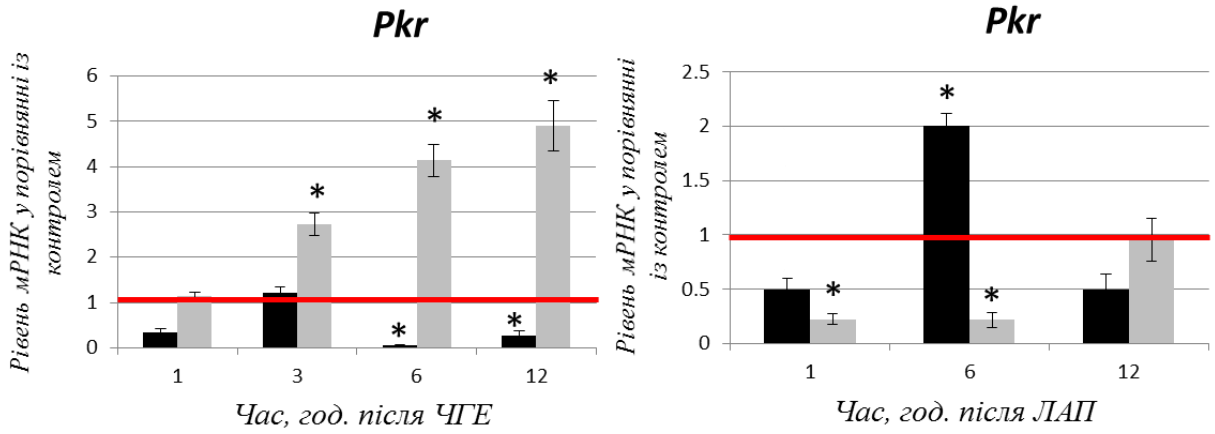


Рис. 3.5. Зміни вмісту мРНК *Pkr* в непаренхімних клітинах і гепатоцитах після часткової гепатектомії (*а*) і лапаротомії (*б*). Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного. Зірочкою (*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при $p \leq 0.05$. Чорні стовпчики – непаренхімні клітини; сірі – гепатоцити

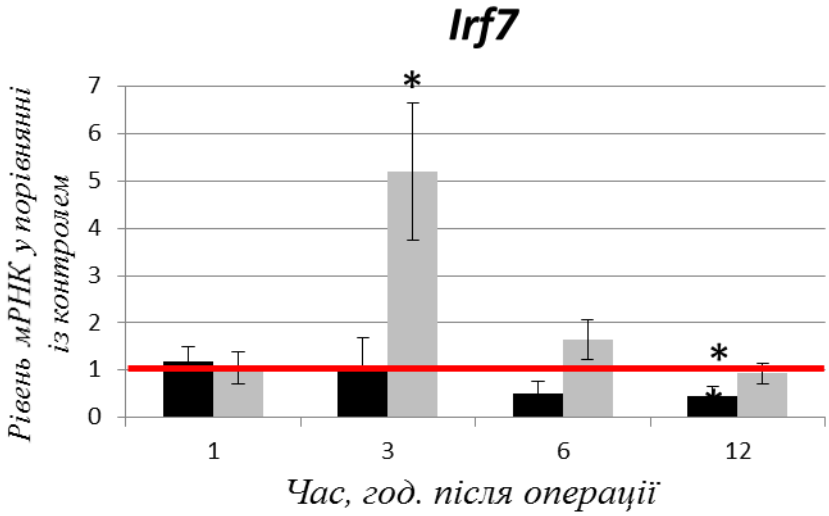


Рис. 3.6. Рівень мРНК *Irf7* в тотальній РНК з печінки після часткової гепатектомії (ЧГЕ) і лапаротомії (ЛАП). Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного). Зірочкою (*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при $p \leq 0.05$. Чорні стовпчики - часткова гепатектомія; сірі – лапаротомія

.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в праці:

1. Expression of ISGylation related genes in regenerating rat liver / A. Kuklin, T. Poliezhaieva, I. Zhyryakova, V. Ogryzko, M. Obolenskaya // Biopolymers and cell. – 2015. – Vol. 31, №5. – P.351 – 361.

3.6. Концентрація *Tbp* мРНК і 18S рРНК відображає загальний рівень транскрипції і трансляції

Для оцінки загального рівня транскрипції і трансляції після обох операцій ми визначали динаміку концентрацій *Tbp* мРНК і *18S* рРНК. *Tbp* мРНК кодує ТАТА-звязувальний білок, який разом з РНК- полімеразою II та загальними транскрипційними факторами утворює комплекс пре-

ініціації транскрипції. Базові концентрації відповідних мРНК наведені у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Концентрація мРНК *Tbp* і рРНК *18S* в інтактній печінці

мРНК/рРНК	Число копій РНК/нг тотальної РНК, (M ± m)
Tbp	443,2 ± 41,20
18S	2 023399,7 ± 153101,78

Експресія гена *Tbp* плавно підвищується протягом дослідного періоду після часткової гепатектомії, а після лапаротомії вона поступово знижується (рис. 3.7). 1*8S* рРНК є компонентом малої субодиниці рибосом, і зміни її рівня віддзеркалюють вміст рибосом в клітині і опосередковано асоціюється з активністю трансляційного апарату. Профілі експресії *18S* рРНК як після часткової гепатектомії, так і після лапаротомії подібні до таких у *Tbp*, окрім раннього зниження рівня *18S* рРНК на першу годину після ЧГЕ (рис. 3.7). Тенденція поступового підвищення рівня *18S* рРНК після лапаротомії узгоджується з відомим накопиченням рибосом під час пререплікативного періоду регенерації печінки, які забезпечують активний синтез білків, необхідний для реплікації ДНК та поділу клітин печінки [41–43].

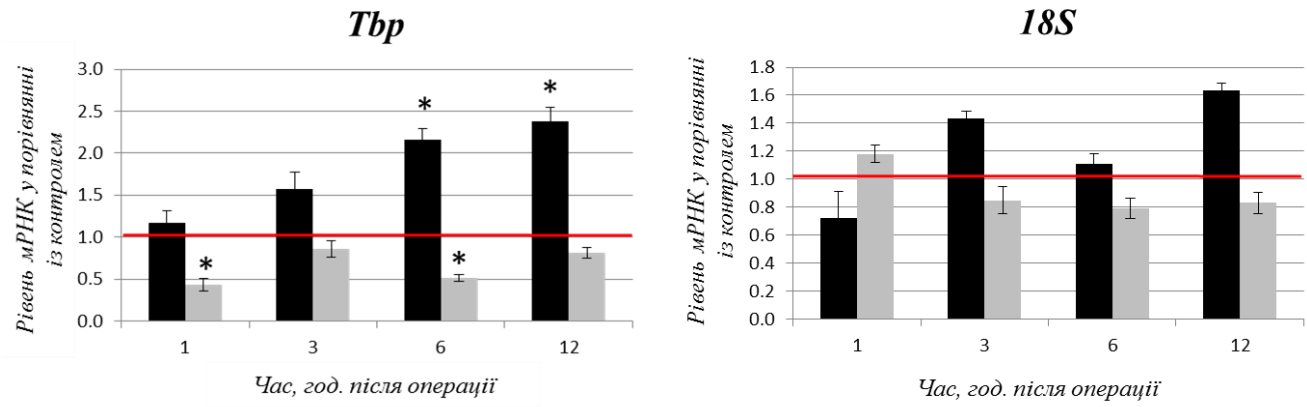


Рис. 3.7. Рівні мРНК генів *Tbp* та рибосомальної РНК*18S*, в печінці після часткової гепатектомії (ЧГЕ) та лапаротомії (ЛАП). Xi/Xo – відношення кількості копій мРНК зразку після операційного втручання до контрольного значення. Планки похибки – стандартна похибка середнього арифметичного. Зірочкою (*) позначено статистично достовірну різницю між експериментальними і контрольними значеннями при $p \leq 0.05$. Чорні стовпчики - часткова гепатектомія; сірі – лапаротомія

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в праці:

2. Expression of ISGylation related genes in regenerating rat liver / A. Kuklin, T. Poliezhaieva, I. Zhyryakova, V. Ogryzko, M. Obolenskaya // Biopolymers and cell. – 2015. – Vol. 31, №5. – P.351 – 361.

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Регенерація печінки - це складний процес, що тонко регулюється в часі та просторі факторами різноманітної природи, на внутрішньоклітинному, зовнішньоклітинному та системному рівнях. Перехід клітин печінки від проліферативного «спокою» до поділу супроводжується активним залученням системи вродженого імунітету, зокрема, як клітинних його компонентів (NK клітини, макрофаги, лейкоцити), так і сигнальнх молекул (TNFα, IL-6, компоненти комплементу C3a і C5a, IL-4) [7–9,147]. Окрім захисної функції компоненти вродженого імунітету підсилюють властивості мітогенів клітин печінки, інакше кажучи праймують клітини печінки для відповіді на мітогенний сигнал.

В даній роботі ми довели, що експресія гена *Ifna* підвищується на ранньому етапі після часткової гепатектомії; визначили профілі генної експресії в первинних гепатоцитах, культивованих з IFNα за умов, наближених до ситуації *in vivo;* і порівняли характер експресії генів системи ІСГілування після часткової гепатектомії і лапаротомії впродовж 12 год після обох операцій. Цей часовий проміжок відповідає перехідному та пререплікативному періоду в регенеруючій печінці і реакції гострої фази після лапаротомії, що є специфічною реакцією з боку печінки на будь-яке ушкодження в організмі, а також відповіді з боку вродженого імунітету після обох операцій.

Обговоренню підлягають декілька питань. По-перше, як розвивається відповідь гепатоцитів на дію IFNα за умов, наближених до ситуації *in vivo*, і чи є якась схожість у цій відповіді з процесами, які відбуваються після часткової гепатектомії; по-друге, як корелюють в часі зміни в експресії гена *Ifnα* після часткової гепатектомії і лапаротомії зі змінами в експресії

генів-мішеней IFNα, зокрема з боку генів системи ІСГілування, у відповідь на часткову гепактектомію і лапаротомію; по-третє, яким чином регулюється експресія гена *Ifnα* і його досліджених «класичних генів-мішеней» на початку відновлювального процесу і відповіді гострої фази.

4.1. Закономірність змін в експресії генів у первинних гепатоцитах щура під впливом IFNα

Профіль генної експресії в гепатоцитах під впливом IFNα було отримано за умов, наближених до ситуації *in vivo*, а саме 250 Од. IFNα/мл середовища протягом короткого періоду інкубації (3 і 6 год.) на відміну від найчастіше використовуваної концентрації IFNα 1000 Од./мл впродовж 24 год. Остання доза є радше симуляцією фармацевтичних доз при терапії IFNα, ніж дослідженням функцій ендогенного IFNα. В нашому дослідженні ми також використали первинну культуру гепатоцитів щура, замість клітинної лінії, оскільки первинна культура найбільше відповідає фізіологічному стану гепатоцитів в інтактній печінці. Обраний нами час інкубації (3 та 6 год) клітин з IFNα також відповідає часовому проміжку експресії IFNα при регенерації печінки.

Після 3 та 6 год інкубування клітин із IFNα ми виявили 24 та 128 диференційно експресованих гени. Спектр цих генів лише частково перекривається зі спектром генів після довготривалаї інкубації з більшою концентрацією IFNα і якісно відрізняється від нього [42].

Експресія диференційно експресованих генів відбувається у строго визначеному порядку (рис. 3.3). На ранньому етапі (3 год) специфічні функції диференційно експресованих генів свідчать про те, що клітини використовують стратегію збереження енергії шляхом використання наявних ресурсів та зміни активності білків для того, щоб дати найшвидшу відповідь. Підвищується рівень експресії генів, залучених до: аутофагії

(*Irgm, Igtp, Similar to IFN inducible GTPase*) і клітини позбавляються від на даний час непотрібних компонентів, а продукти розпаду використовують для першочергово необхідного синтезу; убіквітинування та ІСГілування як найскорішого способу змінити фенотип клітин на відміну від запуску транскрипційного процесу (*Isg15, Ube1l, Mitd1, Herc6)*; часткового інгібування трансляції, яка є енерго-затратним процесом (*Isg54, Pkr*); перемикання мітохондріального синтезу дНТФ на резервний шлях (*Cmpk2*).

Подальший розвиток транскрипційної відповіді характеризується більш інтенсивним залученням ядерного контролю експресії генів через підвищення експресії транскрипційних факторів STAT1, STAT2, та IRF9 на фоні активації шляхів JAK/STAT, PI3K/AKT та p38/MAPK, збільшенням кількості диференційно експресованих генів та подальшим збільшенням (здебільшого) експресії попередньо активованих генів. Відповідь на IFNα з боку гепатоцитів за даних умов характеризується одночасною експресією прозапальних факторів та їх інгібіторів, що перешкоджає розвиткові надлишкового запального процесу. Передача сигналу через адаптерний білок MAVS та TBK1 кіназу може знижуватися через інгібування RIG1 (*Lgp2, Trafd1*); активація генів, які регулюють прозапальний процес, а саме активацію Т-клітин через CXC ліганди та MHC комплекси (*Cxcl10, Cxcl11, Lmp2*) компенсується негативним корецептором PD-1; дія гена, який кодує каспазу 8 (Casp8), може інгібуватися сильним інгібітором апоптозу – XIAP, ІСГілування білків (*Ube1L, Isg15, Trim25*) збалансовується зворотнім процесом – від'єднанням ISG15 (*Usp18*). Таким чином, білки, які кодуються диференційно експресованими генами, можуть діяти на різних рівнях регуляції експресії генів і забезпечувати збалансованість експресії генів за цих умов, тобто водночас сприяти і інгібувати розвиток запальних процесів.

