

Перспективы создания аутологичных гепатоцитов для лечения печеночной недостаточности

М.Н. Евсеева¹, А.Ф. Шептулина², Ю.П. Рубцов¹

¹Кафедра биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

²Клиника пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

The perspectives of autologous hepatocytes generation for the treatment of liver failure

M.N. Evseeva¹, A.F. Sheptulina², Yu.P. Rubtsov¹

¹ Biochemistry and Molecular Medicine Department, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University

² Vasilenko Clinic of internal diseases propedeutics, gastroenterology and hepatology, State educational government-financed institution of higher professional education «Sechenov First Moscow state medical university», Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, the Russian Federation

Цель обзора. Проанализировать основные клеточные источники получения гепатоцитов для создания искусственной печени, описать ключевые особенности каждого из подходов, рассмотреть их достоинства и недостатки.

Основные положения. Пересадка искусственной печени могла бы стать альтернативой традиционной трансплантации. Для создания искусственной печени необходимы специализированные клетки. К настоящему времени предоставлено несколько источников получения гепатоцитоподобных клеток. В обзоре также рассмотрены альтернативные подходы к лечению печеночной недостаточности: ингибирование процесса эпителиально-мезенхимной

The aim of the review. To analyze the main cell-based sources of hepatocyte for artificial liver generation, to describe the key features of each approach, to discuss benefits and shortcomings.

Summary. Artificial liver transplantation could be an alternative for traditional transplantation. For the artificial liver generation specialized cells are required. So far several sources of hepatocyte-like cells generation are known. This review presents alternative approaches for liver failure treatment: inhibition of epithelial-mesenchymal transformation, e.g. by induction of proliferation (gene therapy with HGF), and by influence on immune imbalance (T-regulatory lymphocytes application).

Евсеева Мария Николаевна — аспирант кафедры биохимии и молекулярной медицины ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова. Контактная информация: mr.urfin-juice@yandex.ru; 119192, Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 1. Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

Evseeva Mariia N. — post-graduate, Biochemistry and Molecular Medicine Department, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University. Contact information: mr.urfin-juice@yandex.ru, Russia 119192, Moscow, Lomonosovsky av., 27, bld.1.

Шептулина Анна Фароковна — аспирант кафедры пропедевтики внутренних болезней ПМГМУ им. И.М. Сеченова. Контактная информация: sheptulina.anna@gmail.com; 119991, Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1. Клиника пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко ПМГМУ им. И.М. Сеченова

Sheptulina Anna F. — post-graduate, Chair of internal diseases propedeutics, medical faculty, State educational government-financed institution of higher professional education «Sechenov First Moscow state medical university». Contact information: sheptulina.anna@gmail.com; 119991, Moscow, Pogodinskaya street, 1, bld 1. Vasilenko Clinic of internal diseases propedeutics, gastroenterology and hepatology.

Рубцов Юрий Петрович — доцент, кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры биохимии и молекулярной медицины ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова. Контактная информация: yrubtsov@gmail.com; 119192, Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 1. Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

Rubtsov Yuri P. — assistant professor, senior scientist, Biochemistry and Molecular Medicine Deptment, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University. Contact information: yrubtsov@gmail.com; 119192, Moscow, Lomonosovsky av. 27, bld. 1.

трансформации, например, за счет индукции пролиферации (генно-терапевтические конструкции на основе HGF), воздействия на дисбаланс со стороны иммунной системы (применение Т-регуляторных лимфоцитов).

Заключение. Анализ основных источников аутологичных гепатоцитов позволит определить приоритетные направления будущих исследований, а также выработать дальнейшие шаги для прогресса в лечении печеночной недостаточности.

Ключевые слова: печеночная недостаточность, фиброз печени, аутологичные гепатоциты, индуцированные плюрипотентные клетки, мезенхимные стромальные клетки.

Conclusion. Evaluation of the main sources of autologous hepatocytes would provide insights into priority directions of future studies, and lead to progress in liver failure treatment.

Key words: liver failure, liver fibrosis, autologous hepatocytes, induced pluripotent cells, mesenchymal stromal cells.*

*Резюме на английском языке опубликовано в авторской редакции.

На сегодняшний день единственным способом лечения недостаточности органа является его пересадка. Печеночная недостаточность может быть исходом вирусных и аутоиммунных гепатитов, наследственных заболеваний, интоксикаций. Трансплантация печени в России осуществляется с 1990 г., однако количество операций еще невелико. Например, в 2010 г. в России было проведено 1380 трансплантаций, в сравнения, в США — 6320 [1].

Вместе с тем даже в случае успешно проведенной операции продолжительность жизни пациента ниже, чем средняя продолжительность жизни в популяции. Это обусловлено пожизненным приемом иммуносупрессивных препаратов, направленных на подавление реакции отторжения.

Таким образом, недостаток донорских органов и снижение продолжительности жизни реципиентов после операции являются на сегодняшний день неразрешенными проблемами.

Одним из возможных путей их решения может стать создание искусственной печени [2]. Существует несколько подходов к реализации данного подхода, например 3D-биопринтирование [3] или использование техник децеллюляризации [2] для создания соединительнотканного каркаса. Как в первом, так и во втором случае важным вопросом становится источник получения специализированных клеток.

