

СТВОЛОВЫЕ/ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕЧЕНИ И КОСТНОГО МОЗГА КАК РЕГУЛЯТОРЫ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОЙ ПЕЧЕНИ

Людуп А.В., Онищенко Н.А., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М.Е.

ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва

В обзоре представлены современные сведения об эффективности лечения печеночной недостаточности стволовыми/прогениторными клетками печени (овальные клетки) и костного мозга (гемопоэтические клетки и мезенхимальные стромальные клетки). Показано, что действие этих клеток направлено на нормализацию взаимодействия клеток печени и на реорганизацию процессов восстановительной регенерации в поврежденной печени. Полагают, что применение мезенхимальных стромальных клеток из аутологичного костного мозга является наиболее перспективной стратегией. Однако для окончательного суждения о регенераторных возможностях аутологичных клеток костного мозга необходимо проводить широкомасштабные двойные слепые клинические исследования.

Ключевые слова: оральные клетки, клетки костного мозга, печеночная недостаточность

LIVER AND BONE MARROW STEM/PROGENITOR CELLS AS REGULATORS OF REPARATIVE REGENERATION OF DAMAGED LIVER

Lundup A.V., Onishchenko N.A., Shagidulin M.Y., Krashennnikov M.E.

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

In this review the modern information about effectiveness of liver insufficiency treatment by stem/ progenitor cells of liver (oval cells) and bone marrow (hemopoietic cells and mesenchymal cells) was presented. It is shown that medical action of these cells is referred on normalization of liver cell interaction and reorganization of processes of a reparative regeneration in damaged liver. It is believed that application of mesenchymal stromal cells from an autological bone marrow is the most perspective strategy. However, for definitive judgement about regenerative possibilities of the autological bone marrow cells it is necessary to carry out large-scale double blind clinical researches.

Key word: oval cells, bone marrow cells, liver insufficiency

Известно, что восстановительная регенерация печени осуществляется с помощью различных механизмов и типов клеток. Так, при резекции печени с удалением до 2/3 ее массы регенерация происходит за счет пролиферации оставшихся гепатоцитов, которые проходят несколько циклов деления и восстанавливают массу печени до исходных па-

раметров [28]. Индукторами митотической активности гепатоцитов при этом становятся возросшая нагрузка на сохранившиеся клетки, гипоксия ткани печени и развитие воспалительного ответа, при котором синусоидальные клетки печени (купферовские клетки, клетки Ито, эндотелиальные клетки) и лейкоциты (нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты)

Статья поступила в редакцию 24.02.10 г.

Контакты: Крашенинников Михаил Евгеньевич. **Тел.** 8-903-593-29-84, **e-mail:** krashen@rambler.ru

начинают вырабатывать провоспалительные цитокины, а также ростовые факторы (HGF, EGF, TGF- α , FGF- α [11, 16]) в соотношениях, активизирующих митозы печеночного эпителия. Для растормаживания митотических потенций гепатоцитов характерно также изменение состояния их микроокружения, которое выражается умеренным усилением реакции мезенхимы – возрастает количество и объемная доля тучных и купферовских клеток, наступает резорбция части коллагена, а также угнетение его синтеза на фоне повышения активности коллагеназы [2]. Активации митотической активности гепатоцитов способствуют также и другие факторы, в том числе факторы, выделяемые органами портальной системы.

Между тем при заболеваниях печени, особенно при хронических заболеваниях, часто наступает не активизация, а угнетение пролиферации гепатоцитов, что, как полагают, является результатом воздействия повреждающего фактора на фоне низкого исходного уровня адаптационных резервов организма к этому фактору. В результате в печени нарушается адекватность соотношения вырабатываемых про- и противовоспалительных цитокинов, про- и антифиброгенных факторов (матриксметаллопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТИМП)), и таким образом создаются условия для осуществления не восстановительной регенерации, а для хронически поддерживаемого воспаления и фиброобразования печени. Эти условия характеризуются резко возросшей реакцией мезенхимы ткани печени, выражающейся не повышением, а снижением ее коллагеназной активности, а также нарушением функции самих гепатоцитов (снижением окислительно-восстановительных процессов, органоспецифических функций, митотической активности и резко возросшим участием в продукции провоспалительных цитокинов и коллагена). В результате в пространствах Диссе между гепатоцитов образуются мощные пучки зрелых новообразованных коллагеновых волокон, окруженных скоплениями фибробластов, макрофагов, клеток Ито, лимфоцитов, полиморфноядерных лейкоцитов, эозинофилов и плазматических клеток. Эти клетки поддерживают дисбаланс продуцируемых факторов, поддерживают воспалительный процесс, определяют формирование глубоких структурных нарушений экстрацеллюлярного матрикса и развитие цирроза, так как нарушается согласованность взаимодействия клеток печени, а гепатоциты утрачивают свои митотические потенции [5, 11, 45].

