

7. Aspirin, heparin, and fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction / R. Collins [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1997. — Vol. 336. — P. 847–860.
8. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE) // Lancet. — 1996. — Vol. 348. — P. 1329–1339.
9. Clinical effects of anticoagulant therapy in suspected acute myocardial infarction: systematic overview of randomized trials / R. Collins // B.M.J. — 1996. — Vol. 313. — P. 652–659.
10. Clinical Equivalence of Generic and Brand-Name Drugs Used in Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-analysis / A. S. Kesselheim [et al.] // J.A.M.A. — 2008. — Vol. 299. — P. 2514–2526.
11. Clopidogrel used in combination with aspirin compared with aspirin alone in the treatment of non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes: a systematic review and economic evaluation / C. Main [et al.] // Health Technol. Assess. — 2004. — Vol. 8. — P. 40.
12. Effects of aspirin on coronary reocclusion and recurrent ischemia after thrombolysis: a meta-analysis / S. Roux [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. — 1992. — Vol. 19. — P. 671–677.
13. Efficacy and bleeding complications among patients randomized to enoxaparin or unfractionated heparin for antithrombin therapy in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: a systematic overview / J. L. Petersen [et al.] // J.A.M.A. — 2004. — Vol. 292. — P. 89–96.
14. Efficacy and safety of the low-molecular weight heparin enoxaparin compared with unfractionated heparin across the acute coronary syndrome spectrum: a meta-analysis / S. A. Murphy [et al.] // Eur. Heart J. — 2007. — Vol. 28. — P. 2077–2086.
15. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute non-ST-segment elevation acute coronary syndrome 2008 / Eur. Heart J. — 2007. — Vol. 28. — P. 1598–1660.
16. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation / C. W. Hamm [et al.] // European Heart Journal. — 2011. — Vol. 32. — P. 1093.
17. ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary / Eur. Heart J. — 2007. — Vol. 28. — P. 2375–2414.
18. For the ACUTY Investigators. Bivalirudin for patients with acute coronary syndromes / G. W. Stone [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2006. — Vol. 355. — P. 2203–2216.
19. For the Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: The PCI-CURE study / S. R. Mehta [et al.] // Lancet. — 2001. — Vol. 358. — P. 527–533.
20. For the ExTRACT-TIMI 25 Investigators. Enoxaparin versus Unfractionated Heparin with Fibrinolysis for ST-Elevation Myocardial Infarction / E. M. Antman [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2006. — Vol. 354. — P. 1477–1488.
21. For the Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Rapid Early Action for Coronary Treatment 2 (ISAR-REACT 2) Trial Investigators. Abciximab in Patients With Acute Coronary Syndromes Undergoing Percutaneous Coronary Intervention After Clopidogrel Pretreatment. The ISAR-REACT 2 Randomized Trial / A. Kastrati [et al.] // J.A.M.A. — 2006. — Vol. 295. — P. 1531–1538.
22. For the TRITON-TIMI 38 Investigators. Prasugrel versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes / S. D. Wiviott [et al.] // New Engl. J. Med. — 2007. — Vol. 357. — P. 2001–2015.
23. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group // Lancet. — 1994. — Vol. 343. — P. 311–322.
24. ISIS-2 Collaborative group (1988). «Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2» // Lancet — 1988. — Vol. 8607. — P. 349–360.
25. The GUSTO Investigators. An International Randomized Trial Comparing Four Thrombolytic Strategies for Acute Myocardial Infarction / N. Engl. J. Med. — 1993. — Vol. 329. — P. 673–682.
26. The OASIS-6 Trial Group. Effects of Fondaparinux on Mortality and Reinfarction in Patients With Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. The OASIS-6 Randomized Trial // J.A.M.A. — 2006. — Vol. 295. — P. 1519–1530.
27. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. Guidelines for percutaneous coronary interventions / Eur. Heart J. — 2005. — Vol. 26. — P. 804–847.
28. Thrombolysis and Adjunctive Therapy in Acute Myocardial Infarction / V. Menon [et al.] // Chest. — 2004. — Vol. 126. — P. 549–575.
29. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes / L. Wallentin [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2009. — Vol. 361(11). — P. 1045–1057.

