

CD34, α -SMA И BCL-2 КАК МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫМ АЛКОГОЛЬНЫМ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

Бурганова Г.Р.¹, Абдулхаков С.Р.¹, Гумерова А.А.^{1,2}, Газизов И.М.¹, Йылмаз Т.С.¹, Тутова М.А.¹,
Одинцова А.Х.³, Кундакчян Г.Г.¹, Фаррахов А.З.^{1,3}, Киясов А.П.^{1,2}

¹ ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России

² Казанский (Приволжский) федеральный университет

³ Республиканская клиническая больница Минздрава Республики Татарстан, Казань

Бурганова Гузель Рустамовна

e-mail guzel.burganova@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Цирроз печени — проблема, требующая новых подходов к лечению, поскольку медикаментозная терапия является недостаточно эффективной. Наиболее перспективными могут оказаться новые методы лечения в области регенеративной медицины, в частности использование стволовых клеток (СК). Аутологичные гемопоэтические СК вводили в чревный ствол больным алкогольным циррозом печени. Биоптаты печени окрашивали иммуногистохимически с антителами против CD34, α -гладкомышечного актина (α -ГМА) и Bcl-2. По результатам исследования установлена перспективность данного метода лечения для подавления фиброгенеза в печени и показана высокая информативность иммуногистохимических методов в оценке эффективности трансплантации.

Ключевые слова: алкогольный цирроз печени; гемопоэтические стволовые клетки; регенерация; синусоиды; миофибробласты

SUMMARY

Liver cirrhosis is a problem that requires new therapeutical approaches because the existing treatment is not effective enough. The most promising at present may be new treatments in the field of regenerative medicine and in particular the use stem cells. Autologous hematopoietic stem cells were injected into the celiac trunk of patients with alcoholic cirrhosis. Liver biopsy specimens were stained immunohistochemically with antibodies against CD 34, alpha-smooth-muscle actin (α -SMA) and Bcl-2. The results showed that this approach is effective in suppression of fibrogenesis in liver and immunohistochemical methods are highly informative in assessing the effectiveness of stem cells transplantation.

Keywords: alcoholic liver cirrhosis; hematopoietic stem cells; regeneration; sinusoids; myofibroblasts

ВВЕДЕНИЕ

Алкогольная болезнь печени объединяет различные нарушения структуры и функциональной способности органа, вызванные длительным систематическим употреблением алкогольных напитков. Это заболевание очень широко распространено в популяции и имеет большое клинико-социальное значение вследствие значительного числа трудопотерь, инвалидизации больных, а также развития цирроза печени. Повышение частоты развития алкогольных

циррозов закономерно связано с уровнем потребления алкоголя населением страны.

Во всем мире менее половины всего взрослого населения (приблизительно 2 миллиарда человек) употребляют алкоголь [1]. От последствий употребления алкоголя ежегодно умирают 2,5 миллиона человек, значительную долю из которых составляет молодежь [2]. Воздействие потребления алкоголя имеет значительные индивидуальные различия.

Не у каждого человека, злоупотребляющего алкоголем, возникает цирроз печени. Скорость процессов метаболизма алкоголя у различных людей может отличаться в 3–4 раза в результате действия ряда факторов, включая гендерные и генетические различия в активности ферментных систем печени [3]. В России в последнее десятилетие среди больных циррозом печени увеличивается доля алкогольных циррозов на фоне стабилизации доли HBV- и HCV-циррозов [4].

Консервативные методы лечения хронических заболеваний печени на стадии цирроза, к сожалению, недостаточно эффективны и не влияют на прогноз заболевания, а самый эффективный из существующих методов лечения цирроза — пересадка печени — имеет много недостатков и ограничений, таких как дефицит доноров, операционный риск, высокая стоимость, возможность отторжения трансплантата, необходимость пожизненного приема дорогих иммуносупрессоров и решения множества этических проблем, возникающих как до, так и после трансплантации.

Безусловно, поиск новых методов лечения хронических заболеваний печени у больных на стадии цирроза — одна из наиболее актуальных проблем современной гепатологии. Самыми перспективными на сегодняшний день являются методы регенеративной медицины с использованием стволовых клеток, способных в зависимости от микроокружения превращаться в клетки разных органов и тканей. Основным источником стволовых клеток является костный мозг, способный генерировать клетки-предшественники для большого числа клеток и тканей организма, в том числе и гепатоцитов [5–10]. Наиболее изученными и часто используемыми клетками, которые можно получить как из костного мозга, так и из периферической и пуповинной/плацентарной крови, являются гемопоэтические стволовые клетки [11].

Возможность стимуляции регенерации печени с использованием аутологичных стволовых клеток костного мозга [12; 13] и аллогенных стволовых клеток пуповинной крови [14] была показана во многих экспериментальных исследованиях. X. P. Tang и соавт. продемонстрировали высокую эффективность применения аллогенных стволовых клеток пуповинной крови при лечении вирусных гепатитов у человека [15]. Первые работы, в которых описывалось применение клеток костного мозга для лечения как хронических, так и острых заболеваний печени, появились в 2005 году. Am Esch II и соавт. показали, что трансплантация аутологичных CD133⁺-клеток костного мозга в левую ветвь портальной вены при одновременной эмболизации правой ускоряла регенерацию левой доли печени после резекции правой доли по поводу рака в 2,5 раза [16; 17].