Традиционно считалось, что цирроз печени является необратимым патологическим состоянием. Однако в экспериментальных и клинических наблюдениях последних лет была показана возможность морфологического регресса патологических

изменений в печени [19] путем принудительного перепрограммирования процессов регенерации и активного включения в него системных механизмов регуляции с помощью тканевых, клеточных и пептидных методов терапии [33, 36].

Для восстановления угнетенной пролиферативной активности гепатоцитов при тяжелом повреждении печени сначала стали производить трансплантацию или экстракорпоральное подключение аутологичных, аллогенных, а также ксеногенных гепатоцитов [5, 17]. Длительное изучение эффективности терапевтического применения гепатоцитов в клинике позволило выявить ограничения этого метода. Оказалось, что аутологичные гепатоциты невозможно получить в достаточном количестве, а применение ксеногенных гепатоцитов сдерживают эпидемиологические и иммунологические причины. Кроме того, стало очевидным, что изолированные гепатоциты, выделенные из донорской печени, будучи зрелыми и уже дифференцированными клетками, в культуре не размножаются, не дедифференцируются (т. е. не омолаживаются) и не продуцируют весь требуемый спектр ростовых факторов, а поэтому при трансплантации эти клетки не способны индуцировать эффективную митотическую активность гепатоцитов в поврежденной печени. Показано также, что криоконсервированные гепатоциты, выделенные из донорской печени, утрачивают или существенно ослабляют свои синтетические функции, и поэтому их применение не может обеспечить в организме заместительную функцию.

Клинические наблюдения по применению аутологичных гепатоцитов для лечения фульминантной или хронической печеночной недостаточности (ПН) различной природы также свидетельствуют о низкой эффективности этого метода [14, 27]. В результате перечисленные обстоятельства способствовали росту интереса исследователей к осуществлению восстановительной регенерации печени с помощью регионарных стволовых прогениторных клеток печени – овальных клеток и клеток костного мозга (КМ), которые в настоящее время признаны предшественниками гепатоцитов и синусоидальных клеток печени, так как способны экспрессировать гены гепатоцитарных белков, приобретать некоторые функции гепатоцитов, а также восстанавливать (повышать) функциональные резервы клеток поврежденной печени [1].

1. Овальные клетки как участники восстановительной регенерации печени

При хронических заболеваниях печени, особенно на фоне угнетения пролиферации гепатоцитов, источником регенерации становятся овальные клетки (ОК), локализующиеся в каналах Геринга. Эти клетки относят к разряду внутривнутрипеченочных ство-

ловых/прогениторных клеток (СПК), способных к дифференцировке в гепатоциты и холангиоциты [15]. Морфологически ОК представляют собой округлые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением.

Особенностью ОК является то, что наряду с маркерами эпителиальных клеток печени – гепатоцитов (альбумин, альфа-фетопротейн, цитокератины 8 и 18) и холангиоцитов (цитокератины 7 и 19), они одновременно экспрессируют маркеры гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга (Thy-1, Sca-1, CD34+) [35], а также м-РНК фактора роста стволовых клеток (SCF) и его рецептора (c-kit), необходимых для функционирования этих клеток.

Точное происхождение ОК не установлено, но предполагается, что эти клетки являются сохранившимися потомками эмбриональных СПК печени либо имеют внепеченочное происхождение из костного мозга (КМ).

Специфические поверхностные антигены ОК человека до сих пор не установлены, и это затрудняет их выделение, изучение и использование [12, 28]. Пока лишь установлено, что количество ОК коррелирует с тяжестью хронического заболевания [39] и что эти клетки начинают активироваться – реплицировать (осуществлять синтез дочерней цепи ДНК) при значительном снижении массы гепатоцитов в печени или при истощении репликационного потенциала гепатоцитов в ответ на токсическое воздействие.

В эксперименте была показана способность ОК к репопуляции клеток печени, но не за счет дифференцировки в гепатоциты, а путем их слияния с гепатоцитами (обнаружение в гепатоцитах донорских и реципиентских хромосом) [12], а также способность метаболизировать этанол и бензодиазепины. Вместе с тем уже имеются результаты, указывающие на опасность проведения клеточной терапии этими клетками, так как, например, у грызунов ОК вызывали развитие гепатоцеллюлярной карциномы и холангиокарциномы [41]. Трудности получения культур ОК и их идентификации, а также опасность малигнизирующего воздействия этих клеток способствовали интенсификации исследований по применению аутологичных гемопоэтических и стромальных СПК КМ, получение которых в настоящее время признано легитимным, доступным и безопасным [41].