Поступила 21.01.2013

УДК 616.36: 611.018.26: 602.9
ГЕПАТОЦИТАРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК
(обзор литературы)

А. Г. Скуратов, Д. Р. Петренев, А. Н. Кондрачук

Гомельский государственный медицинский университет

По данным ВОЗ, заболевания печени различной этиологии являются одной из 10 основных причин смертности в мире. Трансплантация печени и использование ее биоинженерных аналогов лимитировано высокими затратами и побочными эффектами лечения, а также объективной ограниченностью источников донорских органов и функциональных клеточных элементов. Применение инновационных подходов направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток может помочь преодолеть многие недостатки существующих методов лечения. В представленной обзорной статье рассматриваются основные источники, особенности дифференцировки и аспекты безопасности использования мезенхимальных стволовых клеток в лечении печеночной недостаточности.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, гепатоцит-подобные клетки, направленная дифференцировка.

HEPATOCYTIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS
(literature review)

A. G. Skuratov, D. R. Petrenyov, A. N. Kondrachuk

Gomel State Medical University

The data of WHO indicate that liver diseases of different etiology are one of the 10 most frequent death causes in the world. Liver transplantation and use of its bioengineered analogs are limited by their high cost and adverse ef-

fects of the treatment, as well as by limited availability of donor organs and functional cellular elements. The application of innovative approaches of directed differentiation of mesenchyme stem cells can help overcome the shortcomings of current treatment methods.

The present literature review covers the main sources, particularities of differentiation and safety aspects of the application of mesenchymal stem cell in the treatment of hepatic failure.

Key words: mesenchymal stem cells; hepatocyte-like cells, directed differentiation.

Заболевания печени становятся всё более распространенными в наши дни и по данным ВОЗ являются одной из 10 основных причин смертности в экономически развитых странах. В этой связи лечение пациентов с тяжелыми формами печеночной недостаточности (ПН) является актуальной проблемой современной медицины. Зачастую, ортотопическая трансплантация печени — это единственный эффективный способ лечения ПН. Однако операция по пересадке печени имеет ограниченное применение из-за недостатка донорских органов, высокой стоимости сопутствующих процедур, риска отторжения трансплантата, рецидива первичного заболевания и неизбежных побочных эффектов последующей пожизненной иммуносупрессии. Вспомогательные экстракорпоральные перфузионные системы детоксикации, или так называемая «искусственная печень» являются недостаточно эффективными и не могут быть использованы в рутинной практике из-за отсутствия стабильного источника функционально полноценных гепатоцитов.

Наиболее разработанной альтернативой пересадке органа является трансплантация зрелых гепатоцитов. Этот метод терапии ПН помогает обеспечить, по крайней мере, временную метаболическую поддержку функции печени. К сожалению, ограниченность источников клеток, иммунное отторжение, краткосрочная жизнеспособность и быстрая фенотипическая дедифференцировка гепатоцитов являются основными препятствиями для клинического применения данного метода. Эти проблемы могут быть преодолены посредством использования аутологических стволовых клеток благодаря их высокому потенциалу к самообновлению и плюрипотентности, а также низкой иммунореактивности и способности оказывать пролиферативное действие за счет синтеза ряда тканевых факторов стромы.

Последние достижения в области направленной дифференцировки стволовых клеток позволяют предположить, что в ближайшем будущем мезенхимальные стволовые клетки (МСК) станут основным источником функциональных клеточных элементов для тканевой инженерии, клеточной терапии и регенерации печени. В то же время, несмотря на все успехи в этой области клеточной биологии, до сих пор не существует единого мнения о возможностях полноценной и эффективной гепатоцитарной дифференцировки МСК *in vitro* и *in vivo*, а также о безопасности их после-

дующего применения для трансплантации или для создания биоинженерных аналогов печени [1].

Источники мезенхимальных стволовых клеток, пригодных для гепатоцитарной дифференцировки

Впервые МСК были обнаружены в костном мозге русским гистологом А. Я. Фриденштейном и описаны как некроветворные, недифференцированные, фибробласт-подобные плюрипотентные клетки-предшественники. Сегодня известно, что МСК присутствуют в большинстве органов и тканей. Эти клетки, известные как «покоящиеся» стволовые клетки, функционально являются репаративным клеточным депо для поддержания клеточного гомеостаза и регенерации тканей.