В качестве источника получения функциональных клеток печени могут выступать *эмбриональные стволовые клетки* (ЭСК), *мезенхимные стромальные клетки* (МСК) взрослого организма, *стволовые клетки печени* (СКП)-предшественники гепатоцитов, гепатоциты, полученные методом прямого репрограммирования, *индуцированные плюрипотентные стволовые клетки* (ИПСК).

Цель настоящего обзора — проанализировать основные способы получения гепатоцитов (см. рисунок).

Получение гепатоцитов из эмбриональных стволовых клеток

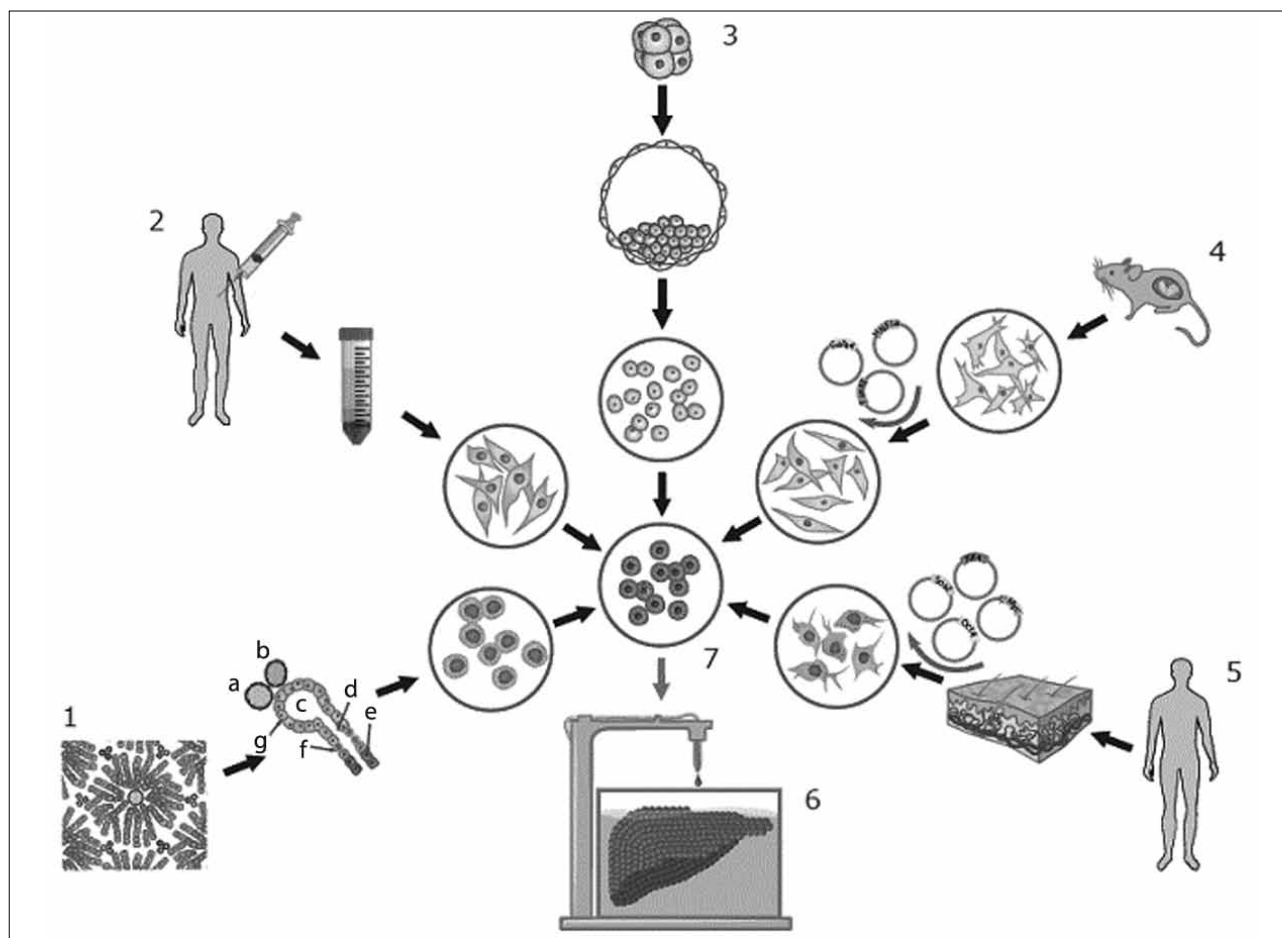
Эмбриональные стволовые клетки — плюрипотентные клетки внутренней зародышевой массы эмбриона на предимплантационной стадии: эти клетки обладают способностью к самообновлению, что позволяет им почти неограниченно делиться. ЭСК можно направленно дифференцировать в клетки трех зародышевых листков [4].

Успешную дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека и мыши в *гепатоцитоподобные клетки* (ГПК) удалось осуществить в нескольких лабораториях [5, 6]. Общая стратегия заключается в последовательном добавлении факторов роста и цитокинов, которые, согласно данным по эмбриогенезу, играют ключевую роль в дифференцировке печени [7].

Например, для формирования энтодермы из эмбриональных клеток необходимо добавление активина А [8]. Для дальнейшей дифференцировки энтодермы в гепатоцитарном направлении используют комбинацию *костных морфогенетических белков* (BMP), *фактора роста фибробластов* (FGF) и активина А. Для достижения созревания дифференцированных клеток в культуральную среду добавляют *фактор роста гепатоцитов* (HGF), *онкостатин М* (OSM) и *дексаметазон* (Dex) [5–10].