2. Клетки костного мозга как участники восстановительной регенерации печени

Исследования, выполненные на животных (мышь) с различными моделями печеночной недостаточности (ПН), показали, что характер и интенсивность восстановительных процессов в печени зависят, с одной стороны, от степени повреждения

печени, а с другой – от степени сохранности биорегуляторной активности КМ [4]. Аналогичные результаты были получены при проведении терапии клетками КМ поврежденной печени у человека. Оказалось, что при умеренной степени поражения печени появление донорзависимых гепатоцитов в печени после трансплантации аллогенных клеток КМ варьировало от 1 до 5% [4], в то же время при более выраженном поражении печени количество донорзависимых гепатоцитов становилось достоверно выше и достигало в отдельных наблюдениях (при выраженном фиброзе печени на фоне хронического гепатита С) 43% [4].

Имеющиеся наблюдения позволяют заключить, что вовлечение СПК КМ в процессы репаративной регенерации происходит наиболее активно в условиях, когда повреждена значительная часть ткани печени и когда необходима эффективная компенсация проявлений ПН в организме. В условиях физиологической регенерации процесс репопуляции печени клетками КМ, по-видимому, также имеет место [5], но происходит с минимальной интенсивностью, и это дало основание полагать, что митотическая активность гепатоцитов в печени регулируется только местными (печеночными) факторами без участия СПК КМ [6].

Средние сроки репопуляции клеток печени под влиянием клеток КМ варьируют. Так, у мышей и крыс этот процесс продолжается от нескольких недель до нескольких месяцев; у человека репопуляция клеток печени регистрируется уже через 2 недели после их трансплантации и сохраняется продолжительное время [4].

Попадание СПК в печень происходит при различных способах их введения: при внутривенном, внутрипортальном, интраперитонеальном, а также при введении клеток под капсулу селезенки [4, 49]. Одним из механизмов миграции СПК КМ является трансэндотелиальная миграция за счет продукции поврежденными клетками провоспалительных сигнальных молекул, в частности стромального фактора (SDF-1) – хомингового белка, к которому экспрессированы рецепторы на СПК КМ [18], а также продукции IL-8, HGF и матрикс-металлопротеиназы-9 (MMP-9) [13].

Важным обстоятельством, интенсифицировавшим исследования по применению клеток КМ для восстановительной регенерации поврежденной печени, стали многочисленные наблюдения способности гемопоэтических и негемопоэтических мезенхимальных стромальных стволовых клеток КМ (ГСК и МСК соответственно), клеток пуповинной крови и крови взрослого человека дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки [25, 32], а также наблюдения, доказывающие появление в печени, после введения клеток КМ, функционально

полноценных гепатоцитов костномозгового происхождения, которые обеспечивают коррекцию моделированной ПН, путем изменения программы функционирования клеток печени и активации процесса их восстановительной регенерации [10].

В настоящее время практически все сходится во мнении, что способность ГСК и МСК КМ дифференцироваться под влиянием печеночного микроокружения в гепатоцитоподобные клетки, проявляющаяся экспрессией в них специфических печеночных генов, а также способность ГСК (клеток миеломоноцитарного ряда) к гибридизации (химеризации) в результате их слияния с гепатоцитами (fusion-феномен) [44] обусловлены их пластичностью. Однако исследованиями последних лет установлено, что партнерами при гибридизации клеток печени при введении клеток КМ становятся не столько гепатоциты (0,6% от всей популяции гепатоцитов), сколько звездчатые клетки (68% всех клеток Ито в печени) и миофибробласты (70% всех клеток в печени), так как именно эти клетки включали Y-хромосому доноров-самцов в результате введения мышам-самкам с токсическим повреждением печени клеток КМ [40]. Поскольку в последние годы показано, что звездчатые клетки печени – CD133+ обладают свойствами прогениторных клеток [1, 23] и при направленном культивировании они начинают экспрессировать гепатоцитарные маркеры – мРНК альбумина и альфа-фетопротеина, то уже сегодня имеются все основания считать, что клетки КМ осуществляют репрограммирование и активизацию восстановительных процессов в печени путем клеточной гибридизации (химеризации) не столько гепатоцитов, сколько непаренхиматозных клеток. Наряду с пластическим эффектом участие ГСК и МСК КМ в регенерации печени осуществляется паракринным путем с помощью дистантно продуцируемых ими гуморальных факторов – цитокинов, хемокинов, ростовых факторов – TNF- α , IL-1, IL-6, LiF, IL-10, NGF, оксид азота, VEGF (A и B), HGF, TGF- β , MMPs (1, 2, 9), TIMPs, FGF-2,7, SCF и др. [26, 33, 38], многие из которых оказывают стимулирующее воздействие на пролиферацию гепатоцитов как *in vitro*, так и *in vivo* [16].

