

ОБЗОРЫ

УДК 616.1.9-055.5

©Долгих

ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

М.С. Долгих

ФГУ Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных
органов Росмедтехнологий, Москва, Щукинская 1; тел.: 499-190-45-31;
эл. почта: marindo@yandex.ru

Недостаточность функции печени остается одной из основных причин смерти. Трансплантация печени является наиболее эффективным методом лечения тяжелых болезней печени. Недостаток донорских органов и высокий риск отторжения трансплантата являются главными проблемами трансплантации печени. Стволовые клетки и изолированные гепатоциты – альтернативные средства для заселения печени после различных повреждений вместо трансплантации печени. В этом обзоре рассмотрены достижения терапии печеночной недостаточности с помощью стволовых клеток в модельных экспериментах на животных и в клинике на людях, а также дальнейшие перспективы их использования.

Ключевые слова: клеточная терапия, стволовые клетки, печеночная недостаточность.

ВВЕДЕНИЕ. Лечение больных с тяжелыми формами печеночной недостаточности остается актуальной задачей. Пересадка печени является единственным эффективным способом борьбы за выживание этих больных. Однако трансплантация печени имеет весьма ограниченное применение из-за недостатка донорских органов. Применение вспомогательных экстракорпоральных перфузионных систем детоксикации крови (“искусственная печень”) недостаточно эффективно и не может быть использовано в рутинной практике из-за отсутствия функционально стабильного источника гепатоцитов. Альтернативой пересадке печени может стать клеточная и генно-клеточная терапия, то-есть трансплантация клеток. Последняя особенно перспективна для лечения генетических нарушений метаболизма печени. Поэтому в настоящее время идет активная разработка методов клеточной терапии. Для клеточной терапии можно использовать как зрелые гепатоциты, так и стволовые клетки. В настоящем обзоре будут рассмотрены перспективы использования стволовых клеток.

1. ПЛАСТИЧНОСТЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

Стволовые клетки могут быть определены как клетки, способные к неограниченному самообновлению, многолинейной дифференцировке и функциональному обновлению ткани *in vivo*. До недавнего времени думали, что плюрипотентные стволовые клетки происходят только из эмбриональных источников. Известно, что во взрослом организме многие ткани содержат стволовые клетки ограниченных линий, способные к самообновлению и функциональному поддержанию в течение продолжительного времени [1].

Недавние наблюдения показали, что миогенные прогениторные клетки, происшедшие из костного мозга, участвуют в регенерации поврежденных скелетных мышц и ишемизированного миокарда [2-5]. Кроме того, предполагаемые мышечные стволовые клетки, как было показано, также участвуют в гемопоэзе, что могло быть следствием того, что как кровь, так и мышечные клетки происходят из мезодермы. Сообщения об участии гемопоэтических стволовых клеток в нейрогенезе, о конверсии взрослых нейтральных стволовых клеток в гемопоэтические клетки, а также демонстрация того, что взрослые нейрональные клетки мышц могут превращаться во все зародышевые листки, по-видимому, подтверждает, что дифференцировка может быть не связана с первоначальным зародышевым листком. Это заставляет предполагать, что взрослые стволовые клетки могут обладать такой же плюрипотентностью, как и эмбриональные стволовые клетки [6].

В первом описании печеночной трансдифференцировки летально облученных крыс подвергали межполовой (cross-sex) или межлинейной (cross-strain) трансплантации костного мозга, за которой следовало введение 2-ацетаминфторида (фторана 2-ААФ) для подавления пролиферации гепатоцитов и для индукции CCl_4 повреждения печени. Изучение печени хозяина показало наличие донорских печеночных клеток, что определялось по экспрессии дипептидилпептидазы IV (ДПП IV+) у мутантных крыс (ДПП IV-) или Y хромосомы у женских особей [7]. Результаты этих опытов приводят к заключению, что клетки костного мозга могли действовать как предшественники для печеночных клеток, по крайней мере в модели повреждения, в которой репликативная способность зрелых гепатоцитов хозяина была ухудшена.

Заселение печени клетками из костного мозга наблюдалось также в отсутствие какого-либо преднамеренного повреждения печени. Костный мозг от доноров мужского пола вводили облученным мышам женского пола, и печеночную ткань анализировали методом флуоресцентной *in situ* гибридизации на Y-хромосому и мРНК альбумина, который выявил значительные уровни гепатоцитов донорского происхождения [8]. Дальнейшая работа на мышах показала, что гемопоэтические стволовые клетки мужского донора, трансплантированные облученному реципиенту-мышам женского пола, показали разброс дифференцировочного потенциала. Кроме гепатоцитов у реципиента были найдены эпителиальные клетки гастроинтестинального тракта, бронхов и кожи донорского происхождения [9]. Однако, эти предположения не были широко подтверждены многими группами либо вследствие невозможности воспроизвести результаты, либо вследствие того факта, что не трансдифференцировка, а слияние клеток, возможно, вызывают указанные явления.

Зрелые гепатоциты быстро пролиферируют в ответ на умеренные повреждения печени, а интрапеченочные стволовые клетки участвуют в более острых повреждениях. Экспериментальные модели частичной гепатэктомии или отравления CCl_4 указывают, что регенерация может иметь место полностью за счет пролиферации зрелых гепатоцитов. Однако, в моделях более острых повреждений, таких как отравление CCl_4 , комбинированное с 2-ААФ, который ингибирует пролиферацию зрелых гепатоцитов, участвуют дополнительные клеточные компоненты. После такого повреждения появляется большое количество малых овальных клеток, способных дифференцироваться как в гепатоциты, так и в желчные клетки [10,11]. Аналогично этому, добавление ретрорсина (агента, защелачивающего ДНК) к CCl_4 приводит к увеличению прогениторов, которые экспрессируют фенотипически характерные продукты овальных клеток (которые однако морфологически отличаются) [12]. Эти результаты привели исследователей к концепции, что регенерация печени происходит на трех различных уровнях: гепатоцитов, интрапеченочных стволовых клеток и экстрапеченочных стволовых клеток [13].

2. ИСТОЧНИКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

2.1. Стволовые клетки печени.

2.1.1. Гепатоциты. Эмбриональные гепатоциты являются стволовыми прогениторными клетками. Будучи трансплантированы, они способны превращаться в гепатоциты и желчные клетки. Однако их применение ограничено по морально-этическим соображениям.

Трансплантация гепатоцитов, которая начинает применяться вследствие недостатка органов для пересадки, показала, что трансплантированные клетки способны к значительной клональной экспансии внутри больной печени реципиента. Гепатоциты являются клетками, которые обычно восстанавливают массу печени при ее повреждении. Решающим свойством стволовых клеток является их способность приводить к большому семейству потомков, и по меньшей мере некоторые из гепатоцитов при определенных условиях способны делать это [14, 15]. При использовании трансгенных мышиных моделей острой печеночной недостаточности было показано, что трансплантированные зрелые гепатоциты способны пролиферировать (до 77 делений) при определенных условиях и заселять печень. Дальнейшие эксперименты на крысах показали, что в условиях гепатэктомии и при подавлении пролиферации собственных гепатоцитов ретрозином трансплантированные гепатоциты способны заселять печень реципиента. С другой стороны, есть данные, что резекция печени не является строго необходимой для стимуляции пролиферации гепатоцитов - достаточно лишь введения ретросина [16-18].