В большинстве исследований эффективность трансплантации стволовых клеток оценивали по уровню нормализации лабораторных показателей, а также по изменению выраженности асцита

и тяжести цирроза печени по шкале Чайлд-Пью и индексу MELD1. Трансплантация аутологичных стволовых клеток костного мозга с фенотипом CD34⁺ и CD133⁺ больным хроническими гепатитами различной этиологии сопровождалась положительной динамикой функциональных проб печени [18–22]. В двух других исследованиях (4 и 8 пациентов) эффективность трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга оценили по улучшению индекса MELD [23; 24]. Исследование Луга и соавт., проведенное на 10 пациентах с циррозом печени (алкогольным, холестатическим, криптогенным и вызванным гепатитом С), с введением 20 мл обогатщенной мононуклеарами суспензии клеток костного мозга в печеночную артерию показало уменьшение сывороточного билирубина и МНО и увеличение уровня альбумина в крови [25]. В 2010 году эта же группа исследователей провела рандомизированное контролируемое исследование эффективности трансплантации клеток костного мозга. Дизайн эксперимента остался прежним, увеличилось количество больных и появилась контрольная группа, получавшая плацебо. Через 3 месяца после трансплантации исследователи наблюдали повышение уровня альбумина по сравнению с контролем (16% против 2%) и уменьшение тяжести цирроза печени по шкале Чайлд-Пью (–8% против +4%). Изменений показателя МНО при сравнении двух групп пациентов не было выявлено [26].

На основании имевшихся на момент начала нашего клинического исследования данных по проводимым в мире клиническим исследованиям было получено разрешение Этического комитета Министерства здравоохранения Республики Татарстан на проведение ограниченных клинических испытаний применения аутологичных гемопоэтических клеток в лечении хронических гепатитов.

Первые результаты применения аутологичных гемопоэтических стволовых клеток для лечения цирроза печени были получены нашей группой на небольшом количестве пациентов (3 человека) со сроком наблюдения 1 месяц после аутотрансплантации. Предварительные результаты и выводы данного этапа были опубликованы в журнале «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия» в 2008 году [27]. На сегодняшний день в клиническом исследовании находятся 12 пациентов, наблюдение за которыми проводится в течение 12 месяцев после трансплантации аутологичных стволовых клеток периферической крови.

Целью нашего исследования было изучить безопасность и эффективность применения аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в лечении

¹ MELD (Model for End-Stage Liver Disease) — модель конечной стадии заболевания печени.

хронических заболеваний печени на примере алкогольного цирроза печени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Протокол исследования был одобрен Ученым советом Казанского государственного медицинского университета и Этическим комитетом Министерства здравоохранения Республики Татарстан. У каждого пациента до начала исследования было получено добровольное информированное согласие на проведение исследования. Пациенты проходили лечение и находились под наблюдением в гастроэнтерологическом отделении Республиканской клинической больницы (РКБ).

В настоящее время в клиническом исследовании находятся 12 пациентов в возрасте от 34 до 67 лет — 10 мужчин и 2 женщины.

Критерии включения пациентов в исследование:

- пациенты в возрасте от 19 до 65 лет, ознакомившиеся с информацией об исследовании и подписавшие добровольное информированное согласие;
- цирроз печени алкогольной этиологии, класс А или В по Чайлд-Пью.

Критерии исключения:

- тяжелая сопутствующая патология;
- прием алкоголя не меньше чем за 6 месяцев до трансплантации стволовых клеток.

До начала исследования пациентам проводилось полное обследование, включающее общий анализ крови и мочи, коагулограмму, функциональные пробы печени, иммунограмму, определение вирусных маркеров, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, фиброэзофагогастродуоденоскопию, электрокардиографию, рентгенографию органов грудной полости и биопсию печени.

После этого в течение пяти дней пациентам производили подкожные инъекции рекомбинантного препарата гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSF (нейпоген) в дозе 480 мкг под ежедневным контролем общего анализа крови. На пятый день стимуляции проводили процедуру лейкафереза на клеточном сортере MSC+ (Haemonetics, США), в результате чего получали конечный продукт — лейкоцитарную массу, обогащенную клетками-предшественниками гемопоэза. Часть объема полученного продукта использовали для подсчета общего числа лейкоцитов и CD34⁺ клеток¹ методом проточной цитометрии на базе лаборатории РКБ МЗ РТ. Анализ выделенных клеток показал, что среднее содержание ядросодержащих мононуклеаров составило $32,5 \times 10^6$ в 1 мл. 40 мл клеточного концентрата в течение трех часов после выделения вводили в чревный ствол пациента

(рис. 1 на цветной вклейке). Введение клеток в чревный ствол прошло без осложнений. Повторные биопсии печени проводили через 3 и 12 месяцев после трансплантации.

