

УДК 576

Использование клеточных технологий в лечении патологий печени

О. С. Петракова^{1,2*}, Е. С. Черниогло¹, В. В. Терских¹, Е. Н. Калистратова², А. В. Васильев^{1,2}¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26² Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: PetrakovaOl@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.04.2012 г.

РЕФЕРАТ Клеточная терапия находит все большее применение в современной клинической практике. Уже проходят клинические испытания (фазы II и III) клеточных продуктов, предназначенных для восстановления таких тканей, как кожа, роговица, гортань и др. Однако получение дифференцированных клеток, характерных для большинства органов, представляет собой более сложную задачу. Предметом лабораторных исследований остается получение функционирующих нейронов, кардиомиоцитов, клеток печени, поджелудочной железы и т.д. Применение клеточной терапии при патологиях печени – сложный многостадийный процесс, требующий детального понимания особенностей дифференцировки и регенерации гепатоцитов. В представленном обзоре проанализировано современное состояние клеточной терапии патологий печени, описано использование различных типов клеток, рассмотрены основные молекулярно-генетические механизмы дифференцировки гепатоцитов, а также проблемы и перспективы развития данного метода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дифференцировка, клеточная терапия, печень, трансплантация клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ES – Embryonic Stem cells (эмбриональные стволовые клетки); iPS – Induced Pluripotent Stem cells (клетки с индуцированной плюрипотентностью); SP – Side Population cells (SP-клетки); ГСК – гемопоэтические стволовые клетки; МСК – мезенхимные стволовые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Терапия патологий печени представляет собой актуальную проблему современной медицины. По данным статистики, в Российской Федерации число больных с различными хроническими и острыми заболеваниями печени превышает 200000 человек в год. Несмотря на достижения современной медицины, использование стандартных терапевтических приемов при хронических и острых патологиях печени оказывается недостаточным, и смертность сохраняется на уровне 80–90%.

Основным способом лечения тяжелых заболеваний печени все еще остается пересадка органа или его части. В связи с недостатком донорского материала разрабатываются методики заместительной клеточной терапии заболеваний печени. Большое количество данных, накопленных за последние годы, показывает, что клеточную терапию можно рассматривать как одно из приоритетных направлений в современной биомедицине и биотехнологии.

Клеточная терапия имеет ряд существенных преимуществ:

1. Трансплантация клеток, в отличие от сложных хирургических операций, технически гораздо проще, менее инвазивна, не несет рисков отторжения и других осложнений.

2. Донорский материал для клеточной терапии более доступен, может быть заготовлен заранее и подвергнут длительному криохраниению.

3. Клеточная трансплантация не только компенсирует дисфункцию органа и способствует восстановлению функционирования собственных клеток больного, но и препятствует возникновению фиброза поврежденных тканей, восполняя утраченную клеточную нишу.

4. В случае аутологичных трансплантаций клетки не элиминируются иммунной системой и могут оказывать пролонгированный (либо постоянный) эффект. В случае аллогенных трансплантаций при наследственных патологиях донорский материал может компенсировать генетический дефект реципиента благодаря синтезу нормальных белков донорскими клетками.

Эффективность замещения дефектов тканей, способность стимулировать собственную регенерацию органа, отсутствие опасностей возникновения фиброзов зависят, главным образом, от используемых клеток. В ряде исследований показано, что при определенных условиях культивирования клетки различного типа способны экспрессировать специфичные для гепатоцитов маркеры. Однако истинная

функциональность тех или иных клеток остается недоказанной. Возникает вопрос: каким критериям должна удовлетворять трансплантируемая клетка, чтобы эффективно восполнять дисфункцию поврежденной печени? Прежде всего, это способность к выполнению синтетической и детоксикационной функций. Клетки должны быть способны экспрессировать специфичные для гепатоцитов белки, такие, как цитохромы P450, альбумин, а также к запасанию гликогена, синтезу мочевины, связыванию билирубина и др. Очевидно, что поиск оптимального источника клеток и получение функционально активных типов клеток в достаточном для трансплантации количестве остается одной из основных задач клеточной биологии. Используемые клетки должны быть легко доступными и способными к быстрой пролиферации *in vitro*, обладать способностью к длительному криохранению, быть иммуносовместимыми и способными к дифференцировке в функционально активные гепатоцитоподобные клетки.

Успех репарации зависит также от участия факторов роста, цитокинов и хемокинов, вовлеченных в комплексную систему сигналов, координирующих поведение клеток. Именно поэтому клетки, выделяющие подходящий набор факторов роста, могут быть предложены для стимуляции и коррекции репарации тех или иных тканевых дефектов. С другой стороны, используемые клетки могут внести значительный (во многих случаях – решающий) вклад в процесс репарации, благодаря трансдифференцировке в целевые дифференцированные и функциональные клетки ткани.

МЕХАНИЗМЫ КЛЕТочНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ

Печень обладает высокой скоростью самообновления и значительными способностями к восстановлению даже после резекции большей ее части. Эти свойства обусловлены наличием сложной системы регенерации (рис. 1), основными компонентами которой являются: способность дифференцированных гепатоцитов к пролиферации и продукции зрелых гепатоцитов, а также к трансдифференцировке в холангиоциты [1]; регенерация из тканевого резерва стволовых клеток; репарация кроветворными клетками посредством слияния миелоидных клеток с поврежденными гепатоцитами и/или дифференцировкой мезенхимных стволовых клеток костного мозга в гепатоцитоподобные клетки [2, 3].

Гепатоциты представляют собой дифференцированные полиплоидные клетки, однако их способность к пролиферации и поддержанию своей популяции приближает их к стволовым клеткам. Во взрослой печени гепатоциты находятся в основном в состоянии покоя (фаза G0 клеточного цикла), однако в слу-



Рис. 1. Гипотетическая схема механизмов клеточной регенерации постнатальной печени [2, 3].

чае возникновения необходимости в регенерации гепатоциты начинают дедифференцироваться, пролиферировать и воспроизводить дифференцированные гепатоциты. Более того, после повреждения клеток желчных протоков в печени крысы гепатоциты проявляли некоторую фенотипическую пластичность и были способны к трансдифференцировке в холангиоциты [1]. В период постнатального роста популяция гепатоцитов увеличивается без участия стволовых клеток [4]. В эмбриональном и раннем постнатальном периоде гепатоциты делятся путем обычного митоза, затем начинается процесс митотической полиплоидизации, в результате которого не только увеличивается число гепатоцитов, но и возрастает их плоидность. В первом цикле после репликации ДНК цитотомии не происходит, в результате чего возникает двуядерный гепатоцит. В следующем митотическом цикле после удвоения ДНК деление ядер происходит синхронно, хромосомы объединяются в одну митотическую пластинку, и возникают две одноядерные тетраплоидные клетки. Далее происходит чередование этих двух циклов с постепенно возрастающей плоидностью гепатоцитов [5]. Для обеспечения постнатального роста печени изначально диплоидные гепатоциты претерпевают всего пять-шесть полиплоидизирующих митозов. Однако при необходимости быстрой регенерации (например, после токсических или инфекционных воздействий и др.) митозы без цитокинеза временно исключают-

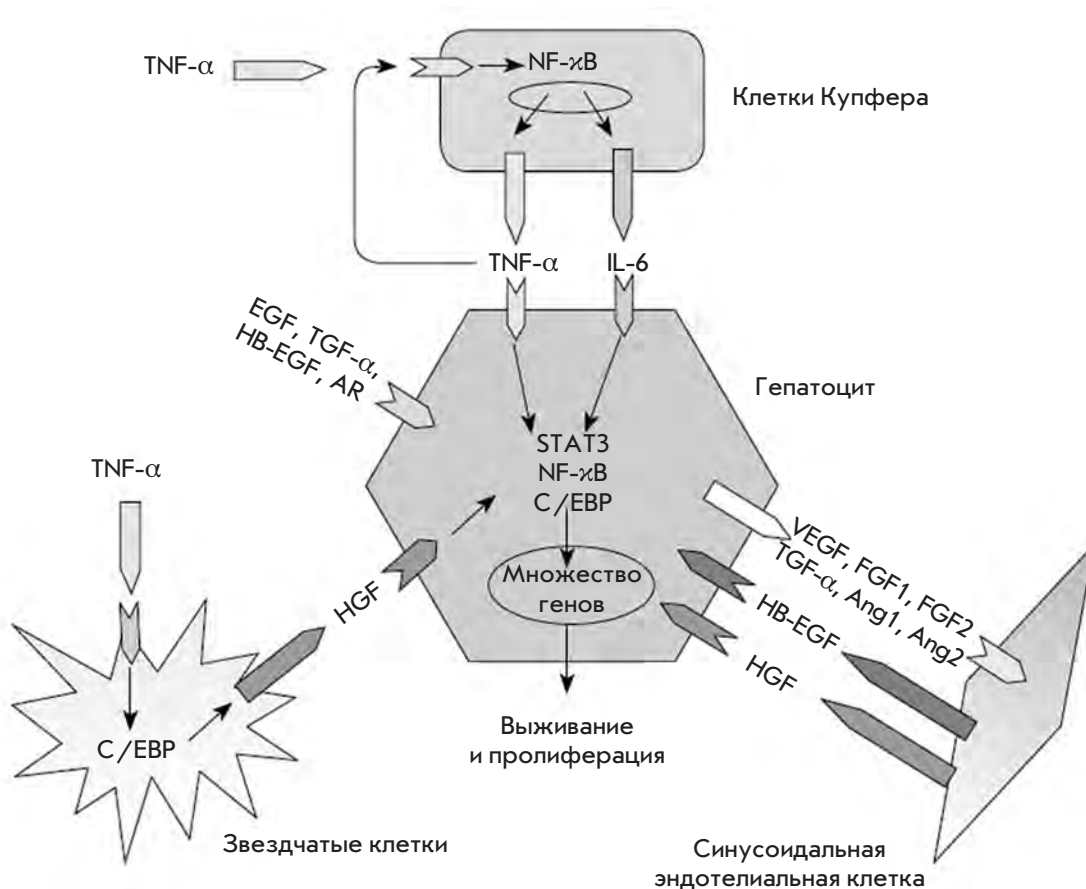


Рис. 2. Молекулярные механизмы поддержания популяции гепатоцитов и инициации их пролиферации [7].