Полученные гепатоцитоподобные клетки по морфологии сходны с эпителиальными и экспрессируют характерный набор генов: альбумин, тромбин-антитромбиновый комплекс и цитохром P-450. Кроме того, им свойственны функциональные характеристики гепатоцитов: накопление гликогена, секреция альбумина, синтез мочевины, захват индоцианина зеленого, индуцибельная активность СYP.

Между тем применение ЭСК до сих пор ограничено в связи с их выраженной иммуногенностью и опасениями этического характера.



Основные способы получения гепатоцитов

1 — собственные стволовые клетки печени расположены в области каналов Геринга. а — печеночная артерия, б — портальная вена, с — внутридолевой желчный проток, d — желчный каналец, e — гепатоциты, f — стволовые клетки печени, g — холангиоциты; 2 — получение аутологических гепатоцитов из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани. Подкожную жировую клетчатку извлекают с помощью резекции или липоаспирации. Полученную жировую ткань подвергают ферментативной обработке, центрифугируют и высевают на культуральный пластик. Затем с помощью проточной цитометрии сортируют прикрепившиеся клетки и выделяют популяцию мезенхимных клеток; 3 — получение гепатоцитов из эмбриональных стволовых клеток. Выделяют клетки внутренней зародышевой массы эмбриона и культивируют их на пластике без добавления сыворотки. На первом этапе производят индукцию энтодермы с помощью активина А, на втором — дифференцировку в гепатоцитарном направлении; 4 — метод прямого репрограммирования: впервые продемонстрирован на *мышинных эмбриональных фибробластах* (МЭФ). После выделения МЭФ трансдуцируют вирусными конструкциями, несущими ключевые гены гепатоцитарной дифференцировки (GATA4, HNF1a, Foxa3). Через 10–14 дней клетки приобретают морфологические и функциональные характеристики гепатоцитов; 5 — метод прямого репрограммирования: фибробласты кожи трансдуцируют вирусными конструкциями, несущими гены плюрипотентности (Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc). Полученные плюрипотентные клетки дифференцируют в гепатоциты по аналогии с эмбриональными стволовыми клетками. Аутологичные гепатоциты (7) можно использовать для создания искусственной печени, например, с помощью биопринтинга (6)

Получение гепатоцитов из мезенхимных стромальных клеток

Мезенхимные стромальные клетки представляют собой мультипотентные клетки, которые обнаруживают в костном мозге, пупочном канатике, жировой ткани, плаценте, мышцах и др. В ряде исследований показана способность МСК взрослого человека под действием определенных факторов принимать *in vitro* фенотип гепатоцитоподобных клеток. В настоящем обзоре в качестве потенциальных источников для получения гепатоцитов будут рассмотрены *стромальные клетки*

костного мозга (СККМ) и *стромальные клетки жировой ткани* (СКЖТ).

СККМ были открыты и выделены в 1970 г. Фриденштейном [11]. На поверхности СККМ присутствуют маркеры CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, CD49e, CD51, CD54, CD59, CD71, в то же время окрашивание антителами не позволяет обнаружить молекулы CD34, CD45, CD14, CD79. СККМ принято считать стволовыми клетками взрослого организма, поскольку они могут делиться в недифференцированном состоянии и, в соответствующих условиях культивирования, приобретать фенотип адипо-, хондро-, остеоцитов

и др. [12]. Впервые возможность СККМ приобретать фенотип ГПК была продемонстрирована K.D. Lee и соавт. [13]: при культивировании СККМ в среде с добавлением FGF4 и HGF на 7-й день отмечалось повышение экспрессии HNF3b, GATA4, SK19, транстиретина и альфафетопротейна. Кроме того, данные клетки обладали рядом функциональных свойств, характерных для гепатоцитов: они секретировали мочевины, альбумин, экспрессировали мРНК P-450, запасали гликоген и захватывали липопротеины низкой плотности (ЛПНП).

Учитывая, что дифференцировка гепатоцитов *in vivo* происходит в трехмерных условиях, в ряде статей описано получение трехмерных каркасов, сконструированных для моделирования более естественных условий дифференцировки. Стоит выделить исследование, в котором для направленной дифференцировки СККМ [15] использовали трехмерные нанопризматические каркасы из полиэпсилонкарбоната. СККМ успешно адгезировали на каркасе, отмечалась их активная пролиферация. Деление клеток сопровождалось экспрессией специфических для гепатоцитарной дифференцировки мРНК (альбумин, альфафетопrotein, SK18, SK19 и цитохром P-450). Сходные результаты получены и при использовании нанопризматического другого состава [16]. Отличительной особенностью трехмерного культивирования является продолжительное непрерывное ведение культуры.

При направленной дифференцировке СККМ в гепатоциты существенную роль играют некоторые сигнальные пути. Так, например, для ранней стадии сокультивирования СККМ с гепатоцитами характерна экспрессия генов Notch-1 и Jagged-1 [16].

Talens—Visconti и соавт. [18] провели исследование, в котором сравнивали эффективность дифференцировки в гепатоцитарном направлении СККМ и СКЖТ. В результате авторам удалось показать, что оба типа клеток сопоставимы по способности к дифференцировке в ГПК. Кроме того, в данном исследовании была впервые продемонстрирована способность дифференцированных СКЖТ экспрессировать CYP2E1 и CYP3A4.