Вопрос о том, какая популяция стволовых клеток является наиболее эффективной в регенерации поврежденных тканей печени, все еще является предметом дискуссий. В одной из ранних публикаций [2] было постулировано, что именно гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) (и только их очищенная фракция (C-kit^{high}Thy^{low}Lin^{low}Sca-1⁺)) могут давать начало гепатоцитам и эффективно влиять на выживаемость фумарилацетоацетат гидролаза-дефицитных мышей (модель тирозинемии 1 типа). Однако в последующих исследованиях было показано, что это утверждение неверно. Shu и соавт. [3] выделили МСК и ГСК (Thy-1.1⁺) из костного мозга крыс линии Sprague-Dawley и обнаружили, что оба типа клеток демонстрировали способность гепатоцитарной дифференцировки. Однако только МСК могли образовывать морфологически определяемые колонии гепатоцит-подобных клеток. Более того, именно МСК костного мозга в сравнении с мононуклеарными клетками крови и ГСК проявляют самый высокий потенциал гепатоцитарной дифференцировки при совместном культивировании с клетками поврежденной печени [4].

Далее исследовательская группа Seo с соавт. [5] показала, что выделенные из жировой ткани МСК тоже могут дифференцироваться в функциональные гепатоцит-подобные клетки как *in vitro* в присутствии коктейля цитокинов, так и *in vivo* путем трансплантации иммунодефицитным SCID-мышам с CCl₄-индуцированным повреждением печени. Аналогичные результаты были получены и для экспериментальных животных. Так, Sgodda с соавт. [6] выделили МСК крысы из перитонеальной жировой ткани и после 28 суток культивирования в питательной среде гепатоцитов обнаружили положительные результаты в ре-

акции определения депонирования гликогена, что ассоциировано с приобретением этими клетками фенотипа гепатоцитов.

Вскоре было обнаружено, что стволовые клетки пуповинной крови человека (ПК) в определенных условиях могут обладать сопоставимым потенциалом гепатогенной дифференцировки с таковыми клетками, выделенными из костного мозга. Было показано, что МСК, выделенные из ПК, могут дифференцироваться в гепатоцит-подобные клетки *in vitro* после 4 недель культивирования в присутствии фактора роста гепатоцитов (HGF) и онкостатина М (OSM) [7] или фактором роста фибробластов-4 (FGF-4) [8].

Ling и соавт. [7] при изучении свойств МСК, выделенных из легких плода, обнаружили, что они функционально и фенотипически схожи с МСК взрослого человека и могут трансдифференцироваться в гепатоцит-подобные клетки в присутствии HGF, эпидермального фактора роста (EGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF).

Следует отметить, что на практике наиболее часто используются МСК, выделенные из костного мозга и жировой ткани, в связи с доступностью исходного материала и возможностью быстрого получения большого количества аутологичных МСК пациента. В то же время МСК, пригодные для дифференцировки в гепатоцитарном направлении, могут быть выделены из многих тканей (жировая ткань, периферическая кровь, фетальная печень, легкие, амниотическая жидкость и пуповинная кровь). Однако полученные из этих тканей клетки имеют различный потенциал гепатоцитарной дифференцировки. По этой причине поиск надежных методов направленной дифференцировки МСК для медицинского применения остается актуальной задачей этой области науки [10].

Дифференцировка МСК в гепатоцит-подобные клетки *in vitro*

Для того, чтобы индуцировать дифференцировку МСК в зрелые гепатоциты *in vitro*, принципиально важным является обеспечение адекватных стимулов для поддержания клеточных функций в культуре. Такими стимулами являются ростовые гормоны, цитокины, факторы внеклеточного матрикса или совместное культивирование с другими типами клеток.

Гормоны и цитокины

В число цитокинов, влияющих на рост клеток печени и дифференцировку *in vitro*, входят HGF, OSM, EGF, TGF, bFGF, инсулин, инсулиноподобный ростовой фактор (IGF), а также фактор ингибирования лейкемии (LIF) и др.

HGF играет важную роль в развитии и регенерации печени, особенно на ранних стадиях эмбрионального развития печени [11]. Изначально HGF был идентифицирован и клонирован как

мощный митоген для гепатоцитов, однако позже выяснилось, что он может выступать в роли плейотропного цитокина мезенхимального происхождения и взаимодействовать с рецептором *c-met*, который является трансмембранным белком с тирозинкиназным цитоплазматическим доменом. В связи с этим большинство исследователей, применяющих ростовые факторы для дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки, до сих пор используют именно HGF.