Биоптаты печени фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, заливали в парафин по стандартной методике², окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином и иммуногистохимически [28] с помощью системы визуализации *Novolink* с коммерческими моноклональными антителами против:

1. CD34 — маркера эндотелиальных и кроветворных стволовых клеток (клон QBEnd/10, *Novocastra, UK*, разведение 1:75);

2. α -SMA — альфа-гладкомышечного актина (α -ГМА), маркера миофибробластов (клон 1A4, *Dako, Denmark*, разведение 1:100);

3. Bcl-2 — антиапоптотического белка, одного из маркеров стволовых и прогениторных клеток (клон 124, *Dako, Denmark*, разведение 1:10).

Синусоиды печени являются уникальными по своему строению и функции кровеносными сосудами. Уникальность эта определяется тем, что эндотелий синусоидов не имеет базальной мембраны, обязательно присутствующей во всех других капиллярах, и не экспрессирует на своей поверхности маркер эндотелия — гликопротеин CD34. Между эндотелиальной выстилкой и гепатоцитами имеется щель — пространство Диссе. В этом пространстве откладывается коллаген при развитии перисинусоидального фиброза, формируется подобие базальной мембраны и нарушается обмен веществ между кровью и гепатоцитами, то есть происходит трансформация синусоидов печени в капилляры [29–31]. Этот процесс получил название «капилляризация» синусоидов. Изменение фенотипа эндотелиальных клеток приводит к появлению на их поверхности рецептора к CD34 и, следовательно, позволяет нам судить о нарушениях гемодинамики в печени на микроструктурном уровне.

α -ГМА — это сократительный белок гладкомышечных клеток, перицитов, миоэпителиальных клеток и миофибробластов. В здоровой печени этот белок находится в гладкомышечных клетках сосудов печени. При хроническом повреждении печени звездчатые клетки и портальные фибробласты последовательно дифференцируются/трансдифференцируются из покоящихся клеток в активированные, а затем в миофибробласты [32]. α -ГМА является маркером миофибробластов, которые активно синтезируют макромолекулы межклеточного матрикса, в том числе коллагены, что приводит к развитию и прогрессированию фиброза в печени.

Bcl-2 — антиапоптотический белок, один из маркеров стволовых и прогениторных клеток. Экспрессия Bcl-2 рассматривается также в качестве одного из признаков опухолевой трансформации

¹ CD34 — наиболее известный и надежный маркер гемопоэтических стволовых клеток.

² Данный раздел работы проводился на базе патологоанатомического отделения РКБ.

клеток. Выбор данного маркера связан с тем, что во многих случаях хронического поражения печени апоптоз является значимым механизмом гибели клеток. С другой стороны, зачастую в исходе такого заболевания развивается первичный рак печени. Кроме того, применение клеточных технологий, связанных со стволовыми клетками, нередко рассматривают с позиции риска развития опухоли в результате трансплантации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функциональные пробы печени, которые являются наиболее распространенным методом оценки состояния органа, не всегда позволяют определить степень и характер повреждения паренхимы. Современный подход к диагностике заболеваний печени предусматривает необходимость морфологического анализа биоптатов печени с обязательной оценкой степени активности и стадии патологического процесса и позволяет прогнозировать течение гепатита, выявлять механизмы повреждения и контролировать эффективность терапии, в данном случае терапии стволовыми клетками.

Как уже было сказано ранее, в нашей работе мы анализировали биоптаты печени и оценивали морфологическую картину на трех различных сроках: до введения аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, через 3 и 12 месяцев после трансплантации.

При окраске биоптатов печени пикрофуксин по Ван-Гизону и гематоксилин-эозином у всех больных мы наблюдали картину алкогольного стеатогепатита, которая включает в себя стеатоз (микро-, макровезикулярный и смешанный), наличие внутридольковых и портальных воспалительных инфильтратов, состоящих из нейтрофилов и мононуклеарных клеток, а также повреждение гепатоцитов преимущественно в 3-й зоне ацинуса и области перисинусоидального фиброза [33] (рис. 2 на цветной вклейке).

До трансплантации стволовых клеток индекс гистологической активности (ИГА) колебался в пределах 10–14 баллов, что соответствует умеренному и тяжелому хроническому гепатиту. При сравнительном анализе ИГА через 3 месяца после трансплантации практически у всех больных произошло снижение ИГА на 2 балла, в числовом выражении ИГА находился в интервалах 8–12 баллов (слабовыраженный и умеренный хронический гепатит). Через 12 месяцев после аутотрансплантации фракции мононуклеаров периферической крови при анализе биоптатов печени мы наблюдали увеличение ИГА в среднем на 2 балла, что свидетельствует о некотором ухудшении морфологической картины печени и возвращении к первоначальному уровню.

При анализе индекса фиброза мы наблюдали схожую картину: до трансплантации у 4 из 12 пациентов исследуемой группы был диагностирован цирроз, у 8 других пациентов — разные степени

фиброза. Через 3 месяца после трансплантации морфологический диагноз цирроза был выставлен только 2 пациенту, через 12 месяцев — 3 пациентам.