Стромальные клетки жировой ткани

СКЖТ представляют собой популяцию клеток, выделенную из жировой ткани и обладающую характеристиками стволовых клеток: способностью к самообновлению и дифференцировке в другие типы клеток.

Стромальные клетки жировой ткани являются доступным и удобным альтернативным источником получения гепатоцитов [19, 20]. Впервые возможность получения гепатоцитоподобных клеток из СКЖТ была показана M.J. Seo и соавт. [20]. Для направленной дифференцировки авторы использовали HGF, OSM и диметилсульфок-

сид (DMSO). Функциональные характеристики полученных клеток включали экспрессию мРНК альбумина, альфафетопrotein, SK18 и SK19, захват ЛПНП и синтез мочевины. Чтобы провести функциональную характеристику гепатоцитоподобных клеток *in vivo*, в исследовании создали модель печеночной недостаточности у NOD/SCID мышшей, индуцированную CCl4. В хвостовую вену вводили дифференцированные СКЖТ. По данным иммуногистохимии на 10-й день введенные клетки синтезировали альбумин и были локализованы в печени.

В другом исследовании [21] для направленной дифференцировки СКЖТ использовали CD105+ (эндоглин) клетки. Индукцию гепатоцитарной дифференцировки производили добавлением коктейля факторов *гепатоцитарной дифференцировки* (HIFC): HGF, FGF1 и FGF4. После этого культивирование продолжали в среде с добавлением онкостатина М и дексаметазона. В течение 3 нед гепатоцитарной индукции отмечали морфологические изменения СКЖТ: клетки изменили вытянутую, уплощенную веретеновидную форму на округлую эпителиальную, появились плотные межклеточные контакты, стали видимыми желчные протоки. В последующие две недели происходило созревание ГПК. За это время существенно увеличилось количество клеток, захватывающих ЛПНП. Важной оценкой функциональных свойств полученных гепатоцитоподобных клеток стала их трансплантация мышам с CCl4-индуцированным поражением печени, при этом наблюдалось улучшение ряда функций печени — снижение уровня аммиака и аланинаминотрансферазы в периферической крови.

В недавней публикации H. Okuga и соавт. [22] для индукции гепатоцитарной дифференцировки СКЖТ применяли метод флотирующих культур — культивирование клеток на чашках со слабым прикреплением, при использовании которого клетки образовывали кластеры. Функциональные характеристики полученных гепатоцитов оценивали как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, уровень мРНК ALB, AFP, G6Pase, CYP3A7 и CYP3A4 дифференцированных СКЖТ был сопоставим с уровнем мРНК первичных гепатоцитов (в отличие от прочих исследований, где значения для дифференцированных клеток были существенно ниже, чем в контроле). Полученные клетки вводили мышам с CCl4-индуцированным поражением печени. Чтобы избежать слияния клеток, дифференцированные СКЖТ пересаживали под капсулу почки. Согласно данным гистологического исследования, клетки прижились под капсулой и синтезировали альбумин (иммуногистохимия). После пересадки было отмечено существенное по сравнению с контролем снижение уровня билирубина в крови. Это снижение было обратно пропорционально уровню мРНК MRP2 (транспортер

билирубина, белок множественной устойчивости к лекарствам 2).

Стволовые клетки печени

В нормальных условиях обновление гепатоцитов не выражено, в этом случае только 0,01% клеток вступают в митоз [23, 24]. В случае повреждения клетки печени начинают активно делиться: после удаления $\frac{2}{3}$ печени у грызунов орган полностью восстанавливает свою массу через 1–2 нед. Гепатоциты обладают очень высокой способностью к самообновлению [23, 24] и могут производить более чем 80 удвоений [25, 26]. Пролиферация гепатоцитов продолжается до тех пор, пока не будет достигнута исходная масса органа [23, 24, 27, 28].

В ряде случаев регенеративного потенциала гепатоцитов недостаточно либо характер травмы ограничивает их пролиферацию. Тогда в процесс восстановления вовлекаются клетки-предшественники (овальные клетки у грызунов), расположенные в области перехода протокового эпителия в печеночные хорды (каналы Геринга): возникает так называемая протоковая реакция [29, 30].

Экспериментально индуцировать появление овальных клеток можно, если в рацион крыс при низком содержании в нем холина добавлять 2-ацетиламинофлуорин (2-AAF) [30–32], который блокирует пролиферацию гепатоцитов, после чего выполнить частичную гепатэктомию. Однако получить овальные клетки таким способом возможно только у крыс. Для осуществления данной процедуры у мышей применяют рацион с низким содержанием холина с добавлением либо этионаина, либо 3,5-диэтоксикарбонил-1,4-дигидрохоллидина [33, 34].

Клетки, аналогичные овальным клеткам грызунов, появляются у человека в случае какого-либо патологического процесса (вирусный гепатит, злокачественные новообразования печени и массивная интоксикация лекарственными препаратами). Их наличие в паренхиме здорового органа взрослого организма до сих пор остается под вопросом [35–37].