4.2. Процеси, що ініціюються IFNα та частковою гепатектомією частково перекриваються

Ми проаналізували дані літератури з метою виявити свідчення щодо експресії виявлених нами в зазначених умовах диференційно експресованих генів у первинних гепатоцитах в печінці, яка відновлюється. Наведені нижче дані або прямо свідчать про участь деяких із них у регенерації печінки, або вказують на їх потенційну участь. Збереження енергії під час перехідного періоду при регенерації печінки може бути одним із ключових елементів, оскільки рівень АТФ різко спадає одразу після ЧГЕ, хоча на сьогодні не відомо чи це зниження супроводжується активацією регуляторних механізмів (наприклад через пуринергічні рецептори) [148]. Накопичення аутофагосом, активація протеолізу в лізосомах, збільшення експресії Mx1 та Mx2 в гепатоцитах спостерігається на ранніх етапах після ЧГЕ (2 - 6 годин), тоді як в подальшому, із розвитком проліферації число аутофагосом поступово знижується [74,149–152]. Попередньо аутофагія розглядалася, як рання компенсаторна реакція, що ініціюється частковою гепатектомією при дефіциті енергії [149]. На сьогоднішній день дані про біологічну роль аутофагії значно розширились, Вважається, що процеси, які призводять до аутофагії, пов’язані з майже з усіма компонентами імунної системи [104]. В печінці, яка регенерує, аутофагія на ранньому етапі регенерації виконує важливу функцію. На сьогодні відомо, що завдяки ній, зокрема, зберігається цілісність і функціональна активність мітохондрій у процесі відновлення органу [153].

Число та профіль білків, що транслюються, з високою вірогідністю змінюються впродовж пререплікативного періоду, адже експресія класичного гена-мішені IFNα *Eif2ak2*, підвищується, і значна частина білка переходить до ядра [11]. Білок Eif2ak2 пригнічує класичну трансляцію мРНК з 5’-кепу, і зумовлює ініціацію синтезу специфічних мРНК, які мають внутрішній сайт для зв’язування з 40S субодиницею рибосом

(internal ribosomal entry sites, IRESs). Є дані, що рівень білка та мРНК каспази-8 також підвищується в регенеруючих гепатоцитах невдовзі після ЧГЕ [73,154]. Клітинно-специфічний нокаут гена каспази-8 в гепатоцитах затримує проліферацію після ЧГЕ, що вказує на важливість цього гена при регенерації [155].

Гени, які беруть участь у передачі регуляторного сигналу, що індукується *in vitro* IFNα, змінюють свою експресію при регенерації печінки. Експресія тих генів, які залучені до JAK/STAT/ISGF3 шляху – *Irf9*, *Stat1* і *Stat2*, а також 2 гени із родини транскрипційних факторів ATF, *Atf2* та *Atf4*, як і ген самого IFNα, - підвищується у гепатоцитах після часткової гепатектомії [72,74]. Інший клас транскрипційних факторів – ядерні рецептори та їхні ліганди, залучені на найраніших стадіях регенерації печінки [156]. Найбільш вивчений серед них, ERα, транслокується із цитоплазми до ядра вже через 1 год після ЧГЕ; PPARα, що регулює енергетичний гомеостаз, клітинний цикл та внутрішньоклітинну передачу сигналів від цитокінів; рецептори ретиноєвої кислоти та ретиноєвий Х-рецептор (RAR/RXR). Миші з нокаутом даних генів, мають значну затримку у регенерації печінки [156–159]. Теж саме відбувається і при нокауті за генами, що кодують білки STAT5 та NF-kB [160]. Експресія ко-активаторів до кожного із вищезазначених генів підвищувалась в нашому експерименті з первинними гепатоцитами, однак їхня участь у регенеруючій печінці залишається маловивченою.

На сьогоднішній день є декілька прикладів убіквітин-залежного розщеплення білків після ЧГЕ. Дві Е3 убіквітин лігази Е3 - DDB1 та SCF (комплекс, що складається із білків Skp1, білком Cul1 із F-боксом –TRCP), беруть участь у розщепленні інгібіторів циклінів та циклін-залежних кіназ у протеасомах, поряд з тим, експресія компоненту протеасоми – p28GANK підвищується після ЧГЕ. Інактивація цих білків призводить до значної затримки синтезу ДНК [161–163].

Затримка та гідроліз РНК в процесивних тільцях та стресових гранулах є цікавим та потенційно новим напрямком дослідження під час регенерації печінки, хоча дані стосовно цих процесів в печінці після

часткової гепатектомії в літературі (за нашим аналізом літератури) відсутні. Проте відомо, що міРНК є потужними регуляторами цих процесів і їхній профіль значно змінюється під час регенерації печінки. Інгібування синтезу специфічних міРНК порушує синтез ДНК після часткової гепатектомії [164–166].

Активація резервного шляху синтезу піримідинів в мітохондріях через 5'-нуклеотидазу використовується регенеруючою печінкою, скоріше за все, для того, щоб забезпечити потреби синтезу мітохондріальної ДНК, який передує синтезу ядерної ДНК та відбувається під час перехідного періоду [167,168]. Збільшення кількості 3'-5' ДНК екзонуклеази, яка розщеплює ДНК та забезпечує субстратом резервний шлях синтезу піримідинів, в печінці необхідне для ефективного проходження регенерації [169].

Різні процеси, пов’язані з імунною відповіддю, активно задіяні у регуляції відновлення печінки [170]. Активація генів, що беруть участь у презентації антигенів через MHC I під дією IFNα *in vitro*, корелює із такою після ЧГЕ. Порушення комплексу MHC I через делецію гена β-мікроглобуліну порушує проліферацією після ЧГЕ [171].

Таким чином, нами було виявлено певну схожість між відповіддю гепатоцитів на IFNα *in vitro* та ранніми змінами в клітинах печінки після ЧГЕ. Проте, залишається невідомим наскільки ці зміни опосередковуються впливом ендогенного IFNα.

4.3. Особливості початкової відповіді досліджених генів на часткову гепатектомію і лапаротомію

На підставі даних експерименту з первинними гепатоцитами були обрані гени системи ІСГілування і проаналізована їх експресія в печінці після часткової гепатектомії і лапаротомії. Ці гени кодують ензими всіх

трьох етапів процесу ІСГілування, сам модифікуючий білок ISG15 та ензим, який від'єднує ISG15 від модифікованого білка.

У роботі показано існування значної різниці в експресії досліджених генів між частковою гепатектомією і лапаротомією в контексті експресії гена *Ifnα* і генів *Tbp* і *18S* рРНК. Рівень мРНК *Ifnα* після часткової гепатектомії має два максимуми, що належать різним клітинним популяціям печінки: перший, що припадає на 1 год після часткової гепатектомі і зумовлений непаренхімними клітинами, і другий, який припалає на 12 год і переважно обумовлений гепатоцитами. Рівень мРНК генів системи ІСГілування залишається майже незмінним за винятком мРНК *Trim25,* рівень якої зростає на 12 год після операції, що може бути пов'язаним з підйомом рівня мРНК *Ifnα* в гепатоцитах (табл. 4.1). Не виключено, що сталий підйом вмісту мРНК *Pkr* в гепатоцитах можна пояснити таким же чином.

Таблиця 4.1

Відмінність між процесами відновлення печінки і реакцією гострої фази

мРНК і рРНК	Часовий інтервал (год)	Відновлення печінки	Реакція гострої фази
мРНК Ifnα в непаренхімних клітинах	1 – 3	↑	↓
мРНК *Isg15, Usp18, Ifr7*	3	↔	↑
мРНК *Trim25*	1 –3	↔	↑
мРНК *Trim25*	3 –12	↑	↔
мРНК *Ube1l, Ube2l6*	1 - 2	↔	↔
мРНК *Ifna* в гепатоцитах	6 - 12	↑	↓

Продовження таблиці 4.1

мРНК *Pkr* в гепатоцитах	1 – 12	↑	↑
мРНК *Tbp*	1 – 12	↔	↑
рРНК *18S*	1 – 12	↔	↑

Примітка: стрілками ↑ і ↓ позначено зростання і зниження коцентарції мРНК і рРНК, відповідно, а значком ↔ 0 незмінність коцентрації

Реакція гострої фази після лапаротомії з боку досліджених генів суттєво відрізняється від реакції після часткової гепатектомії. Зниження рівня мРНК *Ifnα* супроводжується стрімким зростанням концентрації *Isg15*, *Usp18*, *Trim25* на 1 - 3-ю годину. Таким же чином змінюється вміст іншого гена-мішені IFNα – *Irf7* (табл. 4.1). З огляду на цю тенденцію, постає питання за рахунок чого відбувається позитивна регуляція експресії даних генів на першу - третю годину після лапоротомії. Ми проаналізували промотори досліджених генів і з'ясували, що у всіх генах системи ІСГілування, крім гена *Ube2l6*, присутні сайти зв'язування транскрипційних факторів родини IRF (рис. 4.1). Ген *Ube2l6* є єдиним, який не має таких сайтів. Наявність зв'язування транскрипційних факторів родини IRF свідчить про можливу участь IFNα-незалежних механізмів у регуляції експресії даних генів. Представники родини транскрипційних факторів IRF беруть участь у захисних і запальних реакціях і активуються, окрім IFNα, також сенсорами PAMP/DAMP. Хоча досліджені гени системи ІСГілування і відносять до генів-мішеней IFNα, наявні в літературі дані свідчать, що транскрипційні фактори цієї родини, зокрема IRF3, можуть активуватися, незалежно від IFNα, та регулювати експресію деяких генів, відомих як гени-мішені IFNα. Раніше вважалося, що ген *Isg15* є класичною мішенню для IFNα. Проте, згодом було показано, що IRF3 може регулювати експресію гена *Isg15* та низки інших генів-мішеней IFNα,

незалежно від шляху передачі сигалу від рецептора IFNAR [172]. Наразі ми не знаємо, які фактори можуть активувати IRF3 після лапаротомії.

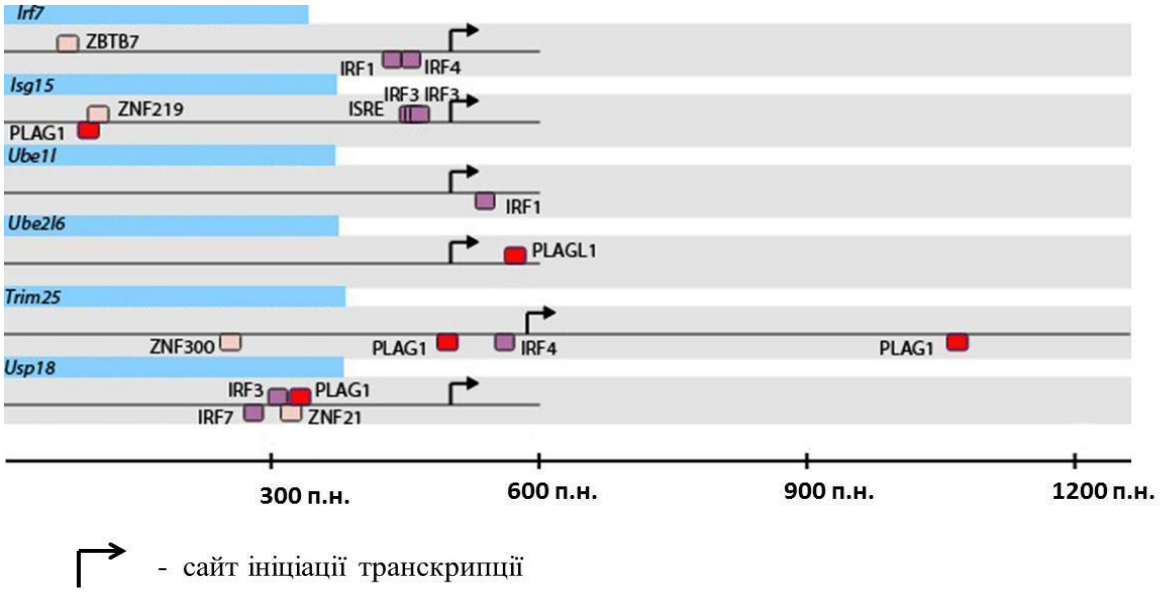


Рис. 4.1. Сайти зв'язування транскрипційних факторів в промоторах генів системи ІСГілування. Дані були отримані автором із використанням інструменту Matinspector

Наразі також невідомо, які білки можуть бути модифікованими ISG15 після часткової гепатектомії і лапаротомії. Однак відомо, що ІСГілування цикліну D1 призводить до його дестабілізації, зниження активності та інгібування клітинного циклу [173]. Враховуючи цей факт, зниження рівня мРНК генів системи ІСГілування після часткової гепатектомії може сприяти підвищенню рівня цикліну D1, який необхідний для виходу клітин із фази G0 клітинного циклу. ІСГілування або убіквітинування білку 14-3-3σ змінює його здатність зв'язувати численні сигнальні білки, які включають кінази, фосфатази та трансмембранні рецептори. Підвищення мРНК *Trim25* на 12-у годину після часткової гепатектомії може зменшувати кількість 14-3-3σ шляхом протеасомної деградації і, таким чином, сприяти переходу від G1 до S фази клітинного циклу, оскільки 14-3-3σ негативно регулює цей етап [174].