Одним из важнейших механизмов формирования фиброза печени является капилляризация синусоидов, которая отражает прогрессирование фиброза, сопровождается нарушением обменных процессов между кровью и гепатоцитами и экспрессией CD34 [34]. у пациентов исследуемой группы до трансплантации CD34⁺-клетки локализовались преимущественно в области портальных трактов и перипортальных инфильтратов. Кроме этого, окрашивались клетки в области порто-портальных и порто-центральных септ, а также единичные клетки в паренхиме печени. Через 3 месяца после трансплантации в синусоидах обнаруживали лишь единичные CD34⁺ эндотелиальные клетки, то есть эндотелий приобретал свойственный ему в норме фенотип. Через 12 месяцев после трансплантации стволовых клеток количество CD34-позитивных клеток вновь увеличивалось, но не достигало первоначального уровня (то есть до трансплантации) (рис. 3 на цветной вклейке).

Фиброз печени — это одна из причин развития печеночной недостаточности при ее хроническом повреждении. Накопление белков внеклеточного матрикса при фиброзе и циррозе происходит за счет активации фибробластов, которые, приобретая фенотип миофибробластов, начинают синтезировать компоненты соединительной ткани. Выраженность фиброза зависит от количества α-ГМА-позитивных миофибробластов. До трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у всех пациентов миофибробласты были обнаружены в составе соединительнотканых септ; это указывало на продолжающийся синтез компонентов соединительной ткани и прогрессирование фиброза. После трансплантации стволовых клеток количество миофибробластов существенно уменьшилось: немногочисленные α-ГМА-позитивные клетки локализовались только в пределах уже сформированных соединительнотканых септ, в основном же α-ГМА присутствовал в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов.

Учитывая, что миофибробласты являются основным источником соединительной ткани в регенерирующей печени, уменьшением их числа можно объяснить восстановление нормальной структуры синусоидных капилляров и обратное развитие перисинусоидального фиброза. Через 12 месяцев вновь нарастало число α-ГМА⁺-клеток, их можно было видеть как в септах, так и в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов, однако, их количество не достигало начального уровня (рис. 4 на цветной вклейке).

В биоптатах печени больных алкогольным циррозом до трансплантации обнаружено значительное



число Vcl-2-позитивных клеток, которые были локализованы как в паренхиме печени, так и в инфильтратах вокруг портальных трактов. В крупных инфильтратах число Vcl-2-позитивных клеток было максимальным, среди них можно было выделить три типа клеток: клетки воспалительного инфильтрата с округлым или овальным ядром, клетки с отростками (синусоидные клетки) и единичные гепатоциты. В паренхиме и в мелких инфильтратах преобладали клетки с отростками; наблюдалась слабая экспрессия Vcl-2 в холангиоцитах. Через 3 месяца после трансплантации на фоне улучшения морфологической картины печени наблюдалось снижение экспрессии Vcl-2: в крупных инфильтратах число Vcl-2-позитивных клеток уменьшалось, в мелких — клетки не обнаруживались. Через 12 месяцев после трансплантации мы наблюдали все три типа клеток, как и в первичных биопсиях: их число не достигало первоначального уровня, однако превышало число клеток на сроке 3 месяца после трансплантации (рис. 5 на цветной вклейке).

Поскольку экспрессия Vcl-2 рассматривается как один из признаков опухолевой трансформации клеток, уменьшение количества Vcl-2⁺-клеток позволяет предположить, что в наблюдаемые нами сроки трансплантация гемопоэтических стволовых клеток не приводит к развитию опухолевого процесса в печени, а, наоборот, снижает риск канцерогенеза.

ОБСУЖДЕНИЕ

До начала нашей работы в мире были проведены эксперименты на животных и первые фазы клинических исследований, в которых авторы проводили попытки трансплантации стволовых клеток при заболеваниях печени различной этиологии. В отличие от этих работ наше исследование имеет ряд преимуществ.

Во-первых, это касается способа трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В работе S. Terai и соавт. [19; 22–24; 35] стволовые клетки пациентам при хронических гепатитах вводили в периферический кровоток, и тогда большая часть клеток «размывалась» по организму, если же стволовые клетки вводились в воротную вену [16; 24; 36; 37], то все клетки поступали в печень с венозной кровью.

В других работах зарубежных авторов [26; 38–41] введение стволовых клеток пациентам с циррозом печени как в печеночную артерию, так и в портальную вену описывается как безопасная и эффективная процедура. Однако в работе M. Mohamadnejad и соавт. после введения CD34⁺-клеток в печеночную артерию 4 больным с декомпенсированным циррозом печени у одного больного в течение нескольких дней после процедуры развились радиоконтрастная нефропатия и гепаторенальный синдром, которые стали причиной его летального исхода. Исходя из этого, исследователи сделали вывод, что введение

CD34⁺-клеток в печеночную артерию больным в стадии декомпенсированного цирроза небезопасно [20].