Однако в недавно опубликованной работе K. Furuyama и соавт. проследили судьбу клеток, синтезирующих фактор транскрипции Sox9 и расположенных в выстилке желчевыводящих протоков [38]. Исследователи охарактеризовали эти клетки как стволовые клетки печени и предложили отличать их от клеток эпителия по экспрессии фактора транскрипции Foxl1 и специфического маркера CD133 (проминина-1) [39–41].

Интересные данные были получены в исследовании, в ходе которого C. Dorrell и соавт. выяснили, что выделить СКП можно из здоровой печени мыши [42]. Накопленные в последнее время сведения позволяют предположить, что сходные клетки, синтезирующие ЕрСАМ (молекулу кле-

точной адгезии эпителиальных клеток), можно обнаружить в печени взрослого человека [43].

ЕрСАМ-положительные клетки успешно подерживают в культуре без утраты фенотипа в течение 30 дней. Дифференцировать их в гепатоциты можно применяя стандартный протокол культивирования в присутствии онкостатина М и DMSO. Дифференцированные клетки экспрессируют маркеры гепатоцитарной дифференцировки — глюкозо-6-фосфатазу, тиразинминотрансферазу, карбамоил-фосфатсинтетазу, триптофан-2,3-диоксигеназу [43].

Таким образом, ЕрСАМ+ клетки являются перспективным источником получения аутологичных гепатоцитов. Но возможность получения большого объема аутологичных гепатоцитов из этих клеток вызывает сомнения.

Получение гепатоцитов методом прямого репрограммирования

Одним из первых упоминаний о методе прямого репрограммирования соматических клеток можно считать работу R.L. Davis: введение кДНК одного гена (MyoD) в фибробласты мыши было достаточно для их репрограммирования в миоциты [44].

Еще один пример успешного прямого репрограммирования — эктопическая экспрессия фактора транскрипции GATA1 в моноцитах. В результате в последних отмечали экспрессию генов эритроидно-мегакариоцитарного роста [45]. Внесение одного фактора транскрипции, GATA1, было достаточно, чтобы ингибировать экспрессию моноцитарных маркеров [46, 47].

Две независимые группы исследователей предложили репрограммировать фибробласты в гепатоциты напрямую, используя факторы транскрипции гепатоцитарной дифференцировки [48, 49]. После инициирования клеток авторы оценивали изменения уровней экспрессии гепатоцитарных маркеров (альфафетопротейн, альбумин) и выбрали оптимальные для репрограммирования сочетания факторов транскрипции: Hnf4a и Foxa1/2/3 [48]; Gata4, Hnf1a, Foxa3 [50]. Кроме того, для эффективного репрограммирования требовалось инактивировать функцию p19Arf [49]. Полученные методом прямого репрограммирования клетки были названы iHep.

Общим ограничением метода репрограммирования следует считать неполноту дифференцировки полученных клеток. Была продемонстрирована следующая функциональная характеристика клеток iHep: приживление в печени мышей, гомозиготных по Fah^{-/-} (модель печеночной недостаточности в отсутствие фермента фумарилацетатгидролазы). В отличие от первичных гепатоцитов степень приживления iHep была невысокой, что сказалось на низкой выживаемости мышей после трансплантации.

Стоит отметить, что введенные клетки после приживления продолжили созревание, поскольку обнаруживалось прекращение экспрессии маркера ранней дифференцировки альфафетопротеина [49]. После удаления внесенных факторов репрограммирования направленность дифференцировки сохранилась [48, 49].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки

Введение четырех факторов транскрипции — Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc — позволяет превратить часть соматических клеток в плюрипотентные. Метод предложен в 2006 г. К. Takahashi и S. Yamanaka [50]. Недостатком метода является низкий выход плюрипотентных клеток. В недавно опубликованной работе А. Soufi и соавт. предложены способы повышения эффективности репрограммирования до 80–100% [51]. При этом авторы подчеркивают зависимость эффективности от эпигенетической модификации гистонов. Полученные плюрипотентные клетки можно направленно дифференцировать. К настоящему моменту предложено несколько способов получения гепатоцитов из ИПСК [52, 53].

Большинство протоколов направлено на этапное моделирование гепатоцитарной дифференцировки с применением активина А для индукции эндодермы и онкостатина М и DMSO для созревания гепатоцитов.

Применение ИПСК имеет серьезные ограничения. Наиболее значимое из них — неполная дифференцировка и, как следствие, возможное присутствие плюрипотентных клеток в итоговой популяции клеток. Введение указанной смеси клеток *in vivo* может привести к развитию опухолей — тератом. Детальное изучение ИПСК и разработка способов, которые помогут избавиться от недифференцированных клеток в результирующей популяции позволят решить эту проблему в будущем.

Заключение

Каждый из описанных выше подходов к получению гепатоцитов имеет ряд преимуществ и ограничений.

Многообещающим является использование стволовых клеток печени — полученные гепатоциты аутологичны, нет необходимости вносить векторные конструкции, а значит, снижен риск мутагенеза и злокачественной трансформации. Вместе с тем вызывает сомнение возможность получить специализированные клетки в требуемом объеме в связи с тем, что резидентные стволовые клетки имеют ограниченный потенциал делений.

Использование эмбриональных стволовых клеток удобно, так как дает возможность получить

достаточное количество гепатоцитов. Кроме того, поскольку эмбриональные клетки плюрипотентны, то несложно осуществить их направленную дифференцировку в клетки — производные эндодермы. Основные ограничения этого подхода — соображения этического характера и высокая иммуногенность ЭСК.