Другой фактор FGF-4 является митогеном для фибробластов и эндотелиальных клеток и поддерживает экспансию клеток *in vitro* в сывороточных средах, а также индуцирует гепатоцитарную дифференцировку в начальной стадии формирования энтодермы [12].

Важное значение для дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении имеют представители подсемейства IL-6. Это онкостатин М (OSM), который продуцируется стволовыми клетками печени на ранних стадиях эмбриогенеза и играет важную роль в созревании гепатоцитов, хотя сам по себе и не вызывает дифференцировку в гепатоцит-подобный фенотип [13], а также LIF, который может индуцировать дифференцировку костномозговых МСК в гепатоциты подобно OSM [14].

В качестве индукторов гепатогенной дифференцировки могут выступать такие химические соединения, как дексаметазон, ретинол, бутират, никотинамид, норадреналин и диметилсульфоксид [15]. Так, например, применение ITS эффективно для индукции пролиферации и улучшения выживания первичных гепатоцитов. Дексаметазон запускает экспрессию гепатоцитарного фенотипа за счет подавления клеточного деления. Никотинамид может усиливать пролиферацию первичных гепатоцитов и является важным компонентом для появления колоний малых гепатоцитов в культуре *in vitro*.

Важным является не только присутствие отдельных факторов дифференцировки, но и изменение их соотношения и концентрации во времени. Так, Snykers и соавт. [16] использовали последовательное добавление нескольких факторов в различное время культивирования клеток, таким образом имитируя паттерн (характерное сочетание факторов во время эмбриогенеза печени), и показали, что эта стратегия улучшает эффективность дифференцировки МСК *in vitro*.

Chivu и соавт. [12] сравнили дифференцировочную эффективность различных факторов (HGF, ITS, дексаметазон и никотинамид), используемых для дифференцировки СК в гепатоцит-подобные клетки, совместно и по отдельности и обнаружили, что HGF и никотинамид обладают наибольшим гепатогенным потенциалом.

В настоящее время активно ведется поиск химических индукторов гепатоцитогенеза, и раз-

работки группы из Китая подтверждают возможность применения так называемых малых молекул (с англ. — «small molecules») для специфической дифференцировки МСК в гепатоциты [17].

Совместное культивирование

Совместное культивирование МСК как с гепатоцитами, так и с непаренхиматозными клетками печени также индуцирует их дифференцировку в гепатоцит-подобные клетки. Zhang и соавт. [18] проводили культивирование МСК, экспрессирующих GFP со свежeweделенными крысиными гепатоцитами и показали, что такой подход более эффективен для гепатоцитарной дифференцировки этих клеток, чем просто культивирование в среде, содержащей HGF. Lange и соавт. [19] культивировали GFP-меченные крысиные МСК совместно с фетальными клетками печени (FLCs), и эксперимент показал, что совместное культивирование не только обеспечивало наилучшие условия для гепатоцитарной дифференцировки, но также улучшало рост и дифференцировку FLCs. Chen и соавт. [20] культивировали стромальные стволовые клетки костного мозга мышей в среде кондиционированной гепатоцитами и выявили дифференцировку этих клеток в гепатоцит-подобные. Vaertschiger и соавт. [10] культивировали МСК в гепатогенной дифференцировочной среде в присутствии клеток гепатомы человека Nuh-7 (a human hepatoma cell line) в условиях, предотвращающих прямой контакт клеток (разделение полупроницаемой мембраной) и обнаружили, что экспрессия альбумина наблюдалась только в условиях кондиционирования среды клетками гепатомы. Более того, непаренхиматозные клетки печени также могут оказывать подобный эффект при совместном культивировании с МСК.

Упомянутые выше данные отчетливо демонстрируют роль гепатоцитов, непаренхиматозных клеточных элементов печени, а также факторов, выделяемых этими клетками, для направленной гепатоцитарной дифференцировки МСК. Фактически печень сама по себе может быть рассмотрена, как идеальная ниша для дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении.