Після часткової гепатектомії відбувається зміна програми функціонування клітин печінки; клітини, що раніше в основному виконували метаболічні функції мають «перепрограмуватися» і набути здатності задовольнити проліферативні потреби печінки для відновлення її маси. Виходячи із загальної логіки зміни функціональних станів клітин, вищезазначене «перепрограмування» може реалізовуватися двома основними шляхами: за разунок якісних і кількісних змін білкового складу клітини, або/та за рахунок зміни активності вже синтезованих білків. Порівняння експресії генів ІСГілування, відповідальних за тимчасову модифікацію білків, і генів *Tbp* та *18S*, відповідальних за загальний рівень транскрипції і трансляції, вказують на принципову різницю між відповіддю на часткову гепатектомію і лапаротомію. На ранніх етапах після часткової гепатектомії можуть створюватися передумови для зміни якісного складу білків й інтенсифікації їх синтезу на фоні зниженої посттрансляційної модифікації білків через ІСГілування. Збільшення інтенсивності синтезу рибосомальної РНК та білку після ЧГЕ – добре задокументований факт, і наші дані підтверджують попередні спостереження [175,176]. Після лапаротомії, навпаки, на перший план скорше виступає модифікація білків через ІСГілування на фоні зниженого загального рівня транскрипції. За рівнем *18S* рРНК, можна говорити лише про тенденцію до зниження інтенсивності трансляції, яка, однак, задокументована в інших дослідженнях [177]

Обидві операції, часткова гепатектомі і лапаротомія, викликають стресову відповідь з боку організму та печінки зокрема. Безумовно, часткова гепатектомія є більш інтенсивним стресовим чинником для організму, ніж лапаротомія. Припускаємо, що залежно від інтенсивності стресових чинників рання відповідь в печінці реалізується або із залученням тимчасової посттранляційної модифікації білків через ІСГілування після лапаротомії або через активацію транскрипції і

трансляції із залученням гена *Ifnα,* але без участі ІСГілування після часткової гепатекомії.

4.4. Аналіз механізму запуску синтезу IFNα після часткової гепатектомії

В результаті досліджень експресії гена *Ifnα* в паренхімних та непаренхімних клітинах печінки після часткової гепатектомії і лапаротомії, було показано, що рівень мРНК *Ifna* найраніше підвищується у непаренхімних клітинах і співпадає у часі із підвищенною біологічною (противірусною) активністю IFNα в гомогенатах печінки. Виникає питання – за рахунок чого може відбуватися активація синтезу IFNα в печінці після ЧГЕ? Щоб дати відповідь на нього, потрібно розглянути механізми активації гена *Ifna.* Як частина системи вродженого імунітету, IFNα, в першу чергу, активується внаслідок вірусної чи бактеріальної інфекції, так званими молекулярними структурами, що асоційовані з патогенами та сигналами небезпеки PAMP/DAMP (Patogen's Associated Molecular Patterns/ Danger Associated Molecular Patterns) [116]. В клітині присутня низка молекулярних сенсорів PAMP/DAMP такі, як TLR4, TLR7, TLR9, RIG1, MDA5, DAI, здатних специфічно розпізнавати макромолекули вірусного чи бактеріального походження (одноланцюгові ДНК і РНК, дволанцюгові ДНК і РНК, ліпополісахариди тощо) та активувати сигнальні каскади, що, в кінцевому випадку активують транскрипційні фактори родини IRF, які, в свою чергу, і активують експресію гена *ifna*. На сьогодні розглядають два основних щляхи активації гена *ifna*. Вірусна длРНК впізнається білками RIG1 та MDA5, які через адаптерний білок MAVS, розташований на поверхні мітохондрій, активують кіназу TBK1, що в свою чергу

фосфорилює і активує транскрипційний фактор IRF3. Після активації, IRF3 транслокується до ядра, де зв'язується із енхансером гена *Ifnb* й активує його експресію. Новосинтезований IFNβ ауто- чи паракринно зв'язується з рецептором IFNRα/β, що призводить до опосередкованої через ISGF3 активації експресії гена *Irf7*, який є типовим активатором гена *Ifna* (рис. 4.2 *а*). Існує й інша можливість активації гена *Ifna* – також фактором IRF7, але після активації молекулярних сенсорів без попереднього синтезу IFNβ (рис. 4.2 *б*).

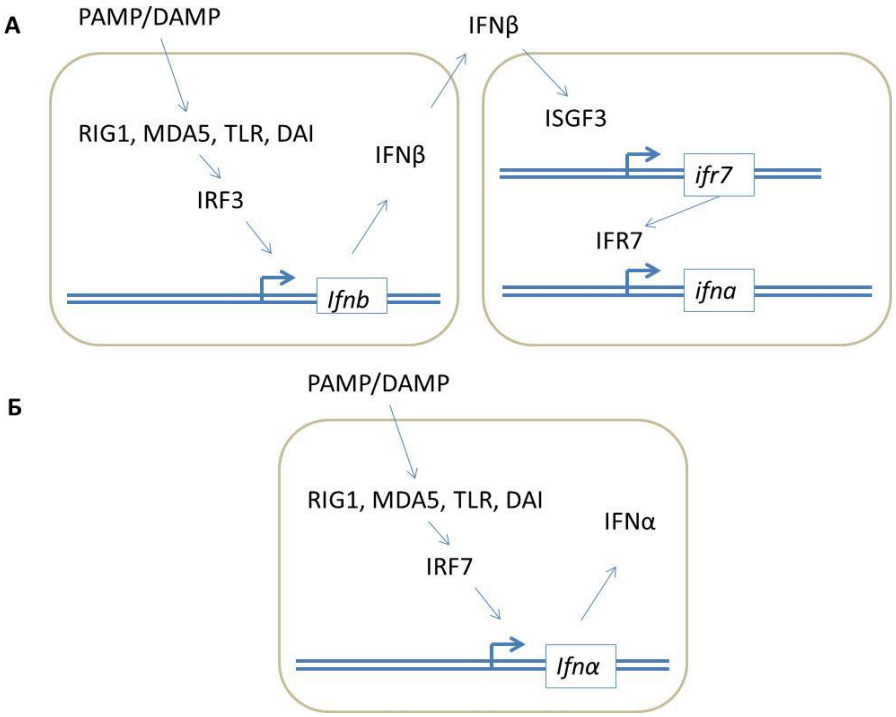


Рис 4.2. Механізм активації синтезу IFNα. А) IFNβ-залежний шлях синтезу IFNα; Б) IFNβ-незалежний шлях синтезу IFNα

Ці два механізми запуску транскрипції *Ifna* є клітинно-специфічними, і реалізація того чи іншого з них залежить від того, чи експресується конститутивно IRF7 в клітинах конкретного типу. За нашими попередніми даними, експресія IFNβ після ЧГЕ не змінюється і ми припускаємо, що синтез IFNα реалізується за другим механізмом [11]. На користь цього може свідчити те, що максимальний рівень мРНК *Ifna* спостерігався у непаренхімних клітинах, більшість із яких представлені печінковими

макрофагами – клітинами Купфера, в яких експресія прямого активатора IFNα, IRF7, відбувається на конститутивному рівні [116]. Наразі ми не можемо сказати, що саме призводить до активації вже синтезованого IRF7 в клітинах Купфера. Одними із потенційних активаторів тут можуть бути ліпополісахариди із портального кровотоку, а також нуклеїнові кислоти, що вивільняються із пошкоджених клітин під час ЧГЕ.

4.5. Резюме

В лабораторії системної біології ІМБіГ вперше було висунуто припущення про можливу участь IFNα як найактивнішого фактора вродженого імунітету і цитокіна плейотропної дії, в переході клітин печінки від стану проліферативного спокою до активації проліферації. На наш погляд, брак робіт в цій галузі, пояснюється існуючою думкою щодо антипроліферативної дії IFNα, але без урахування концентрації і часу його дії в системі. Виконану роботу присвячено дослідженню експресії і ролі IFNα у регенерації печінки з акцентом на вивчення транскрипційної активності гена *Ifnα* в тканині печінки, в паренхімних і непаренхімних клітинах печінки і експресії деяких його генів-мішеней після часткової гепатектомії і лапаротомії. Встановлено, що на ранньому етапі після часткової гепатектомії впродовж перших 3-х годин активується транскрипція гена *Ifnα* і синтез IFNα, концентрацію якого в тканині було визначено в попередніх роботах. Непаренхімні клітини печінки є відповідальними за синтез IFNα Операція лапаротомії не викликає подібних змін в експресії гена *Ifnα* в тканині печінки, а натомість спострігається зниження його експресії в непаренхімних клітинах і гепатоцитах (рис. 3.2).

Для того, щоб з'ясувати, які саме гени можуть відповідати на дію тієї кількості IFNα, яка утворюється в печінці впродовж перших 3-х годин після часткової гепатектомії, ми провели дослідження профілю генної експресії первинних гепатоцитів під впливом IFNα за умов, наближених до тих, що існують в печінці після операції. Ідентифіковані диференційно експресовані гени, які за кількістю і природою відрізнялись від переліку генів, який стандартно виявляють за більш тривалої дії вищих доз IFNα, що призводячи до інгібування проліферативної активності. Перелік генів характеризувався одночасною присутністю про- і протизапальних, про- і протиапоптотичних мРНК, Це свідчить про збалансованість відповіді гепатоцитів на квазіфізіологічну дію IFNα, яка мала би перешкоджати розвиткові проапоптичних процесів та інгібуванню проліферації, що спостерігаються за терапевтичної дії IFNα, наприклад, під час лікування вірусного гепатиту. Цей експеримент чітко вказує на те, що відповідь клітин печінки на дію IFNα залежить від концентрації і тривалості його дії . Одними з найперших генів, які *in vitro* реагували на дію IFNα, були гени системи ІСГілування, і саме їх було обрано для перевірки їх експресії після двох операцій, часткової гепатектомії і лапаротомії. Крім них, експресію генів *Pkr* і *Irf7* як більш вивчених мішеней IFNα, було обрано для дослідження, а також гени домашнього господарства *Tbp* і *18S* рДНК, експресія яких характеризує загальний стан транскрипції і трансляції.

Порівняльний аналіз профілів експресії генів системи ІСГілування із профілем експресії самого *Ifnα* неочікувано засвідчив, що експресія генів системи ІСГілування (*Isg15, Usp18*), а також *Irf7,* незважаючи на літературні дані про облігатність відповіді цих генів на IFNα, не асоціюється з експресією гена *Ifnα* після часткової гепатектомії. Після лапаротомії концентрація мРНК цих генів стрімко зростала впродовж перших 3-х годин і поверталась до вихідного рівня і навіть нижче за нього впродовж наступних годин пререплікативного періоду. На відміну від вищезазначених генів, вміст мРНК *Pkr* поступово зростав після часткової

гепатектомії і майже не мінявся після лапаротомії. Вміст мРНК генів домашнього господарства, *Tbp* мРНК і *18S* рРНК, поступово зростав впродовж всього пререплікативного періоду (12 год) після часткової гепатектомії і був нижчим за вихідний рівень (*Tbp* мРНК) впродовж 12 годин після лапаротомії.

Результати аналізу промоторів генів системи ІСГілування дозволяють припустити, що після часткової гепатектомії під впливом невідомого(их) чинника(ів) відбувається активація транскрипційного фактора IRF7. Останній конститутвно експресується у непаренхімних клітинах (макрофагах) і є загально визнаним індуктором транскрипції гена *Ifnα,* що призводить до підвищення експресії гена *Ifnα* саме у непаренхімних клітинах. Після лапаротомії під впливом також невідомих чинників відбувається активація транскрипційного фактора IRF3, який конститутивно екпресується в усіх клітинах організму і здатний активувати транскрипцію генів системи ІСГілування через специфічні сайти зв'язування в промоторах цих генів. Ці сайти зв'язуання за послідовністю дуже схожі із сайтами зв'язуання для транскрипційного фактору ISGF3, типового передавача сигналу від IFNα, що може пояснювати амбівалентність відповіді генів системи ІСГілування на дію IFNα.

Розгядаючи експресію генів системи ІСГілування в контексті експресії генів *Tbp* і *18S* рДНК, ми вважаємо, що після часткової гепатектомії, як більш сильного і безперечно якісно відмінного стресового чинника в порівнянні з лапаротомією, через глибокі зміни в метаболізмі клітин печінки, створюються передумови для інтенсифікації транскрипції і трансляції і не залучаються більш швидко діючі процеси тимчасової посттрансляційної модифікації білків за допомогою ІСГілування. Ми вважаємо, що рання відповідь на лапаротомію, як на менш сильний і інший за природою стресовий чинник, більше орієнтована на посттрансляційну модифікацію вже існуючих білків, принаймі за допомогою ІСГілування.

Незважаючи на відсутність відповіді на питання про роль IFNα у запуску процесу відновлення печінки після часткової гепатектомії, наші результати засвідчують, що досліджені в роботі гени системи ІСГілування, описані раніше як гени-мішені IFNα, діють так лише в певних ситуаціях. Гени системи ІСГілування, які є генами ранньої відповіді у первинних гепатоцитах на дію IFNα, не відповідають на підвищену експресію гена *Ifnα* після часткової гепатектомії, але їх експресія підвищується після лапаротомії за відсутності активації гена *Ifnα*. В найближчій перспективі планується визначити експресію цих генів на рівні білка і продовжити дослідження пускових механізмів відповді печінки після обох операцій.

ВИСНОВКИ

Проведено поглиблене вивчення експресії гена *Ifnα* в тканині, паренхімних и непаренхімних клітинах печінки щурів після часткової гепатектомії і впродовж реакції гострої фази після лапаротомії. Для визначення ролі IFN*α* у відновленні печінки після часткової гепатектомії досліджено як змінюється транскриптом первинних гепатоцитів, культивованих з IFN*α* в концентрації, яку було визначено в тканині після часткової гепатектомії. Серед диференційно експресованих генів обрано гени системи ІСГілування, які найскоріше реагують на дію IFN*α,* для визначення вмісту їх мРНК в печінці після обох операцій.