Что касается введения клеток в воротную вену, то оно также небезопасно на фоне портальной гипертензии у пациентов с циррозом печени и может привести к внутреннему кровотечению в месте введения иглы. Исходя из этого, было сделано предположение о том, что наиболее безопасным будет введение клеток не в воротную вену, а в артериальный кровоток. Стволовые клетки вводили непосредственно в чревной ствол, что должно было, по нашему мнению, обеспечить доставку трансплантированных клеток в печень как с артериальным, так и с венозным кровотоком: часть клеток сразу попадала в печень по общей печеночной артерии, оставшаяся часть клеток, которая ушла к желудку и к селезенке, попадала в печень с венозной кровью через воротную вену.

Учитывая, что кровь в печень поступает по двум сосудам: воротной вене (венозная кровь от всех непарных органов брюшной полости) и печеночной артерии (артериальная кровь из аорты), преимуществом такого метода введения, по нашему мнению, является не только его безопасность, но и возможность воздействовать стволовыми клетками на разные участки печеночной долики.

Другой особенностью нашего исследования является способ оценки эффективности проведенной трансплантации. В большинстве работ, в которых использовались стволовые клетки для лечения циррозов печени, эффективность трансплантации оценивалась по биохимическим показателям, таким как уровень билирубина, альбумина, общего белка, АЛТ, АСТ и протромбинового времени, а также по изменению выраженности асцита и тяжести цирроза печени по шкале Чайлд-Пью и индексу MELD. Однако уровни аминотрансфераз не отражают гистологические изменения в печени и не имеют прогностической значимости [42]. В нашей работе в отличие от других клинических исследований мы использовали методы иммуногистохимической оценки эффективности трансплантации.

Третье отличие нашей работы заключается в сроках наблюдения за пациентами после трансплантации. В работе S. Terai срок наблюдения за пациентами составлял 6 месяцев, причем они исследовали биопсии печени только на двух сроках: до трансплантации клеток костного мозга и через 4 недели после трансплантации. Иммуногистохимически авторы оценивали экспрессию альфа-фетопротейна и PCNA1 и обнаружили значительное усиление экспрессии этих маркеров в ткани печени через 4 недели после трансплантации клеток костного мозга в периферическую вену [19]. Проведены лишь единичные исследования со сроками наблюдения после трансплантации большими, чем в нашей

¹ PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen) — ядерный антиген пролиферирующих клеток.

работе, однако в этих исследованиях оценивались только клинические и лабораторные показатели [35; 43].

ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в чревный ствол пациентам с алкогольным циррозом печени является эффективной и безопасной процедурой и не наносит вреда здоровью пациентов. Трансплантированные стволовые клетки способны восстанавливать структуру эндотелия синусоидов, уменьшая выраженность их капилляризации. Параллельно этому сокращается число Vcl-2-позитивных клеток, что указывает на уменьшение риска канцерогенеза в печени. Полученные результаты позволяют говорить о перспективности данного метода лечения для

подавления фиброгенеза в печени, а также о высокой информативности иммуногистохимических методов в оценке эффективности трансплантации. Вместе с тем некоторое ухудшение морфологических показателей через 12 месяцев после трансплантации клеток предполагает необходимость повторного введения клеток в течение года после первой процедуры.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследования проведены в рамках республиканской программы «Развитие клеточной медицины в Республике Татарстан» на базе Республиканской клинической больницы МЗ РТ и частично поддержаны грантом Президента РФ для молодых ученых (МК-7805.2010.7).