ся, и деление клеток происходит по стандартному пути. Это предохраняет клетки печени от излишне высокой полиплоидизации. Основными факторами, регулирующими пролиферацию гепатоцитов при репарации, являются интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухолей α (TNF-α), секретируемые клетками Купфера, фактор роста гепатоцитов (HGF), секретируемый звездчатыми клетками. Эти факторы инициируют переход гепатоцитов из фазы G0 в G1. Трансформирующий фактор роста β (TGF-β) подавляет вступление гепатоцитов в митоз после завершения регенерации. Для репликации и поддержания жизнедеятельности гепатоцитов важны также HGF, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), факторы роста фибробластов 1 и 2 (FGF1, FGF2), секретируемые эндотелиальными клетками [6, 7]. Основные молекулярные механизмы, обеспечивающие пролиферацию гепатоцитов, схематически изображены на рис. 2.

Стволовые клетки печени также играют значительную роль в процессе регенерации, если популяция гепатоцитов не способна восстановить поврежденную печень (при резекции критической

части органа, обширных токсических, инфекционных и др. повреждениях). В постнатальной печени существует ряд стволовых клеток, иерархические взаимоотношения которых до сих пор обсуждаются [8]. Основными предшественниками гепатоцитов и холангиоцитов являются овальные клетки. Обычно этим термином обозначают популяцию клеток небольшого размера (около 10 мкм), которые обладают бипотентным потенциалом дифференцировки и имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Овальные клетки происходят, предположительно, из каналов Геринга, которые, по мнению некоторых авторов, полностью состоят из стволовых клеток [9]. Овальные клетки экспрессируют альбумин, альфа-фетопротейн, цитокератин 19, специфический поверхностный маркер OV6 (A6 у мыши), эмбриональный маркер Delta-like/Pref-1, характерный также для гепатобластов [10]. Помимо этого овальные клетки продуцируют маркеры стволовых клеток: c-Kit, Sca-1, нестин, CD90 (Thy-1). По всей видимости, популяция данных клеток является гетерогенной и может содержать клетки разного происхождения. Часть клеток несет маркеры CD45, c-Kit, CD90, аль-

бумин. Популяции этих клеток, по-видимому, состоят из кроветворных стволовых клеток, которые проникают в печень из циркулирующей крови [11]. В целом популяция истинно овальных клеток, экспрессирующая маркеры OV6 и цитокератин 19, – это популяция коммитированных, временно пролиферирующих стволовых клеток печени. Предполагается, что во взрослой печени имеется компартмент менее дифференцированных клеток – изначальных стволовых клеток постнатальной печени. В одной из работ [12] получили популяцию стволовых клеток, экспрессирующих маркер адгезии эпителиальных клеток ЕpСAM. В эмбриональной печени эти клетки, названные гепатическими стволовыми клетками ЕpСAM⁺ (hH_pSCs), являются предшественниками гепатобластов, в постнатальной печени они локализуются в каналах Геринга. Гепатические стволовые клетки экспрессируют также NCAM, c-Kit, CD133/1, CD44H, цитокератин 19 и слабо позитивны по альбумину. Гепатические стволовые клетки не экспрессируют альфа-фетопротейн, CD45, маркеры зрелых гепатоцитов (цитохромы P450, молекулы внутриклеточной адгезии ICAM-1, трансферрин). При индукции дифференцировки *in vitro* клетки приобретали способность к синтезу альфа-фетопротейна и ICAM-1. При трансплантации гепатических клеток мышам NOD/SCID начинался синтез белков, характерных для зрелых гепатоцитов (альбумин, трансферрин). Авторы предположили, что данные клетки являются стволовыми клетками эмбриональной и постнатальной печени и, возможно, могут быть предшественниками овальных клеток [12]. В целом, иерархия стволовых клеток печени показана на рис. 3.

Стволовые клетки костного мозга также могут вносить вклад в регенерацию печени. Как известно, в эмбриональном и раннем постнатальном периоде печень является кроветворным органом. Во взрослом состоянии часть популяции овальных клеток представлена кроветворными клетками, позитивными по CD34, CD45, CD133, и при некоторых патологических процессах печень может стать органом экстрамедуллярного гемопоэза. Показано, что если летально облученным самкам мышей пересадить костный мозг от самцов, то через 6 мес. после трансплантации 1–2% гепатоцитов несли метку Y-хромосомы. Эти гепатоциты экспрессировали альбумин и могли быть как диплоидными, так и полипloidными [13]. При исследовании биопсийного материала печени шести женщин, которым трансплантировали кроветворные клетки из периферической крови доноров-мужчин, Y-хромосому в гепатоцитах выявляли с частотой от 0 до 7% [14]. Предполагали, что стволовые кроветворные клетки обладают способностью к дифференцировке в гепатоциты, однако в ряде работ было пока-

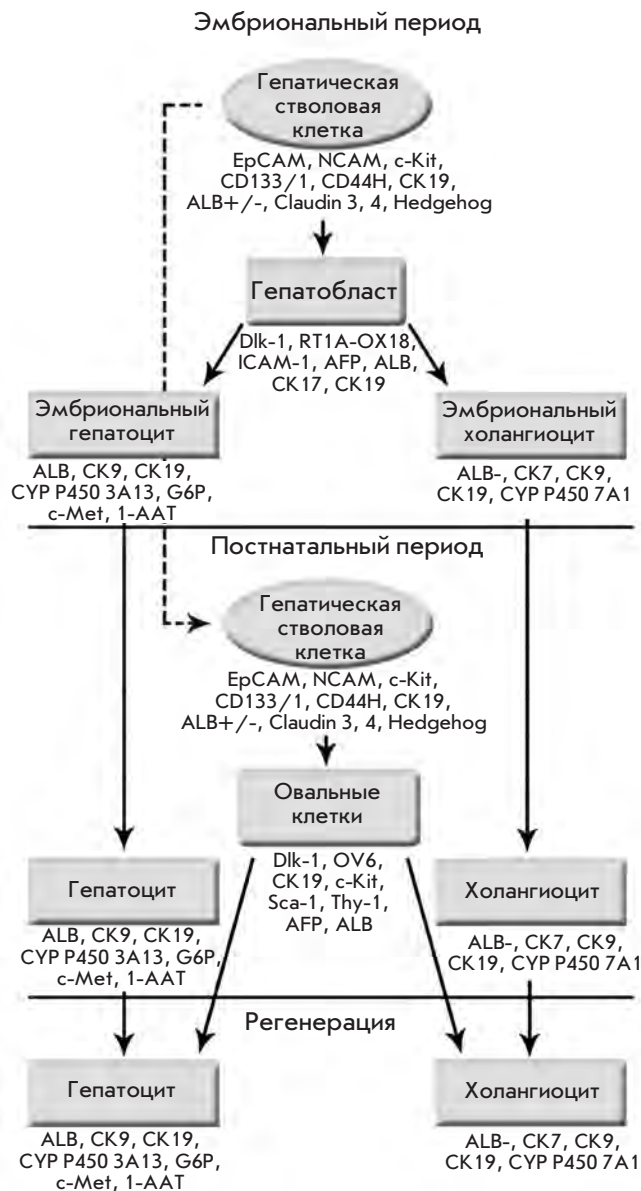


Рис. 3. Гипотетическая схема иерархии стволовых клеток печени [2, 115].

зано, что кроветворные клетки способны сливаться с гепатоцитами реципиента, предупреждая их гибель и стимулируя регенерацию [15, 16]. С гепатоцитами сливаются также клетки миелоцитарной линии, гранулоциты и моноциты-макрофаги [16]. Относительный вклад трансдифференцировки и клеточного слияния в процесс репарации печени стволовыми кроветворными клетками на данный момент обсуждается. Вероятно, в организме осуществляются оба эти процесса.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОК, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОНОРСКОЙ ПЕЧЕНИ

Трансплантация гепатоцитов может стать альтернативой применяемой в современной клинической практике трансплантации печени. Как известно, трансплантация печени может включать замену либо всего органа на донорский, либо его части. Однако недостаток донорских органов, плохая приживаемость и значительные осложнения, связанные с отторжением либо с недостаточной функцией пересаженной печени, существенно ограничивают применяемость данного метода. Кроме того, все еще не разработана достаточно эффективная методика длительного хранения печени как целого органа. В связи с этим трансплантация выделенных из донорской печени гепатоцитов становится перспективным направлением клеточной терапии патологий печени. К преимуществам этого метода относятся возможность использования как только что выделенных клеток, так и клеток после длительного криохранения, донорские клетки могут компенсировать патологии, обусловленные генетическими нарушениями, а также служить векторами для генной терапии. Трансплантация гепатоцитов гораздо менее инвазивная процедура, она практически не несет рисков отторжения. Пересаженные гепатоциты заполняют клеточные ниши, пустующие в результате массовой гибели собственных клеток больного (например, при остром токсическом или инфекционном воздействии), что значительно снижает риск образования фиброза. Кроме того, при трансплантации гепатоцитов нет необходимости удалять печень, поэтому со временем возможна регенерация собственного органа, например, при острой печеночной недостаточности.

Методика трансплантации гепатоцитов включает ряд стандартных процедур, разработанных по требованиям GMP (Good Manufactured Practice) [17]. Источником гепатоцитов может быть донорская печень, которая не подходит для трансплантации из-за жировой дистрофии, занимающей более 40–50% органа, затяжной ишемии, механического повреждения, разрывов капсулы, несоответствия группы крови, повреждения кровеносных сосудов и желчных протоков [18–20]. В редких случаях для трансплантации может использоваться печень плода [21]. Источником клеток может быть печень от доноров с остановкой сердца, печень, пораженная атеросклерозом или фиброзом. Стандартная процедура выделения гепатоцитов включает перфузию печени, ферментативную обработку для разрушения межклеточного вещества, промывку полученной клеточной суспензии. Жизнеспособность выделенных гепатоцитов обычно составляет около 70–90%, а выход – $(1–17) \times 10^6$ клеток/г ткани (для клинического применения рекоменду-

ется использовать гепатоциты с жизнеспособностью не менее 60%). Полученные клетки охлаждают до $+4^\circ\text{C}$ и как можно скорее ресуспендируют в растворе для инфузии для непосредственного введения либо в растворе для заморозки в случае последующего криохранения [22, 23]. Метаболические характеристики гепатоцитов проверяют по активности цитохромов P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C9 и CYP2E1) и способности к синтезу мочевины [24].