Преимуществом ИПСК является получение аутологичных клеток высокой степени дифференцировки. К числу недостатков относят следующие: эффективность процесса дифференцировки невысока, трансплантация примеси недифференцированных клеток опасна возникновением тератом — большое значение имеет отбор полностью дифференцированных клонов.

В последнее время предложены решения представленных выше проблем. Часто цена этого решения — снижение эффективности дифференцировки.

Мезенхимные клетки взрослого организма могут выступать удобной альтернативой выбранным подходам. Они аутологичны, обладают пластичностью при дифференцировке в пределах зародышевого листка, возможно их выделение в большом объеме (стромальные клетки жировой ткани). Ограничением является происхождение этих клеток: из-за существенных эпигенетических различий репрограммировать производные мезенхимы в производные эндодермы затруднительно.

Метод прямого репрограммирования, сохраняя основные преимущества индуцированных плюрипотентных клеток, позволяет обойтись без индукции плюрипотентности. Данное обстоятельство снижает риск возникновения тератокарцином *in vivo*.

Основным недостатком прямого репрограммирования можно считать ограниченное количество делений, а также высокую вероятность неполного соответствия полученных клеток оригиналу.

Таким образом, на сегодняшний момент только метод индуцированной плюрипотентности позволяет «стирать» старый фенотип клеток, что необходимо для достижения максимального подобия с целевыми клетками.

Очевидно, дальнейшее развитие репрограммирования будет связано с оптимизацией метода индуцированной плюрипотентности или будет предложен другой способ контролируемого изменения эпигенетического статуса клетки.

Необходимость получения специализированных клеток печени обусловлена потребностью заменить трансплантацию от донора аутологичной искусственной печенью. Но, возможно, это не единственный подход к лечению.

Известно, что печень обладает высоким регенеративным потенциалом [54]. Однако механизм регенерации в результате хронического повреждения остается не до конца изученным. Представления о восстановительных процессах в печени эволюционировали от гипотезы о нали-

чии какого-то одного наиболее важного участника, обеспечивающего «включение» регенерации, до множества дублирующих друг друга каскадов, действующих по мере необходимости последовательно или одновременно [55–58]. Так, например, ни в одной нокаутной модели ни репликация ДНК, ни клеточная пролиферация полностью не блокируются, т. е. 100% летальности грызунов после гепатэктомии в объеме $\frac{2}{3}$ достичь не удается. Иными словами, какого-либо ключевого гена, задействованного в процессе регенерации печени, видимо, не существует.

Важно отметить, что тип повреждения определяет будущую картину восстановления. Процесс регенерации печени после гепатэктомии можно обозначить лишь условно, поскольку он идет скорее не за счет деления, а за счет компенсаторного увеличения количества сохранных гепатоцитов. Вероятно, в процессах возмещения гепатоцитов после гепатэктомии и восстановления ткани после некроза паренхимы участвуют разные сигнальные каскады [56, 57]. Восстановление массы печени после гепатэктомии осуществляется за счет репликации существующих гепатоцитов, при этом активации клеток-предшественников не происходит [57].

Иная картина при повреждении галактозамином. В этом случае наблюдается репликация и дифференцировка внутрипеченочных клеток предшественников [58, 59]. Согласно данным М.И. Yovchev и соавт. [60], после воздействия на клетки печени D-галактозамином удалось выделить бипотентные прогениторные клетки печени, которые обладали как эпителиальными, так и мезенхимными характеристиками. Было показано, что эти клетки могут подвергаться *эпителиально-мезенхимной* (ЭМТ) и *мезенхимно-эпителиальной* (МЕТ) трансформации [60, 61].

ЭМТ — процесс утраты клетками эпителиальных и приобретения мезенхимных характеристик (меняются форма клеток и их адгезивные свойства). Обратный процесс обозначается как МЕТ. Именно последний оказывает существенное влияние на успех репрограммирования [62].

Способность к ЭМТ *in vitro* была продемонстрирована для гепатоцитов, холангиоцитов и кле-

ток Ито. Например, первичные гепатоциты печени крыс, выделенные после индукции фиброза с помощью CCl₄, обладали рядом характеристик мезенхимных клеток [63]. Поскольку гепатоциты могут подвергаться ЭМТ *in vitro*, можно предположить, что в развитии фиброза данный процесс также имеет место.

Учитывая возможную роль ЭМТ в течении фиброза, альтернативным терапевтическим подходом можно считать внесение генетических конструкций для коррекции патологического процесса *in vivo*. Так, ингибирование процесса ЭМТ, сопряженное с «включением» МЕТ, возможно с помощью плазмиды с геном HGF (фактор роста гепатоцитов). В этом случае HGF вводят в печень грызунам методами невирусной доставки [67]. Возможно использование малых интерферирующих РНК к CTGF (фактор роста коллагена) [65].

Лечение поражений печени во многом зависит от этиологии. С недавних пор печень стали все чаще рассматривать как лимфоидный орган. Для нее характерна высокая иммунологическая толерантность. Потеря толерантности может быть причиной развития аутоиммунной патологии — аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит.

Регуляторные Т-клетки (T-reg), видимо, играют главенствующую роль в поддержании баланса между иммунотолерантностью и активацией иммунной системы в печени. Показано, что T-reg (CD4⁺ CD25⁺) влияют на патогенез аутоиммунного гепатита [66], поэтому еще одним терапевтическим подходом в лечении аутоиммунного гепатита, возможно, станет модулирование функции T-reg [67].