Особый интерес представляют данные о важной роли фактора роста стволовых клеток – SCF в репаративной регенерации печени. Выяснилось, что печень является богатым источником SCF и что этот фактор стимулирует пролиферацию гепатоцитов при резекции печени [37]. Кроме того, оказалось, что клетки КМ, и прежде всего МСК, также являются продуцентами SCF. Эти факты заставляют предполагать, что при дефиците образования SCF в печени в результате ее резекции или повреждения активация образования и доставки SCF клетками КМ будет способствовать восстановлению (нор-

мализации) функциональной активности не только гепатоцитов, но и непаренхиматозных клеток печени – главных регуляторов митотической активности гепатоцитов, а также будет способствовать пролиферации и дифференцировке стволовых клеток печени, т. е. овальных клеток, репопулирующих ее паренхиму и обеспечивающих регресс фиброобразования экстрацеллюлярного матрикса.

Индукция регенерации печени под воздействием паракринного эффекта МСК была впервые продемонстрирована Parekkadan et al. [34], которые на модели поражения печени D-галактозамином смогли продемонстрировать значительное улучшение выживаемости крыс с фульминантным течением токсического гепатита при введении им МСК-кондиционированной среды. В последующих исследованиях эти авторы уточнили, что повышение выживаемости крыс, снижение гибели клеток печени и ускорение их регенерации при использовании фракционированной МСК-кондиционированной среды обусловлено молекулами (цитокинами, хемокинами), имеющими гепаринсвязывающую аффинность [36].

3. Использование клеток костного мозга для индукции восстановительной регенерации печени при остром (некротическом) и хроническом (фиброзирующем) повреждении

3.1. Клиническая эффективность применения клеточной терапии

В настоящее время уже накоплено достаточно экспериментальных и клинических наблюдений, которые свидетельствуют о том, что при хроническом фиброзирующем повреждении печени аутологичные, аллогенные и ксеногенные ГСК и МСК способны оказывать восстановительное воздействие на структуру и показатели функции поврежденной печени [24, 42, 46].

Было установлено, что введение клеток КМ мышам с CCL₄-поврежденной печенью и сформировавшимся в ней фиброзом снижает летальность, повышает уровень альбумина в крови, снижает трансаминазы [47] и оказывает фибролитический эффект на ткань печени [24, 46], возникновение которого связывают с выраженной экспрессией матрикс-металлопротеиназы-9 [41] при трансплантации клеток в зону фиброза. Было высказано предположение, что активация восстановительных процессов в цирротически измененной печени может быть обусловлена увеличением количества ОК в перипортальной зоне через 1 неделю после трансплантации клеток КМ [41], снижением экспрессии мРНК проколлагена 1-го типа и TGF- β 1 в эти же сроки за счет индукции апоптоза активиро-

ванных клеток Ито, а также может быть обусловлена повышением количества высокоплоидных гепатоцитов (8n и 16n) в сохранившейся паренхиме печени, которые образовались за счет активизации механизмов клеточного слияния. При сравнительном исследовании терапевтической эффективности аутологичных ГСК и МСК КМ при ПН было констатировано, что результативность от применения МСК была выше как в эксперименте [41], так и в клинике у больных с ПН [30]. При ответе на вопрос о предпочтительности используемого типа МСК – недифференцированных МСК или МСК, предифференцированных в гепатоцитарном направлении (была подтверждена экспрессия гепатоцитарных маркеров), было установлено [47], что независимо от способа введения клеток (внутривенно или под капсулу селезенки) регенерационный потенциал недифференцированных МСК превосходит регенерационный потенциал гепатоцитоподобных МСК. Полученный результат может быть связан со снижением при культивировании *in vitro* экспрессии хемокиновых рецепторов на гепатоцитоподобных МСК, которое ведет к соответствующему снижению их хемотаксической реакции. Возможно также, что более высокая реакционная активность недифференцированных МСК обусловлена их способностью продуцировать более широкий спектр факторов, которые активируют работу разных клеток и в разных органах, повреждаемых при ПН, что, суммарно действуя, ускоряет восстановительные процессы в печени.