Трансплантацию гепатоцитов, как правило, проводят через портальную вену, селезеночную вену или внутрибрюшинную трубку. При введении в брюшную полость, поджелудочную железу либо непосредственно в паренхиму печени наблюдается худшая выживаемость гепатоцитов. Наилучшим способом трансплантации считается введение через портальную вену, однако при осуществлении данной процедуры необходимо контролировать давление в портальной вене во избежание ее блокировки [25, 26]. Введение гепатоцитов в селезенку чаще применяется при хронических заболеваниях печени, когда фиброз препятствует приживлению вводимых клеток. Количество клеток, необходимое для трансплантации, зависит от вида патологии и составляет около 5–10% от теоретической массы печени ($(2–4) \times 10^8$ клеток/кг веса тела), однако, за одну процедуру вводят не более 1% от количества гепатоцитов пациента. Печень взрослого человека содержит примерно 2.8×10^{11} гепатоцитов, таким образом, за одну трансплантацию рекомендуется вводить $(2–4) \times 10^9$ донорских клеток [27]. По некоторым наблюдениям, в случае хронических заболеваний количество клеток может быть меньше, а для терапии наследственных патологий, напротив, необходимо увеличить число трансплантируемых клеток. Устойчивый терапевтический эффект достигается в течение 4–8 нед. после трансплантации и поддерживается 6–9 мес.

На данный момент трансплантация донорских гепатоцитов проведена более чем 80 больным в 13 медицинских центрах [18, 19, 28–30]. Из них около 30 (в том числе дети) имели наследственные нарушения метаболизма в печени, такие, как дефицит орнитинтранскарбамилазы либо гликогеноз. Трансплантация гепатоцитов привела к значительному улучшению состояния больных с наследственными нарушениями. Показано также, что трансплантация гепатоцитов может стабилизировать состояние детей, ожидающих донорскую печень [29, 31]. В ряде случаев, например при болезни Криглера–Найара, количество клеток, необходимое для устойчивого клинического эффекта, составляет до 12% от массы печени пациента, поэтому в связи с ограниченным количеством вводимых клеток требуется проводить повторные трансплантации. Трансплантация гепа-

тоцитов при нарушении обмена билирубина может успешно заменять пересадку всей печени на протяжении более 11 мес. [32–34]. При гликогенозе наблюдается восстановление нормального уровня глюкозы как у детей, так и у взрослых [19, 35].

Основной недостаток данного метода – дефицит донорского материала. К приоритетным задачам направления относятся – улучшение качества выделяемых гепатоцитов, оптимизация методик криохранения и повышение эффективности «заселения» печени. Не разработаны также оптимальные процедуры иммуносупрессии: как известно, пересаженные донорские гепатоциты элиминируются из печени через 6–9 мес. Одним из подходов может быть выбор оптимальных популяций стволовых клеток печени, способных к пролиферации и значительному увеличению своего количества *in vitro* с последующей дифференцировкой, а также создание соответствующих клеточных линий [36]. С другой стороны, остается актуальным поиск оптимального альтернативного источника клеток (в том числе и аутологичных) для терапии патологий печени.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА

Необходимость в поиске альтернативных источников клеточного материала для терапии патологий печени обусловлена, прежде всего, дефицитом донорских органов, малой доступностью и недостаточным количеством пригодных для трансплантации гепатоцитов. Кроме того, клетки из альтернативных источников могут быть использованы в аутологичном варианте. Показано, что к трансдифференцировке в гепатоцитарном направлении способны в той или иной степени различные клеточные типы, однако, получить полноценно функционально активные клетки печени так и не удалось [37]. Наиболее хорошо изучены на данный момент, если говорить о проведении как экспериментальных, так и клини-

ческих испытаний, эмбриональные стволовые клетки (Embryonic Stem cells – ES) и клетки с индуцированной плюрипотентностью (Induced Pluripotent Stem cells – iPS) [38–41], стволовые и прогениторные клетки печени [12, 42]. Как клетки, способные к дифференцировке в гепатоциты, изучают мезенхимные клетки костного мозга [43, 44] и жировой ткани [45–47], клетки амниотической жидкости [48–50] и др. Однако во всех этих работах наблюдали лишь частичную трансдифференцировку и не было достигнуто функционально активное состояние, присущее гепатоцитам.

Плюрипотентные клетки ES и iPS

Интерес к эмбриональным стволовым клеткам обусловлен прежде всего их широким дифференцировочным потенциалом: выделенные из внутренней клеточной массы бластоцисты, эмбриональные стволовые клетки сохраняют свойства плюрипотентности при длительном культивировании *in vitro* и могут дать начало клеткам всех трех зародышевых листков. На данный момент огромное количество работ посвящено дифференцировке ES-клеток в разные типы клеток взрослого организма. В то же время применение ES-клеток на практике может быть сопряжено с рядом нерешенных проблем, таких, как риски образования тератом, этические проблемы разрушения эмбрионов, длительные и трудоемкие дифференцировочные протоколы и т.д. Существуют данные о низкой иммуногенности ES-клеток человека, что также может представлять интерес. Однако не установлено сохранение низкой иммуногенности данными клетками при индукции дифференцировки в том или ином направлении [51].

Протоколы гепатоцитарной дифференцировки ES-клеток включают ряд основных этапов, имитирующих процессы, происходящие при развитии печени [52–54]. Основные стадии этого процесса представлены в *таблице*.

Основные этапы дифференцировки ES-клеток в гепатоцитарном направлении [55, 56]

Стадия дифференцировки	Длительность, дни	Основные дифференцировочные маркеры	Гепатоцитарные маркеры, характерные для данной стадии
Индукция образования энтодермы	3–4	Активин А	Sox17, Hnf-3β
Коммитирование клеток в гепатоцитарном направлении	4–7	BMP2, FGF4	Hnf-3β, альфа-фетопротеин
Пролиферация гепатобластоподобных клеток	5–10	HGF, KGF	Альбумин, альфа-фетопротеин, G6P, ТАТ
Созревание гепатоцитоподобных клеток	8–15	Онкостатин М, дексаметазон, N2, B27	Альбумин, G6P, ТАТ, РЕРСК, TDO, СУР Р450 и др.

Для повышения эффективности дифференцировки используют различные деметилирующие агенты. Идея применения деметилирующих агентов основана на их способности активировать экспрессию генов посредством снятия метилирования с ДНК: при снятии метилирования с промоторных зон активируется экспрессия генов, что значительно расширяет дифференцировочный потенциал клеток. Однако, поскольку деметилирование ДНК происходит случайным образом, для коммитирования клеток в определенном направлении деметилирующие агенты применяют в сочетании с факторами роста и цитокинами [32]. При использовании вальпроевой кислоты, ингибирующей гистон-деацетилазу, удалось повысить эффективность дифференцировки ES-клеток мыши [57]. Таким образом получили гепатоцитоподобные клетки, способные к синтезу альбумина, цитохромов P450, запасанию гликогена, в то время как при дифференцировке без вальпроевой кислоты получили структуры, напоминающие клетки желчных протоков. Однако в этом случае при инъекции дифференцированных в гепатоцитарном направлении ES-клеток мышам Balb/c nude не удалось избежать образования тератом [57]. Следует отметить, что при инъекции мышам с иммунодефицитом ES-клеток человека, прошедших дифференцировку в гепатоцитарном направлении, не наблюдали образования тератом, тогда как инъекции недифференцированных ES-клеток приводили к появлению тератом [55, 58].

Другой источник гепатоцитоподобных клеток – iPS-клетки. iPS-клетки – это индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, получаемые искусственно из соматических клеток взрослого организма, в которые вводят определенные гены и факторы, важные для достижения состояния плюрипотентности [59]. Как и ES-клетки, iPS-клетки способны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, однако, в отличие от ES-клеток, существует возможность получать аутологичные iPS-клетки для заместительной клеточной терапии, а также iPS-клетки от больных с различными наследственными заболеваниями для моделирования патологического процесса *in vitro* и тестирования лекарственных средств [60, 61].

В целом, протоколы гепатоцитарной дифференцировки iPS- и ES-клеток сходны. В результате *in vitro*-дифференцировки iPS-клеток человека в гепатоцитарном направлении при помощи цитокинов и аденовирусных векторов, экспрессирующих ген *Hes*, который играет важную роль в развитии гепатоцитов, получены гепатоцитоподобные клетки, экспрессирующие маркеры эндодермы *Hnf-3 β* и *Sox17*, а также альбумин и цитохромы P450 [60]. Показано также [54], что на 7-й день дифференцировки iPS-

клеток человека с использованием стандартного протокола примерно 60% клеток начинали продуцировать альбумин и альфа-фетопроtein; к 20-му дню клетки приобретали способность к синтезу мочевины (примерно 15% от уровня синтеза гепатоцитами) и запасанию гликогена [54], но доля гепатоцитоподобных клеток была невысокой (около 10%). Однако отсутствие онкогенных потенциалов при использовании данных клеток не было показано.

Соматические клетки

Стволовые и прогениторные клетки печени. Мультипотентные постнатальные и прогениторные клетки печени могут служить альтернативным источником для клеточной терапии. Они эффективно пролиферируют *in vitro* (и/или *in vivo*), так что можно получить значительное их количество из небольшого биоптата. Эти клетки гораздо дольше сохраняют жизнеспособность и лучше выдерживают криохраниение, чем зрелые гепатоциты, а также менее иммуногенны. Стволовые клетки печени способны как к дифференцировке в гепатоциты *in vivo*, так и к поддержанию своей популяции, что может пролонгировать терапевтический эффект от их введения. Стволовые клетки уже коммитированы в гепатоцитарном направлении и не требуют длительных дифференцировочных процедур. Основную сложность для широкого использования этих клеток представляет недостаток донорского материала.