2.1.2. Овальные клетки (малые гепатоциты, холангиоциты). Овальные клетки - это собственные стволовые клетки печени. Овальные клетки являются малыми элементами непаренхиматозной природы. Для изучения биологии овальных клеток используется много моделей грызунов и, очевидно, что термин "овальные клетки" описывает гетерогенную клеточную популяцию, которая экспрессирует различные комбинации фенотипических маркеров линий как гепатоцитов, так и билиарных клеток (таб.).

Таблица. Маркеры печени клеточных линий грызунов [19].

Маркер	Овальные клетки	Гепатоциты	Клетки желчных протоков
Альбумин	+	+	-
AFP	+	Фетальные	-
π-GST	+	Фетальные	+
M2PK	+	Фетальные	+
CK8	+	+	+
CK14	+/-	-	-
CK18	+	+	+
CK19	-/+	+	+
OV-6	+	+	+
A6	+	+	+

Примечание: AFP - альфа-фетопроtein, CK - цитокератин, π-GST - π-глутатион трансфераза, M2PK - M2 пирuvat-киназа, OV-6 - маркер овальных клеток, A6.

Природа овальных клеток остается не вполне ясной. Ультраструктурный анализ этих “малых клеток” в портальном регионе печени пациентов с хронической болезнью печени выявил 3 типа овальных клеток, различающихся морфологическими характеристиками и локализацией. Таким образом, овальные клетки являются мультипотентной клеточной популяцией с потенциалом дифференцировки в гепатоциты и билиарные клетки, а при определенных условиях в эпителий поджелудочной железы и кишечный эпителий, что было доказано в ряде экспериментов [19].

Интересно, что антигены, традиционно ассоциирующиеся с гемопоэтическими клетками, также экспрессируются овальными клетками, включая c-kit, fit-3, Thy-1, CD34. Поэтому овальные клетки считаются стволовыми клетками печени. Эти клетки многочисленны, легко культивируются и могут быть использованы для трансплантации.

При массивных повреждениях печени происходит активация стволовых клеток внутри мельчайших ответвлений внутрипеченочного билиарного дерева (желчных протоков). Эта так называемая реакция “овальных клеток” или “реакция протоков” умножает популяцию билиарных клеток перед тем, как эти клетки трансдифференцируются в гепатоциты [20]. У людей эти мельчайшие желчные протоки (каналы Геринга) обычно распространяются на проксимальную треть лобулы, и клетки этих каналов “чувствуют” массивное повреждение печени, пролиферируя и дифференцируясь в гепатоциты [21]. На этом основании некоторые авторы причисляют овальные клетки к холангиоцитам. Другие авторы предполагают, что овальные клетки происходят из перидуктулярных клеток вокруг портальной области или из еще неидентифицированных стволовых клеток, которые могут быть малыми гепатоцитами [22, 23].

Попытки использовать овальные клетки для трансплантации были до сих пор безуспешны вследствие развития гепато- и холангиокарцином. По-видимому, овальные клетки необходимо предварительно генетически модифицировать перед трансплантацией. Недавно были получены трансфицированные овальные клетки, которые дифференцировались в нормальные гепатоциты [24].

Популяция малых гепатоцитов в печени крысы составляет 1,5-2% гепатоцитов, и количество этих клеток уменьшается с возрастом. Клетки могут быть выделены из печени человека, причем показана их клональная экспансия в культуре. Хотя клетки могут расти без потери гепато-характеристик в течение нескольких месяцев, их иммортализация так трудна, что клеточных линий не существует. С другой стороны, кластеры малых гепатоцитов наблюдали *in vivo* у грызунов с острыми болезнями печени, полученными в результате действия гепатотоксинов - дипина, D-галактозамина, ретрорсина и других. Малые гепатоциты также появляются в печени людей, больных острыми вирусными гепатитами, а также при хронических гепатитах и циррозах.

2.2. Стволовые клетки непеченочной природы.

2.2.1. Клетки поджелудочной железы. Очевидно, что клетки поджелудочной железы могут легко дифференцироваться в гепатоциты - в их эмбриологически близкородственный клеточный тип. Krakowski et al. [25] получили трансгенную мышь с KGF (keratinocyte growth factor)-регулируемым инсулиновым промотором и в течение 6 месяцев внутри островков Лангерганса появлялись многочисленные функциональные гепатоциты. Комбинация дексаметазона и онкостатина М является очень эффективным индуктором трансдифференцировки экзокринных клеток поджелудочной железы в гепатоциты [26].

2.2.2. Костный мозг. Лучшее всего изучены взрослые гемопоэтические стволовые клетки, которые формируют кровь и иммунную систему в течение жизни. Костный мозг содержит большей частью коммитированные прогениторные клетки, нециркулирующие стромальные клетки, обладающие способностью превращаться в мезенхимальные линии (мезенхимальные стволовые клетки - MSCs), и гемопоэтические стволовые клетки (HSCs). Эти последние привлекают особое

внимание исследователей. Экспрессия клеточных маркеров используется в стандартной экспериментальной практике для характеристики популяции клеток гемопоэтической фракции. Хотя популяция CD34⁺ используется в клинической практике подвергающихся трансплантации стволовых клеток, следует отметить, что у мышей экспрессия CD34⁺ является динамическим явлением и может неверно отражать содержание стволовых клеток. У людей внутри популяции CD34⁺ моноклональные антитела AC133 идентифицируют субпопуляцию CD34⁺ bright, которая обладает большими способностями к гемопоэтической реконструкции в моделях ксенотрансплантации по сравнению с популяцией CD34⁺ dim [27, 28].

В эксперименте было показано, что трансдифференцировка не может иметь места в физиологических условиях и что для генерации более сильного ответа необходимо повреждение ткани, такое как накопление токсических катаболитов или апоптотических симптомов (провокация) [29, 30]. Интересно отметить, что недавние исследования роли HSCs в модели фиброза печени показали более высокие уровни гепатоцитов из костного мозга, чем сообщалось ранее. В качестве источника костного мозга были использованы трансгенные мыши, экспрессирующие GFP (green fluorescent protein), и до 26% печени реципиента было заселено в течение 4 недель [31].

Хотя наличие и острота повреждения печени может быть важна для регуляции степени пластичности стволовых клеток и их приживания, сообщенные данные литературы варьируют. Детальный анализ использованных моделей показывает, что различные субпопуляции стволовых клеток могут иметь разный уровень функциональной пластичности. Хотя первоначальные исследования использовали главным образом нефракционированный костный мозг, последующая работа показала важность клеток CD34⁺ для приживания в печени [8]. Недавно было показано, что фракция SP (side population) клеток мозга (популяция примитивных клеток с повышенной способностью к эмиграции) содержала клетки с подобной способностью и была богата стволовыми клетками CD34⁻ [27, 32, 33]. Авторы многочисленных исследований убедились в том, что минимальные отличия в экспериментальных методах могут быть ответственны за наблюдаемые разногласия в экспериментах [34, 35].