1. Експресія гена *Ifnα* у непаренхімних клітинах печінки зростає на початку відновлювального процесу вже через 1 год після часткової гепатектомії і знижена впродовж 12 год після лапаротомії;
2. Вперше охарактеризовано зміни в профілі генної експресії у первинних гепатоцитах під впливом IFNα за умов, наближених до ситуації після часткової гепатектомії. Визначено диференційно-експресовані гени і послідовність активації їх експресії впродовж 3-х і 6-ти год з початку дії IFN*α*.
3. В інтактних гепатоцитах гени системи ІСГілування є генами ранньої відповіді на квазіфізіологічну дію IFNα .
4. Вперше показано, що після часткової гепатектомії і лапаротомії, експресія «інтерферон-регульованих генів» системи ІСГілування і гена *Irf7* не асоціюється з експресією гена *Ifnα* на відміну від «інтерферон-регульованого гена» *Pkr,* експресія якого асоціюється із експресією *Ifnα*.
5. Проведений систематичний біоінформаційний аналіз промоторів генів системи ІСГілування засвідчив наявність сайтів зв’язування для транскрипційних факторів родини IRF, зокрема IRF3. Це передбачає участь цих факторів в активації експресії генів після лапаротомії.
6. За результатами аналізу експресії генів *Tbp* і *18S* рРНК, з одного боку,

і генів системи ІСГілування, з іншого, сформульовано положення, про те, що більш рання відповідь на часткову гепатектомію реалізується за участі процесів транскрипції і трансляції, а на лапаротомію – за участі тимчасової модифікації білків шляхом ІСГілування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Michalopoulos G. Liver regeneration / GK Michalopoulos, MC DeFrances // Science (80-.). – 1997. – P. 45–53
2. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product / D.P. Bottaro, J.S. Rubin, D.L. Faletto [et al.] // Science. – 1991. – № 4995. – P. 802–804
3. Moolten F.L. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation / F L Moolten, N L Bucher // Science. – 1967. – № 3798. – P. 272–274
4. Expression and Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Rats / E. Taniguchi, S. Sakisaka, K. Matsuo [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 2001. – № 1. – P. 121–129
5. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome / M.J. Fullwood, M.H. Liu, Y.F. Pan [et al.] // Nature. – 2009. – № 7269. – P. 58–64
6. Systems Analysis of the Complement-Induced Priming Phase of Liver Regeneration / J.S. Min, R.A. DeAngelis, E.S. Reis [et al.] // J. Immunol. – 2016. – № 6. – P. 2500–8
7. Obolenskaya M. Levels of RNA for TNF-α and receptors during the prereplicative period of liver regeneration / M. Obolenskaya // Biopolym. Cell. – 1994. – № 5. – P. 68–77
8. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice / J. Fujita, M.W. Marino, H. Wada [et al.] // Surgery. – 2001. – № 1. – P. 48–54
9. The regulation of liver cell survival by complement / M.M. Markiewski, R. a DeAngelis, C.W. Strey [et al.] // J. Immunol. – 2009. – № 9. – P. 5412–5418
10. Taub R. Liver regeneration:from myth to mechanism / Rebecca Taub, Hoffman-la Roche // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2004. – № 10. – P. 836–847

11. Interferon α expression in the rat liver after partial hepatectomy / M. Perepelyuk et al. // Biopolym. Cell. – 2006. – № 4. – P. 276–282
12. Isaacs A. Virus interference I The interferon / A Isaacs, J Lindenmann // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1957. – № 927. – P. 258–267
13. Atanasiu P. Effect of interferon originating in malignant cells on experimental infection of the newborn hamster with polyoma virus / P Atanasiu, C Chany // C. R. Seances Soc. Biol. Fil. – 1960. – P. 1687–1689
14. Paucker K. Quantitative studies on viral interference in suspended L cells / K. Paucker, K. Cantell, W. Henle // Virology. – 1962. – № 2. – P. 324–334
15. Gresser I. Inhibition by Interferon Preparations of a Solid Malignant Tumour and Pulmonary Metastases in Mice / Ion Gresser, Chantal Bourali-Maury // Nature. – 1972. – № 64. – P. 78–79
16. Chelbi-Alix M.K. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research / Mounira K. Chelbi-Alix, Juana Wietzerbin // Biochimie. – 2007. – P. 713–718
17. Pestka S. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors / S. Pestka, C.D. Krause, M.R. Walter // Immunol. Rev. – 2004. – P. 8–32
18. Roberts R.M. Interferon-tau and pregnancy / R.M. Roberts // J. Interferon Cytokine Res. – 1996. – № 4. – P. 271–273
19. Lefèvre F. A novel and atypical type one interferon gene expressed by trophoblast during early pregnancy / F Lefèvre, V Boulay // J. Biol. Chem. – 1993. – № 26. – P. 19760–19768
20. Limitin: An interferon-like cytokine that preferentially influences B-lymphocyte precursors / K. Oritani, K.L. Medina, Y. Tomiyama [et al.] // Nat. Med. – 2000. – № 6. – P. 659–666
21. Michiels T. Characterization of the Murine Alpha Interferon Gene Family / T. Michiels // Society. – 2004. – № 15. – P. 8219–8228
22. Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals / C.H. Woelk, S.D.W. Frost, D.D. Richman [et al.] // Gene. – 2007. – № 1–2. – P. 38–50
23. Samuel C.E. Interferons, Interferon Receptors, Signal Transducer and Transcriptional Activators, and Interferon Regulatory Factors / C.E.

Samuel // J. Biol. Chem. – 2007. – № 28. – P. 20045–20046

24. Weerd N. a de Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions / N. a de Weerd, S. a Samarajiwa, P.J. Hertzog // J. Biol. Chem. – 2007. – № 4. – P. 20053–20057
25. Antiviral activities of the soluble extracellular domains of type I interferon receptors / C.S. Han, Y. Chen, T. Ezashi [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2001. – P. 6138–6143
26. Hong F. Tumor necrosis factor alpha attenuates interferon alpha signaling in the liver: involvement of SOCS3 and SHP2 and implication in resistance to interferon therapy / F. Hong, V. a Nguyen, B. Gao // FASEB J. – 2001. – P. 1595–1597
27. Suppression of USP18 Potentiates the Anti-HBV Activity of Interferon Alpha in HepG2215 Cells via JAK/STAT Signaling / L. Li, Q.-S. Lei, S.-J. Zhang [et al.] // PLoS One. – 2016. – № 5. – P. e0156496
28. Interferon alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway / L. Thyrell, L. Hjortsberg, V. Arulampalam [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – № 23. – P. 24152–24162
29. Interferon alpha /beta promotes cell survival by activating nuclear factor kappa B through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt / C.H. Yang, a Murti, S.R. Pfeffer [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – № 17. – P. 13756–13761
30. G1P3, an IFN-induced survival factor, antagonizes TRAIL-induced apoptosis in human myeloma cells / V. Cheriyath, K.B. Glaser, J.F. Waring [et al.] // J. Clin. Invest. – 2007. – № 10. – P. 3107–3117
31. Gao B. Cytokines, STATs and liver disease / B. Gao // Cell. Mol. Immunol. – 2005. – № 2. – P. 92–100
32. Regulation of IFN-alpha/beta genes: evidence for a dual function of the transcription factor complex ISGF3 in the production and action of IFN-alpha/beta / H. Harada, M. Matsumoto, M. Sato [et al.] // Genes Cells. – 1996. – P. 995–1005
33. Kaur S. The PI3’ kinase pathway in interferon signaling / S. Kaur, S.

Uddin, L.C. Platanias // J. Interferon Cytokine Res. – 2005. – P. 780–787

34. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor / A. Brunet, A. Bonni, M.J. Zigmond [et al.] // Cell. – 1999. – № 6. – P. 857–868
35. Interferon alpha / beta Promotes Cell Survival by Activating Nuclear Factor kappa-B through Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt / C.H. Yang, A. Murti, S.R. Pfeffer [et al.] // J Biol Chem. – 2001. – № 17. – P. 13756–13761
36. The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of the CrkL adaptor protein / S. Ahmad, Y.M. Alsayed, B.J. Druker [et al.] // J. Biol. Chem. – 1997. – № 48. – P. 29991–29994
37. The Rac1 / p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Is Required for Interferon alpha -dependent Transcriptional Activation but Not Serine Phosphorylation of Stat Proteins / S. Uddin, F. Lekmine, N. Sharma [et al.] // J. Biol Chem. – 2000. – № 36. – P. 27634–27640
38. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action / M. a García, J. Gil, I. Ventoso [et al.] // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2006. – № 4. – P. 1032–1060
39. Hepatocytes response to interferon alpha levels recorded after liver resection / A. Kuklin, B. Tokovenko, N. Makogon [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. – 2014. – № 2. – P. 90–99
40. New advances in our understanding of the unique RNase L in host pathogen interaction and immune signaling / E. Gusho, D. Baskar, S. Banerjee [et al.] // Cytokine. – 2016
41. The mEPN scheme: an intuitive and flexible graphical system for rendering biological pathways / T.C. Freeman, S. Raza, A. Theocharidis [et al.] // BMC Syst. Biol. – 2010. – № 1. – P. 65
42. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays / M.J. de Veer, M. Holko, M. Frevel [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2001. – P. 912–920
43. The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer / J.A. Marchal, G.J. Lopez, M. Peran [et al.] // FASEB J. – 2014. – № 5. – P.

1965–74

44. A scientific journey through the 2-5A/RNase L system / R.H. Silverman [et al.] // Cytokine Growth Factor Rev. – № 5–6. – P. 381–8
45. Interferon-Inducible GTPases in Host Resistance, Inflammation and Disease / D. Pilla-Moffett, M.F. Barber, G.A. Taylor [et al.] // J. Mol. Biol. – 2016. – № 17. – P. 3495–513
46. Targeting of the GTPase Irgm1 to the phagosomal membrane via PtdIns(3,4)P(2) and PtdIns(3,4,5)P(3) promotes immunity to mycobacteria / S. Tiwari, H.-P. Choi, T. Matsuzawa [et al.] // Nat. Immunol. – 2009. – № 8. – P. 907–917
47. GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals / A.R. Shenoy, D.A. Wellington, P. Kumar [et al.] // Science. – 2012. – № 6080. – P. 481–485
48. Verhelst J. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited / J. Verhelst, P. Hulpiau, X. Saelens // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2013. – № 4. – P. 551–566
49. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex / H. Wesche, W.J. Henzel, W. Shillinglaw [et al.] // Immunity. – 1997. – № 6. – P. 837–847
50. Distinct effects of knocking down MEK1 and MEK2 on replication of herpes simplex virus type 2 / H. Zhang, H. Feng, L. Luo [et al.] // Virus Res. – 2010. – № 1–2. – P. 22–27
51. Biochemical characterization of the Ran-RanBP1-RanGAP system: are RanBP proteins and the acidic tail of RanGAP required for the Ran-RanGAP GTPase reaction? / M.J. Seewald, A. Kraemer, M. Farkasovsky [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2003. – № 22. – P. 8124–8136
52. IFN-alpha secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus / M.E. Keir, C.A. Stoddart, V. Linquist-Stepps [et al.] // J. Immunol. – 2002. – № 1. – P. 325–331
53. Expression and activation of apoptosis-related molecules involved in interferon-α-mediated apoptosis in human liver cancer cells / H. Yano, S. Ogasawara, S. Momosaki [et al.] // Int. J. Oncol. – 2005. – № 6. – P. 1645–

1652

54. Ikushima H. The IRF Family Transcription Factors at the Interface of Innate and Adaptive Immune Responses / H. Ikushima, H. Negishi, T. Taniguchi // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. – 2013
55. Levy D.E. STATS: Transcriptional control and biological impact / David E Levy, Jr. J E Darnell // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2002. – № 9. – P. 651–62
56. Cutting edge: independent roles for IRF-3 and IRF-7 in hematopoietic and nonhematopoietic cells during host response to Chikungunya infection / C. Schilte, M.R. Buckwalter, M.E. Laird [et al.] // J. Immunol. – 2012. – № 7. – P. 2967–2971
57. Gerber S.A. IFN-alpha induces transcription of hypoxia-inducible factor-1alpha to inhibit proliferation of human endothelial cells / Scott A Gerber, Jordan S Pober // J. Immunol. – 2008. – № 2. – P. 1052–1062
58. Suppression of Angiogenesis and Therapy of Human Colon Cancer Liver Metastasis by Systemic Administration of interferon alpha / S. Ozawa, H. Shinohara, H. Kanayama [et al.] // Neoplasia. – 2001. – № 2. – P. 154–164
59. Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon-alpha Use of customized gene arrays / J.F. Schlaak, C.M.U. Hilkens, A.P. Costa-Pereira [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – № 51. – P. 49428–49437
60. David M. Interferons and microRNAs / M. David // J. Interferon Cytokine Res. – 2010. – № 11. – P. 825–828
61. Differential expression of interferon-induced microRNAs in patients with chronic hepatitis C virus infection treated with pegylated interferon alpha / C. Scagnolari, P. Zingariello, J. Vecchiet [et al.] // Virol. J. – 2010. – № 1. – P. 311
62. Shin J. Il miR-122, IL28B genotype and the response to interferon in chronic hepatitis C virus infection / Jae Il Shin, Michael Eisenhut // Nat. Rev. Immunol. – 2013. – № 12. – P. 902
63. IFN-alpha Regulates Blimp-1 Expression via miR-23a and miR-125b in Both Monocytes-Derived DC and pDC / S. Parlato, R. Bruni, P. Fragapane [et al.] // PLoS One. – 2013. – № 8. – P. 1–12
64. В.А. М. Восстановление печеночной ткани послу удаления целых

долей печени до четырех пятых органа / M. B.A. // Биолого-химические исследования над печеночной тканью. – 1894. – 1-26 P.