Трехмерное (3D) культивирование

Многие исследования показывают, что 3D-культивирование гепатоцитов с другими типами мезенхимальных клеток, в том числе печеночного и внепеченочного происхождения улучшают выживание и функциональные показатели первичных гепатоцитов *in vitro* [21]. Многие 3D-матрицы или трехмерные субстраты для культивирования клеток предотвращают дедифференцировку клеток и помогают сохранять структуру клетки, поляризацию мембраны и функциональные свойства [22]. Исследования гепатоцитарной дифференцировки МСК с использованием 3D-матрикса довольно

редки. Kazemnejad и соавт. [23] изготовили трехмерную структуру из нановолокон poly(ϵ -caprolactone)/collagen/polyethersulfone чтобы культивировать МСК костного мозга (МСК-КМ) человека. Культивирование МСК в предложенной 3D-системе показало лучшие по сравнению с обычным культивированием в двумерной системе на пластике уровни продукции таких маркеров дифференцировки, как альбумин, мочевины и АЛТ. Механизмы этого феномена не идентифицированы, однако предполагается, что биоимитирующие нановолокна усиливают биологическую активность ростовых факторов и цитокинов, участвующих в гепатогенной дифференцировке.

Транскрипционные факторы

Несмотря на то, что точные механизмы гепатогенной дифференцировки не полностью раскрыты, определенные транскрипционные факторы, функционирующие во время эмбриогенеза, были применены для трансдифференцировки МСК в гепатоциты. Транскрипционный фактор HNF3 β является ключевым для этого процесса. Он относится к семейству транскрипционных факторов так называемых FOX и во время эмбриогенеза регулирует экспрессию более 100 генов в печени, поджелудочной железе, кишечнике и в легких. Ishii и соавт. [24] применили тетрациклин-регулируемую систему экспрессии HNF3 β в МСК-КМ линии UE7T-13 и обнаружили, что приблизительно 80 % клеток становилось альбумин положительными после обработки тетрациклином и β FGF, таким образом демонстрируя, что HNF3 β индуцирует эффективную дифференцировку МСК костного мозга человека.

Дифференцировка МСК в гепатоцит-подобные клетки *in vivo*

С тех пор, как была показана возможность дифференцировки МСК *in vitro*, стали активно изучать возможность применения этих свойств и *in vivo*. Многочисленные исследования, которые проводились на животных моделях (как правило, лабораторных мышках и крысах) с моделированным фиброзом или повреждением печени (токсическим, механическим), подтвердили возможность дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки и стали основой для разработки новых терапевтических способов влияния на патогенез печеночных заболеваний. Sato и соавт. [25] экспериментально подтвердили способность дифференцировки МСК-КМ человека в гепатоциты *in vivo* (без слияния с первичными гепатоцитами) путем прямой инокуляции клеток в ткани печени крыс с моделированным хроническим повреждением печени аллиловым спиртом. Эти результаты хорошо согласуются с данными исследований свойств МСК как *in vitro*, так и *in vivo*.

Таким образом, дифференцировка МСК *in vivo* является одной из перспективных современных стратегий применения этих клеток в

терапии заболеваний печени. Одним из вариантов этой технологии является пересадка прекоммитированных в гепатоцитарном направлении (обработка соответствующими факторами *in vitro*) МСК или их смеси с гепатоцитами [5].

Важным аспектом применения МСК для терапии заболеваний печени является их способность стимулировать регенерацию эндогенных паренхиматозных клеток и деградацию фиброзного матрикса [26]. Интересен тот факт, что недифференцированные МСК костного мозга обладают большим потенциалом в подавлении фиброза печени, индуцированного воздействием CCl_4 , по сравнению с МСК адипогенного и гепатогенного происхождения. Связано это с тем, что уровни экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 (ММР-2) и ММР-9 более высоки в недифференцированных клетках [27]. Также МСК способны проявлять и определенные противовоспалительные эффекты за счет продукции факторов, ингибирующих апоптоз гепатоцитов и модулирующих острофазный ответ.

Молекулярные механизмы дифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки

Детальный механизм трансдифференцировки МСК в гепатоцит-подобные клетки до сих пор остается малоизученным. Мезенхимально-эпителиальная трансформация (МЭТ), то есть процесс, обратный эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ), является важнейшим этапом эмбрионального развития, а также наблюдается в онкопрогрессии.

Ochiya и соавт. [28] с помощью *microarray*-анализа исследовали профиль экспрессии генов гепатоцит-подобных клеток, полученных из МСК жировой ткани, и обнаружили, что уровни экспрессии генов *Twist* и *Snail*, регулирующих ЭМТ, снижаются в процессе дифференцировки клеток. Этот процесс сопровождался усилением экспрессии эпителиальных маркеров, таких как E-кадгерин и α -катенин и снижением экспрессии мезенхимальных маркеров, таких как N-кадгерин и виментин. Эти данные свидетельствуют, что МЭТ является ключевым звеном в процессе дифференцировки гепатоцитов из МСК.