Хотя клетки костно-мозгового происхождения могут при определенных условиях способствовать регенерации печени, терапевтический потенциал зависит от достаточности функций этих клеток. В модели, использующей мышей, дефицитных по фумарилацетогидролазе (FAH) (модель фатальной наследственной болезни печени - тирозинемии), взрослые клетки костного мозга диких животных вводили летально облученным мутантам. У мутантов развивалась прогрессирующая печеночная недостаточность, если их не лечили 2-(2-нитро-4-трифтор-метилбензоил)-1,3-циклогександиолом (NTBC). Кормление NTBC прекращали после трансплантации, чтобы улучшить селекцию клеток, заселяющих печень. После эвтаназии оказалось, что клетки костно-мозгового происхождения образовали большую часть массы печени (до 30-50%) и были видны большие узелки донорского происхождения, состоящие из нормальных гепатоцитов, экспрессирующих FAH. Исследования биохимических функций показали, что клетки костно-мозгового происхождения восстановили эти параметры почти до нормального уровня, включая экспрессию отсутствующей печеночной гидролазы, что вело к долговременному выживанию животных. Более того, при выделении HSCs из костного мозга с помощью флуоресцентного клеточного сортера, эти клетки оказались единственными клетками костного мозга, способными превращаться в гепатоциты. Введение мышам малого количества (10-1000) HSCs наряду с конгенными взрослыми клетками костного мозга в качестве радиопротективной дозы было достаточно для генерации кластера функционирующих гепатоцитов [29].

В других опытах на модели грызунов с введением CCl₄ и ретрорсина инфузия клеток костного мозга после повреждения печени не дала

положительного функционального результата в смысле выживания животных. Анализ гемопоэтических клеток, инфильтрующихся в печень, выявил большое количество гранулоцитов, представляющих воспалительный ответ на некроз печени. Была идентифицирована также малая часть клеток желчных протоков без доказательства их дифференцировки в гепатоциты [36].

Гемопоэтические стволовые клетки могут генерировать гепатоциты прямо, так же как и промежуточное образование овальных клеток, в зависимости от способа повреждения и типа модели. Это было продемонстрировано на моделях грызунов и подтверждено на людях путем ретроспективного исследования реципиентов костного мозга и трансплантации печени [8, 37-41].

Таким образом, у грызунов, по-видимому, вклад HSCs в репарацию печени и выживание ограничен определенными моделями поражения печени, в которых существует преимущество для выживания введенных клеток.

3. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОТОКОЛОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ ДЛЯ ПЕРЕЗАСЕЛЕНИЯ ПЕЧЕНИ И ПРЕИМУЩЕСТВА ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

Печень отличается высокой способностью к репаративной регенерации за счет гепатоцитов и собственных стволовых клеток. Однако часто собственной репаративной способности бывает недостаточно и пациенты умирают от печеночной недостаточности. В клинике применяется терапия печеночной недостаточности зрелыми гепатоцитами как *ex vivo*, так и *in vivo*. Однако применение этих методов встречается с серьезными трудностями, в особенности с необходимостью накопления и обеспечения пролиферации и функциональной активности гепатоцитов. Эти трудности следующие:

1) Чтобы зрелые гепатоциты переселили печень, необходимо создать существенное селекционное преимущество для трансплантированных клеток, связанное с экстенсивным повреждением печени, потерей паренхимы или неспособностью эндогенных гепатоцитов к пролиферации, а такие условия не обеспечиваются в реальной терапии.

2) Дифференцированные гепатоциты трудно эффективно накапливать методом культивирования. Однако, стволовые/прогениторные клетки печени можно культивировать и использовать культивированные стволовые/прогениторные клетки печени или клеточные линии для репопуляции печени.

3) Существуют трудности при введении чужеродных генов в гепатоциты *in vitro*, и эффективная генная терапия может быть легче достигнута с помощью стволовых/прогениторных клеток печени [42].

В работах Evarts, Thorgeirsson et al. [43-45] крыс обрабатывали 2-ацетаминифторидом (2-AAF), который вызывает экстенсивное повреждение ДНК в печени, и затем производили гепатэктомию 2/3 печени. В этих условиях наблюдали массивную пролиферацию овальных клеток в перипортальном регионе, подтвержденную захватом [³H]тимидина. Это и другие исследования подтвердили, что когда пролиферация гепатоцитов блокирована, “факультативные” стволовые клетки начинают активно пролиферировать в ответ на стимулы регенерации. Существует предположение, что перипортальные клетки взрослой печени, экспрессирующие мРНК альфа-фетопротейна (онкобелка зародышевой печени), представляют собой стволовые/прогениторные клетки печени, в то время как в ходе дифференцировки в зрелые гепатоциты происходит переключение клетки на синтез близкого по структуре, но характерного для взрослых гепатоцитов альбумина [46].

Shafritz [42] считает, что преимущества стволовых/прогениторных клеток печени по сравнению со зрелыми гепатоцитами для репопуляции печени обусловлены следующими причинами:

1. Требуется меньше селекционного давления для пролиферации после трансплантации.

2. Возможность размножаться в культуре и возможность развивать линии стволовых/прогениторных клеток печени.

3. Пролиферация может продолжаться долгое время после трансплантации.
4. Возможность отклика на гормоны и ростовые факторы.
5. Возможность регенерировать полные доли печени.
6. Способность оставаться живыми в течение длительного времени и лучше поддерживать сохраненную массу печени.
7. Возможность использовать для генной терапии *ex vivo*.

4. МОДЕЛИ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ.

Печеночную недостаточность у модельных животных можно вызвать различными способами. К их числу относятся: 1) хирургические способы - гепатэктомия и перевязка сосудов; 2) токсическое поражение печени с помощью, например, CCl_4 или дипина, вызывающего обширный некроз печени; 3) специальные диеты (холин-дефицитная и др.); 4) сочетание CCl_4 с гепатоканцерогенами (2-ацетиламинофтораном-2-AAF, этионином, 3-метил-4-диметиламинобензоатом)), подавляющими пролиферацию гепатоцитов; 5) сочетание ретрорсина (ДНК-связывающий пирролизидиновый алкалоид) с гепатэктомией; 6) генетические модели.

Экспериментальные модели являются ценными для изучения репликации и функционального потенциала отобранных популяций клеток с потенциалом гепатоцитов – клеток печени, поджелудочной железы или гемопоэтических стволовых клеток. Некоторые модели позволяют обеспечить почти полное замещение паренхимы печени донорскими клетками. Среди этих моделей получили распространение: модель с FAN-дефицитными мышами, модель с мышами, трансгенными по активатору плазминогена урокиназного типа (uPA), модель трансдукции Bcl-2 аденоассоциированным вирусом - (AAV)-Bcl-2 с обработкой Fas-антителами и другие модели [14, 15, 42].

4.1. FAN- дефицитные мыши.

Эта модель разработана для изучения наследственной тирозинемии 1 типа у людей. В данном случае оказывается сильное позитивное селекционное давление на трансплантированные клетки, поскольку FAN-дефицитные мыши умирают новорожденными без получения 2-(2-нитро-4-трифтор-метилбензоил)-1,3-циклогександиона (NTBC) - вещества, которое предотвращает накопление токсических метаболитов тирозинового катаболического пути. Свойства гепатоцитов, подобные стволовым клеткам, были наглядно продемонстрированы в этой модели. Когда 104 нормальных гепатоцита от конгенных самцов мышей дикого типа вводили в селезенку мутантных самок, эти клетки быстро колонизировали мутантную печень [47]. Хотя большинство FAN-дефицитных мышей, лишённых лечения NTBC, которым трансплантируют клетки поджелудочной железы, умирают, малая их часть выживает с 50-70% замещения больной печени гепатоцитами, происшедшими из клеток поджелудочной железы [14, 15, 48].