65. Experimental pathology of the liver I Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal / G. Higgins, Anderson R [et al.] // Arch.Pathol. – 1931. – № 2. – P. 186–202
66. Effect of partial hepatectomy on DNA aythesis and mitosis in heterotopic partial autografts of rat liver / G.F. Leong, J.W. Grisham, B. V Hole [et al.] // Cancer Res. – 1964. – P. 1496–501
67. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection / T.G. Marques, E. Chaib, J.H. da Fonseca [et al.] // Acta Cir. Bras. – 2012. – № 8. – P. 589–594
68. Gene Expression Profile at the G 1 / S Transition of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice Reportes Bio Do No t D ist r ibu / A. Satyanarayana, R. Geffers, J. Buer [et al.] 2004. – № November. – P. 1405–1417
69. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice / A.I. Su, L.G. Guidotti, J.P. Pezacki [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2002. – № 17. – P. 11181–11186
70. Fukuhara Y. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy / Y. Fukuhara, A. Hirasawa, X. Li // J. Hepatol. – 2003. – № 6. – P. 784–792
71. Identification of transcriptional networks during liver regeneration / P. White, J.E. Brestelli, K.H. Kaestner [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – № 5. – P. 3715–3722
72. Han H. Effects of the pathogen infection-related genes on rat liver regeneration / H. Han, L. Zhang, C. Xu // Life Sci. J. – 2006. – № 2. – P. 50–55
73. Correlation analysis of liver tumor-associated genes with liver regeneration / C.-S. Xu, S.-B. Zhang, X.-G. Chen [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2007. – № 24. – P. 3323–3332
74. Microarray approach reveals the relevance of interferon signaling pathways with rat liver restoration post 2/3 hepatectomy at cellular level / X. Chen,

C. Xu, F. Zhang [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. – 2010. – № 7. – P. 525–539

75. Michalopoulos G.K. Liver regeneration / George K Michalopoulos, Marie DeFrances // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2005. – № April. – P. 101–134
76. Growth control of human biliary epithelial cells by interleukin 6, hepatocyte growth factor, transforming growth factor beta1, and activin A: comparison of a cholangiocarcinoma cell line with primary cultures of non-neoplastic biliary epithelial cells / S. Yokomuro, H. Tsuji, J.G. Lunz [et al.] // Hepatology. – 2000. – № 1. – P. 26–35
77. EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration / A. Collin de L'hortet, H. Gilgenkrantz, J.-E. Guidotti [et al.] // Int. J. Hepatol. – 2012. – P. 476910
78. Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture / G. Michalopoulos, H.D. Cianciulli, A.R. Novotny [et al.] // Cancer Res. – 1982. – № 11. – P. 4673–4682
79. Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration / M. Macias-Silva, W. Li, J.I. Leu [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – № 32. – P. 28483–28490
80. An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice / J. LaMarre, M.A. Hayes, G.K. Wollenberg [et al.] // J. Clin. Invest. – 1991. – № 1. – P. 39–44
81. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver / T. Ichikawa, Y.Q. Zhang, K. Kogure [et al.] // Hepatology. – 2001. – № 5. – P. 918–925
82. Zimmermann A. Regulation of liver regeneration / A. Zimmermann // Nephrol. Dial. Transplant. – 2004. – P. iv6-10
83. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis / S. Duarte, J. Baber, T. Fujii [et al.] // Matrix Biol. – 2015. – P. 147–156
84. Campbell J. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver

regeneration / JS Campbell, Lisa Prichard // J. Clin. Invest. – 2001. – № 10. – P. 1285–1292

85. Fausto N. Involvement of the innate immune system in liver regeneration and injury / N. Fausto 2006. – P. 347–349
86. TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L) / J.J. Kim, S.B. Lee, J.K. Park [et al.] // Cell Death Differ. – 2010. – № 9. – P. 1420–1434
87. Effect of NF-kappa B inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis in human RPE cells / P. Yang, B.S. McKay, J.B. Allen [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2004. – № 7. – P. 2438–2446
88. The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation / S. Haga, M. Ozaki, H. Inoue [et al.] // Hepatology. – 2009. – № 1. – P. 204–214
89. Natarajan A. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration / A. Natarajan, B. Wagner, M. Sibilia // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2007. – № 43. – P. 17081–17086
90. HGF–Met Pathway in Regeneration and Drug Discovery / K. Matsumoto, H. Funakoshi, H. Takahashi [et al.] // Biomedicines. – 2014. – № 4. – P. 275–300
91. Kanao T. Lymphangiogenesis promotes lens destruction and subsequent lens regeneration in the newt eyeball, and both processes can be accelerated by transplantation of dendritic cells / Tomoko Kanao, Yukihisa Miyachi // Dev. Biol. – 2006. – № 1. – P. 118–124
92. Godwin J.W. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration / J.W. Godwin, A.R. Pinto, N.A. Rosenthal // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2013. – № 23. – P. 9415–9420
93. Wound healing in the PU1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells / P. Martin, D. D'Souza, J. Martin [et al.] // Curr. Biol. – 2003. – № 13. – P. 1122–1128
94. Martin P. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and

the ugly / Paul Martin, S Joseph Leibovich // Trends Cell Biol. – 2005. – № 11. – P. 599–607

95. Suppression of the immune response potentiates tadpole tail regeneration during the refractory period / T. Fukazawa, Y. Naora, T. Kunieda [et al.] // Development. – 2009. – № 14. – P. 2323–2327
96. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease / J.R. Bradley // J. Pathol. – 2008. – № 2. – P. 149–160
97. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – № 5. – P. 878–888
98. Crispe I. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance / I. Crispe, M. Giannandrea, I. Klein // Immunol. Rev. – 2006. – № October. – P. 101–118
99. Proinflammatory Cytokine Production in Liver Regeneration Is Myd88-Dependent, but Independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4 / J.S. Campbell, K.J. Riehle, J.T. Brooling [et al.] // J. Immunol. – 2006. – № 4. – P. 2522–2528
100. Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools / R. Simon, A. Lam, M. Li [et al.] 2007. – № 301. – P. 11–17
101. Huang D.W. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources / D.W. Huang, B.T. Sherman, R. a Lempicki // Nat. Protoc. – 2009. – № 2. – P. 44–57
102. COTRASIF: Conservation-aided transcription-factor-binding site finder / B. Tokovenko, R. Golda, O. Protas [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2009. – № 7
103. The interferon-inducible GTPases / S. Martens, J. Howard [et al.] // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2006. – P. 559–89
104. Chauhan S. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense / S. Chauhan, M.A. Mandell, V. Deretic // Mol. Cell. – 2015. – № 3. – P. 507–521
105. Interferon-stimulated gene of 20 kDa protein (ISG20) degrades RNA of Hepatitis B virus to impede the replication of HBV in vitro and in vivo / C.R. Leong, K. Funami, H. Oshiumi [et al.] // Oncotarget. – 2016

106. Distinct induction patterns and functions of two closely related interferon-inducible human genes, ISG54 and ISG56 / F. Terenzi, D.J. Hui, W.C. Merrick [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – № 45. – P. 34064–71
107. Interferon-inducible antiviral effectors / A.J. Sadler, B.R.G. Williams [et al.] // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – № 7. – P. 559–68
108. Zhang D. Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system / Dongxian Zhang, Dong-Er Zhang // J. Interferon Cytokine Res. – 2011. – № 1. – P. 119–130
109. Bie P. de Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms / P de Bie, a Ciechanover // Cell Death Differ. – 2011. – № 9. – P. 1393–1402
110. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity / K. Ozato, D.-M. Shin, T.-H. Chang [et al.] // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – № 11. – P. 849–60
111. Ubiquitin ligases and the immune response / Y.-C. Liu [et al.] // Annu. Rev. Immunol. – 2004. – P. 81–127
112. XIAP monoubiquitylates Groucho/TLE to promote canonical Wnt signaling / A.J. Hanson, H.A. Wallace, T.J. Freeman [et al.] // Mol. Cell. – 2012. – № 5. – P. 619–28
113. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture) / A. Ciechanover // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2005. – № 37. – P. 5944–5967
114. Kipreos E.T. The F-box protein family / E T Kipreos, M Pagano // Genome Biol. – 2000. – № 5. – P. 3002.1-3002.7
115. PARP, transcription and chromatin modeling / M. Posavec Marjanović, K. Crawford, I. Ahel [et al.] // Semin. Cell Dev. Biol. – 2016
116. Ning S. IRF7: activation, regulation, modification and function / S. Ning, J.S. Pagano, G.N. Barber // Genes Immun. – 2011. – № 6. – P. 399–414
117. Platanias L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling / L.C. Platanias // Nat. Rev. Immunol. – 2005. – № May. – P. 375–386

118. Identification of a transcriptionally active peroxisome proliferator-activated receptor alpha -interacting cofactor complex in rat liver and characterization of PRIC285 as a coactivator / S. Surapureddi, S. Yu, H. Bu [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2002. – № 18. – P. 11836–41
119. ERAP140, a conserved tissue-specific nuclear receptor coactivator / W. Shao, S. Halachmi, M. Brown [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2002. – № 10. – P. 3358–72
120. Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator / D.B. Bloch, A. Nakajima, T. Gulick [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2000. – № 16. – P. 6138–46
121. CPAP is a novel stat5-interacting cofactor that augments stat5-mediated transcriptional activity / B. Peng, K.D. Sutherland, E.Y.M. Sum [et al.] // Mol. Endocrinol. – 2002. – № 9. – P. 2019–33
122. Centrosomal P4 1-associated Protein Is a New Member of Transcriptional Coactivators for Nuclear Factor- kappa B / M. Koyanagi, M. Hijikata, K. Watashi [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – № 13. – P. 12430–12437
123. The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors / B.H. Jennings, D. Ish-Horowicz [et al.] // Genome Biol. – 2008. – № 1. – P. 205
124. c-Myb protein interacts with Rcd-1, a component of the CCR4 transcription mediator complex / M. Haas, M. Siegert, A. Schürmann [et al.] // Biochemistry. – 2004. – № 25. – P. 8152–9
125. Role of 2-5A-dependent RNase-L in senescence and longevity / J.B. Andersen, X.L. Li, C.S. Judge [et al.] // Oncogene. – 2007. – № October 2006. – P. 3081–3088
126. Human Bex2 interacts with LMO2 and regulates the transcriptional activity of a novel DNA-binding complex / C. Han, H. Liu, J. Liu [et al.] 2005. – № 20. – P. 6555–6565
127. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses / E.J.A.M. Sijts, P.M. Kloetzel [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2011. – № 9. – P. 1491–502
128. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions / J.R.

Groom, A.D. Luster [et al.] // Immunol. Cell Biol. – 2011. – № 2. – P. 207–15

129. Intrahepatic levels of PD-1/PD-L correlate with liver inflammation in chronic hepatitis B / J. Chen, X.-M. Wang, X.-J. Wu [et al.] // Inflamm. Res. – 2011. – № 1. – P. 47–53
130. Tudor-SN and ADAR1 are components of cytoplasmic stress granules / R. Weissbach, A.D.J. Scadden [et al.] // RNA. – 2012. – № 3. – P. 462–71
131. Identification of novel argonaute-associated proteins / G. Meister, M. Landthaler, L. Peters [et al.] // Curr. Biol. – 2005. – P. 2149–2155
132. Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria / Y. Xu, M. Johansson, A. Karlsson [et al.] // J. Biol. Chem. – 2008. – № 3. – P. 1563–71
133. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity / D.B. Stetson, J.S. Ko, T. Heidmann [et al.] // Cell. – 2008. – № 4. – P. 587–98
134. Immune signaling by RIG-I-like receptors / Y.-M. Loo, M. Gale [et al.] // Immunity. – 2011. – № 5. – P. 680–92
135. FLN29 deficiency reveals its negative regulatory role in the Toll-like receptor (TLR) and retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicase signaling pathway / T. Sanada, G. Takaesu, R. Mashima [et al.] // J. Biol. Chem. – 2008. – № 49. – P. 33858–64
136. Regulation of actin dynamics by protein kinase R control of gelsolin enforces basal innate immune defense / A.T. Irving, D. Wang, O. Vasilevski [et al.] // Immunity. – 2012. – № 5. – P. 795–806
137. Link between the ubiquitin conjugation system and the ISG15 conjugation system: ISG15 conjugation to the UbcH6 ubiquitin E2 enzyme / T. Takeuchi, S. Iwahara, Y. Saeki [et al.] // J. Biochem. – 2005. – № 6. – P. 711–719
138. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein / C. Zhao, S.L. Beaudenon, M.L. Kelley [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2004. – № 20. – P. 7578–7582
139. Durfee L.A. The basis for selective E1-E2 interactions in the ISG15

conjugation system / L.A. Durfee, M.L. Kelley, J.M. Huibregtse // J. Biol. Chem. – 2008. – № 35. – P. 23895–23902