Авторы статьи выражают благодарность Всеволоду Арсеньевичу Ткачуку и своим близким за помощь и поддержку.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 14-15-00439 «Механизмы развития функциональной гетерогенности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека».

Список литературы

1. Wertheim J.A., Petrowsky H., Saab S., Kupiec-Weglinski J.W., Busuttil R.W. Major challenges limiting liver transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2011; 11(9):1773-84.
2. Pedro M. Baptista, Mohummad M. Siddiqui, Genevieve Lozier, Sergio R. Rodriguez, Anthony Atala, Shay Soker. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* 2011; 53(2).
3. Gruene M., Pflaum M., Deiwick A., Koch L., Schlie S., Unger C., Wilhelmi M., Haverich A., Chichkov B.N. Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells. *Biofabrication* 2011; 3(1).
4. Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A., Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 2000; 18:399-404.
5. Cai J., Zhao Y., Liu Y., Ye F., Song Z., Qin H., Meng S., Chen Y., Zhou R., Song X., Guo Y., Ding M., Deng H. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 2007; 45(5):1229-39.

6. Duan Y., Catana A., Meng Y., Yamamoto N., He S., Gupta S., Gambhir S.S., Zern M.A. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells* 2007; 25(12):3058-68.
7. Snykers S., de Kock J., Rogiers V., Vanhaecke T. *In vitro* differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells* 2009; 27:577-605.
8. D'Amour K.A., Agulnick A.D., Eliazar S., Kelly O.G., Kroon E., Baetge E.E. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1534-41.
9. Kubo A., Shinozaki K., Shannon J.M., Kouskoff V., Kennedy M., Woo S., Fehling H.J., Keller G. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 2004; 131:1651-62.
10. Shiraki N., Umeda K., Sakashita N., Takeya M., Kume K., Kume S. Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes Cells* 2008; 13(7):731-46.
11. Friedenstein, A. J. P.-S. I., Petrakova K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *The Journal of Embryological Experimental Morphology* 1966; 16:381-90.
12. Liu H., Kim Y., Sharkis S., Marchionni L., Jang Y.Y. *In vivo* liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med* 2011; 3(82):1-19.
13. Lee K.D., Kuo T.K., Whang-Peng J., Chung Y.F., Lin C.T., Chou S.H., Chen J.R., Chen Y.P., Lee O.K. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40(6):1275-84.
14. Kazemnejad S., Allameh A., Soleimani M., Gharehbaghian A., Mohammadi Y., Amirizadeh N., Jazayeri M. Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(2):278-87.
15. Lin N., Lin J., Bo L., Weidong P., Chen S., Xu R. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif* 2010; 43(5):427-34.
16. Okumoto K., Saito T., Hattori E., Ito J.I., Adachi T., Takeda T., Sugahara K., Watanabe H., Saito K., Togashi H., Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes *in vitro*: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(4):691-5.
17. Taléns-Visconti R., Bonora A., Jover R., Mirabet V., Carbonell F., Castell J.V., Gomez-Lech M.J. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12(36):5834-45.
18. Aurich I., Mueller L.P., Aurich H., Luetzkendorf J., Tisljar K., Dollinger M.M., Schormann W., Walldorf J., Hengstler J.G., Fleig W.E., Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007; 56(3):405-15.
19. Banas A., Teratani T., Yamamoto Y., Tokuhara M., Takeshita F., Osaki M., Kawamata M., Kato T., Okochi H., Ochiya T. IFATS series: *in vivo* therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells (at-mscs) after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 2008; 26(10):2705-12.
20. Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C., Jung J.S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(1):258-64.
21. Koniaris L.G., McKillop I.H., Schwartz S.I., Zimmers T.A. Liver regeneration. *J Am Coll Surg* 2003; 197:634-59.
22. Okura H., Komoda H., Saga A., Kakuta-Yamamoto A., Hamada Y., Fumimoto Y., Lee C.M., Ichinose A., Sawa Y., Matsuyama A. Properties of hepatocyte-like cell clusters from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16(4):761-70.
23. Fausto N., Campbell J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120(1):117-30.
24. Riehle K.J., Dan Y.Y., Campbell J.S., Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(Suppl. 1):203-12.
25. Overturf K., al-Dhalimy M., Ou C.N., Finegold M., Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; 151(5):1273-80.
26. Michalopoulos G.K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 2010; 176(1):2-13.
27. Michalopoulos G.K. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213(2):286-300.
28. Alison M.R., Golding M., Sarraf C.E., Edwards R.J., Lalani E.N. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology* 1996; 110(1):182-90.
29. Theise N.D., Saxena R., Portmann B.C., Thung S.N., Yee H., Chiriboga L., Kumar A., Crawford J.M. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30:1425-33.
30. Tatematsu M., Ho R.H., Kaku T., Ekm J.K., Farber E. Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am J Pathol* 1984; 114(3):418-30.
31. Kofman A.V., Morgan G., Kirschenbaum A., Osbeck J., Hussain M., Swenson S., Theise N.D. Dose- and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury. *Hepatology* 2005; 41(6):1252-61.
32. Santoni-Rugiu E., Jenes P., Thorgeirsson S.S., Bisgaard H.C. Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* 2005; 113(11-12):876-902.
33. Preisegger K.H., Factor V.M., Fuchsbichler A., Stumptner C., Denk H., Thorgeirsson S.S. Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease. *Lab Invest* 1999; 79(2):103-9.
34. Wang X., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (Suppl. 1):11881-8.
35. Roskams T., Katoonizadeh A., Komuta M. Hepatic progenitor cells: an update. *Clin Liver Dis* 2010; 14(4):705-18.
36. Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; 33:738-50.
37. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39:1477-87.
38. Furuyama K., Kawaguchi Y., Akiyama H., Horiguchi M., Kodama S., Kuhara T., Hosokawa S., Elbahrawy A., Soeda T., Koizumi M., Masui T., Kawaguchi M., Takaori K., Doi R., Nishi E., Kakinoki R., Deng J.M., Behringer R.R., Nakamura T., Uemoto S. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet* 2011; 43(1):34-41.
39. Alison M., Islam S., Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* 2009; 217(2):282-98.
40. Gouw A.S.H., Clouston A.D., Theise N.D. Ductular reactions in human liver: diversity at the interface. *Hepatology* 2011; 54(5):1853-63.
41. Rountree C.B., Mishra L., Willenbring H. Stem cells in liver diseases and cancer: recent advances on the path to new therapies. *Hepatology* 2012; 55(1):298-306.
42. Dorrell C., Erker L., Schug J., Kopp J.L., Canaday P.S., Fox A.J., Smirnova O., Duncan A.W., Finegold M.J., Sander M., Kaestner K.H., Grompe M. Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev* 2011; 25(11):1193-203.