Уже в настоящее время в разных клиниках западных стран на крайне ограниченном контингенте больных с ПН начали проводиться исследования по оптимизации применения аутологичных клеток КМ: изучаются разные популяции клеток (ГСК и МСК), их дозы, а также сроки и кратность введения клеток больному [11, 21, 22, 29].

Так, Gasbarrini et al. [21] сообщили о позитивных результатах внутривенного введения несортированных аутологичных клеток КМ для спасения 67-летнего больного с тяжелым токсическим (лекарственным) гепатитом, у которого имеются противопоказания для трансплантации печени. Было констатировано быстрое улучшение синтетической и детоксикационной функции печени, причем в биопсийном материале, взятом на 20-е сутки после трансплантации клеток КМ, отмечалось увеличение пролиферации гепатоцитов вокруг очагов некроза, которое авторы связали с паракринным эффектом введенных клеток.

Knoefel et al. [22] после внутривенного введения аутологичных CD133+ (МСК) КМ больному с эмболизацией портальной вены в результате опухоли печени отметили увеличение пролиферации гепатоцитов в 2,5 раза и коррекцию клинических

показателей ПН, что позволило им высказать предположение о высоком терапевтическом потенциале МСК КМ и указать на необходимость дальнейшего изучения возможностей этого метода.

Mohamadnejad et al. [29] провели уже 2 группы исследований на больных с циррозом печени, в которых сравнивалась терапевтическая эффективность аутологичных МСК (I группа) при внутривенном введении в дозе $31,73 \times 10^6$ клеток, и аутологичных ГСК (II группа) при введении в печеночную артерию в дозе $5,25 \times 10^6$ клеток. Оказалось, что из 4 больных I-й группы у 2 через 12 месяцев наступило достоверное улучшение состояния, оцениваемое по клиническим шкалам более чем в 2 раза, тогда как во II-й группе (n = 4) позитивные изменения по тем же критериям к тому же сроку наблюдения были незначительные. Эти результаты послужили для авторов основанием считать, что применение МСК для коррекции ПН в дозах, в 6 раз более высоких, чем дозы ГСК, может оказаться более эффективным.

Анализ результатов клинических исследований разных групп авторов, в которых наряду с позитивной оценкой приводятся сведения об отсутствии улучшения структуры и функции печени при введении МСК в условиях тяжелой ПН [9], позволил [11] сформулировать общие рекомендации для повышения результативности применения МСК в клинике у больных с циррозом печени.

Эти авторы рекомендуют:

- использовать фракцию МСК, очищенную от фиброгенных клеток, т. е. использовать CD133+ клетки, что должно снизить риск прогрессирования фиброза печени;
- осуществлять возможно более раннее применение МСК, в частности на этапе развитого гепатита В, когда по своим биологическим характеристикам МСК еще не отличаются от клеток здоровых людей;
- использовать достаточно большой объем клеток (от миллиарда до как минимум миллиона клеток на 1 кг массы тела больного), чтобы можно было оказать мощное регуляторное воздействие на оставшуюся паренхиму печени, сохранившиеся непаренхиматозные клетки и измененный экстрацеллюлярный матрикс;
- считать безопасным при наращивании массы МСК использование не более 3–5 культуральных пассажей, так как при этом сохраняется генетическая стабильность культивируемых клеток; достаточным исходным объемом аспириата КМ для получения необходимого количества МСК может стать объем 10–15 мл КМ [48, 49];
- считать предпочтительным способом введения МСК внутривенный способ. Внутривенное и внутривенное введение МСК из-за

нарушения свертываемости крови у больных ПН должно служить противопоказанием для катетеризации указанных сосудов;

- проводить широкомасштабные двойные слепые клинические исследования, которые должны предшествовать внедрению трансплантации МСК в широкую клиническую практику лечения хронической ПН.

3.2. Влияние МСК на регуляцию фиброгенеза поврежденной печени

Традиционно считалось, что диагноз «цирроз печени» означает необратимость ее повреждения. Однако исследования последних лет, выполненные на животных и в клинике, указывают на возможность хотя бы частичного регресса уже сформировавшегося фиброза [19].