140. Molecular cloning of rat efp: expression and regulation in primary osteoblasts / S. Inoue, T. Urano, S. Ogawa [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1999. – № 2. – P. 412–418
141. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins / M.P. Malakhov, O.A. Malakhova, K. Il Kim [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – № 12. – P. 9976–9981
142. Cytokines and liver regeneration / M. Obolenskaya [et al.] // Eos (Washington. DC). – 1997. – № 2. – P. 51–58
143. Signalling molecules in regenerating liver / M. Obolenskaya [et al.] // Biopolym Cell. – 1998. – № 3. – P. 210–222
144. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus / E.M. Webber, P.J. Godowski, N. Fausto [et al.] // Hepatology. – 1994. – № 2. – P. 489–97
145. Knobeloch K.P. Chapter 17 in vivo function of ISGylation / K.P. Knobeloch 2010. – P. 215–227
146. Zamanian-Daryoush M. Cell cycle regulation of the double stranded RNA activated protein kinase, PKR / M. Zamanian-Daryoush, S.D. Der, B.R. Williams // Oncogene. – 1999. – P. 315–326
147. A complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration / R. a DeAngelis, M.M. Markiewski, I. Kourtzelis [et al.] // J. Immunol. – 2012. – № 2. – P. 641–648
148. The RAX/PACT-PKR stress response pathway promotes p53 sumoylation and activation, leading to G_1 arrest / R.L. Bennett, Y. Pan, J. Christian [et al.] // Cell Cycle. – 2012. – № 2. – P. 407–17
149. Regeneration of the mammalian liver I Auto-phagocytosis during dedifferentiation of the liver cell in preparation for cell division / F.F. Becker, B.P. Lane [et al.] // Am. J. Pathol. – 1965. – № 5. – P. 783–801
150. Multiple sclerosis associated with interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia / I. Kataoka, K. Shinagawa, Y. Shiro [et al.] // Am. J. Hematol. – 2002. – № February 2001. – P. 149–153

151. Suppression of lysosomal proteolysis at three different steps in regenerating rat liver / K. Watanabe, K. Ishidoh, T. Ueno [et al.] // J. Biochem. – 1998. – № 5. – P. 947–56
152. Transcriptome analysis of hepatocytes after partial hepatectomy in rats / C. Xu, X. Chen, C. Chang [et al.] // Dev. Genes Evol. – 2010. – № 9–10. – P. 263–74
153. Suppression of autophagy during liver regeneration impairs energy charge and hepatocyte senescence in mice / T. Toshima, K. Shirabe, T. Fukuhara [et al.] // Hepatology. – 2014. – № 1. – P. 290–300
154. Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration / E. Zorde-Khvalevsky, R. Abramovitch, H. Barash [et al.] // Hepatology. – 2009. – № 1. – P. 198–206
155. Role of caspase-8 in hepatocyte response to infection and injury in mice / T. Ben Moshe, H. Barash, T.-B. Kang [et al.] // Hepatology. – 2007. – № 4. – P. 1014–24
156. Nuclear receptors in regenerating liver and hepatocellular carcinoma / M. Vacca, C. Degirolamo, V. Massafra [et al.] // Mol. Cell. Endocrinol. – 2013. – № 1–2. – P. 108–19
157. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes / S. Dupont, A. Krust, A. Gansmuller [et al.] // Development. – 2000. – № 19. – P. 4277–91
158. Delayed liver regeneration in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice / S.P. Anderson, L. Yoon, E.B. Richard [et al.] // Hepatology. – 2002. – № 3. – P. 544–54
159. Deregulation of growth factor, circadian clock, and cell cycle signaling in regenerating hepatocyte RXRalpha-deficient mouse livers / X. Yang, M. Guo, Y.-J.Y. Wan [et al.] // Am. J. Pathol. – 2010. – № 2. – P. 733–43
160. Loss of signal transducer and activator of transcription 5 leads to hepatosteatosis and impaired liver regeneration / Y. Cui, A. Hosui, R. Sun [et al.] // Hepatology. – 2007. – № 2. – P. 504–13
161. Gene and protein expressions of p28GANK in rat with liver regeneration /

J.-M. Qin, X.-Y. Fu, S.-J. Li [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2003. – № 11. – P. 2523–7

162. Glycogen synthase kinase 3 β-dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration / S. Sekiya, A. Suzuki [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2011. – № 27. – P. 11175–80
163. Genetic abolishment of hepatocyte proliferation activates hepatic stem cells / Y. Endo, M. Zhang, S. Yamaji [et al.] // PLoS One. – 2012. – № 2. – P. e31846
164. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration / G. Song, A.D. Sharma, G.R. Roll [et al.] // Hepatology. – 2010. – № 5. – P. 1735–43
165. MicroRNA profiling in murine liver after partial hepatectomy / I. Chaveles, A. Zaravinos, I.G. Habeos [et al.] // Int. J. Mol. Med. – 2012. – № 5. – P. 747–55
166. A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration / R. Ng, G. Song, G.R. Roll [et al.] // J. Clin. Invest. – 2012. – № 3. – P. 1097–108
167. Activity of cytosolic 5'-nucleotidase in regenerating rat liver after partial hepatectomy / H. Tjernshaugen, P. Fritzson [et al.] // Int. J. Biochem. – 1984. – № 6. – P. 607–13
168. Increases in the mitochondrial DNA replication and transcription in the remnant liver of rats / H. Koyama, T. Kurokawa, T. Nonami [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – № 3. – P. 858–61
169. Pre-replicative association of multiple replicative enzyme activities with the nuclear matrix during rat liver regeneration / R.A. Tubo, R. Berezney [et al.] // J. Biol. Chem. – 1987. – № 3. – P. 1148–54
170. Markiewski M.M. Liver inflammation and regeneration : Two distinct biological phenomena or parallel pathophysiologic processes ? / M.M. Markiewski, R.A. Deangelis, J.D. Lambris 2006. – P. 45–56
171. Cyclosporine enhances liver regeneration: the role of hepatocyte MHC expression and PGE2--a study relevant to graft immunogenicity / I. Fouzas, M. Daoudaki, G.C. Sotiropoulos [et al.] // Eur. J. Med. Res. – 2008. – № 4.

– P. 154–62

172. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 coordinately regulate the type I IFN response in myeloid dendritic cells downstream of MAVS signaling / H.M. Lazear, A. Lancaster, C. Wilkins [et al.] // PLoS Pathog. – 2013. – № 1. – P. e1003118
173. UBE1L causes lung cancer growth suppression by targeting cyclin D1 / Q. Feng, D. Sekula, Y. Guo [et al.] // Mol. Cancer Ther. – 2008. – № 12. – P. 3780–3788
174. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth / T. Urano, T. Saito, T. Tsukui [et al.] // Nature. – 2002. – № 6891. – P. 871–875
175. Hepatic protein synthesis in the regenerating rat liver after hepatopancreatectomy / K. Okano, T. Tsubouchi, Y. Yamashita [et al.] // Surg. Today. – 1997. – № 6. – P. 511–517
176. Nikolov E.H. Activated ribosomal RNA synthesis in regenerated rat liver upon inhibition of protein synthesis / E.H. Nikolov, B.B. Nankova, M.D. Dabeva // Mol. Biol. Rep. – 1991. – № 1. – P. 45–52
177. Baumann H. The acute phase response / H Baumann, J Gauldie // Immunol. Today. – 1994. – № 2. – P. 74–80

ДОДАТКИ

Додаток А

А.1 Попередня обробка і нормалізація даних експерименту з мікроареями ДНК

Контроль якості і попередню обробку проводили в статистичному середовищі R із використанням пакетів функцій Bioconductor. Перевірку якості проходження реакції гібридизації, яка залежить також і від попередніх етапів підготовки проби, проводили за допомогою пакету simpleaffy та affyPLM [http://bioconductor.org/packages/2.12/bioc/manuals/simpleaffy/man/simpleaffy.pdf] [http://www.bioconductor.org/packages/2.11/bioc/vignettes/affyPLM/inst/doc/QualityAssess.pdf] і використовували функції “image”, “RLE”, “NUSE” у вигляді: >pset=firPLM(data.raw) – де data.raw це AffyBatch об’єкт (завантажені дані мікроареїв)

>image(pset) – створює псевдо зображення мікроареїв

>RLE(pset) – створює діаграму розподілу відносного логарифму експресії

>NUSE(pset) – створює діаграму розподілу нормалізованої стандартної похибки.

Для визначення середнього фонового сигналу, якості кРНК, фактору нормалізації та ефективності гібридизації була застосована функція qc пакету simpleaffy, у вигляді

>qc(data.raw)

>plot(qc(data.raw)) - виводить графічне відображення результатів контролю якості

Для попередньої обробки результатів та нормалізації було використано функції із пакету affy [http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/manuals/affy/man/affy.pdf] Нормалізацію проводили у два етапи: на першому етапі між чотирма групами результатів, які включали результати культивування гепатоцитів впродовж трьох годин з IFNα і без нього і відповідно впродовж шести годин; на наступному між всіма 12 мікроареями. Для цього застосовували команди:

>data.bgcorrected = bg.correct.rma(data.raw) – дана команда виконує корекцію фонового сигналу в усіх мікроареях. Наступні чотири команди нормалізують окремо кожну із чотирьох експериментальних груп за методом “quantile” (чипи 1, 3, 5 - IFNα, 3год. культивування; 2, 4, 6, - 3год. культивування без IFNα; 7, 9, 11 – IFNα, 6год. культивування; 8,10,12 – 6 год. культивування без ІФН α)

>data.normalized.135 = normalize(data.bgcorrected[,c(1,3,5)], method="quantiles")

>data.normalized.246 = normalize(data.bgcorrected[,c(2,4,6)], method="quantiles")

>data.normalized.7911 = normalize(data.bgcorrected[,c(7,9,11)], method="quantiles")

>data.normalized.81012 = normalize(data.bgcorrected[,c(8,10,12)], method="quantiles")

Після нормалізації дані міроареїв кожної із експериментальних груп були стадійно “злиті” в один об’єкт “data.normalized” за допомогою наступних трьох команд.

>data.normalized.7911_81012 = merge.AffyBatch(data.normalized.7911, data.normalized.81012)

>data.normalized.135_246 = merge.AffyBatch(data.normalized.135, data.normalized.246)

>data.normalized = merge.AffyBatch(data.normalized.135_246, data.normalized.7911_81012)

Фінальна нормалізація проводилася між усіма мікроареями за допомогою функції “expresso”, де: data.normalized - дані, що нормалізовані на попередніх етапах; bgcorrect.method=”rma” – параметр, що визначає метод, за яким проводиться корекція фонового сигналу (“rma”); normalize.method=”quantile” – визначає метод за яким проводиться нормалізація даних; pmcorrect.method=”pmonly” – параметр, за яким проводиться обчислення лише над зондами, що повністю комплементарні до цільової кРНК (perfect match); summary.method=”medianpolish” – параметр, що визначає метод, за яким підсумовуються дані в наборі зондів до единого значення експресії генів.

>eset.medianpolish = expresso(data.normalized, bgcorrect.method="none", normalize.method="quantiles", pmcorrect.method="pmonly", summary.method="medianpolish")

При застосуванні цієї команди було створено об’єкт “eset.medianpolish”, що містить нормалізовані, логарифмовані та сумарні значення експресії. Для порівняння даних до та після нормалізації використовували команди:

>boxplot(data.raw)

>boxplot(exprs(eset.medianpolish))

які виводять діаграми розподілу інтенсивностей сигналу. Значення експресії були збережені в текстовий файл за допомогою функції

>write.exprs(eset.medianpolish, file=”data.mpolish.txt”), що створює текстовий файл “data.mpolish.txt” в робочій директорії.

А.2 Оцінка якості проведення експерименту з мікроареями ДНК

Оцінка якості результатів гібридизації кРНК з мікроареями ДНК - важливий перший крок в аналізі даних. Оцінка якості дає змогу визначити

наскільки успішно був проведений синтез кРНК, а також наскільки ефективно була проведена гібридизація кРНК з мікроареями ДНК.

Для визначення варіації між інтенсивністю сигналів на різних мікроареях ми використали відносний логарифм експресії (Relative Log Expression, RLE) і нормалізовану стандартну похибку (Normalized Unscaled Standard Error, NUSE) з функцій пакету affyPLM. NUSE вираховується для кожного гена на всіх мікроареях та стандартизується так, щоб медіана стандартної похибки для кожного гена дорівнювала одиниці. RLE вираховується для кожного гена шляхом порівняння величини експресії для кожного гена на кожному мікроареї з медіаною величини експресії для цього гена на всіх мікроареях. Оскільки ми припускаємо, що більшість генів експресуються на сталому рівні, то значення NUSE і RLE мають бути близько одиниці та нуля, відповідно, і відхилення за даними параметрами в якомусь конкретному мікроареї може свідчити про нижчу якість даних, отриманих з нього (рис. А.1.1) [http://www.bioconductor.org/packages/2.11/bioc/vignettes/affyPLM/inst/doc/QualityAssess.pdf]. В нашому експерименті, мікроареї 11.CEL та 8.CEL мають трохи завищені значення NUSE, що може бути пов’язаним із підвищеною, відносно решти мікроареїв, загальною інтенсивністю сигналів. Проте ці відхилення за даними показниками не є суттєвими, оскільки після нормалізації параметри якості лежали в межах норми.

Пакет Simpleaffy дозволяє оцінити якість РНК і результати гібридизації за п’ятьма критеріями: середнім значенням фону; фактором нормалізації; кількістю зондів на мікроареї, з якими гібридизувалась кРНК; співвідношенням інтенсивностей сигналів, утворених з 3’-ділянками ДНК гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (ГАФДГ) і β-актину, до інтенсивностей сигналів в зоні 5’- ділянок цих генів [http://bioconductor.org/packages/2.12/bioc/manuals/simpleaffy/man/simpleaffy.pdf].