4.2. Мыши, трансгенные по активатору плазминогена урокиназного типа.

В этой модели протеиназа uPA под контролем альбуминового промотора синтезируется исключительно в печени, причем токсичность имеет место благодаря активации субстрата uPA плазминогена в плазмин, что индуцирует внутриклеточное протеолитическое повреждение [49]. Печень подвергается длительному повреждению в результате экспрессии uPA, что ведет к некрозу и смерти большинства животных. Печень мышей, трансгенных по альбумину-uPA, может полностью замещаться здоровыми трансплантированными гепатоцитами [16], и даже долговременно хранившиеся криопресервы гепатоцитов [50] и полиплоидные гепатоциты [51] колонизируют печень мышей, трансгенных по основному белку мочи (MUP-uPA). Для развития модели трансген альбумин – uPA должен быть включен в иммунотолерантную мышь *pu/pu*, что позволяет расти гепатоцитам разных видов крыс [52], и гепатоцитам человека для исследований метаболизма лекарств или канцерогенности. Действительно, мыши, иммунодефицитные и uPA\RAG-2 (рекомбинантный ген активации-2), поддерживают рост гепатоцитов человека [53] и остаются пермиссивными для инфекции вируса гепатита В.

В этих двух генетических моделях мышей (урокиназа активатор плазминогена-uPA и фумарил-ацетоацетат гидролаза-FAH-null) трансплантированные гепатоциты могли делиться от 12-14 до 100 и более раз, что (в последнем случае) соответствует нормальным стволовым клеткам [12, 42, 47, 54]. Авторы отмечают, что именно малые гепатоциты (очевидно, овальные стволовые клетки печени) колонизируют печень реципиента.

4.3. Трансдукция адено-ассоциированным вирусом (AAV) Bcl-2 и терапия антителами к Fas.

Эта модель является скорее стратегией для распространения генетически модифицированных клеток. гAAV трансдуцирует только около 2% гепатоцитов при инъекции непосредственно в печень мыши, но при включении в конструкцию минигена, кодирующего Bcl-2, и затем при преимущественном индуцировании апоптоза в нетрансдуцированных клетках путем систематического введения Fas-антител, пропорция трансдуцированных клеток увеличивалась до 20% [42, 55].

4.4. Модель uPA/Rag2-/- мышей для ксенотрансплантации.

Эта модель была получена благодаря скрещиванию uPA-трансгенных мышей (с постоянным повреждением печени) с мышами линии Rag2-/-, дефицитными по Т и В клеткам и иммунотолерантным по отношению к трансплантированным клеткам. В этой модели трансплантированные гепатоциты других видов (в том числе человека) могли пролиферировать в печени мыши [42, 53, 54].

Ещё одна генетическая модель была разработана для маркировки трансплантированных клеток.

4.5. ДПП IV(-) - мутантные крысы.

ДПП IV(-)-мутантные крысы (у которых отсутствовал специфичный мембранный белок дипептидил-пептидаза DPPIV) были использованы для доказательства того, что после трансплантации прогениторных клеток в печень (обработанную D-галактозамином) именно они пролиферировали и дифференцировались в организме реципиента. Эта модель была разработана в начале 90-х годов Thompson et al.[56].

Трансплантированные гепатоциты крыс дикого типа F344 (DPPIV+) полностью интегрировались в структуры паренхиматозного корда печени мутантов крыс F344 (DPPIV-) и образовывали гибридные желчные каналы с гепатоцитами хозяина [57, 58]. Эпителиальные прогениторные клетки были выделены из печени и поджелудочной железы, и после трансплантации оба эти типа клеток дифференцировались в гепатоциты. Но эти клетки были способны лишь к весьма ограниченному числу делений [59, 60]. При обработке ретрорсином и частичной гепатэктомии трансплантированные клетки могли заселять весь орган [12].

Из-за большого селективного давления такие модели, как FAH и uPA, неприемлемы для людей. Поэтому была разработана другая модель - ретрорсиновая.

4.6. Ретрорсиновая модель.

Крыс обрабатывали ретрорсином, пирролизидиновым алкалоидом, который захватывается печенью и метаболизируется до активной формы, препятствуя пролиферации гепатоцитов путем нарушения их клеточного цикла [18, 42, 61-63]. Если обработанных ретрорсином крыс подвергнуть частичной гепатэктомии, их эндогенные гепатоциты становятся неспособны пролиферировать и восстанавливать печень. После трансплантации гепатоцитов дикого типа крысам DPPIV(-) после обработки ретрорсином и частичной гепатэктомии, удалось полностью восстановить объем печени со всеми функциями [42, 61].

4.7. Применение D-галактозамина.

Пролиферацию зрелых гепатоцитов можно заблокировать с помощью D-галактозамина. Этот агент включается в UDP-галактозамин и истощает энергию клетки нарушением метаболизма UDP. Весь синтез РНК и белков временно ингибируется и происходит некроз печени. В этих условиях D-галактозамин индуцирует пролиферацию малых эпителиальных клеток (овальных стволовых клеток) в перипортальном регионе. Эти клетки, позитивные по альфа-фетопротеину,

быстро делятся, выходят в печеночную паренхиму и превращаются морфологически и фенотипически в гепатоциты с экспрессией генов альбумина и глюкозо-6-фосфатазы и потерей экспрессии гена альфа-фетопротейна [64]. После введения D-галактозамина масса печени полностью восстанавливается в течение 10-14 дней, так что хотя пролиферация гепатоцитов заблокирована, регенерация печени полностью происходит за счет стволовых прогениторных клеток. В противоположность D-галактозамину, действие которого носит временный характер, действие ретрорсина длительно.

4.8. Облучение.

Облучение использовали для блокирования эндогенных гепатоцитов, что позволяло трансплантированным гепатоцитам дикого типа полностью перезаселять печень [65]. Возможно, апоптоз эндогенных гепатоцитов с поврежденной ДНК играет роль в долговременной репопуляции печени как в ретрозиновой модели, так и в модели облучения.

5. ОБОГАЩЁННЫЕ ПОПУЛЯЦИИ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ.