Стволовые клетки, как правило, характеризуются двумя фундаментальными свойствами: способностью к самообновлению и к дифференцировке в различные типы клеток. Эти процессы регулируются различными факторами роста, в том числе белками *Wnt*. Накопленные данные показывают, что сигнальный путь *Wnt*/ β -катенин играет ключевую роль в поддержании плюрипотентности, а также в процессах перепрограммирования соматических клеток и в процессах детерминации и дифференцировки МСК. Механизмы воздействия *Wnt* на клетку подразделяют на канонический (β -катенин зависимый) путь, который изменяет концентрацию клеточного

β -катенин и в конечном счете контролирует программы генной экспрессии, связанные с определением судьбы клетки и морфогенезом, и так называемые неканонические (β -катенин независимые) пути, которые регулируют поляриность клетки, стимулируя реорганизацию цитоскелета и метаболизм кальция. Исторически механизмы воздействия *Wnt* разделяли, используя три стандартных метода определения: по активности в культуре клеток C57MG, по способности влиять на эмбриогенез у *Xenopus* и по индукции образования почечных канальцев в изолированной культуре мезенхимальных клеток почки. Однако позже выяснилось, что выбор сигнального пути зависит не столько от лиганда, сколько от рецептора и других белков, составляющих собственно сигнальный путь. В последние годы также показана его решающая роль в самообновлении и пролиферации прогениторных клеток [29]. Ке и соавт. [30] продемонстрировали, что блокировка *Wnt*-сигнального пути активизирует дифференцировку МСК в гепатоциты.

Эпигенетическая модификация клеток, такая как метилирование ДНК и ацетилирование гистонов также имеет большое значение в регуляции процессов дифференцировки МСК. Действие ингибиторов метилтрансферазы ДНК отдельно или в комбинации с ингибиторами диацетилазы гистонов показали возможности дифференцировки клеток в гепатоцитарном направлении [31]. Так, добавление трихостатина А в культуру МСК человека, обработанную в течение 6 дней агентами, стимулирующими гепатоцитарную дифференцировку, инициирует их трансдифференцировку в клетки с фенотипическими и функциональными свойствами, характерными для первичных гепатоцитов. В целом ремоделирование хроматина выглядит обнадеживающей стратегией преодоления запрограммированной судьбы клеток и индукции линейно-специфической дифференцировки [15].

Безопасность применения стволовых клеток

Применение аутологичных МСК фактически решает большинство этических проблем использования эмбриональных стволовых клеток. Однако вопросы безопасности использования первичных и дифференцированных МСК в клинической практике остаются открытыми. Несмотря на отсутствие прямых доказательств, существует настороженность относительно рисков онкогенной трансформации МСК, так как эти клетки обладают высокой способностью к самообновлению, сходной с таковой у опухолевых клеток. Исследования Sawada и соавт. [32] продемонстрировали, что уровень пролиферации МСК постепенно снижается и примерно через 3 месяца наблюдается физиологическое старение клеток. При этом профиль экспрессии генов, регулирующих клеточную пролиферацию МСК, достоверно отличался от такового у опухолевых клеток.

Существуют сообщения о том, что трансплантация МСК-КМ может привести к прогрессированию фиброза печени [33]. Сообщается, что МСК костного мозга могут длительное время присутствовать в тканях печени, при этом сохраняя мезенхимальную морфологию и не демонстрируя экспрессию печеночных маркеров. Кроме того, после трансплантации МСК в поврежденную или регенерирующую печень они локализуются совместно с депо коллагена, которое способствует их дифференцировке в миофибробласты, что в конечном итоге может приводить к образованию фиброзной ткани. Таким образом, необходимо учитывать все потенциально негативные эффекты при использовании МСК в терапии заболеваний печени [32].

Заключение

Современные достижения в области дифференцировки МСК в гепатоцитарном направлении, а также использование аутологичных клеток позволяет преодолеть многие ограничения существующих методов лечения ПН. Использование гепатоцит-подобных клеток, дифференцированных из МСК, является перспективным направлением в создании инновационных подходов для регенерации печени и тканевой инженерии. При этом необходим строгий контроль свойств и субпопуляционного состава полученных клеточных популяций и оценка их онкогенного потенциала.

