

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участие клеток Ито в гистогенезе и регенерации печени

А.А. Гумерова, А.П. Киясов, М.С. Калигин, И.М. Газизов, С.Р. Абдулхаков,
Д.И. Андреева, М.А. Титова, Т.С. Сметанникова

Кафедра нормальной анатомии, Казанский государственный медицинский университет

Participation of Ito-cells in histogenesis and regeneration of the liver

A.A. Gumerova, A.P. Kiasov, M.S. Kaligin, I.M. Gazizov, S.R. Abdulkhakov, D.I. Andreeva, M.A. Titova, T.S. Smetannikova

Department of Normal Anatomy, Kazan State Medical University

В последнее десятилетие опубликован не один десяток работ, свидетельствующих о возможности образования гепатоцитов из кроветворных стволовых клеток, имеющих, как известно, мезенхимальное происхождение. В настоящей работе проведен анализ вероятности развития эпителия печени из других источников, не жели энтодерма. Ключевые этапы дифференцировки эпителиальных и синусоидных клеток печени в ходе её нормального онтогенеза и регенерации у человека и крысы изучены иммуногистохимически с использованием широкой панели моноклональных антител к маркерам эпителиальных, мезенхимальных и стволовых клеток и апоптоза. Результаты исследования позволяют сделать вывод, что одним из источников развития гепатоцитов могут быть десмин-позитивные мезенхимальные клетки, а следовательно, что перисинусоидальные клетки печени — основной претендент на роль стволовой клетки этого органа.

Ключевые слова: клетки Ито, печень, регенерация.

Устоявшаяся теория развития печени базируется на исследованиях, проведенных в середине XX века. Считается, что предшественники гепатоцитов выселяются в мезенхиму поперечной перегородки из эпителия двенадцатиперстной кишки эмбриона. Из эпителиальных клеток образуются гепатобласты/гепатоциты и холангиоциты, а из клеток мезенхимы дифференцируются синусоидные клетки [1–3]. На определенных этапах развития часть гепатобластов, расположенных вокруг сосудов, образуют так называемую протоковую пластинку, из клеток которой формируются внутрипеченочные желчные протоки [4]. Существование региональной стволовой клетки печени в настоящее время не вызывает сомнений. Традиционно считается, что она находится среди клеток мельчайших внутрипеченочных желчных протоков — канальцев Геринга, а их непосредственными потомками являются так называемые овальные клетки, обладающие свойствами бипотентности и дающие начало как гепатоцитам, так и холангиоцитам [5]. Однако в последние годы установлена возможность развития гепатоцитов из стволовой кроветворной клетки [6–8], т.е. клетки мезенхимальной, а не энтодермальной природы. В связи с этим возникает вопрос: не могут ли постоянно «прописанные» в печени клетки мезенхимального происхождения быть источником гепатоцитов в ходе развития и регенерации? Для ответа на этот вопрос было предпринято комплексное иммуногистохимическое исследование, в котором с помощью выявления широкого спектра фенотипических и дифферен-

There have been a lot of reports about differentiation possibilities of hepatocytes from hematopoietic stem cells or mesenchymal cells in the past decade.

The potential of hepatic epithelium differentiation from other sources besides entoderm has been analysed in the present study. A wide variety of monoclonal antibodies of epithelial, mesenchymal and stem cell markers and apoptosis were used to study the main stages of differentiation of epithelial and sinusoidal cells of the liver during normal ontogenesis and regeneration in human and rat. The results obtained lead to the conclusion that desmin-positive mesenchymal cells might be one of the sources of hepatocyte differentiation, with perisinusoidal cells being the most probable stem cells of the liver.

Key words: Ito-cells, liver, regeneration.

цировочных маркеров проведен детальный анализ всех этапов гисто- и органогенеза печени человека и закономерностей дифференцировки гепатоцитов. Особое внимание было уделено изучению взаимодействия печени с окружающей ее мезенхимой и сопоставлению фенотипов эпителия передней кишки и гепатоцитов. Также была изучена динамика межклеточных взаимодействий в процессе репаративной регенерации печени больных хроническими гепатитами и крыс после частичной гепатэктомии и повреждения печени нитратом свинца. Выбранные экспериментальные модели отличаются тем, что ни в том, ни в другом случае не было описано появление овальных клеток в ходе регенерации.

Материал и методы

Печень эмбрионов и плодов человека различных сроков гестации (с 4-й по 33-ю неделю пренатального развития) получали в результате легальных медицинских абортов, самопроизвольных выкидышей и индуцированных преждевременных родов по медицинским показаниям (78 образцов). Также были изучены биоптаты печени больных хроническими гепатитами (156 образцов). Во всех случаях использования для исследований тканей человека нами было получено информированное добровольное согласие родителей и больных. Регенерация у крысы изучена на двух моделях. Исследования проведены на белых лабораторных беспородных крысах — самцах. Операцию частичной гепатэктомии выполняли по методике Хиггенса и Андерсона [9]. Забой животных под

эфирным наркозом и взятие печени производили через 1, 2, 3, 5, 7 сут. после операции. Нитрат свинца вводили внутривенно однократно в хвостовую вену в дозе 100 мкМ/кг веса животного [10]. Забой животных под эфирным наркозом и извлечение печени производили через 24, 48, 72, 96, 120 часов после введения нитрата свинца.