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption. Meeting 2nd. World Health Organization technical report series; No. 944. — 2006.
2. Global strategy to reduce the harmful use of alcohol. World Health Organization, 2010.
3. Crabb D.W. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology / D.W. Crabb, M. Matsumoto, D. Chang et al. // Proc. Nutr. Soc. — 2004. — Vol. 63. — P. 49–63.
4. Хазанов А.И. Эволюция этиологических факторов циррозов печени по результатам 58-летних наблюдений за больными в крупном многопрофильном стационаре / А.И. Хазанов // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 2004. — Т. 14, № 3 — С. 66–72.
5. Petersen B.E. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells / B.E. Petersen, W.C. Bowen, K.D. Patrene et al. // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 1168–1170.
6. Lagasse E. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo* / E. Lagasse, H. Connors, M. Al-Dhalimy et al. // Nat. Med. — 2000. — Vol. 6, № 11. — P. 1229–1234.
7. Theise N.D. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation / N.D. Theise, S. Badve, R. Saxena et al. // Hepatology. — 2000. — Vol. 31, № 1. — P. 235–240.
8. Theise N.D. Liver from bone marrow in humans / N.D. Theise, M. Nimmakayalu, R. Gardner et al. // Hepatology. — 2000. — Vol. 32. — P. 11–16.
9. Jiang Y. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow / Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt et al. // Nature. — 2002. — Vol. 418. — P. 41–49.
10. Alison M.R. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells / M.R. Alison, R. Poulsom, R. Jeffery et al. // Nature. — 2000. — Vol. 406, № 6793. — P. 257.
11. Румянцев А.Г. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: Руководство для врачей / А.Г. Румянцев, А.А. Масчан — М.: Медицинское информационное агентство, 2003. — 912 с.
12. Fujii H. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice / H. Fujii, T. Hirose, S. Oe et al. // J Hepatol. — 2002. — Vol. 36, № 5. — P. 653–659.
13. Masson S. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review / S. Masson, D.J. Harrison J.N. Plevris et al. // Stem cells. — 2004. — Vol. 22, № 6. — P. 897–907.
14. Kakinuma S. Human Umbilical Cord Blood as a Source of Transplantable Hepatic Progenitor Cells / S. Kakinuma, Y. Tanaka, R. Chinzeia et al. // Stem Cells. — 2003. — Vol. 21. — P. 217–227.
15. Tang X.P. Clinical and experimental study on therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation on severe viral hepatitis / X.P. Tang, X. Yang, H. Tan et al. // World J. Gastroenterol. — 2003. — Vol. 9, № 9. — P. 1999–2003.
16. Am Esch II J.S. Portal application of autologous CD133⁺ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration / J.S. Am Esch, W.T. Knoefel, M. Klein et al. // Stem Cells. — 2005. — Vol. 23, № 4. — P. 463–470.
17. Am Esch II J.S. Infusion of CD133⁺ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study / J.S. Am Esch II, M. Schmelzle, G. Furst et al. // Ann. Surg. — 2012. — Vol. 255, № 1. — P. 79–85.
18. Gordon M.Y. Characterization and clinical application of human CD34⁺ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor / M.Y. Gordon, N. Levicar, M. Pai et al. // Stem Cells. — 2006. — Vol. 24, № 7. — P. 1822–1830.
19. Terai S. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy / S. Terai, T. Ishikawa, K. Omori et al. // Stem Cells. — 2006. — Vol. 24. — P. 2292–2298.
20. Mohamadnejad M. Phase I human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis / M. Mohamadnejad, M. Namiri, M. Bagheri et al. // World J. Gastroenterol. — 2007. — Vol. 13, № 24. — P. 3359–3363.
21. Khan A.A. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study / A.A. Khan, N. Parveen, V.S. Mahaboob et al. // Transp. Proc. — 2008. — Vol. 40, № 4. — P. 1140–1144.
22. Kim J.K. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis / J.K. Kim, Y.N. Park, J.S. Kim et al. // Cell Transp. — 2010. — Vol. 19, № 10. — P. 1237–1246.
23. Mohamadnejad M. Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis / M. Mohamadnejad, K. Alimoghaddam, M. Mohyeddin-Bonab et al. // Arch. Iranian Med. — 2007. — Vol. 10, № 4. — P. 459–466.
24. Kharaziha P. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial / P. Kharaziha, P.M. Hellstrom, B. Noorinayer et al. // Eur. J. Gastroenterol. and Hepatol. — 2009. — Vol. 21, № 10. — P. 1199–1205.
25. Lyra A.C. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease / A.C. Lyra, M.B. Soares, L.F. da Silva et al. // World J. Gastroenterol. — 2007. — Vol. 13, № 7. — P. 1067–1073.
26. Lyra A.C. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study / A.C. Lyra, M.B. Soares, L.F.M. Da Silva et al. // Eur. J. Gastroenterol. and Hepatol. — 2010. — Vol. 22, № 1. P. 33–42.
27. Киясов А.П. Трансплантация аутогенных гемопоэтических стволовых клеток больным хроническими гепатитами / А.П. Киясов, А.Х. Одицова, А.А. Гумерова и соавт. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2008. — Т. III, № 1. — С. 70–75.
28. Киясов А.П. Современные технологии морфологических исследований: методическое пособие для студентов, аспирантов и врачей-патологов / А.П. Киясов. — Казань: КГМУ, 2001. — 38 с.
29. Mulhall B.P. Nonalcoholic steatohepatitis / B.P. Mulhall, Z.M. Younossi // Curr. Treat. Options Gastroenterol. — 2004. — Vol. 7, № 6. — P. 423–430.