На сегодняшний день основное внимание уделяется методам выделения стволовых клеток печени и поиску оптимальных клеточных популяций, обладающих наилучшим регенеративным потенциалом. При помощи проточной флуориметрии выделены гепатические клетки, несущие поверхностный маркер адгезии эпителиальных клеток EpcAM. Доля этих клеток у доноров всех возрастов составляет 0.5–2.5% клеток паренхимы печени. Они могут проходить более 150 пассажей *in vitro*, являются позитивными по цитокератинам 8, 18 и 19, CD133/1, CD44H, слабо позитивными по альбумину. Гепатические клетки не экспрессируют альфа-фетопроtein, маркеры взрослых гепатоцитов (цитохромы P450), молекулы внутриклеточной адгезии ICAM-1, маркеры гемопоэтических (CD45) и мезенхимных клеток (десмин, VEGFR α). При индукции дифференцировки эти клетки приобретают способность к синтезу альфа-фетопроteина и ICAM-1. При трансплантации гепатических EpcAM⁺-клеток мышам NOD/SCID наблюдали формирование печеночных структур из клеток человека и синтез белков, характерных для зрелых гепатоцитов. Таким образом, предположили, что данные клетки являются стволовыми клетками постна-

тальной печени и могут использоваться для заместительной клеточной терапии [12]. В другой работе методом иммуномагнитного сортирования была отобрана положительная по Thy-1 (CD90) популяция клеток из печени взрослого донора. По всей видимости, эта популяция была гетерогенной и содержала клетки, позитивные по маркерам прогениторных клеток: гемопоэтических – CD34, стволовых – CD117, СК19, протоковых – СК14, овальных клеток – OV6. Популяция Thy-1-позитивных клеток обладала значительно более высоким дифференцировочным потенциалом, чем Thy-1-негативная, и могла дифференцироваться как в гепатоциты, так и в протоковые клетки. О функциональной активности данных клеток свидетельствует экспрессия HerPar 1 и альбумина человека после инъекции этих клеток мышам с иммунодефицитом [42]. В качестве еще одного подхода можно рассматривать выделение так называемых SP-клеток (Side Population cells – SP) методом проточной флуориметрии. Показано, что многие типы стволовых клеток содержат АТФ-зависимые ABC-транспортеры, ответственные за выброс из клетки различных цитостатиков и лекарственных средств, активность которых приводит к формированию феномена множественной лекарственной устойчивости. Одно из веществ, выбрасываемых из стволовых клеток, – краситель Hoechst 33342, использование которого позволяет отсортировать на проточном цитофлуориметре не окрашенные мелкие клетки, получившие название SP-клеток. Из печени человека получены CD45- и Hoechst 33342-негативные SP-клетки, способные к формированию колоний при культивировании *in vitro*. Через 2–3 нед. культивирования в колониях появлялись крупные клетки, содержащие много гранул, внутриклеточный липофусцин и часто двойное ядро. Культивируемые клетки были позитивными по маркерам гепатоцитов человека: HerPar, цитокератинам 8 и 18, цитохромам P450 и альбумину. Таким образом, SP-клетки, выделенные из печени взрослого донора, способны к дифференцировке в гепатоцитарном направлении *in vitro* [62].

ГСК и МСК костного мозга, пуповинной крови и жировой ткани. Интерес к стволовым клеткам костного мозга как потенциальному источнику гепатоцитов возник еще в ранних работах Петерсена [63]. После трансплантации костного мозга облученным мышам в их печени наблюдали клетки донора, которые в дальнейшем дифференцировались в гепатоцитоподобные клетки. Эти эксперименты подвергли сомнению существовавшее ранее предположение о возможности получения гепатоцитов исключительно из энтодермальных источников. Оказалось,

что у женщин, после трансплантации им мужского костного мозга, находили гепатоциты с мужским карิโอотипом [13]. Неизвестно, возникают ли гепатоциты из клеток костного мозга посредством трансдифференцировки, слияния или горизонтального переноса генов, это по-прежнему остается предметом дискуссий [64].

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) можно легко отсортировать по маркерам CD31 и CD34 и выделить из костного мозга, пуповинной крови или в некоторых случаях из периферической крови. Показано, что при поражении печени пересаженные человеческие ГСК приобретают способность производить альбуминсинтезирующие клетки в печени мышей и репарировать дефекты печени как посредством слияния [15], так и без слияния с клетками хозяина [65]. Напротив, у мезенхимных стволовых клеток (МСК) костного мозга не обнаружено феномена клеточного слияния [66]. МСК костного мозга, пуповинной крови и жировой ткани обладают иммуносупрессирующими и противовоспалительными свойствами, легко культивируются *in vitro*, а также синтезируют ряд цитокинов и факторов роста, способных стимулировать репарацию собственных клеток больного. Благодаря этим свойствам многие рассматривают МСК как удобный источник клеток для заместительной клеточной терапии [67–69]. Показано, что состояние мышей с острой печеночной недостаточностью, вызванной четыреххлористым углеродом, улучшается после введения МСК костного мозга. В опытной группе наблюдалась значительно более высокая выживаемость гепатоцитов по сравнению с контрольной группой, несмотря на то, что приживления МСК на момент наблюдения не происходило. Положительный эффект от введения МСК относят на счет их стимулирующего и противовоспалительного действия [70]. Интактные МСК из пуповинной крови человека вводили также в печень эмбрионов овцы, и через 56–70 дней после трансплантации зафиксировали экспрессию альбумина человека, доля человеческих клеток в печени ягнят составила при этом от 2.6 до 12.5% [71].

В ряде работ проведена дифференцировка МСК в гепатоцитарном направлении. При обработке МСК жировой ткани человека HGF, онкостатином М и дексаметазоном получена экспрессия альфа-фетопротейна и альбумина [45]. В другой работе при использовании гепатоцитарной ростовой среды и деметилирующего агента (20 мкМ 5-азацидин) МСК жировой ткани крысы дифференцировались в клетки, экспрессирующие альбумин, альфа-фетопротейн, цитохромы P450 1A1, цитокератины 18 и 19 [46]. Эти клетки также синтезировали мочевины. При дифференцировке МСК костного

мозга человека под действием FGF4, HGF и дексаметазона не удалось индуцировать гепатоцитарную дифференцировку *in vitro*. Однако при добавлении деметилирующего агента трихостатина А (1 мкМ) – ингибитора гистоновой деацетилазы, были получены эпителиоподобные клетки, экспрессирующие цитокератин 18. Клетки также синтезировали альбумин, характеризовались повышенной активностью цитохромов P450 и секрецией мочевины [43].

На данный момент произведено несколько трансплантаций клеток костного мозга с целью терапии патологий печени [72]. Некоторые из них включали использование гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) для мобилизации собственных стволовых клеток костного мозга и стимуляции регенерации печени без необходимости выделять костный мозг [73, 74]. Трансплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга 27 пациентам с хроническими заболеваниями печени либо циррозом привела к увеличению секреции альбумина и снижению уровня билирубина [75–77].

Несмотря на некоторые успехи в применении стволовых клеток костного мозга при заболеваниях печени, механизм их действия еще предстоит выяснить. По-прежнему не решены проблемы безопасности, в частности, связанные с возможным развитием фиброзов при участии МСК, что может усугубить течение заболеваний [78]. Необходимо прояснить как влияют эти клетки на пораженную печень и механизмы их воздействия, прежде чем будут предприняты попытки их клинического использования.

Клетки амниотической жидкости. Амниотическая жидкость содержит гетерогенную популяцию клеток фетального происхождения, в которой присутствуют стволовые клетки, позитивные по мезенхимным маркерам (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105), нейральным маркерам (нестин, β -3-тубулин, NEFH), а также по некоторым из маркеров плюрипотентности (Oct4, Nanog). Эти клетки интересны прежде всего своим широким дифференцировочным потенциалом: они дифференцируются *in vitro* в остеогенном, адипогенном, нейральном, эндотелиальном, гепатоцитарном и др. направлениях [50, 79–82]. Недавно показали, что одновременно с мезенхимными маркерами стволовые клетки амниотической жидкости экспрессируют и эпителиальные маркеры: кератин 19, кератин 18 и p63 [83]. Это опровергло ранее существующее представление о стволовых клетках амниотической жидкости как о МСК. И хотя статус этих клеток активно обсуждается, можно предположить, что способность к образованию фиброзных поражений при использовании клеток амниотической жидкости будет ниже, чем в случае клеток истинно мезенхимного проис-

хождения. К недостаткам данного источника клеток относятся их малая доступность, ограниченное количество донорского материала и необходимость производить забор на определенной стадии беременности, что не всегда возможно.

Была показана возможность дифференцировки клеток амниотической жидкости в гепатоцитарном направлении. Клетки культивировали на чашках, покрытых матригелем или коллагеном, в присутствии HGF, FGF4, инсулина, онкостатина М и дексаметазона. На 7-й день дифференцировки наблюдалось изменение морфологии клеток: они приобретали полигональную форму без отростков. На 45-й день выявлен синтез альбумина, альфа-фетопротеина, Hnf-4 α , с-Met рецептора HGF. Уровень синтезируемой мочевины возрастал с 50 нг/ч на клетку в контрольной культуре до 1.21×10^3 нг/ч на клетку в дифференцированной культуре [49]. Сравнили способность к дифференцировке МСК костного мозга человека и стволовых клеток амниотической жидкости. Клетки культивировали на чашках, покрытых коллагеном типа 1, в присутствии дифференцировочных агентов: 0–2 день – FGF4, 3–5 день – HGF, 6–18 день – HGF + инсулин-трансферрин-селенит + дексаметазон и трихостатин А (ингибитор гистоновых деацетилаз). Начиная с седьмого дня в обеих культурах наблюдались морфологические изменения: форма клеток становилась округлой, полигональной. В дальнейшем форма клеток амниотической жидкости гораздо быстрее и стабильнее изменялась на эпителиоподобную. Количественный ПЦР-анализ показал, что в обеих культурах клеток экспрессия гепатоцитарных маркеров, таких, как альфа-фетопротеин, альбумин, цитокератин 18, Hnf-1 α , C/EBP α , CYP1A1, изначально была незначительной либо отсутствовала. На начальном этапе дифференцировки экспрессия данных маркеров практически не изменялась, однако на стадии созревания гепатоцитов экспрессия гепатоцитарных маркеров значительно возросла, причем на 14-й день дифференцировки экспрессия всех маркеров в культуре клеток амниотической жидкости была значительно выше, чем в культуре МСК костного мозга. На стадии созревания гепатоцитов экспрессия всех маркеров, за исключением альфа-фетопротеина, увеличивалась. Экспрессия альфа-фетопротеина достигала максимального значения к 14-му дню дифференцировки, затем начала снижаться, в то время как максимум экспрессии альбумина наблюдался к 28-му дню дифференцировки. Экспрессия альбумина в клетках амниотической жидкости была примерно в 1.3 раза выше, чем в МСК костного мозга. Иммунофенотипический анализ показал, что в культуре клеток амниотической жидкости доля клеток, позитивных по гепатоцитарным марке-

рам, достоверно выше, чем в культуре МСК. Эти клетки также обладали способностью к синтезу мочевины и запасанию гликогена [50].

Все эти данные говорят о перспективности использования стволовых клеток амниотической жидкости в клеточной терапии, однако необходимо лучше понимать их дифференцировочный статус и способность к образованию фиброзов.

Клетки энтодермального происхождения. На сегодняшний день активно изучается возможность трансдифференцировки клеток в пределах одного зародышевого листка. Плюсы данного подхода понятны: близкие по гистогенетическому происхождению клетки проявляют значительно большую фенотипическую пластичность в пределах одного зародышевого листка; они быстрее и глубже трансдифференцируются в другие типы клеток данного зародышевого листка, не требуя длительных и трудоемких дифференцировочных протоколов.