Проблема эффективного заселения печени МСК-производными гепатоцитами для обеспечения адекватного функционирования органа все еще является предметом дискуссий. Большинство исследований на животных подтверждают, что МСК могут стать ключевыми «игроками» в вопросах регенеративной медицины. Однако клиническое применение стволовых клеток человека для лечения заболеваний печени все еще находится в зачаточном состоянии. Необходимы дополнительные исследования для повышения эффективности и согласованности гепатогенной дифференцировки МСК. Все это необходимо для лучшего понимания механизмов достижения высокоэффективной трансдифференцировки стволовых клеток. Оправдан также переход в стадию клинических испытаний клеточных продуктов для доказательства эффективности лечения пациентов с ПН.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Bone marrow stem cells and the liver: are they relevant? / M. A. Eckersley-Maslin [et al.] // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2009 — № 24. — P. 1608–1616.
2. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells / B. E. Petersen [et al.] // *Science.* — 1999. — Vol. 284. — P. 1168–1170.
3. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells / S. N. Shu [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2004 — Vol. 10. — P. 2818–2822.
4. Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow / K. A. Cho [et al.] // *Cell Biol. Int.* — 2009. — Vol. 33. — P. 772–777.
5. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo / M. J. Seo [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — Vol. 328. — P. 258–264.
6. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo / M. Sgoddar [et al.] // *Exp. Cell. Res.* — 2007. — Vol. 313. — P. 2875–2886.
7. In vitro differentiation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells / S. H. Hong [et al.] // *Biochem. Biophys. Res Commun.* — 2005. — Vol. 330. — P. 1153–1161.
8. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells into hepatocytes / X. Q. Kang [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2005. — Vol. 11. — P. 7461–7466.
9. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells derived from human fetal lung to hepatocyte-like cells / L. Ling [et al.] // *Cell Biol. Int.* — 2008. — Vol. 32. — P. 1091–1098.
10. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver / R. M. Baertschiger [et al.] // *PLoS One.* — 2009. — № 4. — P. 6657.
11. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation / G. Forte [et al.] // *Stem Cells.* — 2006. — Vol. 24. — P. 23–33.
12. In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors / M. Chivu [et al.] // *Transl Res.* — 2009. — Vol. 154. — P. 122–132.
13. Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis / T. Kinoshita [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* — 1999. — Vol. 96. — P. 7265–7270.
14. Leukemia inhibitory factor contributes to hepatocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells / P. A. Lysy [et al.] // *Differentiation.* — 2008. — Vol. 76. — P. 1057–1067.
15. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: differentiation into hepatic lineage / R. Talens-Visconti [et al.] // *Toxicol. In Vitro.* — 2007. — Vol. 21. — P. 324–329.
16. Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow / S. Snykers [et al.] // *BMC Dev Biol.* — 2007. — Vol. 7. — P. 24.
17. Hepatic differentiation of rat mesenchymal stem cells by a small molecule / J. Ouyang [et al.] // *ChemMedChem.* — 2012. — Vol. 7(8). — P. 1447–1452.
18. Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells / Q. Zhang [et al.] // *DNA Cell Biol.* — 2007. — Vol. 26. — P. 497–503.
19. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells / C. Lange [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 12. — P. 2394–2397.
20. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes / Y. Chen [et al.] // *J. Cell. Biochem.* — 2007. — Vol. 102. — P. 52–63.
21. The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro / R. J. Thomas [et al.] // *Cells Tissues Organs.* — 2005. — Vol. 181. — P. 67–79.
22. Enhanced in vitro maturation of subcultivated fetal human hepatocytes in three dimensional culture using poly-L-lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M / S. Hanada [et al.] // *Int J Artif Organs.* — 2003. — Vol. 26. — P. 943–951.
23. Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold / S. Kazemnejad [et al.] // *J Gastroenterol Hepatol.* — 2009. — Vol. 24. — P. 278–287.
24. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta / K. Ishii [et al.] // *Hepatology.* — 2008. — Vol. 48. — P. 597–606.
25. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion / Y. Sato [et al.] // *Blood.* — 2005. — Vol. 106. — P. 756–763.
26. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis / L. J. Dai [et al.] // *Stem Cell Res.* — 2009. — Vol. 2. — P. 16–25.
27. Suppression of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by transplantation of a clonal mesenchymal stem cell line derived from rat bone marrow / M. Hardjo [et al.] // *Cell Transplant.* — 2009. — Vol. 18. — P. 89–99.
28. *Ochiya, T.* Commitment of stem cells into functional hepatocytes / T. Ochiya, T. Yamamoto, A. Banas // *Differentiation.* — 2010. — Vol. 79. — P. 65–73.