В больной печени человека может не быть существенных селективных преимуществ для роста трансплантированных клеток, которые имеются в описанных моделях, поэтому важно определить, возможно ли обогащение истинными стволовыми клетками, что улучшило бы их распространение в печени реципиента в отсутствие главных стимулов роста. В настоящее время проводятся интенсивные исследования, направленные на поиск маркеров стволовых/прогениторных клеток печени, их выделение и очистку с помощью специфичных антител. Однако, специфичные маркеры пока не найдены. Фетальные клетки печени экспрессируют интегрин $\alpha 6$ (CD49f) и интегрин $\beta 1$ (CD29), которые презентуются обычно на зрелых гепатоцитах, и не экспрессируют CD 45 и Ter119, являющиеся специфическими маркерами гемопоэтических клеток [66]. Интересно, что клетки, показывающие наибольшее обогащение прогениторными клетками печени в реакции колониеобразования, были негативны на c-kit, который является положительным сортирующим маркером для гемопоэтических стволовых клеток и определяется также в овальных клетках печени [42, 67]. Наоборот, позитивная селекция по c-kit была использована для обогащения стволоподобных прогениторных клеток печени человека, которые могли дифференцироваться в культуре в желчные эпителиальные клетки [68]. В других исследованиях для селекции гемопоэтических стволовых клеток был использован маркер CD 34, и эти клетки дифференцировались в гепатоциты [38]. Kubota and Reid [69] использовали гены МНС I класса, OX 18 и ICAM-1 для выделения фетальных клеток крыс ED13, которые экспрессировали фенотипические маркеры гепатоцитов (AFP и альбумин) и эпителиальных клеток желчного протока (СК-19) в культуре. Отсутствие экспрессии МНС I класса и умеренная экспрессия ICAM-I могут позволить гепатобластам избежать реакции иммунной системы, когда их трансплантируют в организм МНС-несовместимого хозяина. В отношении размера гепатоцитов нет единого мнения; у FАН-дефицитной мыши гепатоциты среднего размера скорее, чем самые малые гепатоциты, были наилучшими колоние-образователями [70], в то время как у обработанных ретрорсином крыс Fischer, мутантных по DPPIV(-), мельчайшие гепатоциты DPPIV(+) продуцировали самые большие колонии [71]. Действительно, если крысам вводили ретрорсин и затем подвергали частичной 2/3 гепатэктомии, через короткое время печеночная паренхима становилась полностью состоящей из малых гепатоцитов, очевидно устойчивых к мито-ингибирующему эффекту ретрорсина [12]. Не исключено, что эти клетки являются потомками субпопуляции стволовых клеток [13].

6. РОЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ.

Большую роль в репопуляции печени и в фенотипическом поведении трансплантата играет сайт хозяина, в который производится трансплантация

клеток. Если гепатоциты трансплантированы в дорсальный сальник, селезенку или перитонеальную область, возникает экспрессия некоторых гепато-специфичных генов, но обычно очень ограниченная. Однако, если гепатоциты трансплантированы в печень, образуются клетки со стандартным гепатоцитическим фенотипом. С фетальными клетками наблюдали, что если они трансплантируются в печеночные каналы, они дифференцируются в гепатоциты, а если они трансплантируются в желчный проток, то они дифференцируются в эпителиальные клетки желчного протока [42, 72]. Некоторые клетки обладают бипотенцией и образуют кластеры, содержащие как гепатоциты, так и клетки желчных протоков. Клетки трансформированной недифференцированной гепатомы, будучи трансплантированными в печень, образуют клетки с выраженным фенотипом гепатоцитов и прекращают клеточный рост [42, 73]. Таким образом, локальное окружение печени играет важную роль в определении фенотипа трансплантированных клеток.

7. ПРОДУКТЫ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ВЫЗЫВАЮТ РЕВЕРСИЮ ОСТРОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ.

Среди мультипотентных стромальных клеток костного мозга имеются мезенхимальные стволовые клетки (MSCs), которые являются клетками-предшественниками стромальных тканей, поддерживающих гемопоэз. Ранее была показана способность мезенхимальных стволовых клеток (MSCs) изменять иммунный ответ [74]. Было замечено, что при трансплантации этих клеток они уходят от иммунного надзора. *In vitro* было показано, что MSCs активно ингибируют функцию некоторых иммунных клеток путем секреции цитокинов, ростовых факторов и действия ферментов. Молекулы, выделяемые MSCs, могут вызывать реверсию острой печеночной недостаточности. Parekkadan et al. [75] на крысах показали, что введение бессывороточной концентрированной среды после выращивания на ней мезенхимальных стволовых клеток обеспечивало значительное выживание этих животных с острой печеночной недостаточностью. Авторы наблюдали дозо-зависимый эффект уменьшения смертности крыс, который, однако, исчезал при увеличении количества клеток, что указывает на наличие оптимальной концентрации клеток и на существование терапевтического окна. Были получены доказательства модуляции иммунной системы животных. Предварительный анализ секретируемой MSCs жидкости методом микроципов обнаружил большую фракцию хемотактических цитокинов или хемокинов. Когда среда после культивирования MSCs была фракционирована по принципу связывания гепарина (известного лиганда для всех хемокинов), только эта фракция оказывала положительное влияние на животных с острой печеночной недостаточностью. Эти данные являются первыми экспериментальными результатами, показывающими возможность использования хемокинов, выделяемых MSCs, в терапии воспалений и указывающими на роль хемокинов (и измененной миграции лейкоцитов) в новом терапевтическом воздействии на острую печеночную недостаточность [75].

8. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

Печеночные стволовые клетки из любого источника, сами гепатоциты, овальные клетки/холангиоциты, или гемопоэтические стволовые клетки костного мозга (HSCs) могут быть терапевтически полезны для лечения различных болезней печени. Сюда входит ряд генетических болезней, таких как болезнь Вильсона, синдром Криглер-Найяра, тирозинемия, дефицит фактора IX. Например, введение через портальную вену эквивалента 5% паренхимальной массы пациенту с синдромом Криглера-Найяра привело к уменьшению сывороточного билирубина и к увеличению конъюгатов билирубина в желчи [76]. Стволовые клетки, особенно HSCs, также могут служить идеальным сосудом для доставки терапевтических генов в печень, в особенности противовоспалительных цитокинов (интерлейкин-10) для лечения аутоиммунных болезней печени, антифиброзных цитокинов (фактор роста гепатоцитов), и антивирусных

цитокинов (интерферон-альфа) для лечения инфекции вируса гепатита В. При введении костного мозга приблизительно одна треть реципиентов печени может быть освобождена от длительной вынужденной иммуносупрессии. Внедрение клеток костного мозга реципиента в донорскую печень могло бы быть важным фактором толеризации больного: эндотелий, произошедший из костного мозга реципиента, был найден в трансплантированной печени [77], а c-kit-позитивные клетки были найдены в желчных протоках [68]. В настоящее время совершенно ясно, что HSCs играют важную роль в биологии печени, и экспериментальные модели позволяют влиять на этот процесс [14, 15]. Стимуляция регенерации печени аутологичными стволовыми клетками применяется уже давно и имеет богатую экспериментальную базу. HSCs используются для репопуляции кроветворной ткани при ее недостаточности [78]. Общепринятым маркером HSCs у человека считается CD34+. Другой изученной популяцией являются CD133+ и CD34+/CD133+ гемопоэтические клетки. Опубликованы результаты первых клинических наблюдений в Германии о внутрипортальной аутотрансплантации CD133+ клеток, способных к дифференцировке в гепатоциты, для регенерации резецированной печени [79]. Пять пациентов с хронической печеночной недостаточностью различного генеза, не подлежащие пересадке печени, с прогнозируемой продолжительностью жизни не менее 3-х месяцев, ежедневно получали подкожные инъекции Г-КСФ (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора) с целью мобилизации HSCs в периферический кровоток. Клетки CD34+ выделяли методом магнитного сортинга на 5-е сутки от начала мобилизации. Клетки вводили в печень через печеночную артерию (2 пациента) или портальную вену (3 пациента) в количестве от 1 до 200 млн. Пациентов наблюдали амбулаторно в течение 60 дней с момента трансплантации. У всех пациентов определяли нормализацию уровней билирубина, альбумина и С-реактивного белка, 2 пациента продемонстрировали резкое улучшение метаболической функции печени. Была показана также неоднородность популяции CD34+, в которой только 1% клеток оказались адгезивными и прилипали к пластику при культивировании. Неадгезивные клетки в основном экспрессировали молекулы, ассоциированные с дифференцировкой гемопоэтических клеток. Адгезивные же клетки, наряду с гемопоэтическими маркерами, экспрессировали продукты некоторых генов печеночной, панкреатической, нервной и сердечной линий дифференцировки. На основании выявленных особенностей адгезивных клеток авторы предполагают, что именно они ответственны за потенциальное восстановление функций пораженного органа [80].