Накоплено достаточно много сведений о трансдифференцировке клеток энтодермы *in vitro* и *in vivo*. Протоковые клетки поджелудочной железы, пересаженные в печень крысы, дифференцируются в гепатоциты [84]. Овальные клетки также могут дифференцироваться в эндокринные и экзокринные клетки поджелудочной железы [85]. В культуре *in vitro* тоже может происходить дифференцировка островковых клеток в гепатоциты при увеличении плотности посева [86]. Показано, что при воздействии дексаметазона ацинарные клетки поджелудочной железы могут дифференцироваться в гепатоциты [87]. Таким образом, клетки энтодермы проявляют способность к взаимной трансдифференцировке и могут возмещать функциональную недостаточность другой ткани в пределах энтодермального зародышевого листка. Однако как для клеток печени, так и для клеток поджелудочной железы существует проблема дефицита донорского материала. Именно поэтому актуальным остается поиск оптимального источника клеток энтодермы для заместительной клеточной терапии.

Один из возможных источников клеток энтодермы – клетки слюнной железы. Слюнная железа закладывается как зачаток эктодермы, затем в нее мигрируют клетки энтодермального происхождения [88]. Будучи функциональным аналогом экзокринных клеток поджелудочной железы, клетки слюнной железы могут служить удобным источником энтодермальных клеток для заместительной терапии при патологиях печени и поджелудочной железы. На данный момент накоплено достаточно сведений о культивировании *in vitro* клеток слюнной железы, выделенных от человека и животных. Культивируемые *in vitro* клетки слюнной железы представ-

ляют собой активно пролиферирующую культуру, способную проходить значительное число пассажей [89]. Клетки слюнной железы человека и животных (мышь, крыса, свинья) позитивны по цитокератинам 18 и 19 и зачастую по альфа-фетопротеину [90, 91]. При определенных условиях культивирования клетки слюнной железы приобретают способность к синтезу альбумина [92]. Однако этот источник клеточного материала остается относительно малоизученным. Детальное выяснение механизмов дифференцировки клеток слюнной железы в гепатоцитарном направлении, а также их вклад в репарацию патологий печени еще предстоит выяснить.

Методика прямой дифференцировки – использование генетических конструкций для перепрограммирования соматических клеток

Методика прямой дифференцировки клеток основана на использовании генетических конструкций для перепрограммирования различных типов клеток сразу в целевые, минуя возвращение в плюрипотентное состояние. Одно из основных преимуществ данного подхода перед использованием плюрипотентных ES- и iPS-клеток – отсутствие рисков образования тератом. Этот относительно новый подход, требующий детального понимания молекулярно-генетических механизмов той или иной клеточной дифференцировки, активно развивается в последнее время.

Выполнен ряд работ, указывающих на возможность прямого перепрограммирования клеток различного происхождения [93]. Например, функционирующие β -клетки можно получать из экзокринных клеток поджелудочной железы мыши. Опытным путем с помощью реэкспрессии ключевых регуляторных генов *in vivo* найдена комбинация минимального количества генов (*Ngn3*, *Pdx1* и *Mafa*), с помощью которых можно перепрограммировать дифференцированные клетки взрослого организма в клетки, проявляющие свойства эндокринных клеток поджелудочной железы. Такие клетки неотличимы от эндогенных β -клеток по размеру, форме и ультраструктуре, они экспрессируют гены, необходимые для функционирования β -клеток, и могут уменьшать гипергликемию, активно секретируя инсулин и способствуя перестройке локальных кровеносных сосудов [94].

Что касается клеток печени, то работ, посвященных получению функционально активных гепатоцитоподобных клеток методом прямой дифференцировки, пока немного. Это связано в основном со сложностью и многостадийностью гепатоцитарной дифференцировки, что затрудняет поиск ключевых дифференцировочных генов. Однако первые успехи в этой области уже получены. При индукции гепато-

цитарной дифференцировки фибробластов из хвоста мыши использовали лентивирусную трансфекцию 14 генов, играющих ключевую роль в развитии печени [95]. После анализа опубликованных данных были отобраны две комбинации генов, индуцирующих эпителиальный фенотип фибробластов и экспрессию гепатоцитарных маркеров. Первая комбинация состояла из шести генов: *Foxa2*, *Foxa3*, *Hnf-1 α* , *Hnf-4 α* , *Hnf-6* и *Gata4*; а вторая – из восьми, включая *Foxa1* и *Hlf* [96, 97]. При исключении из комбинации *Hnf-6* наблюдали значительное увеличение числа эпителиоподобных колоний, а исключение *Hnf-4 α* еще более способствовало образованию эпителиоподобных колоний. Оставшиеся гены также разделили на комбинации: *Gata4*, *Hnf-1 α* , *Foxa3* и *Gata4*, *Hnf-1 α* , *Foxa2*, причем первая комбинация показала лучший результат. Интересно, что при использовании комбинации *Gata4*, *Hnf-1 α* и *Foxa3* наблюдали появление экспрессии генов эндогенных факторов *Foxa2* и *Foxa3*, а исключение из этой комбинации любого из генов блокировало гепатоцитарное перепрограммирование. Полученные индуцированные гепатоцитоподобные клетки были названы iHep. Данные клетки были позитивными по E-кадгерину и белку плотных контактов Tjp1. На 14-й день 23% эпителиоподобных клеток были позитивными по альбумину. iHep были также позитивными по альфа-фетопротейну, цитокератинам 18 и 19, *Hnf-4 α* , цитохромам P450. Маркеры панкреатической дифференцировки замечены не были, iHep не проявляли свойств клеток иных типов, кроме гепатоцитарных. iHep также были способны к запасанию гликогена и секреции альбумина в среду. При внутриселезеночной инъекции клеток iHep мышам *Fah^{-/-}*, у которых нарушен метаболизм тирозина и которые могут жить только, если корм содержит 2-(2-нитро-4-трифторметилбензол)-1,3-циклогександион, наблюдалась значительная репопуляция клеток печени (от 5 до 80%). Эти мыши могли жить, не получая 2-(2-нитро-4-трифторметилбензол)-1,3-циклогександион, тогда как при инъекции интактных фибробластов наблюдалась гибель мышей и отсутствовала репопуляция печени [95]. Все эти данные свидетельствуют об эффективности прямой дифференцировки фибробластов мыши в гепатоцитоподобные клетки с помощью регуляторных факторов *Gata4*, *Hnf-1 α* и *Foxa3*. Тем не менее подобный подход требует дальнейшего изучения, так как при использовании репрограммированных фибробластов возникает повышенный риск образования фиброза, который может быть инициирован примесью не репрограммированных фибробластов в культуре. При использовании клеток с минимальными способностями к образованию фиброза (например, эпите-

лиальных) оптимальный набор регуляторных генов может быть другим.

Еще один подход к стимуляции регенерации печени – использование генетических векторов, несущих ключевые гены, которые усиливают пролиферацию клеток печени (рис. 2), уменьшают апоптоз либо восполняют генетические дефекты печени [7]. Однако этот подход требует детального изучения, в том числе создания оптимальных и безопасных векторов для переноса генов, разработку методик доставки векторов в печень и т.д.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕПАТОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Дефинитивная энтодерма дает начало большинству органов пищеварительного тракта, включая печень [53]. До активации органоспецифических генов экспрессируются несколько ранних маркеров энтодермы, в том числе *Otx2*, *Hesx1*, *Hesx*, *Cdx2*. Затем в первичной полоске клетки мезоэнтодермы начинают продуцировать ряд факторов, таких, как GSC, *Hnf-3 β* , *Cxcr4*, *Sox17a/b*, *Brachyury*, E-кадгерин, *VEGFR2*, VE-кадгерин, *PDGFR α* , *Gata4*, *Gata6*, которые определяют дифференцировку клеток дефинитивной энтодермы и мезодермальных предшественников. Печень возникает из латеральной энтодермы развивающегося вентрального отдела передней кишки (примерно на стадии E8.5 развития мыши и около третьей недели беременности человека) [97]. Ростовые факторы, выделяемые сердечной мезодермой и мезенхимой поперечной перегородки (*FGF*, *BMP*) стимулируют дальнейшую дифференцировку подлежащей энтодермы в гепатоцитарном направлении. В энтодерме экспрессия генов семейства *Hnf-3* (*Foxa*) обеспечивает запуск гепатоцитарной дифференцировки, индуцированной сигналами от *FGF* [98]. Однако экспрессия *Wnt* и *FGF4* мезодермой задних отделов кишки на данном этапе ингибирует гепатоцитарную дифференцировку [99]. На поздних стадиях (при формировании гепатоцитов и холангиоцитов) *Wnt*, напротив, стимулирует пролиферацию и дифференцировку. Критическую роль для фетальных клеток печени играет HGF, необходимый для дальнейшего роста и пролиферации клеток печеночного зачатка. Подобная регуляция осуществляется через с-Met-рецептор к HGF. HGF препятствует коммитированию гепатобластов в холангиоциты через блокировку Notch. Показано, что эндотелиальные клетки стимулируют развитие печени, в том числе благодаря секреции HGF [100]. Ген *Tbx3* способствует развитию гепатобластов через супрессию p19^{ARF} [101]. Когда гепатобласты формируются, их форма меняется с кубической на вытянутую, затем происходит образование псевдомногослойного эпителия.

Этот процесс регулируется геном *Hex*. Затем базальная мембрана разрушается, и клетки пролиферируют в окружающей строме. Эти более поздние морфологические изменения контролируются генами *Prox1*, *Hnf-6/OC-1* и *OC-2*. *Hnf-6* и *OC-2* регулируют E-кадгерин, тромбоспондин-4 и *Spp1*, которые контролируют адгезию и миграцию клеток во многих типах тканей [102]. *Notch* определяет переключение развития гепатобластов с гепатоцитарного направления в сторону формирования желчных протоков [103]. Для созревания гепатоцитов также важен гемопоэз. После того как печеночный зачаток выступит из кишечной трубки, в него мигрируют гемопоэтические клетки, которые секретируют онкостатин М и IL-6 [104]. Онкостатин М стимулирует экспрессию гепатоцитарных дифференцировочных маркеров, индуцирует морфологические изменения клеток печеночного зачатка и способствует активации синтетических и детоксикационных свойств печени, регулирует клеточную адгезию. Глюкокортикоиды также способствуют созреванию печени, поддерживают пролиферацию и функционирование дифференцированных гепатоцитов. Показано, что физиологические концентрации дексаметазона (синтетического глюкокортикоида) в фетальной печени супрессируют продукцию альфа-фетопротеина и инициируют синтез альбумина [104], способствуют запасанию гликогена [105]. Основные этапы развития клеток печени отображены на рис. 4.