29. *Merkel, C.* Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt? / C. Merkel, C. Karner, T. Carroll // *Pediatr Nephrol.* — 2007. — Vol. 22 (11). — P. 1825–1838.

30. Down regulation of Wnt signaling could promote bone marrow derived mesenchymal stem cells to differentiate into hepatocytes / Z. Ke [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2008. — Vol. 367. — P. 342–348.

31. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes

in coculture with nonparenchymal liver cells / S Yamazaki [et al.] // *J Hepatol.* — 2003. — Vol. 39. — P. 17–23.

32. *Sawada, R.* Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells / R. Sawada, T. Ito, T. Tsuchiya // *Yakugaku Zasshi.* — 2007. — Vol. 127. — P. 851–856.

33. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis / F. P. Russo [et al.] // *Gastroenterology.* — 2006. — Vol. 130. — P. 1807–1821.

Поступила 08.02.2013

УДК 611.018:612.467

ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ОРГАНОВ МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Е. К. Солодова, А. Ф. Максименко

Гомельский государственный медицинский университет

Авторами представлена лекция по теме «Гистофизиология органов мочевыделительной системы» на английском языке. Лекция составлена на основе материала зарубежных учебных пособий, изданных на английском языке для обучения студентов медицинских школ и университетов.

Ключевые слова: почка, нефрон, почечное тельце, проксимальный каналец, дистальный каналец, петля Генле, фильтрационный барьер, собирательная трубочка, моча, юкстагломерулярный аппарат, мочеточник, мочевой пузырь, мочеиспускательный канал.

HISTOPHYSIOLOGY OF THE URINARY SYSTEM ORGANS

E. K. Solodova, A. F. Maximenko

Gomel State Medical University

The authors are presenting the lecture on the topic «Histophysiology of the urinary system organs» in English. The lecture was composed on the basis of foreign textbooks published in English for students of medical colleges and universities.

Key words: kidney, nephron, renal corpuscle, proximal tubule, distal tubule, loop of Henle, filtration barrier, collecting tubule, urine, juxtaglomerular apparatus, ureter, urinary bladder, urethra.

The urinary system consists of the paired kidneys and ureters and unpaired urinary bladder and urethra.

Kidney functions:

1. Production, storage and passing of urine.
2. Excretion.
3. Providing of the electrolyte and water balance.
4. Providing of the acid-base balance.
5. Regulation of blood pressure.
6. Regulation of red blood cells formation.

Development of the kidneys

The source of the kidneys development is intermediate mesoderm — nephrotom. The urinary system develops in a craniocaudal direction and includes three following stages: pronephros, mesonephros and metanephros.

The pronephros differentiates at the end of week 3 in the cervical region and is nonfunctional. It disappears at the end of week 4.

Proliferation of segmented nephrotom cells provides the formation of the pronephric tubules on each side of the body in the cervical region. They fuse with each other forming the two pronephric ducts, which progress towards the cloaca and will be used by mesonephros.

The mesonephros differentiates in week 4 and functions as an interim kidney till the permanent

kidney called metanephros is established. The mesonephros regresses in week 8.

The mesonephros is developed from the next nephrotom segments, which form S-shaped mesonephric tubules. The external ends of these tubules open into the mesonephric or Wolffian duct, which is continuation of the pronephric duct.

Internal ends of the mesonephric tubules form the double-layer capsules around the arterial capillary or glomerulus, which are branches of the dorsal aorta. The capsule and glomerulus form the renal corpuscles.

The metanephros differentiates at the beginning of month 2 and begins to function 3 weeks later.

The metanephros is developed from the metanephric blastema, which is nonsegmented homogenous mesodermal mass in the caudal part of embryo body.

The metanephric blastema gives rise to the epithelium of all nephrons parts. The epithelium of the collecting tubules, the papillary ducts, the calyces, the renal pelvis and the ureters differentiate from the metanephric diverticulum, which arises from the lower portion of the Wolffian duct where it opens into cloaca.

General structure of the kidneys

The kidneys are large, bean-shaped organs, surrounded by dense connective tissue capsule.