Фракция ранних предшественников гемопоэтических клеток костного мозга CD133+ считается одной из наиболее привлекательных для аутологичной трансплантации, так как эти клетки были уже успешно использованы для кардиомиопластики [81, 82]. Трём пациентам с обширными - до 80%-резекциями печени в связи с онкологическими заболеваниями проводилась трансплантация аутологичных клеток костного мозга CD133+, собранными методом магнитного сортинга. Было показано ускорение регенерации печени в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой после аналогичных операций. Прирост общего объема печени (ООП) составил 51%, 122% и 43% (4,03мл/день) после 22, 21 и 14 дней соответственно от момента трансплантации. Авторы наблюдали неоднородность выделенной сортигом фракции CD133+ клеток [79]. Этот факт нуждается в скорейшем изучении, так как есть данные, что клетки CD133+ являются раковыми стволовыми клетками человека [83].

Клетки CD133+ были описаны как стволовые клетки взрослого организма в 1997 г. Экспрессия гликопротеина CD133+ описана на гемопоэтических клетках фетальной печени, костного мозга, пуповинной и периферической крови, на циркулирующих эндотелиальных прогениторах и некоторых опухолевых клетках человека. Оказалось, что эти клетки способны к многократным делениям и высокой степени экспансии *in vitro*, что позволило рассматривать их как одну из

самых ранних стволовых популяций во взрослом организме человека [84]. Несмотря на наличие онкогенного потенциала, CD133+ стали применять в клинике для кардиомиопластики [81, 82].

В последние годы было установлено, что способность эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и мыши к самообновлению объясняется взаимодействием таких факторов, как Oct-3/4 (Octamer-binding transcription factor 4), SOX2 и NANOG [85-87]. Все три фактора конкурируют при связывании с промоторами некоторых генов, большинство из которых кодируют так называемые гомеодоменные белки, необходимые для самой ранней дифференциации тканей и органов. Было выявлено 353 человеческих гена, которые одновременно могут связывать все три фактора. Их сайты связывания находятся в непосредственной близости, что указывает на взаимодействие этих факторов при совместной регуляции транскрипции некоторых генов. В результате ряда дополнительных исследований был сделан вывод, что факторы Oct-3/4, SOX2 и NANOG поддерживают “стволовость” клеток через активацию генов, участвующих в процессе деления эмбриональных стволовых клеток, и инактивацию генов, запускающих процессы развития и дифференцировки. Результаты этих исследований создают предпосылки для развития экспериментальных систем с искусственным подавлением и индукцией процессов дифференцировки, продлевая или сокращая фазу плюрипотентности клеток, что в дальнейшем станет важным инструментом в клеточной трансплантологии [85].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Стволовые клетки печени способны пролиферировать и дифференцироваться в функциональные специализированные клетки. Существуют 2 главных источника стволовых клеток печени, практическое применение которых для репарации печени обсуждается: 1) зрелые гепатоциты, которые могут приобретать вновь способность пролиферировать; 2) овальные клетки, то-есть непаренхиматозные элементы печени, обладающие потенциалом пролиферации [23, 24].

Помимо собственных стволовых клеток печени, костный мозг (и особенно гемопоэтические клетки) и поджелудочная железа также являются источником стволовых клеток. Трансплантация костного мозга или инфузия гемопоэтических стволовых клеток (HSCs) через неясные механизмы приводила к регенерации печени в различных экспериментальных моделях [1].

Опыт клинического применения стволовых клеток и гепатоцитов вселяет оптимизм. Собственные стволовые клетки вступают в действие, когда имеется тяжелое повреждение печени и когда собственные гепатоциты неспособны выполнять свою функциональную роль. Для обеспечения выживания клеток необходимо не только создать селективное преимущество, но и обеспечить выживание клеток путем улучшенного кровоснабжения и, возможно, введения ростовых факторов. Важно также место введения клеток, так как роль микроокружения в выживании и дифференцировке клеток весьма существенна. Можно использовать подложки – носители (обычно полимерного происхождения, например, полимолочную и полигликолевую кислоты), на которые заранее засевают клетки до трансплантации. При трансплантации клеток большая часть их гибнет в первые дни, однако выжившие клетки затем начинают пролиферировать и заселяют печень.

Использование взрослых стволовых клеток преодолевает многие моральные и этические барьеры на пути манипуляций с эмбриональными клетками, и если соматические клетки действительно могут преодолеть барьеры зародышевых линий, то HSCs будут идеальным источником. Уже существует значительный опыт работы с ними, и они относительно доступны. Кроме того, их введение может индуцировать иммунологическую толерантность, так как они могут потенциально индуцировать гемопоэтический микрохимеризм, таким образом избегая необходимости иммуносупрессии. HSCs дают готовую возможность стволовых клеток или прогениторов для заселения печени, полученных от живых доноров. В настоящее время остается много проблем и значительная неопределенность