Специфический профиль транскрипции, характерный для гепатоцитов, поддерживается рядом ге-

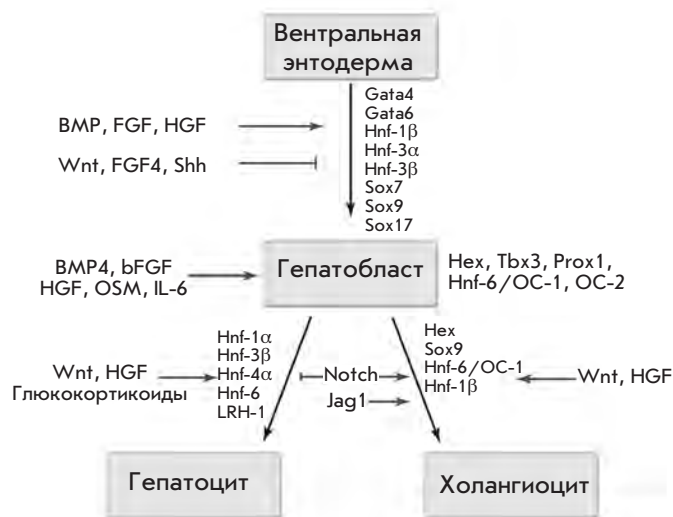


Рис. 4. Основные этапы развития клеток печени [97, 116].

нов, в том числе семейством *Hnf*, кодирующим ядерные факторы гепатоцитов. В число ключевых генов этого семейства входят *Hnf-1* – член семейства ROU гомеобоксных генов; *Hnf-3* – ДНК-связывающий домен; *Hnf-4* – член суперсемейства рецепторов стероидных гормонов; и *Hnf-6*.

Варианты *Hnf-1α* и *Hnf-1β* (или *vHnf-1*) фактора *Hnf-1* взаимодействуют с ДНК в виде гомо- или гетеродимеров. Эти белки имеют одинаковые ДНК-связывающие домены, но активируют транскрипцию разных генов. *Hnf-1β* экспрессируется в энтодерме передней кишки (на стадии E5–E6 у мыши), *Hnf-1α* активируется позже (на стадии E11 у мыши), в период формирования паренхимы печени. Экспрессия *Hnf-1α* в эмбриональной печени ниже, чем *Hnf-1β*, однако, после рождения уровень экспрессии *Hnf-1α* становится выше. *Hnf-1* активирует более 1000 специфических для печени генов, содержащих в промоторной области сайт связывания этого фактора, при этом *Hnf-1* негативно регулирует свою собственную экспрессию. *Hnf-4* является позитивным регулятором *Hnf-1*, способным активировать экспрессию этого гена, но экспрессию целевых генов эти факторы регулируют независимо друг от друга [106].

Подсемейство *Hnf-3* состоит из трех белков: *Hnf-3α*, *Hnf-3β* и *Hnf-3γ* (они же *Foxa1*, *Foxa2* и *Foxa3* соответственно), которые связываются с ДНК в виде мономеров. Члены данного подсемейства имеют строгую гомологию области ДНК-связывающих доменов, они способны узнавать одни и те же нуклеотидные последовательности. *Hnf-3α* и *Hnf-3β* регулируют экспрессию генов в гепатоцитах, желудочном, кишечном и бронхиальном эпителии. *Hnf-3γ* также играет важную роль в экспрессии генов в клетках печени, кишечника, семенников. *Hnf-3β* появляется на 7-й день эмбрионального развития мыши в первичной полоске, *Hnf-3α* имеет схожую динамику экспрессии, но его концентрация ниже. *Hnf-3γ* начинает экспрессироваться на стадии E12 развития мыши.

Hnf-4 включает три основных члена: *Hnf-4α*, *Hnf-4β*, *Hnf-4γ* и множество переходных вариантов. *Hnf-4* принадлежит к суперсемейству ядерных рецепторов стероидных гормонов, он связывается с ДНК в виде гомодимера. *Hnf-4β* обладает меньшей ДНК-связывающей активностью, чем *Hnf-4α* и является более слабым трансактиватором. *Hnf-4α* экспрессируется в печени, почках, поджелудочной железе. *Hnf-4β* экспрессируется не только в этих органах, но и в желудке, кишечнике, легких, яичниках и семенниках, в то время как *Hnf-4γ* – в почках, поджелудочной железе, семенниках, но не в печени. *Hnf-4* является ключевым регулятором тканеспецифической экспрессии генов в висцеральной энтодерме, необходимым для нормальной экспрессии секре-

тируемых факторов, таких, как альфа-фетопротеин, аполипопротеины, ретинолсвязывающий белок и др. Некоторые авторы считают, что Hnf-4α играет ведущую роль, запуская каскад реакций и поддерживая специфическую для гепатоцитов транскрипцию. Hnf-4α связывается примерно с 12% генов, экспрессируемых в гепатоцитах, в то время как другие транскрипционные факторы связываются не более чем с 2.5% промоторных регионов [106]. Hnf-4α как один из наиболее ранних маркеров энтодермы появляется в мышинных эмбрионах на 5-й день развития. До стадии E9 экспрессия Hnf-4α ограничена экстраэмбриональной висцеральной энтодермой, затем он появляется в печени и кишечнике. Во взрослом организме Hnf-4α экспрессируется в печени, почках, кишечнике и поджелудочной железе.

Hnf-6 принадлежит к семейству One Cut факторов транскрипции (известных также как ОС-1). Hnf-6 связывается с CREB-связывающим белком (СВР), экспрессируется в печени, поджелудочной железе и нервной системе. Hnf-6 выявляется на 9-й день эмбрионального развития, в печени эмбрионов мыши исчезает между 12.5 и 15-м днем, а после 15-го дня появляется снова. Во взрослом организме Hnf-6 экспрессируется в печени, поджелудочной железе, головном мозге, яичках. Интересно, что Hnf-3β и Hnf-6 потенциально регулируют экспрессию одних и тех же генов, они критичны для функционирования гепатоцитов. Hnf-6 узнает область -138...-126 промотора *Hnf-3β*, он необходим для активации этого промотора. При этом Hnf-3β способен связываться с промотором Hnf-6 и репрессировать его [107]. Hnf-6 способствует дифференцировке гепатобластов в клетки желчных

протоков, тогда как Hnf-3β играет ключевую роль в дифференцировке и функционировании гепатоцитов.

Экспрессию ядерных гепатоцитарных факторов и других маркеров висцеральной энтодермы в эмбриональном развитии индуцирует Gata6. Факторы семейства TGF-β также способны индуцировать экспрессию этих маркеров. Гипотетические регуляторные пути, обеспечивающие поддержание специфического для печени паттерна экспрессии генов, представлены на рис. 5 [108].

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Одна из основных проблем при трансплантации донорских гепатоцитов – плохая их приживаемость и элиминация иммунной системой в течение нескольких месяцев после трансплантации. Показано, что важную роль в выживании и приживаемости вводимых клеток играет межклеточный матрикс. В работе по исследованию влияния межклеточного матрикса на приживаемость донорских гепатоцитов в печень крысы перед трансплантацией донорских клеток интрапортально вводили коллаген или фибронектин. Через 4 дня после трансплантации доля прижившихся гепатоцитов в печени повышалась более чем в 10 раз в случае, если предварительно был введен коллаген или фибронектин [109]. Совместное введение гепатоцитов и факторов роста (TGF-α) также может увеличить количество прижившихся клеток [110]. Известно, что приживаемость клеток зависит от наличия соответствующей «клеточной ниши». В опытах на макаках использовали временную блокировку портальной вены, что вызвало ишемию и частичную гибель клеток печени. При последующей трансплантации донорских гепатоцитов их доля в печени реципиента составила около 10% от ее массы [111]. Однако целесообразность клинического применения данного подхода остается под вопросом.

Для увеличения времени жизни трансплантированных гепатоцитов в организме пациента подбирают доноров, совместимых по антигенам АВО и HLA. В настоящее время иммуносупрессию часто обеспечивают при помощи моноклональных антител к рецептору IL-6 в сочетании с небольшими дозами фармакологических препаратов такролимус и сиролимус [112]. Важное значение для элиминации введенных гепатоцитов имеют натуральные киллеры (НК). Показано, что блокирование НК-клеток в печени при помощи специфической или локальной иммуносупрессии улучшает приживаемость и пролиферацию трансплантированных гепатоцитов [113]. Кроме того, использование стволовых клеток печени может иметь более продолжительный эффект за счет того, что стволовые клетки зачастую не элиминируются

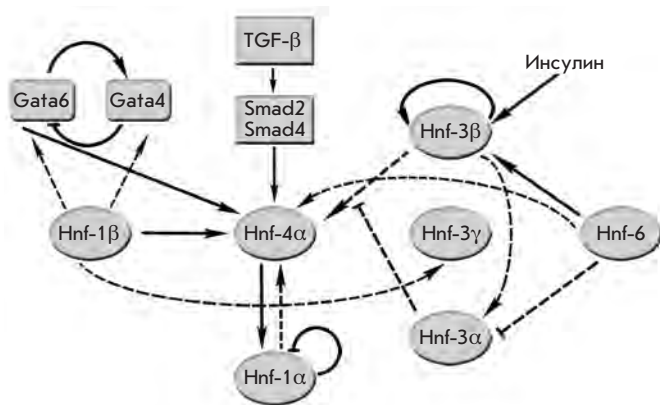


Рис. 5. Транскрипционная иерархия гепатоцитарных факторов роста. Сплошными стрелками показаны универсальные регуляторные пути, пунктирными – регуляция на определенных стадиях развития [108].

иммунной системой реципиента, могут долгое время поддерживать свою популяцию и давать популяцию дифференцированных клеток.

Актуальным также остается улучшение качества выделяемых гепатоцитов. Использование раствора Celsior® для хранения и транспортировки биоптатов печени предотвращает деградацию и гибель гепатоцитов [22]. Перфузия донорской ткани N-ацетилцистеином также позволила повысить качество выделяемых клеток [114].