30. Koruk M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis / M. Koruk, S. Taysi, M.C. Savas et al. // *Ann. Clin. Lab. Sci.* — 2004. — Vol. 34, № 1. — P. 57–62.
31. Fierbinteanu-Braticevici C. The risk factors of fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis / C. Fierbinteanu-Braticevici, A. Bengus, M. Neamtu et al. // *Rom. J. Intern. Med.* — 2002. — Vol. 40, № 1–4. — P. 81–88.
32. Газизов И.М. Изменение микроархитектоники печени и активация в ней стволовых клеток после частичной гепатэктомии у крыс: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / И.М. Газизов; Казанский гос. мед. университет. — Казань, 2009. — 20 с.
33. Tiniakos D.G. Liver biopsy in alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis patients / D.G. Tiniakos // *Gastroenterol Clin Biol.* — 2009. — Vol. 33, № 10–11. — P. 930–939.
34. Одинцова А.Х. Патогенетические механизмы клеточных реакций перисинусоидального фиброза при неалкогольной жировой болезни печени: автореф. дис. на соискание научной степени канд. мед. наук / А.Х. Одинцова; Казанский гос. мед. университет. — Казань, 2005. — 20 с.
35. Yannaki E. Lasting amelioration in the clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis with boost infusions of mobilized peripheral blood stem cells / E. Yannaki, A. Anagnostopoulos, D. Kapetanos et al. // *Exp. Hematol.* — 2006. — Vol. 34, № 11. — P. 1583–1587.
36. Gasbarrini A. Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. / A. Gasbarrini, G.L. Rapaccini, S. Rutella et al. // *Dig. Liver Dis.* — 2007. — Vol. 39, № 9. — P. 878–882.
37. Furst G. Portal vein embolization and autologous CD133⁺ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience / G. Furst, J.S. Am Esch, L.W. Poll et al. // *Radiology.* — 2007. — Vol. 243, № 1. — P. 171–179.
38. Salama H. Autologous CD34⁺ and CD133⁺ stem cells transplantation in patients with end stage liver disease / H. Salama, A.R. Zekri, A.A. Bahnassy et al. // *World J. Gastroenterol.* — 2010. — Vol. 16, № 42. — P. 5297–5305.
39. Gupta D.K. Stem cells as a therapeutic modality in pediatric malformations / D.K. Gupta, S. Sharma, P. Venugopal et al. // *Transp. Proc.* — 2007. — Vol. 39, № 3. — P. 700–702.
40. Pai M. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34⁺ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis / M. Pai, D. Zacharoulis, M. N. Milicevic et al. // *Am. J. Gastroenterol.* — 2008. — Vol. 103, № 8. — P. 1952–1958.
41. Yan L. Peripheral blood monocytes from patients with HBV related decompensated liver cirrhosis can differentiate into functional hepatocytes / L. Yan, Y. Han, J. Wang et al. // *Am. J. Hematol.* — 2007. — Vol. 82, № 11. — P. 949–954.
42. Sougioultzis S. Alcoholic hepatitis: from pathogenesis to treatment / S. Sougioultzis, E. Dalakas, P.C. Hayes et al. // *Curr. Med. Res. Opin.* — 2005. — Vol. 21, № 9. — P. 1337–1346.
43. Levicar N. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34⁺ cells in patients with chronic liver disease / N. Levicar, M. Pai, N. A. Habib et al. // *Cell. Proliferation.* — 2008. — Vol. 41, № 1. — P. 115–125.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ

CD34, α -SMA И VCL-2 КАК МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫМ АЛКОГОЛЬНЫМ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

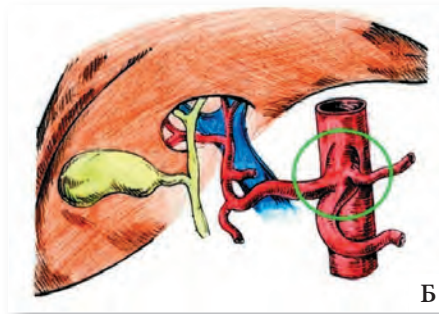
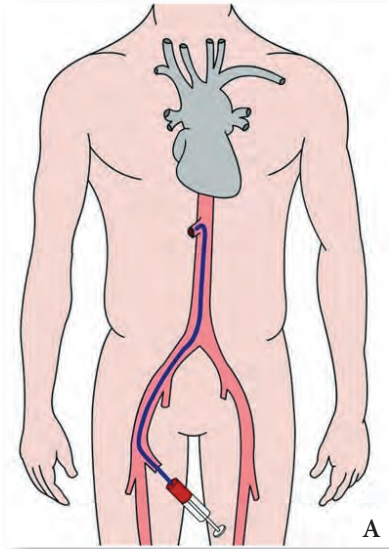


Рис. 1. Схематичное изображение места введения CD34+ фракции мононуклеаров в чревный ствол.

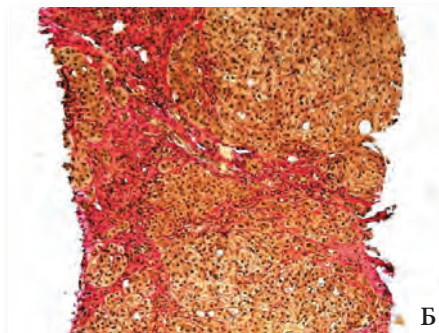
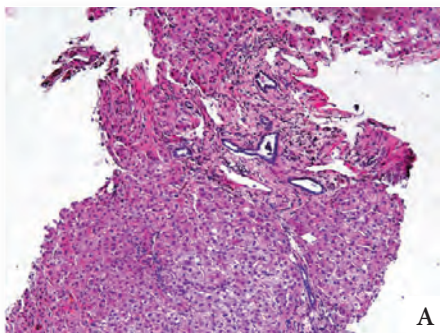


Рис. 2. Окраска биоптатов печени: А — гематоксилин-эозином; Б — пикрофуксином по Ван-Гизону; $\times 100$.