относительно того, как эти клетки можно использовать в клинической практике. Во-первых, требуется лучшее понимание механизмов действия стволовых клеток. Необходимо установить, могут ли HSCs играть терапевтическую роль в хронических заболеваниях печени. Во-вторых, механизм геномной пластичности нуждается в большей определенности. Если трансдифференцировка действительно ответственна за этот процесс, тогда возможно более широкое использование HSCs для ряда заболеваний печени, в то время как слияние клеток может быть использовано для доставки корректирующих генов для лечения метаболических расстройств печени, поскольку могла бы быть гарантирована генетическая стабильность в репрограммированных клетках. Однако, учитывая разноречивые данные об уровнях трансдифференцировки и противоречия, касающиеся механизмов, ответственных за этот процесс, эти вопросы кажутся пока далекими от решения и ставят под вопрос терапевтическую стратегию, основанную на этой идее. Кроме того, требуется большая работа для решения практических проблем. Если HSCs способны трансплантироваться прямо как гепатоциты, то прямая внутриорганный инъекция облегчает задачу и позволяет избежать облучения для истощения костного мозга реципиента. Напротив, если трансплантация костного мозга является предпосылкой, тогда, по-видимому, будут необходимы периферическое введение препаратов костного мозга и манипуляции с микроокружением печени для максимального привлечения HSCs. Новые открытия в биологии взрослых стволовых клеток дают надежду на развитие репаративной гепатологии. Однако, в настоящее время необходимо соблюдать осторожность. Пластичность взрослых стволовых клеток имеет место, но это явление достаточно редкое даже при селективном давлении, и только будущее покажет, будет ли оно клинически значимым для человека [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Masson S., Harrison D.J., Plevris J.N., Newsome P.N. (2004) Stem Cells, **22**, 897-907.
2. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R. Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. (2001) Nature, **410**(6829), 701-705.
3. Jackson K.A., Majka S.M., Wang H., Pocius J., Hartley C.J., Majesky M.W., Entman M.L., Michael L.H., Hirschi K.K., Goodell M.A. (2001) J. Clin. Invest., **107**, 1395-1402.
4. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **98**, 10344-10349.
5. Помапов И.В., Кириллов И.А., Онищенко Н.А. (2007) Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, **2**, 45-51.
6. Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlström H., Lendahl U., Frisén J. (2000) Science, **288**, 1660-1663.
7. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., Goff J.P. (1999) Science, **284**, 1168-1170.
8. Theise N.D., Badve S., Saxena R., Henegariu O., Sell S., Crawford J.M., Krause D.S. (2000) Hepatology, **31**, 235-240.
9. Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S., Sharkis S.J. (2001) Cell, **105**(3), 369-377.
10. Farber E. (1956) Cancer Res., **16**, 142-148.
11. Yin L., Lynch D., Ilic Z., Sell S. (2002) Histol. Histopathol., **17**, 65-81.
12. Gordon G.J., Coleman W.B., Hixson D.C., Grisham J.W. (2000) Am. J. Pathol., **156**(2), 607-619.
13. Sell S. (2001) Hepatology, **33**, 738-750.
14. Alison M.R., Poulson R., Jeffrey R., Dhillon A.P., Quaglia A., Jacob J., Noveelli M., Prentice G., Williamson J., Wright N.A. (2000) Nature, **406**, 257-258.

15. *Alison M.R.* (2002) *Transplant. Proc.*, **34**, 2702-2705.
16. *Rhim J.A., Sandgren E.P., Degen J.L., Palmiter R.D., Brinster R.L.* (1994) *Science*, **263**, 1149-1152.
17. *Overturf K., al-Dhalimy M., Tanguay R., Brantly M., Ou C.N., Finegold M., Grompe M.* (1996) *Nature Genet.*, **12**, 266-273.
18. *Laconi E., Sarma D.S.R., Pani P.* (1995) *Carcinogenesis*, **16**, 139-142.
19. *Lowes K.N., Croager E.J., Olynyk J.K., Abraham L.J., Yeoh G.C.T.* (2003) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 4-12.
20. *Alison M.R.* (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 710-715.
21. *Theise N.D., Saxena R., Portmann B.C., Thung S.N., Yee H., Chiriboga L., Kumar A., Crawford J.M.* (1999) *Hepatology*, **30**(6), 1425-1433.
22. *Sell S.* (1998) *Hepatology*, **27**, 317-331.
23. *Feldman G.* (2001) *Cell Biol. Toxicol.*, **17**, 77-85.
24. *Yasui O., Miura N., Kawarada K., Koyama K., Sugiyama T.* (1997) *Hepatology*, **25**, 329-334.
25. *Krakowski M.L., Kritzik M.R., Jones E.M., Krah T., Lee J., Arnush M., Gu D., Sarvetnick N.* (1999) *Am. J. Pathol.*, **154**(3), 683-691.
26. *Shen C.N., Slack J.M., Tosh D.* (2000) *Nat. Cell Biol.*, **2**, 879-887.
27. *Goodell M.A., Rosenzweig M., Kim H., Marks D.F., DeMaria M., Paradis G., Grupp S.A., Sieff C.A., Mulligan R.C., Johnson R.P.* (1997) *Nat. Med.*, **3**(12), 1337-1345.
28. *Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A.G., Olweus J., Kearney J., Buck D.W.* (1997) *Blood*, **90**(12), 5002-5012.
29. *Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Feingold M., Weisman J.L., Grompe M.* (2000) *Nat. Med.*, **6**, 1229-1234.
30. *Mallet V.O., Mitchell C., Mezey E., Fabre M., Guidotti J.E., Renia L., Coulombel L., Kahn A., Gilgenkrantz H.* (2002) *Hepatology*, **35**(4), 799-804.
31. *Terai S., Sakaida I., Yamamoto N., Omori K., Watanabe T., Ohata S., Katada T., Miyamoto K., Shinoda K., Nishina H., Okita K.* (2003) *J. Biochem. Tokyo*, **134**(4), 551-558.
32. *Wulf G.G., Luo K.L., Jackson K., Brenner M.K., Goodell M.A.* (2003) *Haematologica*, **88**(4), 368-378.
33. *Goodell M.A., Brose K., Paradis G., Conner A.S., Mulligan R.C.* (1996) *J. Exp. Med.*, **183**(4), 1797-1806.
34. *Theise N.D., Krause D.S., Sharkis S.* (2003) *Science*, **299**, 1317.
35. *Wagers A.J., Sherwood R.I., Christensen J.L., Weissman I.L.* (2002) *Science*, **297**(5590), 2256-2259.
36. *Dahlke M.H., Popp F.C., Bahlmann F.H., Aselmann H., Jöger M.D., Neipp M., Piso P., Klempnauer J., Schlitt H.J.* (2003) *J. Hepatol.*, **39**, 365-367.
37. *Allen J.W.* (2002) *Tissue Engineering*, **8**, 725-737.
38. *Barrileaux B., Phinney D.G., Prockop D.J., O'Connor K.C.* (2006) *Tissue Engineering*, **12**(11), 3007-3019.
39. *Thorgeirsson S.S.* (1996) *FASEB J.*, **10**, 1249-1256.
40. *Rudolph K.L., Chang S., Millard M., Schreiber-Agus N., De Pinho R.A.* (2000) *Science*, **287**(5456), 1253-1258.
41. *Theise N.D., Nimmakayalu M., Gardner R., Illei P.B., Morgan G., Teperman L., Henegariu O., Krause D.S.* (2000) *Hepatology*, **32**, 11-16.
42. *Shafritz D.A., Dabeva M.D.* (2002) *Einstein Quart. J. Biol. Med.*, **19**, 20-32.
43. *Evarts R.P., Nagy P., Marsden E., Thorgeirsson S.S.* (1987) *Carcinogenesis*, **8**, 1737-1740.
44. *Evarts R.P., Nagy P., Nakatsukasa H., Marsden E., Thorgeirsson S.S.* (1989) *Cancer Res.*, **49**, 1541-1547.
45. *Thorgeirsson S.S.* (1993) *Am. J. Pathol.*, **142**, 1331-1333.
46. *Abelev G.I.* (1971) *Adv. Cancer Res.*, **14**, 295-358.
47. *Overturf K., Al-Dhalimy M., Ou C.N., Finegold M., Grompe M.* (1997) *Am. J. Pathol.*, **151**, 1273-1280.