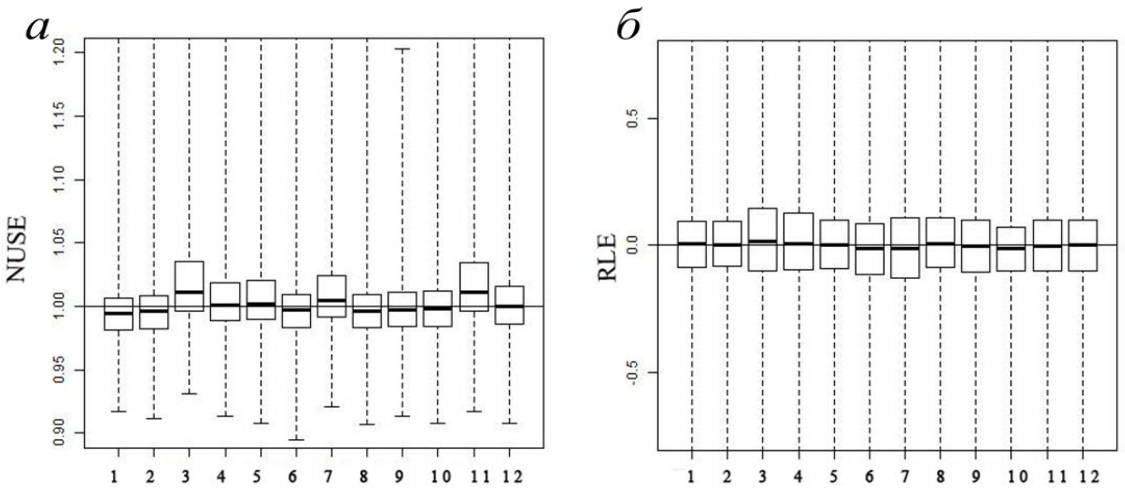


Рис. А.1.1. Діаграми розподілу нормалізованої стандартної похибки NUSE (*а*) і відносного логарифму експресії RLE (*б*). 1 – 12, номери мікроареїв, що досліджувалися.

Значення фонової інтенсивності виражається в безрозмірних величинах та зазвичай коливається від 20 до 100. Як видно з рис. А.1.2, який було згенеровано функцією qc пакету simpleaffy, значення інтенсивності фону для всіх експериментів знаходиться в межах 53 – 66 (рис. А.1.2), що свідчить про малий розкид за даним показником.

Для того, щоб нормалізувати інтенсивності сигналів між різними чипами, зазвичай розраховується середнє значення середніх інтенсивностей сигналів всіх чипів, які були в експерименті, і до цього значення зводяться середні значення інтенсивності кожного чипа через спеціально розрахований коефіцієнт – фактор нормалізації. Affymetrix рекомендує, щоб значення фактору нормалізації не перевищувало трьох (рис. А.1.2). Результат нормалізації можна також побачити за різницею розподілів інтенсивностей сигналів між мікроареями (рис. А.1.3) [http://bioconductor.org/packages/2.12 /bioc/ manuals/simpleaffy/man/simpleaffy.pdf].

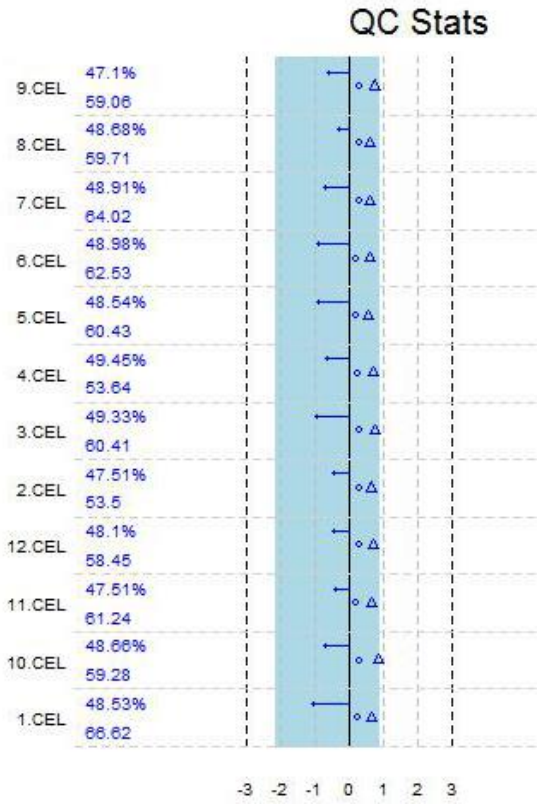


Рис. А.1.2. Діаграма параметрів контролю якості гібридизації. Кружечек – співвідношення інтенсивностей сигналу 3′ до 5′ ділянки гена гліцеральдегід фосфат дегідрогенази (не має перевищувати одиницю); Δ – співвідношення інтенсивностей сигналу 3′ до 5′ ділянки гена β-актину (не має перевищувати трьох); • − величина фактору нормалізації (має лежати в межах від - 3 до 3); значення у відсотках – кількість «присутніх генів», під ними середнє значення інтенсивності фону.

За величиною співвідношення інтенсивності сигналів з повністю комплементарних (perfect match) і контрольних зондів з одним некомплементарним нуклеотидом (mismatch) обирається одна із трьох можливостей щодо наявності певної кРНК в досліджуваному препараті – «присутня» (P – present), відсутня (A- absent) або присутність достеменно не визначена (M – marginal). Кількість «присутніх» кРНК в зразку виражається у відсотках по відношенню до загальної кількості зондів і не повинна сильно варіювати між різними мікроареями [http://bioconductor.org/packages/2.12/bioc/manuals/simpleaffy/man/simpleaffy

.pdf]. В нашому експерименті розкид за даним показником був досить малим і коливався від 47.1% до 49.45% (рис. А.1.3).

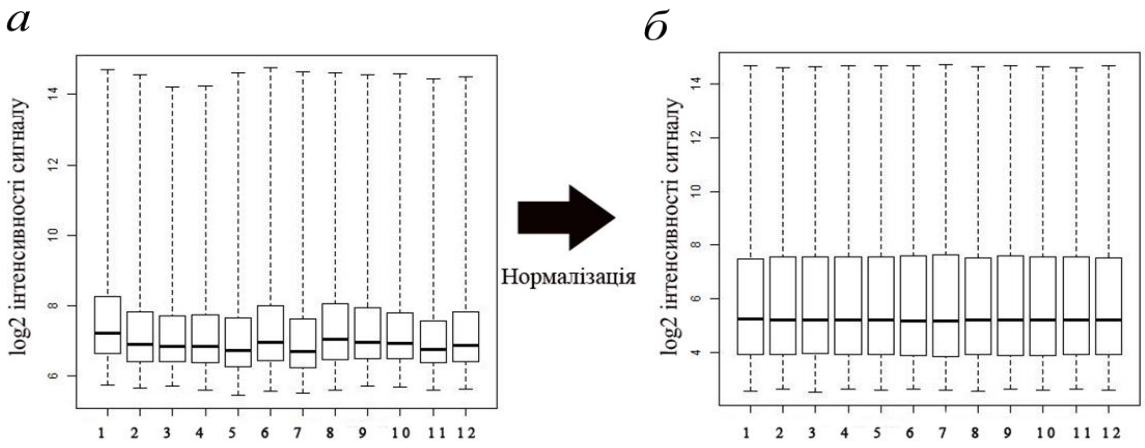


Рис. А.1.3. Розподіл інтенсивностей сигналу до та після нормалізації. 1 – 12, номери мікроареїв, що досліджувалися.

Окремим елементом оцінки ефективності гібридизації є визначення співвідношення інтенсивностей сигналів для контрольних зразків кРНК, які вносяться в гібридизаційну суміш і походять з локусів BioB, BioC, BioD і Cre E. Coli. РНК, зчитану з цих локусів, вносять в гібридизаційну суміш у зростаючій концентрації від РНК BioB до РНК Cre, а саме від 1,5 пМоль РНК BioB до 100 пМоль РНК Cre. Гібридизаційний сигнал РНК BioB з відповідним зондом має бути “присутнім” у кожному зразку. В такому разі чутливість методу є оптимальною. В нашому експерименті цей сигнал був на всіх чипах.

Іще одне співвідношення використовується для оцінки повноти полімеризації при синтезі кДНК і інтактність молекул кРНК, а саме співвідношення інтенсивності сигналів від гібридизації кРНК з 3'- і 5'-ділянками ДНК, які кодують ГАФДГ та β-актин. ГАФДГ має більш короткий транскрипт, ніж β-актин., тому максимально допустиме співвідношення для нього дорівнює одиниці, а для β-актину трьом

[http://bioconductor.org/packages/2.12/bioc/manuals/simpleaffy/man/simpleaffy.pdf]. Всі значення співвідношення інтенсивностей сигналів від 3'- до 5'-ділянок генів ГАФДГ та β-актину не перевищували 1, що свідчить про хорошу якість РНК та високу ефективність in vitro транскрипції для всіх зразків (рис. А.1.2).

Таким чином отримані дані засвідчили якість кРНК і проведеної реакції гібридизації. Попередня обробка і нормалізація даних відповідають загальноприйнятим критеріям і дозволяють перейти до наступного етапу - статистичному аналізу і визначенню диференційно експресованих генів.

Додаток Б

Диференційно експресовані гени

Таблиця Б.1

Диференційно-експресовані гени після трьох годин інкубації з IFNα

#	Ідентифікатор набору зондів Affymetrix	Параметричне значення величини p	Приріст/спад експресії у порівнянні із контролем	Символ гену	Повна назва гену
1	1387969_at	4.30E-05	31.56	*Cxcl10*	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
2	1394528_at	6.08E-05	2.88	NA	NA
3	1370913_at	1.54E-04	6.40	*Rsad2*	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
4	1383938_at	2.40E-04	10.18	*Ncoa7*	nuclear receptor coactivator 7
5	1373197_at	3.37E-04	5.86	*LOC686701*	similar to Protein KIAA1404
6	1393085_at	3.89E-04	2.70	*Mitd1*	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1
7	1390531_at	3.97E-04	2.41	*Pric285*	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285
8	1379568_at	4.85E-04	6.49	*Ifit2*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
9	1376908_at	7.66E-04	8.52	*Ifit3*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
10	1383564_at	7.94E-04	3.77	*Irf7*	interferon regulatory factor 7
11	1381014_at	8.09E-04	2.89	*Ifi44*	interferon-induced protein 44
12	1391489_at	8.41E-04	3.00	*Irgm*	immunity-related GTPase family, M
13	1379633_a	8.53E-	2.75	*Uba7*	ubiquitin-like modifier activating

Продовження таблиці Б.1

	_at	04			enzyme 7
14	1375796_at	8.65E-04	9.15	*Igtp*	interferon gamma induced GTPase
15	1368073_at	1.35E-03	4.72	*Irf1*	interferon regulatory factor 1
16	1392637_at	1.37E-03	6.28	NA	NA
17	1382314_at	1.55E-03	3.15	*G1p2*	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)
18	1371015_at	1.61E-03	3.77	*Mx1*	myxovirus (influenza virus) resistance 1
19	1383424_at	1.87E-03	7.37	*Cmpk2*	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial
20	1389365_at	1.97E-03	2.47	*LOC690000*	similar to CG3740-PA
21	1376151_a_at	2.19E-03	2.10	*NA*	NA
22	1373992_at	2.53E-03	5.80	*MGC108823*	similar to interferon-inducible GTPase
23	1388149_at	3.75E-03	2.09	*Tap1*	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
24	1377497_at	3.76E-03	3.03	*Oasl*	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
25	1382902_at	3.78E-03	2.20	*Herc6*	potential ubiquitin ligase
26	1382177_at	4.20E-03	2.72	NA	NA
27	1391754_at	4.74E-03	2.33	*Oas1i*	2'-5' oligoadenylate synthetase 1I
28	1376496_at	4.80E-03	2.10	*Apol9a*	apolipoprotein L 9a

NA – ген не має анотації

Таблиця Б2

Диференційно експресовані гени в первинних гепатоцитах після стимуляції IFNα впродовж шести годин

Продовження таблиці Б.2

#	Ідентифікатор набору зондів Affymetrix	Параметричне значення величини p	Приріст/спад експресії у порівнянні із контролем	Символ гену	Повна назва гену
1	1379568_at	4.00E-07	13.20	*Ifit2*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
2	1373197_at	6.00E-07	11.53	*LOC686701*	similar to Protein KIAA1404
3	1389365_at	1.20E-06	5.24	*LOC690000*	similar to CG3740-PA
4	1391489_at	2.00E-06	7.20	*Irgm*	immunity-related GTPase family, M
5	1374337_at	2.70E-06	9.40	Rnf213	ring finger protein 213
6	1373514_at	3.40E-06	7.73	*LOC688296*	similar to chromosome 17 open reading frame 27
7	1390531_at	4.20E-06	2.98	*Pric285*	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285
8	1381014_at	4.30E-06	5.88	*Ifi44*	interferon-induced protein 44
9	1379316_at	4.30E-06	4.53	*NA*	NA
10	1385252_at	4.40E-06	2.56	*Trim6*	tripartite motif-containing 6
11	1383424_at	4.40E-06	29.93	*Cmpk2*	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial
12	1376908_at	4.60E-06	22.54	*Ifit3*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
13	1393085_at	4.70E-06	6.10	*Mitd1*	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1
14	1392637_at	5.50E-06	19.52	*NA*	NA
15	1370913_at	5.90E-06	8.80	*Rsad2*	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
16	1391754_at	6.70E-06	5.35	*Oas1i*	2'-5' oligoadenylate synthetase 1I
17	1396163_at	8.50E-06	8.94	*Igtp*	interferon gamma induced GTPase
18	1379633_a_	9.20E-06	6.43	*Uba7*	ubiquitin-like modifier