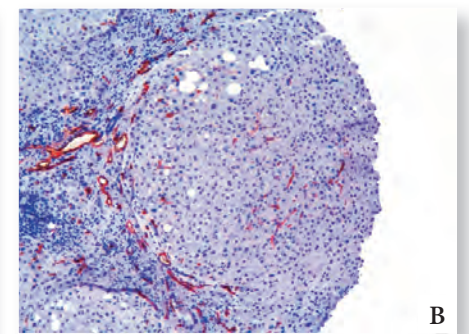
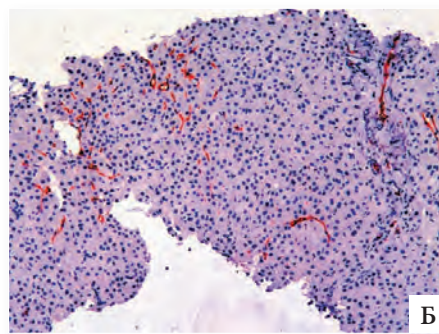
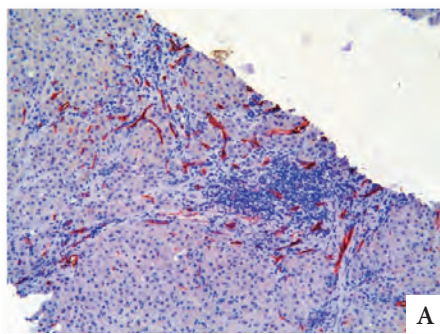


Рис. 3. Капилляризация синусоидов: А — до трансплантации; Б — через 3 месяца после трансплантации; В — через 12 месяцев после трансплантации. Окрашивание с антителами к CD34 (продукт иммуногистохимической реакции — красного цвета), $\times 100$.

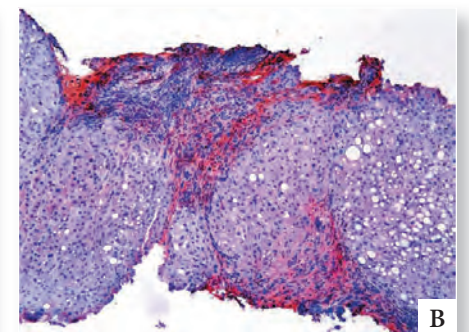
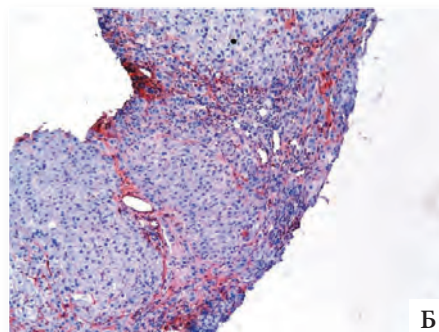
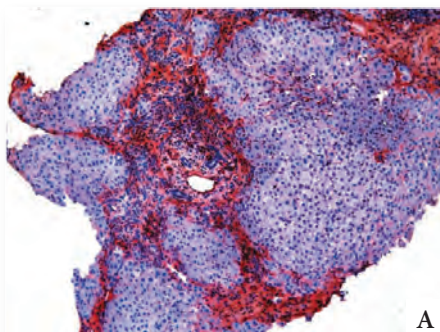


Рис. 4. Трансдифференцировка звездчатых клеток в миофибробласты (α -ГМА): А — до трансплантации; Б — через 3 месяца после трансплантации; В — через 12 месяцев после трансплантации. Окрашивание с антителами к α -ГМА (продукт иммуногистохимической реакции — красного цвета), $\times 100$.

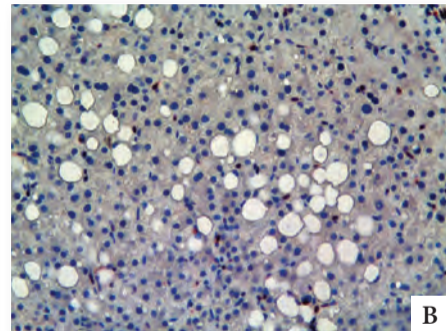
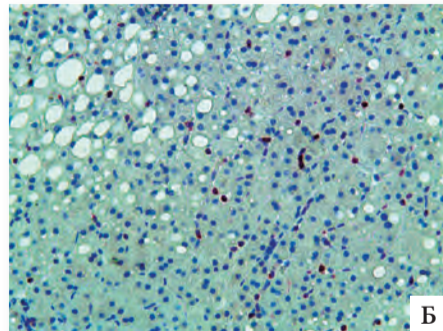
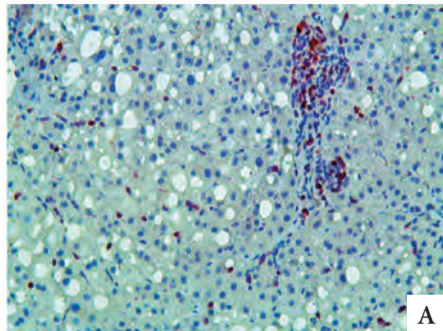


Рис. 5. Антиапоптотическая активность клеток печени (Bcl-2): А — до трансплантации; Б — через 3 месяца после трансплантации; В — через 12 месяцев после трансплантации. Окрашивание с антителами к Bcl-2 (продукт иммуногистохимической реакции — красного цвета), $\times 200$.