48. Wang X., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Grompe M. (2001) *Am. J. Pathol.*, **158**(2), 571-579.
49. Sandgren E.P., Palmiter R.D., Heckel J.L., Daugherty C.C., Brinster R.L., Degan J.L. (1991) *Cell*, **66**, 245-256.
50. Rhim J.A., Sandgren E.P., Palmiter R.D., Brinster R.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(11), 4942-4946.
51. Jamal H.Z., Weglarz T.C., Sandgren E.P. (2000) *Gastroenterology*, **118**(2), 390-394.
52. Weglarz T.C., Degen J.L., Sandgren E.P. (2000) *Am. J. Pathol.*, **157**, 1963-1974.
53. Dandri M., Burda M.R., Torok E., Pollok J.M., Iwanska A., Sommer G., Rogilrs X., Rogler C.E., Gupta S., Will H., Greten H., Petersen J. (2001) *Hepatology*, **33**, 981-988.
54. Peterson J., Dandri M., Gupta S., Rogler C.E. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 310-313.
55. Mignon A., Guidotti J.E., Mitchell C., Fabre M., Wernet A., De La Coste A., Soubrane O., Gilgenkrantz H., Kahn A. (1998) *Nat. Med.*, **4**, 1185-1188.
56. Thompson N.L., Hixson D.C., Calliavan H., Panzica M., Flanagan D., Faris R.A., Hong W., Hartel-Schenk S., Doyle D. (1991) *Biochem. J.*, **273**, 497-502.
57. Gupta S., Rajvanshi P., Lee D.C. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5860-5864.
58. Dabeva M.D., Hwang S.G., Vasa S.R.G., Novikoff P.M., Hixson D.C., Gupta S., Shafritz D.A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7356-7361.
59. Gupta S., Chowdhury N.R., Jagtiani R., Gustin K., Shafritz D.A., Chowdhury J.R., Burk R.D. (1990) *Transplantation*, **50**, 472-475.
60. Ponder K.P., Gupta S., Leland F., Darlington G., Finegold M., DeMayo J., Ledley F.D., Chowdhury J.R., Woo S.L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1217-1221.
61. Laconi E., Oren R., Mukhopadhyay D., Hurston E., Laconi S., Pani P., Dabeva M.D., Shafritz D.A. (1998) *Am. J. Pathol.*, **153**, 319-329.
62. Samuel A., Jago M.V. (1975) *Chem. Biol. Interact.*, **10**, 185-197.
63. Oren R., Dabeva M., Petkov P., Hurston E., Laconi E., Shafritz D.A. (1999) *Hepatology*, **29**, 75-81.
64. Dabeva M.D., Shafritz D.A. (1993) *Am. J. Pathol.*, **143**, 1606-1620.
65. Guha C., Sharma A., Gupta S., Alfieri A., Gorla G.R., Gagandeep S., Sokhi R., Roy-Chowdhury N., Tanaka K.E., Vikram B., Roy-Crowdhury J. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 5871-5874.
66. Suzuki A., Zheng Y., Kondo R., Kusakabe M., Takada Y., Fukao K., Nakauchi H., Taniguchi H. (2000) *Hepatology*, **32**, 1230-1239.
67. Fujiio K., Evarts R.P., Marsden E.R., Thorgeirsson S.S. (1994) *Lab. Invest.*, **70**, 511-516.
68. Crosby H.A., Kelly D.A., Strain A.J. (2001) *Gastroenterology*, **120**, 534-544.
69. Kubota H., Reid L.M. (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**, 12132-12137.
70. Overturf K., Al-Dhalimy M., Finegold M., Grompe M. (1999) *Am. J. Pathol.*, **155**, 2135-2143.
71. Katayama S., Tateno C., Asahara T. (2001) *Am. J. Pathol.*, **158**, 97-105.
72. Sandhu J.S., Petkov P.M., Dabeva M.D., Shafritz D.A. (2001) *Am. J. Pathol.*, **159**, 1323-1334.
73. Coleman W.B., Wennerberg A.E., Smith G.J., Grisham J.W. (1993) *Am. J. Pathol.*, **142**, 1373-1382.
74. Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F., Radu A., Moseley A.M., Deans R., Marshak D.R., Flake A.W. (2000) *Nat. Med.*, **6**(11), 1282-1286.
75. Parekkadan B., van Poll D., Sukanuma K., Carter E.A., Berthiaume F., Tilles A.W., Yarmush M.L. (2007) *PLoS ONE*, **2**(9), e4941
76. Fox I.J., Chowdhury J.R., Kaufman S.S., Goertzen T.C., Chowdhury N.R., Warkentin P.I., Dorko K., Sauter B.V., Strom S.C. (1998) *N. Engl. J. Med.*, **338**, 1422-1426.
77. Gao Z., McAlister V.C., Williams G.M. (2001) *Lancet*, **357**, 932-933.

78. Thomas E.D. (2005) *Int. J. Hematol.*, **81**, 89-93.
79. Esche II J.S., Knoefel W.T., Klein M., Ghodsizad A., Fuerst G., Poll L.W., Piechaczek C., Burchardt E.R., Feifel N., Stoldt V., Stockschrader M., Stoecklein N., Tustas R.Y., Eisenberger C.F., Peiper M., Haussinger D., Hosch S.B. (2005) *Stem Cells*, **23**(4), 463-470.
80. Gordon M.Y., Levicar N., Pai M., Bachellier P., Dimarakis I., Al-Allaf F., M'Handi H., Thalji T., Welsh J.P., Marley S.B., Davies J., Dazzi F., Marelli-Berg F., Tait P., Playford R., Jiao L., Jensen S., Nicholls J.P., Ayav A., Nohandani M., Farzaneh F., Gaken J., Dodge R., Alison M., Apperley J.F., Lechler R., Habib N.A. (2006) *Stem Cells*, **24**(7), 1822-1830.
81. Stamm C., Westphal B., Kleine H.D., Petzsch M., Kittner C., Klinge H., Schumichen, Nienaber C.A., Freund M., Steinhoff G. (2003) *Lancet*, **361**, 45-46.
82. Pompilio G., Cannata A., Peccatori F., Bertolini F., Nascimbene A., Capogrossi M.C., Biglioli P. (2004) *Ann. Thorac. Surg.*, **78**, 1808-1813.
83. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire J., Dirks P.B. (2004) *Cancer Res.*, **432**, 396-400.
84. Summers Y.J., Heyworth C.M., de Wynter E.A., Hart C.A., Chang J., Testa N.G. (2004) *Stem Cells*, **22**(5), 704-715.
85. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnston S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R., Young R.A. (2005) *Cell*, **122**(6), 947-956.
86. Pera M.F., Trounson A.O. (2004) *Development*, **131**, 5515-5525.
87. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waaknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. (1998) *Science*, **282**, 1145-1147.

Поступила: 13. 11. 2007.

THE PERSPECTIVES OF HEPATIC FAILURE TREATMENT BY STEM CELLS

M.S. Dolgikh

Institute of Transplantology and Artificial Organs, Rosmedtechnology, Shchukinskaya ul., 1,
Moscow, Russia; tel.: 499-190-45-31; e-mail: marindo@yandex.ru

The insufficiency of liver functions remains one of the major causes of death. The liver transplantation is the most effective method for treating severe liver diseases. The shortage of donor organs and high risk of graft rejection are the main problems for liver transplantation.

Stem cells and isolated hepatocytes are alternative means for repopulating the liver after various injuries instead of liver transplantation. This review analyses the experimental and clinical advantage and perspectives on the stem cells use in clinical trials for treating hepatic failure.

Key words: cell therapy, stem cells, hepatic failure.