Известно, что фиброзирование ткани печени наступает в результате некомпенсируемой гибели гепатоцитов и увеличения синтеза фибриллярных белков в экстрацеллюлярном матриксе пространства Диссе. Оно развивается вследствие наступающего стрессорного повреждения гепатоцитов и других клеток печени, а также возникающих при этом нарушений межклеточных взаимодействий (гепатоцитов и непаренхиматозных клеток печени), что находит отражение в гиперпродукции провоспалительных цитокинов (интерлейкинов, хемокинов) и факторов роста этими клетками [45].

Ключевым моментом в индукции фиброзированной поврежденной печени становится поддерживаемая провоспалительными цитокинами самоактивация непаренхиматозных клеток, и прежде всего звездчатых клеток или клеток Ито (КИ). КИ наряду с секрецией провоспалительных цитокинов и экспрессией молекул адгезии при активации превращаются в клетки, хронически поддерживающие реактивность, так как при этом приобретают черты антигенпрезентирующих клеток и способны стимулировать пролиферацию лимфоцитов [43]. Однако при самоподдерживаемой активации КИ одновременно подвергаются фенотипическому изменению, так как переходят из состояния покоя и накопления витамина А (ретинола) в активно пролиферирующие миофибробластоподобные клетки, главной функцией которых становится синтез фибриллярного коллагена и других нерастворимых белков экстрацеллюлярного матрикса, количество которых увеличивается при фиброзе печени [20]. Так как активированные КИ становятся клетками, не только поддерживающими хроническое воспаление в печени, но и непосредственными участниками процессов ее фиброирования при заболеваниях, то индукция апоптоза этих клеток и была положена в основу разработки метода антифиброзной терапии печени. В настоящее время на многочисленных экспериментальных моделях фиброза печени был уста-

новлен факт антифиброзного действия МСК [8, 11]. Было установлено, что сокультивирование МСК с активированными КИ приводит к значительному снижению накопления коллагена в среде и пролиферации клеток, а также к индукции апоптоза КИ [33]. Механизмы, лежащие в основе регуляции активности КИ, авторы связали с паракринными медиаторами МСК – IL-10, TNF- α , HGF и др., так как блокада секретированных МСК цитокинов – IL-10 и TGF- α позволяла отменить ингибиторный эффект МСК на пролиферацию КИ и синтез ими коллагена. Было показано, что индукцию апоптоза активированных КИ вызывают и HGF (фактор роста гепатоцитов) и NGF (фактор роста нервов), причем взаимодействие NGF происходит с рецептором NGF низкой аффинности – p-75, который экспрессируется на активированных КИ [7]. Изучение механизма регуляторного влияния МСК на активированные КИ при сокультивировании этих клеток показало, что МСК препятствуют дифференцировке КИ в активированные миофибробласты, так как количество КИ в фазе G₀ клеточного цикла – увеличивалось, а в фазе S – сокращалось [50].

Поскольку распад коллагенов и ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса регулируются активностью матриксных металлопротеиназ (ММП) и их тканевых ингибиторов (ТИМП), то можно предположить, что МСК осуществляют регуляцию фиброгенеза в печени также путем сопряженного изменения экспрессии ТИМП и ММП. В исследованиях *in vitro* была показана четкая корреляция между снижением экспрессии ТИМП и повышением апоптоза КИ, что позволило предположить участие ТИМП в регуляции жизнеспособности КИ через сопряженную активацию ММП [31]. В опытах на крысах с использованием МСК для лечения инфаркта миокарда было показано, что под воздействием МСК происходило снижение экспрессии ТИМП-1 в миокарде на фоне снижения в нем коллагенов 1-го и 2-го типов и TGF-b, а также улучшение показателей функции миокарда. Возможно, подобные молекулярные механизмы реализуются и в экстрацеллюлярном матриксе печени, при применении МСК, однако таких исследований мы не смогли обнаружить в литературе.

Вместе с тем следует иметь в виду, что не все исследователи признают фибролитический эффект клеток КИ и их способность индуцировать апоптоз КИ [40]. Более того, они считают, что клетки КИ сами по себе вносят вклад в развитие фиброза печени, так как существенно увеличивают в ней популяцию КИ. Эти наблюдения дополняются результатами исследований Sakaida [41], который отметил, что, несмотря на снижение фиброза печени при введении МСК, незначительное количество трансплантированных клеток все же превращается в КИ.

Полученные результаты авторы объясняют тем, что трансплантированные МСК снижают количество активированных КИ, вызывая их апоптоз, но, очевидно, МСК способствуют также дифференцировке предшественников КИ в поврежденной печени и тем самым способствуют восполнению пула стволовых клеток в самой печени, которыми, по последним данным, являются в том числе клетки Ито [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При тяжелых заболеваниях печени – как острых, так и хронических – из-за гибели гепатоцитов и нарушения согласованности межклеточных взаимодействий создаются условия для хронически поддерживаемого воспаления, фиброзирования печени, а также угнетения пролиферативной активности гепатоцитов.