Ключевыми для современной клеточной терапии остаются вопросы биологической безопасности и эффективности. При использовании плюрипотентных клеток (ES и iPS) необходимо иметь надежный протокол удаления недифференцированных клеток из трансплантата, поскольку плюрипотентные ES- и iPS-клетки способны к образованию тератом. Проблемой остается и оценка риска образования фиброза при использовании тех или иных типов клеток. При изучении способности МСК костного мозга восполнять клетки печени при остром и хроническом повреждении определяли долю донорских МСК и степень их гепатоцитарной дифференцировки. Через 4 нед. после трансплантации вклад донорских клеток оказался невысоким (около 0.08% от общего количества клеток печени при остром повреждении и около 3–4% при хроническом повреждении), при этом лишь 5–10% из них имели гепатоцитарный фенотип. Значительная доля донорских клеток (около 35%) имела миофибробластный фенотип, многие из них располагались в зонах фиброзных септ [78]. Становится очевидным, что необходимо количественно оценивать эффективность гепатоцитарной дифференцировки при использовании тех или иных типов клеток и выяснять риск образования ими фиброза. Одна из основных задач клеточной биологии – поиск доступного источника клеток с низким профиброгенным потенциалом и высокой

способностью к гепатоцитарной дифференцировке. Кроме того, необходимо, чтобы эти клетки можно было использовать как в аллогенном, так и в аутологичном вариантах.

Перспективным представляется использование прямой дифференцировки клеток, однако, для разработки стандартных протоколов необходимо хорошо понимать молекулярные механизмы процессов, происходящих при развитии и дифференцировке гепатоцитов. Определение основных «дифференцировочных» генов, оптимальных для трансдифференцировки клеток из различных гистогенетических источников, является одной из ключевых задач данного направления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на данный момент активно разрабатывается ряд принципиально различных подходов к терапии патологий печени с использованием клеточных технологий. Проводится *in vitro* и *in vivo* тестирование разных типов клеток, подбираются оптимальные процедуры дифференцировки. Несмотря на некоторые обнадеживающие результаты, полученные на лабораторных животных, еще не найден достаточно безопасный и эффективный подход. Дефицит донорской печени и донорских гепатоцитов заставляет искать альтернативные источники клеточного материала, однако, на данный момент клетки, способные выполнять в достаточной степени функции гепатоцитов, все еще не получены. Предстоит провести поиск оптимального типа клеток и разработку процедур дифференцировки, удовлетворяющих критериям биологической безопасности и функциональной эффективности. ●

Работа выполнена при поддержке РФФИ
(проект № 11-04-12061-офи-М-2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michalopoulos G.K., Barua L., Bowen W.C. // *Hepatology*. 2005. V. 41. № 3. P. 535–544.
2. Урываева И.В. Стволовые клетки в регенерации печени. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. М.: Медицина, 2009. Т. 2. 456 с.
3. Conigliaro A., Brenner D.A., Kisseleva T. // *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. 2010. V. 3. P. 39–47.
4. Dabeva M.D., Shafritz D.A. // *Semin. Liver Dis.* 2003. V. 23. № 4. P. 349–362.
5. Урываева И.В. // *Цитология*. 1979. Т. 21. С. 1427–1437.
6. Roskams T. // *J. Hepatol.* 2006. V. 45. № 1. P. 1–4.
7. Hussein M.A. // *World J. Gastroenterol.* 2010. V. 28. № 16. P. 4019–4030.
8. Michalopoulos G.K. // *J. Cell Physiol.* 2007. V. 213. № 2. P. 286–300.
9. Thorgeirsson S.S., Factor V.M., Grisham J.W. // *Handbook of Stem Cells*. 2004. V. 2. P. 497–512.
10. Jensen C.H., Jauho E.I., Santoni-Rugiu E., Holmskov U., Teisner B., Tygstrup N., Bisgaard H.C. // *Am. J. Pathol.* 2004. V. 164. № 4. P. 1347–1359.
11. Corcelle V., Stieger B., Gjinovci A., Wollheim C.B., Gauthier B.R. // *Exp. Cell Res.* 2006. V. 10. № 312. P. 2826–2836.
12. Schmelzer E., Zhang L., Bruce A., Wauthier E., Ludlow J., Yao H., Moss N., Melhem A., McClelland R., Turner W., et al. // *J. Exp. Med.* 2007. V. 204. № 8. P. 1973–1987.
13. Theise N.D., Badve S., Saxena R., Henegariu O., Sell S., Crawford J.M., Krause D.S. // *Hepatology*. 2000. V. 31. № 1. P. 235–240.
14. Korbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruifrok A.C., Rondon G., Albitar M., Champlin R.E., Estrov Z. // *N. Engl. J. Med.* 2002. V. 7. № 346. P. 738–746.

15. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., Grompe M. // *Nature*. 2003. V. 24. № 422. P. 897–901.
16. Camargo F.D., Finegold M., Goodell M.A. // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 113. № 9. P. 1266–1270.
17. Pareja E., Martinez A., Cortes M., Bonora A., Moya A., Sanjuan F., Gomez-Lechon M.J., Mira J. // *Cirugia Espanola*. 2010. V. 87. № 3. P. 139–147.
18. Bilir B.M., Guinette D., Karrer F., Kumpe D.A., Krysl J., Stephens J., McGavran L., Ostrowska A., Durham J. // *Liver Transpl.* 2000. V. 6. P. 32–40.
19. Muraca M., Gerunda G., Neri D., Vilei M.T., Granato A., Feltracco P., Meroni M., Giron G., Burlina A.B. // *Lancet*. 2002. V. 359. P. 317–318.
20. Alexandrova K., Griesel C., Barthold M., Heuft H.G., Ott M., Winkler M. // *Cell Transplant.* 2005. V. 14. P. 845–853.
21. Habibullah C.M., Syed I.H., Qamar A., Taher-Uz Z. // *Transplantation*. 1994. V. 58. P. 951.
22. Donato M.T., Serralta A., Jimenez N., Perez G., Castell J.V., Mir J. // *Drug Metab. Dispos.* 2005. V. 33. P. 108–114.
23. Gomez-Lechon M.J., Lahoz A., Jimenez N., Bonora A., Castell J.V., Donato M.T. // *Cell Transplantation*. 2008. V. 17. P. 887–897.
24. Donato M.T., Lahoz A., Montero S., Bonora A., Pareja E., Mir J. // *Cell Transplantation*. 2008. V. 17. P. 1211–1219.
25. Baccarini U., Adani G.L., Sanna A., Avellini C., Sainz-Barriga M., Lorenzin D. // *Transpl. Int.* 2005. V. 18. P. 750–754.
26. Sokal E.M. // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006. V. 29. P. 426–430.
27. Selden C., Hodgson H. // *Transpl. Immunol.* 2004. V. 12. P. 273–288.
28. Horslen S.P., McCowan T.C., Goertzen T.C., Warkentin P.I., Cai H.B., Strom S.C., Fox I.L. // *Pediatrics*. 2003. V. 111. P. 1262–1267.
29. Dhawan A., Mitry R.R., Hughes R.D., Lehec S., Terry C., Bansal S., Arya R., Wade J.J., Verma A., Heaton N.D., et al. // *Transplantation*. 2004. V. 78. P. 1812–1814.
30. Horslen S.P., Fox I.J. // *Transplantation*. 2004. V. 77. P. 1481–1486.
31. Mitry R.R., Dhawan A., Hughes R.D., Bansal S., Lehec S., Terry C., Heaton N.D., Karani J.B., Mieli-Vergani G., Rela M. // *Transplantation*. 2004. V. 77. P. 1614–1616.
32. Khan A.A., Parveen N., Mahaboob V.S., Rajendraprasad A., Ravindrakrishna H.R., Venkateswarlu J., Rao P., Pande G., Narusu M.L., Khaja M.N., et al. // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. P. 1148–1150.
33. Lysy P.A., Najimi M., Stephenne X., Bourgeois A., Smets F., Sokal E.M. // *World J. Gastroenterol.* 2008. V. 14. P. 3464–3470.
34. Smets F., Najimi M., Sokal E.M. // *Pediatr. Transplant.* 2008. V. 12. P. 6–13.
35. Lee K.W., Lee J.H., Shin S.W., Kim S.J., Joh J.W., Lee D.H., Kim J.W., Park H.Y., Lee H.H., et al. // *Cell Transplant.* 2007. V. 16. P. 629–637.
36. Fitzpatrick E., Mitry R.R., Dhawan A. // *J. Internal. Med.* 2009. V. 266. P. 339–357.
37. Snykers S., Henkens T., De Rop E., Vinken M., Fraczek J., De Kock J., De Prins E., Geerts A., Rogiers V., Vanhaecke T. // *J. Hepatol.* 2009. V. 51. P. 187–211.
38. Rambhatla L., Chiu C.P., Kundu P., Peng Y., Carpenter M.K. // *Cell Transplant.* 2003. V. 12. № 1. P. 1–11.
39. Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Rivas-Carrillo J.D., Chen Y., Yamatsuji T., Tanaka N., Kobayashi N. // *Cell Transplant.* 2006. V. 15. № 4. P. 335–341.
40. Hay D.C., Fletcher J., Payne C., Terrace J.D., Gallagher R.C., Snoeys J., Black J.R., Wojtacha D., Samuel K., Hannoun Z., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 26. № 105. P. 12301–12306.
41. Mizumoto H., Aoki K., Nakazawa K., Ijima H., Funatsu K., Kajiwara T. // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. № 2. P. 611–613.
42. Weiss T.S., Lichtenauer M., Kirchner S., Stock P., Aurich H., Christ B., Brockhoff G., Kunz-Schughart L.A., Jauch K.W., Schlitt H.J., et al. // *Gut*. 2008. V. 57. P. 1129–1138.
43. Snykers S., Vanhaecke T., De Becker A., Papeleu P., Vinken M., van Riet I., Rogiers V. // *BMC Dev. Biol.* 2007. V. 2. № 7. P. 24.
44. De Kock J., Vanhaecke T., Rogiers V., Snykers S. // *Aatex*. 2008. V. 14. P. 605–611.
45. Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C., Jung J.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 328. P. 258–264.
46. Sgodda M., Aurich H., Kleist S., Aurich I., Konig S., Dollinger M.M., Fleig W.E., Christ B. // *Exp. Cell Res.* 2007. V. 313. P. 2875–2886.
47. Stock J., Staeger M.S., Muller L.P., Sgodda M., Volker A., Volkmer I., Lutzendorf J., Christ B. // *Transplant. Proc.* 2008. V. 40. P. 620–623.
48. Давыдова Д.А., Воротеляк Е.А., Смирнова Ю.А., Зиновьева Р.Д., Романов Ю.А., Кабаева Н.В., Терских В.В., Васильев А.В. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 2. С. 112–119.
49. Dawn M.D., De Coppi P., Bartsch G., Atala A. // *Meth. Enzymol.* 2006. V. 419. P. 426–438.
50. Zheng Y.B., Gao Z.L., Xie C., Zhu H.P., Peng L., Chen J.H., Chong Y.T. // *Cell Biol. Internat.* 2008. V. 32. № 11. P. 1439–1448.
51. Drukker M., Katchman H., Katz G., Even-Tov Friedman S., Shezen E., Hornstein E., Mandelboim O., Reisner Y., Benvenisty N. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 221–229.
52. Agarwal S., Holton K.L., Lanza R. // *Stem Cells*. 2008. V. 26. P. 1117–1127.
53. Charles E.M., Gordon K. // *Cell*. 2008. V. 132. P. 661–680.
54. Song Z., Cai J., Liu Y., Zhao D., Yong J., Duo S., Song X., Guo Y., Zhao Y., Qin H., et al. // *Cell Res.* 2009. V. 19. P. 1233–1242.
55. Cai J., Zhao Y., Liu Y., Ye F., Song Z., Qin H., Meng S., Chen Y., Zhou R., Song Y., et al. // *Hepatology*. 2007. V. 45. P. 1229–1239.
56. Kheolamai P., Dickson A.J. // *BMC Mol. Biol.* 2009. V. 10. P. 35.
57. Dong X.J., Zhang G.R., Zhou Q.J., Pan R.L., Chen Y., Xiang L.X., Shao J.Z. // *World J. Gastroenterol.* 2009. V. 7. № 15. P. 5165–5175.
58. Lavon N., Yanuka O., Benvenisty N. // *Differentiation*. 2004. V. 72. P. 230–238.
59. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.
60. Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., et al. // *Mol. Therapy*. 2011. V. 19. № 2. P. 400–407.
61. Chun Y.S., Chaudhari P., Jang Y.Y. // *Int. J. Biol.* 2010. V. 14. № 6. P. 796–805.
62. Hussain S.Z., Strom S.C., Kirby M.R., Burns S., Langemeijer S., Ueda T., Hsieh M., Tisdale J.F. // *Dig. Dis. Sci.* 2005. V. 50. № 10. P. 1755–1763.
63. 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. // *Science*. 1999. V. 284. P. 1168–1170.
64. Brulport M., Schormann W., Bauer A., Hermes M., Elsner C., Hammersen F.J., Beerheide W., Spitkovsky D., Harting W., Nussler A., et al. // *Hepatology*. 2007. V. 46. P. 861–870.
65. Jang Y.Y., Collector M.I., Baylin S.B., Diehl A.M., Sharkis S.J. // *Nat. Cell Biol.* 2004. V. 6. P. 532–539.
66. Aurich I., Mueller L.P., Aurich H., Luetzendorf J., Tisljar K., Dollinger M.M., Schormann W., Walldorf J., Hengstler J.G., Fleig W.E., et al. // *Gut*. 2007. V. 56. P. 405–415.
67. Lange C., Bassler P., Lioznov M.V., Bruns H., Kluth D., Zander A.R., Fiegel H.C. // *Transplant. Proc.* 2005. V. 37. P. 276–279.
68. Ryan J.M., Barry F.P., Murphy J.M., Mahon B.P. // *J. Inflamm.* 2005. V. 26. № 2. P. 8.