Продовження таблиці Б.2

	at				activating enzyme 7
19	1387969_at	1.21E-05	20.52	*Cxcl10*	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
20	1396268_at	1.27E-05	3.88	*Sp110*	SP110 nuclear body protein
21	1382177_at	1.35E-05	6.58	*NA*	NA
22	1393832_at	1.41E-05	3.14	*Rbm43*	RNA binding motif protein 43
23	1376056_at	1.42E-05	3.59	*NA*	NA
24	1387242_at	1.62E-05	3.92	*Eif2ak2*	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
25	1374725_at	2.00E-05	2.08	*Mov10*	Moloney leukemia virus 10
26	1383757_at	2.05E-05	3.99	*NA*	NA
27	1376151_at	2.37E-05	5.85	Irg	interferon gamma induced GTPase
28	1394352_at	2.44E-05	4.40	*Ifih1*	interferon induced with helicase C domain 1
29	1377950_at	2.46E-05	32.52	*RGD1309362*	similar to interferon-inducible GTPase
30	1373757_at	2.55E-05	2.59	*Trafd1*	TRAF type zinc finger domain containing 1
31	1373992_at	2.57E-05	15.10	*MGC108823*	similar to interferon-inducible GTPase
32	1382902_at	2.59E-05	4.15	*Herc6*	potential ubiquitin ligase
33	1370693_at	2.67E-05	3.29	*Cnp*	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
34	1383564_at	3.11E-05	8.62	*Irf7*	interferon regulatory factor 7
35	1377497_at	3.19E-05	6.37	*Oasl*	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
36	1388149_at	3.23E-05	5.08	*Tap1*	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
37	1373912_at	3.31E-05	3.84	*Enpp4*	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4
38	1379748_at	3.33E-05	5.34	*H28*	histocompatibility 28
39	1382314_at	3.83E-05	6.41	*G1p2*	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)
40	1370400_at	4.04E-05	3.66	*RT1-N3*	RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (N3)
41	1375955_at	4.11E-05	2.06	*Rnf114*	ring finger protein 114
42	1376496_at	4.11E-05	5.44	*Apol9a*	apolipoprotein L 9a

Продовження таблиці Б.2

43	1395742_at	4.56E-05	2.21	*NA*	NA
44	1391463_at	4.65E-05	3.41	*Ddx58*	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
45	1376693_at	4.77E-05	10.41	*RGD1563091*	similar to OEF2
46	1385502_at	5.20E-05	4.27	*Trim21*	tripartite motif-containing 21
47	1377117_at	5.77E-05	2.25	*NA*	NA
48	1379613_at	6.48E-05	4.74	*Parp14*	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
49	1378257_at	6.55E-05	3.51	*Trex1*	three prime repair exonuclease 1
50	1390023_at	6.78E-05	2.56	*LOC680039*	hypothetical protein LOC680039
51	1381525_at	7.82E-05	2.17	*NA*	NA
52	1376920_at	8.06E-05	10.66	*LOC500013*	similar to sterile alpha motif domain containing 9-like
53	1368973_at	8.69E-05	2.41	*Adar*	adenosine deaminase, RNA-specific
54	1378293_at	9.33E-05	2.02	*Trim26*	tripartite motif-containing 26
55	1371015_at	1.02E-04	20.07	*Mx1*	myxovirus (influenza virus) resistance 1
56	1397457_at	1.03E-04	2.18	*NA*	NA
57	1390312_at	1.04E-04	8.68	NA	similar to mKIAA2005 protein
58	1383938_at	1.04E-04	6.10	*Ncoa7*	nuclear receptor coactivator 7
59	1380071_at	1.08E-04	3.81	*Parp12*	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12
60	1393957_at	1.16E-04	3.98	*NA*	NA
61	1387354_at	1.33E-04	4.34	*Stat1*	signal transducer and activator of transcription 1
62	1380079_at	1.46E-04	10.99	*RGD1561472*	similar to mKIAA2005 protein
63	1381556_at	1.48E-04	19.17	*Ddx60*	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60
64	1380021_at	1.50E-04	4.41	*Dennd2d*	DENN/MADD domain containing 2D
65	1379365_at	1.55E-04	6.49	*Cxcl11*	chemokine (C-X-C motif) ligand 11

Продовження таблиці Б.2

66	1376144_at	1.74E-04	3.94	*Parp9*	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9
67	1384457_at	1.85E-04	3.84	*Fbxw17*	F-box and WD-40 domain protein 17
68	1369262_at	1.86E-04	2.01	*Casp8*	caspase 8
69	1379538_at	2.12E-04	2.85	*Cenpj*	centromere protein J
70	1374718_at	2.14E-04	4.78	*Dtx3l*	deltex 3-like (Drosophila)
71	1374331_at	2.25E-04	2.88	*Rqcd1*	rcd1 (required for cell differentiation) homolog 1 (S. pombe)
72	1390507_at	2.37E-04	4.02	*Isg20*	interferon stimulated exonuclease 20
73	1381228_at	2.45E-04	15.05	*NA*	NA
74	1377052_at	2.48E-04	2.24	Trim26	tripartite motif-containing 26
75	1382546_at	2.49E-04	4.80	Phf11	PHD finger protein 11
76	1383863_at	2.54E-04	4.84	*Lmo2*	LIM domain only 2
77	1387283_at	2.55E-04	4.69	*Mx2*	myxovirus (influenza virus) resistance 2
78	1368073_at	2.58E-04	4.66	*Irf1*	interferon regulatory factor 1
79	1383189_at	2.61E-04	8.12	NA	NA
80	1374627_at	2.64E-04	2.49	NA	NA
81	1372112_at	2.80E-04	2.67	*RGD1304579*	similar to 9230105E10Rik protein
82	1388915_at	3.10E-04	2.59	NA	NA
83	1389571_at	3.28E-04	2.86	*Stat2*	signal transducer and activator of transcription 2
84	1389034_at	3.41E-04	4.64	*Usp18*	ubiquitin specific peptidase 18
85	1394695_at	4.43E-04	4.29	*Fam46a*	family with sequence similarity 46, member A
86	1389006_at	4.53E-04	2.78	Mpeg1	macrophage expressed gene 1
87	1385277_x_at	4.59E-04	2.77	*Dhx58*	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
88	1379631_at	5.00E-04	2.23	*Csf1*	colony stimulating factor 1 (macrophage)
89	1396077_at	5.15E-04	2.79	*NA*	NA
90	1372868_at	5.56E-04	4.53	*Tor3a*	torsin family 3, member A
91	1377726_at	6.25E-04	2.10	*Trim25*	tripartite motif-containing 25

Продовження таблиці Б.2

92	1384483_at	6.80E-04	4.48	Flywch 1	FLYWCH-type zinc finger 1
93	1377826_at	6.83E-04	5.62	NA	NA
94	1375585_at	7.39E-04	3.14	NA	NA
95	1379285_at	7.65E-04	5.63	*Rtp4*	receptor (chemosensory) transporter protein 4
96	1372604_at	8.04E-04	2.28	*RGD13 09808*	similar to apolipoprotein L2; apolipoprotein L-II
97	1374469_at	8.10E-04	5.57	NA	similar to C20orf118
98	1370351_at	8.21E-04	2.16	*Tdrd7*	tudor domain containing 7
99	1383448_at	8.32E-04	2.30	*Irf9*	interferon regulatory factor 9
100	1382074_at	9.08E-04	2.72	*Rnf19b*	ring finger protein 19B
101	1376869_at	9.32E-04	2.23	NA	NA
102	1387495_at	1.08E-03	2.14	*Tle4*	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)
103	1375006_at	1.10E-03	2.53	ZC3HAV 1L	zinc finger CCCH-type, antiviral 1-like
104	1379695_at	1.24E-03	4.81	*NA*	NA
105	1374551_at	1.32E-03	2.45	*Ifi35*	interferon-induced protein 35
106	1372140_at	1.34E-03	2.12	*Ccdc28 a*	coiled-coil domain containing 28A
107	1382950_at	1.49E-03	12.13	NA	NA
108	1394528_at	1.51E-03	2.16	NA	NA
109	1372071_at	1.63E-03	3.60	CD320	CD320 molecule
110	1389164_at	1.78E-03	3.41	*Herc3*	hect domain and RLD 3
111	1369427_at	1.86E-03	2.97	*Mpeg1*	macrophage expressed gene 1
112	1370186_at	2.02E-03	2.52	*Psmb9*	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)
113	1371152_at	2.18E-03	3.05	*Oas1a*	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A
114	1391222_at	2.28E-03	2.12	*N4bp1*	Nedd4 binding protein 1
115	1373412_at	2.34E-03	2.68	*Nt5c3*	5'-nucleotidase, cytosolic III
116	1388791_at	2.44E-03	4.56	*RGD13 09930*	similar to 2810022L02Rik protein
117	1369248_at	2.85E-03	2.32	*Xiap*	X-linked inhibitor of apoptosis
118	1379604_at	2.90E-03	2.17	NA	NA

Продовження таблиці Б.2

119	1396205_at	3.80E-03	2.94	NA	NA
120	1370875_at	3.89E-03	2.11	*Ezr*	Ezrin
121	1394340_at	4.36E-03	3.44	*Inpp1*	inositol polyphosphate-1-phosphatase
122	1371078_at	4.67E-03	2.33	NA	NA
123	1382603_at	4.69E-03	4.86	Pdcd1lg2	programmed cell death 1 ligand 2
124	1382907_at	4.76E-03	2.44	*LOC310721*	similar to 4930431B09Rik protein

NA – ген не має анотації

Додаток В

Наявність сайтів зв'язування транскрипційних факторів в промоторах диференційно експресованих генів

Таблиця В.1

Збагаченість промоторів диференційно-експресованих генів на сайти зв'язуання транскрипційних факторів

Назва гену	Транскрипційні фактори					
3 години інкубування із ІФН-α	STAT4	ISRE	NFAT	IRF1	MaxMyc	NF-kB
immunity-related GTPase family, M	+		+	+		
interferon gamma induced GTPase						
myxovirus (influenza virus) resistance 1		+	+			
similar to interferon-inducible GTPase RGD1309362			+			
similar to interferon-inducible GTPase; similar to MGC108823 protein	+	+				
radical S-adenosyl methionine domain containing 2			+			
transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)			+	+		+
2'-5'-oligoadenylate synthetase-like			+			
cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial			+			+
interferon regulatory factor 1	+		+			+
peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285						
nuclear receptor coactivator 7			+			
interferon regulatory factor 7		+	+		+	
MIT, microtubule interacting and transport,	+		+			

Продовження таблиці В.1

domain containing 1						
interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)			+	+		
chemokine (C-X-C motif) ligand 10			+	+		+
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3			+			
apolipoprotein L 9a		+				
potential ubiquitin ligase						
interferon gamma induced GTPase			+	+		
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2		+	+			
2'-5' oligoadenylate synthetase 1I	+		+	+		+
6 годин інкубування із ІФН-α						
ring finger protein 19B						
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)			+	+		
RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (N3)		+	+			
TRAF type zinc finger domain containing 1			+		+	+
2'-5' oligoadenylate synthetase 1A			+			
myxovirus (influenza virus) resistance 2		+	+	+		
tripartite motif-containing 25			+		+	+
torsin family 3, member A		+	+			+
FLYWCH-type zinc finger 1						
NA						
similar to apolipoprotein L, 3; similar to apolipoprotein L2; apolipoprotein L-II			+			
5'-nucleotidase, cytosolic III						+
interferon induced with helicase C domain 1	+		+			
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58						
similar to C20orf118			+			+
CD320 molecule			+			

Продовження таблиці В.1

X-linked inhibitor of apoptosis			+	+		
hect domain and RLD 3			+			
similar to Protein KIAA1404; similar to Ab1-133			+	+		
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12			+			
LIM domain only 2			+	+	+	
ring finger protein 114			+		+	
NA	+		+			
tudor domain containing 7				+		
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4	+		+			
family with sequence similarity 46, member A			+			
PHD finger protein 11			+			
caspase 8			+			
inositol polyphosphate-1-phosphatase		+	+			
coiled-coil domain containing 28A			+			
Moloney leukemia virus 10		+	+			
transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)						
zinc finger CCCH-type, antiviral 1-like			+			
signal transducer and activator of transcription 1; signal transducer and activator of transcription 4		+	+			+
F-box protein 39			+			
similar to CG3740-PA	+		+			
similar to NEDD4-binding protein 1 (N4BP1); Nedd4 binding protein 1			+			
similar to 4930431B09Rik protein			+			
similar to 2810022L02Rik protein			+			+
rcd1 (required for cell differentiation) homolog 1 (S. pombe)			+		+	
programmed cell death 1 ligand 2		+	+	+		
tripartite motif-containing 6			+		+	

Продовження таблиці В.1

similar to 9230105E10Rik protein			+			
2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase				+	+	+
DENN/MADD domain containing 2D	+		+	+		
interferon stimulated exonuclease 20			+	+		
DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58		+	+			
tripartite motif-containing 21	+		+			
ezrin			+	+		+
colony stimulating factor 1 (macrophage)	+		+			
interferon regulatory factor 9	+		+		+	
interferon-induced protein 35			+	+	+	
adenosine deaminase, RNA-specific	+	+	+			
interferon-induced protein 44		+	+			
chemokine (C-X-C motif) ligand 11	+		+			+
three prime repair exonuclease 1			+			
centromere protein J			+			
deltex 3-like (Drosophila)			+	+	+	
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9			+			
hypothetical protein LOC680039			+			
guanylate binding protein 4		+	+			
receptor (chemosensory) transporter protein 4		+				
ubiquitin-like modifier activating enzyme 7						
NA			+			
F-box and WD-40 domain protein 17						
signal transducer and activator of transcription 2		+	+			+
tripartite motif-containing 26		+	+			+
NA						
SP110 nuclear body protein			+			+
ubiquitin specific peptidase 18	+		+			
similar to apolipoprotein L, 3; apolipoprotein L, 3			+			+
NA			+			

NA – ген не має анотації