Методы клеточной терапии путем трансплантации гепатоцитов, стволовых клеток печени (овальные клетки) и клеток КМ (ГСК и МСК) направлены на индукцию клеток печени (гепатоциты и непаренхиматозные клетки) и их взаимодействия, а также на перепрограммирование процессов восстановительной регенерации поврежденной печени. Анализ результатов применения клеточной терапии свидетельствует, однако, об ограниченных регуляторных возможностях зрелых донорских гепатоцитов, о трудностях получения и опасности применения (малигнизация) стволовых (прогениторных) овальных клеток печени и о перспективности применения стволовых клеток аутологичного КМ, особенно МСК.

Установлено, что результативность применения клеток КМ для индукции восстановительных процессов в печени при ее повреждении – как в эксперименте, так и в клинике – зависит от множества факторов – от типа используемых клеток КМ (ГСК или МСК), их предифференцировки, дозы, а также от тяжести (обратимости) и объема исходного повреждения печени. Поэтому для окончательного суждения о регенераторных возможностях аутологичных клеток КМ при лечении заболеваний печени в клинике необходимо проводить широкомасштабные двойные слепые клинические исследования под контролем информативных клинических, лабораторных и морфологических методов исследования для оценки динамики в ней восстановительных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киясов А.П., Гумерова А.А., Титова М.А. Овальные клетки – предполагаемые стволовые клетки печени или гепатобласты? // Клет. трансплантология и ткан. инженерия. 2006. Т. 2. № 4. С. 55–58.

2. Косых А.А., Бесараб И.Ю., Рощина Н.М. Роль соединительной ткани в репаративной регенерации нормальной и цирротически измененной печени // Регенерация, адаптация, гомеостаз/ Под ред. Б.П. Солопаева. Горький. 1990. С. 21–30.
3. Тоцаков В.Ю. Методические аспекты создания низкотемпературного банка изолированных клеток печени: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 1990. 28 с.
4. Черных Е.Р., Останин А.А., Пальцев А.И. Стволовые клетки в регенерации печени: новые подходы к лечению печеночной недостаточности // Гепатология. 2004. № 5. С. 24–33.
5. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. Лечение печеночной недостаточности методами трансплантации и экстракорпорального подключения печени и других тканей (биологические и клинические аспекты). М.: ВИНТИ, 1994. 141 с.
6. Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации печени // Патол. физиол. и экспер. терапия. 2008. № 1. С. 2–7.
7. Asai K., Tamakawa S., Yamamoto et al. Activated hepatic stellate cells overexpress p75NTR after partial hepatectomy and undergo apoptosis on nerve growth factor stimulation // Liver Int., 2006. Vol. 26. P. 295–603.
8. Aziz M.T.A., Atta H.M., Mahfouz S. et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis // Clin. Biochem. 2007. Vol. 40. P. 893–899.
9. Carvalho A.B., Quintannilha L.F., Dias et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stem cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. Stem Cells. 2008. Vol. 26. P. 1307–1314.
10. Chamberlain J., Yamagami T., Colletti E., Theise et al. Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep // Hepatology. 2007. Vol. 460. P. 1935–1945.
11. Dai L.J., Li H.Y. et al. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis // Stem Cell Res. 2009. Vol. 2, 1. P. 16–25.
12. Dan Y.Y., Yeoh G.C. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective // J. Gastroenterol. Hepatol. 2008. Vol. 23. P. 687–698.
13. Dalakas E., Newsome P.N., Harrison D.J., Plevris J.N. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury // FASEB J. 2005. Vol. 19 (10). P. 1225–1231.
14. Faenza S., Baraldi O., Bernardi M. et al. Mars and Prometheus: our clinical experience in acute chronic liver failure // Transplant. Proc. 2008. Vol. 40. P. 1169–1171.
15. Fausto N., Campbell J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation // Mech. Dev. 2003. Vol. 120. P. 117–130.
16. Fausto N., Riehle K.J. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications // J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 2005. Vol. 12. P. 181–189.
17. Flohr T.R., Bonatti H., Brayman K.L., Pruett T.L. The use of stem cells in liver disease // J. Current Opinion in Organ Transplantation. 2009. Vol. 14. P. 64–71.