43. Yoon S.M., Gerasimidou D., Kuwahara R., Hytioglou P., Yoo J.E., Park Y.N., Theise N.D. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology* 2011; 53(3):964-73.
44. Davis R.L., Weintraub H., Lassar A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51(6):987-1000.
45. Pevny L., Simon M.C., Robertson E., Klein W.H., Tsai S.F., D'Agati V., Orkin S.H., Costantini F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991; 349:257-60.
46. Visvader J.E., Elefanty A.G., Strasser A., Adams J.M. GATA-1 but not SCL induces megakaryocytic differentiation in an early myeloid line. *EMBO J* 1992; 11(12):4557-64.
47. Kulesa H., Frampton J., Graf T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thrombocytes, and erythroblasts. *Genes Dev* 1995; 9(10):1250-62.
48. Sekiya S., Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356):390-3.
49. Huang P., He Z., Ji S., Sun H., Xiang D., Liu C., Hu Y., Wang X., Hui L. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356):386-9.
50. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4):663-76.
51. Soufi A., Donahue G., Zaret K.S. Nature Facilitators and impediment of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 2012; 151(5):994-1004.
52. Song Z., Cai J., Liu Y., Zhao D., Yong J., Duo S., Song X., Guo Y., Zhao Y., Qin H., Yin X., Wu C., Che J., Lu S., Ding M., Deng H. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 2009; 19(11):1233-42.
53. Si-Tayeb K., Noto F.K., Nagaoka M., Li J., Battle M.A., Duris C., North P.E., Dalton S., Duncan S.A. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cell. *Hepatology* 2010; 51(1):297-305.
54. Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43(2, Suppl. 1):597-608.
55. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32:19-31.
56. Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. Liver regeneration. *Science* 1997; 276:60-6.
57. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:836-847.
58. Lemire J.M., Shiojiri N., Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 1991; 139:535-52.
59. Dabeva M.D., Shafritz D.A. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 1993; 143:1606-20.
60. Yovchev M.I., Grozdanov P.N., Zhou H., Racheria H., Guha C., Daveva M.D. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 2008; 47:636-47.
61. Pagan R., Martin I., Liobera M., Vilario S. Epithelial-mesenchymal transition of cultured rat neonatal hepatocytes is differentially regulated in response to epidermal growth factor and dimethyl sulfoxide. *Hepatology* 1997; 25(3):598-606.
62. Bedzhov I., Alotaibi H., Basilicata M.F., Ahlborn K., Liszewska E., Brabletz T., Stemmler M.P. Adhesion, but not a specific cadherin code, is indispensable for ES cell and induced pluripotency. *Stem Cell Res* 2013; 11(3):1250-63.
63. Valdes F., Alvarez A.M., Locascio A., Vega S., Herrera B., Fernandez M., et al. The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes. *Mol Cancer Res* 2002; 1(1):68-78.
64. Zhang S.H., Wen K.M., Wu W., Li W.Y., Zhao J.N. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013; 37(6):602-7.
65. Yang D., Gao Y.H., Tan K.B., Zuo Z.X., Yang W.X., Hua X., Li P.J., Zhang Y., Wang G. Inhibition of hepatic fibrosis with artificial microRNA using ultrasound and cationic liposome-bearing microbubbles. *Gene Ther* 2013; 20(12):1140-8.
66. Longhi M.S., Ma Y., Mieli-Vergani G., Vergani D. Regulatory T cells in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2012; 57(4):932-3.
67. Longhi M.S., Hussain M.J., Kwok W.W., Mieli-Vergani G., Ma Y., Vergani D. Autoantigen-specific regulatory T cells, a potential tool for immune-tolerance reconstitution in type-2 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2011; 53(2):536-47.