69. Le Blanc K., Ringden O. // *J. Intern. Med.* 2007. V. 262. P. 509–525.
70. Kuo T.K., Hung S.P., Chuang C.H., Chen C.T., Shih Y.R., Fang S.C., Yang V.W., Lee O.K. // *Gastroenterology*. 2008. V. 134. P. 2111–2121.
71. Chamberlain J., Yamagami T., Colletti E., Theise N.D., Desai J., Frias A., Pixley J., Zanjani E.D., Porada C.D., Almeida-Porada G. // *Hepatology*. 2007. V. 46. P. 1935–1945.
72. Houlihan D.D., Newsome P.N. // *Gastroenterology*. 2008. V. 135. P. 438–450.
73. Gaia S., Smedile A., Omede P., Olivero A., Sanavio F., Balzola F., Ottobrelli A., Abate M.L., Marzano A., Rizzetto M., et al. // *J. Hepatol.* 2006. V. 45. P. 13–19.
74. Gordon M.Y., Levcar N., Pai M., Bechellier P., Dimarakis I., Al-Allaf F., M'Hamdi H., Thalji T., Welsh J.P., Marley S.B., et al. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1822–1830.
75. Lyra A.C., Soares M.B., da Silva L.F., Fortes M.F., Silva A.G., Mota A.C., Oliveira S.A., Braga E.L., de Cervalho W.A., Genser B., et al. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 1067–1073.
76. Mohamadnejad M., Namiri M., Bagheri M., Hashemi S.M., Ghanaati H., Zare Mehrijardi N., Kazemi Ashtiani S., Malekzadeh R., Baharvand H. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. P. 3359–3363.
77. Levcar N., Pai M., Habib N.A., Tait P., Jiao L.R., Marley S.B., Davis J., Dazzi F., Smadja C., Jensen S.L., et al. // *Cell Prolif.* 2008. V. 41. P. 115–125.
78. Di Bonzo L.V., Ferrero I., Cravanzola C., Mareschi K., Rustichell D., Novo E., Sanavio F., Cannito S., Zamara E., Bertero M., et al. // *Gut*. 2008. V. 57. P. 223–231.
79. Prusa A.R., Marton E., Rosner M., Bernaschek G., Hengstschlager M. // *Hum. Reprod.* 2003. V. 18. P. 1489–1493.
80. Tsai M.S., Hwang S.M., Tsai Y.L., Cheng F.C., Lee J.L., Chang Y.J. // *Biol. Reprod.* 2006. V. 74. P. 545–551.
81. Perin L., Sedrakyan S., Da Sacco S., De Filippo R. // *Meth. Cell Biol.* 2008. V. 86. P. 85–99.
82. Zhang P., Baxter J., Vinod K., Tulenko T.N., Dimuzio P. // *Stem Cells Develop.* 2009. V. 18. P. 1299–1308.
83. Давыдова Д.А. // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2010. № 5. С. 517–526.
84. Dabeva M.D., Hwang S.G., Vasa S.R., Hurston E., Novikoff P.M., Hixson D.C., Gupta S., Shafritz D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 8. № 94. P. 7356–7361.
85. Slack J.M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 5. P. 369–378.
86. Zulewski H., Abraham E.J., Gerlach M.J., Daniel P.B., Moritz W., Muller B., Vallejo M., Thomas M.K., Habener J.F. // *Diabetes*. 2001. V. 50. P. 521–533.
87. Tosh D., Shen C.N., Slack J.M. // *Hepatology*. 2002. V. 36. P. 534–543.
88. Бабаева А.Г., Шубникова Е.А. Структура, функция и адаптивный рост слюнных желез. М.: Изд-во МГУ, 1979. 192 с.
89. Гвазава И.Г., Васильев А.В., Балан О.В., Терских В.В. // *Цитология*. 2011. № 53. С. 129–134.
90. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. // *Hepatology*. 2004. V. 39. P. 667–675.
91. Sato A., Okumura K., Matsumoto S., Hattori K., Hattori S., Shinohara M., Endo F. // *Cloning Stem Cells*. 2007. V. 9. P. 191–205.
92. Matsumoto S., Okumura K., Ogata A., Hisatomi Y., Sato A., Hattori K., Matsumoto M., Kaji Y., Takahashi M., Yamamoto T., et al. // *Cloning Stem Cells*. 2007. V. 9. P. 176–190.
93. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Sudhof T.C., Wernig M. // *Nature*. 2010. V. 25. № 463. P. 1035–1041.
94. Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. // *Nature*. 2008. V. 2. № 455. P. 627–632.
95. Huang P., He Z., Ji S., Sun H., Xiang D., Liu C., Hu Y., Wang W., Hui L. // *Nature*. 2011. V. 475. P. 386–389.
96. Kyrnizi I., Hatzis P., Katrakili N., Tronche F., Gonzalez F.J., Talianidis I. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 2293–2305.
97. Zaret K.S. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 329–340.
98. Lee C.S., Friedman J.R., Fulmer J.T., Kaestner K.H. // *Nature*. 2005. V. 16. № 435. P. 944–947.
99. McLin V.A., Rankin S.A., Zorn A.M. // *Development*. 2007. V. 134. № 12. P. 2207–2217.
100. LeCouter J., Moritz D.R., Li B., Phillips G.L., Liang X.H., Gerber H.P., Hillan K.J., Ferrara N. // *Science*. 2003. V. 299. P. 890–893.
101. Suzuki A., Sekiya S., Buscher D., Izpissua Belmonte J.C., Taniguchi H. // *Development*. 2008. V. 135. P. 1589–1595.
102. Margagliotti S., Clotman F., Pierreux C.E., Beaudry J.B., Jacquemin P., Rousseau G.G., Lemaigre F.P. // *Dev. Biol.* 2007. V. 311. P. 579–589.
103. Zong Y., Panikkar A., Xu J., Antoniou A., Raynaud P., Lemaigre F., Stanger B.Z. // *Development*. 2009. V. 136. P. 1727–1739.
104. Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N., Caballero-Corbalan J., Tanaka N., Kobayashi N. // *Acta Med. Okayama*. 2008. V. 62. P. 63–68.
105. Yabaluri N., Bashyam M.D. // *J. Biosci.* 2010. V. 35. P. 473–484.
106. Nagaki M., Moriwaki H. // *Hepatology Res.* 2008. V. 38. P. 961–969.
107. Rausa F.M., Tan Y., Costa R.H. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. P. 437–449.
108. Lazarevich N.L. // *Biochemistry*. 2000. V. 65. P. 117–133.
109. Kumaran V., Joseph B., Benten D., Gupta S. // *Gastroenterology*. 2005. V. 129. P. 1643–1653.
110. Kosone T., Takagi H., Horiguchi N., Kakizaki S., Sato K., Watanabe Y., Mori M. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008. V. 23. P. 260–266.
111. Dagher I., Boudechiche L., Branger J., Coulomb-Lhermine A., Parouchev A., Sentilhes L., Lin T., Groyer-Picard M.T., Vons C., Hadchouel M., et al. // *Transplantation*. 2006. V. 82. P. 1067–1073.
112. Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan E.A., Korbitt G.S., Toth E., Warnock G.L., Kneteman N.M., Rajotte R.V. // *N. Engl. J. Med.* 2000. V. 343. P. 230–238.
113. Wesolowska A., Olszewski W.L., Durluk M. // *Transplant. Proc.* 2003. V. 35. P. 2358–2360.
114. Sagias F., Mitry R.R., Hughes R.D., Dhawan A. // *40th Annu. Meet. Espghan*. 2007. V. 3. P. 58.
115. Walkup M.H., Gerber D.A. // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 1833–1840.
116. Behbahan I.S., Duan Y., Lam A., Khoobyari S., Ma X., Ahuja T.P., Zern M.A. // *Stem Cell Rev. Rep.* 2011. V. 7. P. 748–759.