18. Fox J.M., Chamberlain G., Ashton B.A., Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking // *Br. J. Haematol.* 2007. Vol. 137. P. 491–502.
19. Friedman S.L. Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis – is it all hype? // *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2007. Vol. 4. P. 236–237.
20. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver // *Physiol. Rev.* 2008. Vol. 88. P. 125–172.
21. Gasbarrini A., Rapaccini G.L., Rutella S. et al. Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis // *Dig. Liver Dis.* 2007. Vol. 39. P. 878–882.
22. Knoefel W.T., Klein M. et al. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration // *Stem Cells.* 2005. Vol. 23. P. 463–470.
23. Kordes C. et al. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 352. P. 410–417.
24. Kuo T.K., Hung S. et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success for using bone marrow mesenchymal stem cells // *Gastroenterology.* 2008. Vol. 134. P. 2111–2121.
25. Lange C., Bassler P., Lioznov M.V. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells // *World J. Gastroenterol.* 2005. Vol. 11. P. 4497–4504.
26. Langer D.A., Das A., Semela D. et al. Nitric oxide promotes caspase-independent hepatic stellate cell apoptosis through the generation of reactive oxygen species // *Hepatology.* 2008. Vol. 47. P. 1983–1993.
27. McKenzie T.J., Lillegard J.B., Nyberg S.L. Artificial and bioartificial liver support // *Semin Liver Dis.* 2008. Vol. 28. P. 210–217.
28. Michalopoulos G.K. Liver regeneration // *J. Cell. Physiol.* 2007. Vol. 213. P. 286–300.
29. Mohamadnejad M., Alimoghaddam K., Mohyeddin-Bonab M. et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis // *Arch. Iran Med.* 2007a. Vol. 10. P. 459–466.
30. Mohamadnejad M., Namiri M., Bagheri M. et al. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis // *World J. Gastroenterol.* 2007b. Vol. 13. P. 3359–3363.
31. Murphy F.R., Issa R., Zhou X. et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 11 069–11 076.
32. Ong S.Y., Dai H., Leong K.W. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture // *Biomaterials.* 2006a. Vol. 27. P. 4087–4097.
33. Parekkadan B., Poll D., Megeed Z. et al. Immunomodulation of hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 2007a. Vol. 363. P. 247–252.
34. Parekkadan B., Poll D., Suganuma K. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007b. Vol. 2 (9). P. e941.
35. Petersen B.E., Grossbard B., Hatch H. et al. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers // *Hepatology.* 2003. Vol. 37. P. 632–640.
36. Poll D., Parekkadan B., Cho C.H. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo* // *Hepatology.* 2008. Vol. 47. P. 1634–1643.
37. Ren X., Colletti L. et al. Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy // *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 112. P. 1407–1418.
38. Ren G., Zhang L., Zhao X. et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide // *Cell Stem Cell.* 2008. Vol. 2. P. 141–150.
39. Roskams T., Yang S.Q., Koteish A. et al. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease // *Am J. Pathol.* 2003. Vol. 163. P. 1301–1311.
40. Russo F.P., Alison M.R., Bigger B.W. et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis // *Gastroenterology.* 2006. Vol. 130. P. 1807–1821.
41. Sakaida I. Cell therapy with bone marrow cell for liver cirrhosis // *J. Electrophoresis.* 2006. Vol. 50. P. 7–12.
42. Sakaida I., Terai S., Yamamoto N. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice // *Hepatology.* 2004. Vol. 40. P. 1304–1311.
43. Viñas O., Bataller R., Sancho-Bru P. et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation // *Hepatology.* 2003. Vol. 38. P. 919–929.
44. Willenbring et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver // *Nat. Med.*, 2004. Vol. 10, 7. P. 774–748.
45. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis // *J. Pathol.* 2008. Vol. 214. P. 199–210.
46. Yagi K., Kojima M., Oyagi S. et al. Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine. *Yakugaku Zasshi.* 2008. Vol. 128. P. 3–9.
47. Yu Y., Yao A.H., Chen N. et al. Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regeneration. *Mol Ther.* 2007. Vol. 15. P. 1382–1389.
48. Zhang Z.X., Guan L.X., Zhang K., Wang S. et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged *in vitro* // *Cell. Biol. Int.* 2007a. Vol. 31. P. 645–648.
49. Zhang Z.X., Guan L.X., Zhang K., Zhang Q., Dai L.J. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury // *Cytotherapy.* 2008. Vol. 10. P. 134–139.
50. Zhao D.C., Lei J.X., Chen R. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rat // *World J. Gastroenterol.* 2005. Vol. 14. P. 3431–3440.