**Эффективность внутривенной инфузии мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при экспериментальном циррозе печени**

Для лечения экспериментального цирроза печени ранее применяли трансплантацию гепатоцитов [1] или методы генотерапии – например, введение гена HGF [2] или анти-TGF-beta-терапия [3].

В последнее время появились работы по стимуляции регенерации печени методом трансплантации клеток костного мозга – гемопоэтических и/или мезенхимальных. Выяснено, что это может осуществляться как путем клеточного слияния донорских клеток с гепатоцитами, так и посредством прямой дифференцировки.

Имеется ряд работ, демонстрирующих, что клетки костного мозга играют существенную роль в патогенезе цирротического процесса и фиброза. Хотя мнения ученых на этот счет неоднозначны. Например, показано, что при повреждении легких, клетки костного мозга мигрируют в очаг, дифференцируются в миофибробласты и активно участвуют в образовании фиброзного рубца [5,6]. С другой стороны, при системном введении мезенхимальных стволовых клеток мышам с формирующимся токсическим фиброзом легких, показали дифференцировку донорских клеток в легочной эпителий, уменьшение синтеза коллагена и интенсивности хронического воспаления [4].

Аналогичные данные получены и при изучении роли клеток костного мозга в развитии цирроза печени. Так, клиническая работа [7] демонстрирует прямое участие гемопоэтических клеток в патогенезе аутоиммуного гепатита с формированием первичного билиарного цирроза. Недавнее исследование [9], выполненное на человеческом материале, так же указывает на возникновение миофибробластов в цирротической печени из клеток костного мозга. Однако, работа [8] китайских исследователей демонстрирует дифференцировку этих клеток в гепатоциты, но не в миофибробласты при развитии экспериментального цирроза.

В новой работе, опубликованной в Transplantation,авторы выполняли внутривенную инфузию сингенных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) мышам с формирующимся токсическим циррозом печени. Токсический цирроз моделировали введением CCl-4 (четыреххлористого углерода). Сингенные клетки костного мозга выделяли и производили негативный (удаляли позитивную популяцию) магнитный сортинг (MACS) по CD45(+), GlyA(+), CD34(+). Затем культивировали добиваясь образования единичных (1 колония на 1 лунку 96-ти луночной плашки) пластик-адгезивных колоний. Перед транспланатцией клетки, выделеные из колоний имели фенотип CD34, CD45, CD31, vWF, GlyA, CD11a, CD11b – негативные и Flk1 – позитивные. Подобный фенотип сохранялся на протяжении 30 пассажей.

Трансгендерную клеточную трансплантацию производили внутривено в дозе 1 миллион через 1 неделю от начала моделирования цирроза и немедленно (в тот же день) после введения токсина. Контрольные животные получали физ. раствор.

Через 5 недель после назначения токсина в группах с клеточной трансплантацией наблюдали engraftment и дифференцировку введенных клеток. Они имели эпителий-подобную морфологию, несли Y-хромосому (донор – самец, реципиент – самка) и экспрессировали альбумин. Подобные клетки не идентифицировались на более ранних сроках (2 недели). Морфологические признаки цирроза-фиброза были значительно меньше в группе немедленной трансплантации, по сравнению с отсроченной трансплантацией клеток (через неделю) и контролем (физ. раствор). Однако «морфологический регресс» цирроза наблюдался в этой группе только через 5 недель от начала эксперимента, а в более ранние сроки (2 недели) между группами не было получено никаких достоверных отличий. В группах с клеточной трансплантацией было так же обнаружено снижение (но незначительное) содержания гидроксипролина, как маркера усиленного синтеза коллагена в цирротической печени. В сыворотке крови обнаружили значительное снижение таких маркеров развивающегося цирроза печени как трансаминазы (ALT), procollagen III-N-peptide и гиалуроновой кислоты – в группе с немедленной трансплантацией клеток. И только в этой же группе идентифицировали значительное снижение уровня мРНК TGF-beta1 (трансформирующего фактора роста), как одного из самых важных маркеров фиброгенеза и синтеза коллагена. С другой стороны не обнаруживалось никакого влияния клеточной трансплантации на сывороточный общий биллирубин.

Таким образом, показано положительное влияние трансплантации flk-1(+) МСК костного мозга на замедление развития и регресс экспериментального цирроза печени. Однако благоприятный эффект трансплантации проявлялся только при немедленном, но не отсроченном введении клеток после начала действия повреждающего фактора.

Все-таки остается неясным механизм действия введенных клеток. Так, клетки были похожи на эпителий протоков, но синтезировали альбумин. И почему именно Flk-1(+) популяция как маркер МСК? Напомню, что Flk-1 является одним из рецепторов (тирозин-киназовым) vascular endothelial growth factor (VEGF), а их взаимодействие обусласливает запуск ангиогенеза [10,11]. Экспрессируется, в основном на эндотелиоцитах и гематопоэтических прогениторных клетках [11]. Сортировка клеток (эмбриональных стволовых [12] и костного мозга взрослых и фетусов [13]) по Flk-1(+) производится, как правило для получения предшественников сосудистого эндотелия и стимуляции ангиогенеза. И хотя в работе для трансплантации применяли очищенную от гемопоэтических клеток Flk-1(+) популяцию клеток, ни слова не было сказано об ангиогенезе в печени.

**Список литературы**

1. Nagata H, et al. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. Gastroenterol 2003; 124; 2: 422-431

2. Matsuno Y, et al. Hepatocyte growth factor gene transfer into the liver via the portal vein using electroporation attenuates rat liver cirrhosis. Gene Ther 2003; 10; 18: 1559-1566

3. Arias M, et al. Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. BMC Gastroenterol 2003; 3; 1: 29

4. Ortiz LA, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. PNAS 2003; 100: 8407

5. Epperly MW, et al. Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 29; 2: 213-224

6. Hashimoto, et al. Bone marrow–derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. J Clin Invest 2004; 113: 243-252

7. Kyriakou DS, et al. Hemopoietic progenitor cells and bone marrow stromal cells in patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. J Hepatol 2003; 39; 5: 679-685

8. Zhan YT, et al. Differentiation of bone marrow stem cells in rat hepatic fibrogenesis environment. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 2003; 11; 11: 673-675

9. Forbes S, et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. Gastroenterol 2004; 126: 955–963

10. Achen MG, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). PNAS 1998; 95; 2: 548-553

11. Chiang MK, Flanagan JG. Interactions between the Flk-1 receptor, vascular endothelial growth factor, and cell surface proteoglycan identified with a soluble receptor reagent. Growth Factors 1995; 12; 1: 1-10

12. Yamashita J, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature 2000; 408; 6808: 92-96

13. Fanga B, et al. Multipotency of Flk1+CD34– progenitors derived from human fetal bone marrow. J Lab Clin Med 2004; 143; 4