Печень человека и крысы фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Иммуногистохимическое окрашивание срезов печени человека и крысы проводили стрептавидин-биотиновым методом [11] с использованием коммерческих моно-

клональных антител и визуализационных систем фирм DAKO (Дания) и NOVOCASTRA (Великобритания). В работе использованы антитела к эпителиальным маркерам — цитокератинам 18, 19, эпителиальному мембранному антигену (Epithelial Membrane Antigen, EMA), эпителиальному специфическому антигену (Epithelial Specific Antigen, ESA), специфическому антигену гепатоцитов (Hepatocyte Specific Antigen, HSA), билиарному гликопротеину CD66a; к мезенхимальным маркерам — виментину, десмину, альфа-гладкомышечному актину (α -SMA); к маркерам стволовых и прогениторных клеток — Vcl-2, C-kit, C-met. Также было проведено двой-

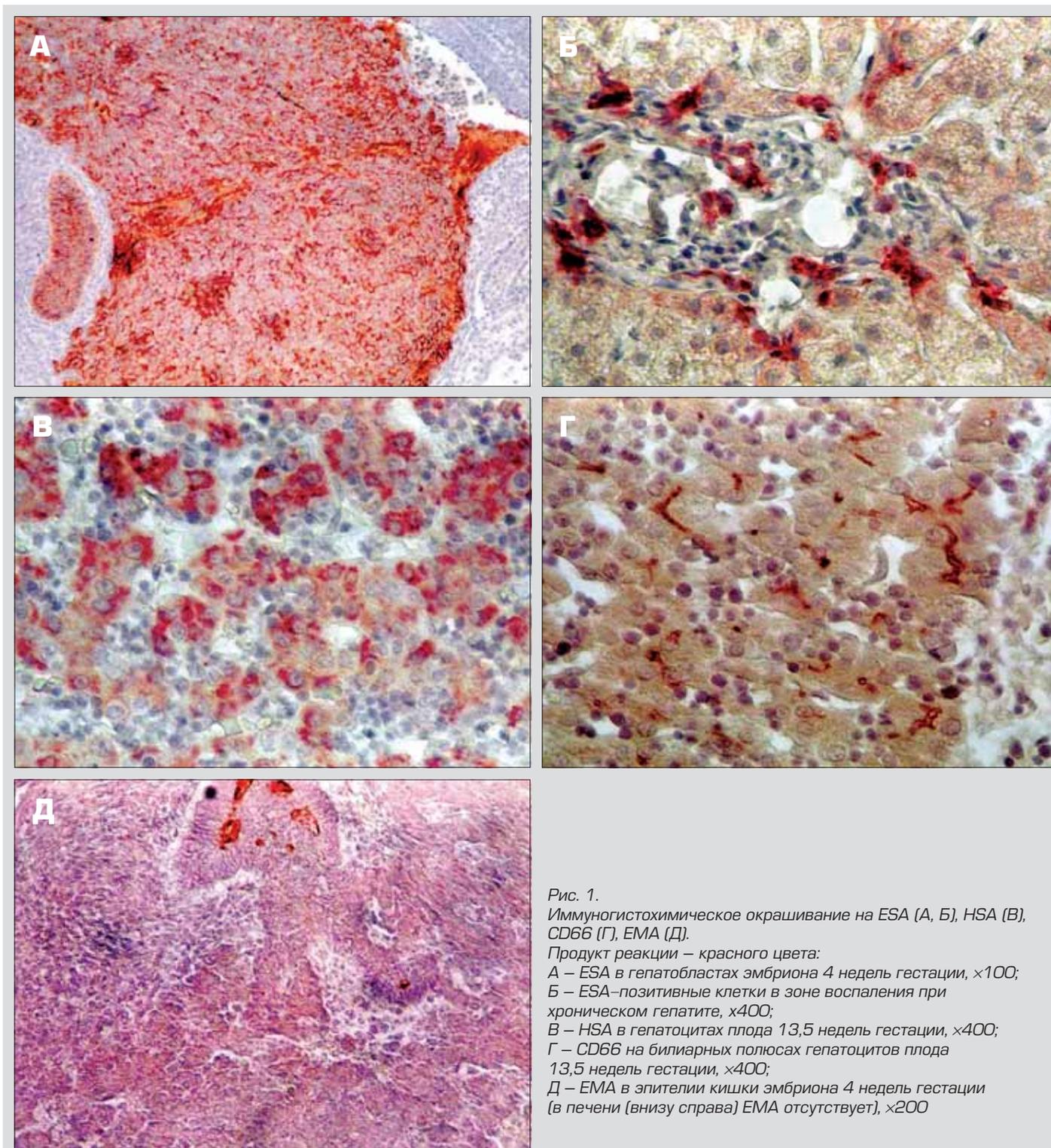


Рис. 1.
Иммуногистохимическое окрашивание на ESA (А, Б), HSA (В), CD66 (Г), EMA (Д).
Продукт реакции — красного цвета:
А — ESA в гепатобластах эмбриона 4 недель гестации, $\times 100$;
Б — ESA-позитивные клетки в зоне воспаления при хроническом гепатите, $\times 400$;
В — HSA в гепатоцитах плода 13,5 недель гестации, $\times 400$;
Г — CD66 на билиарных полюсах гепатоцитов плода 13,5 недель гестации, $\times 400$;
Д — EMA в эпителии кишки эмбриона 4 недель гестации (в печени (внизу справа) EMA отсутствует), $\times 200$

ное иммуногистохимическое окрашивание эмбриональной и плодной печени человека на десмин/цитокератины 18, 19, десмин/HSA и десмин/Vcl-2.

Результаты и обсуждение

Развитие печени человека начинается с выселения небольшого количества эпителиальных клеток из эпителия передней кишки в мезенхиму поперечной перегородки. Результаты изучения закономерностей экспрессии эпителиальных маркеров выявили различные паттерны их появления и динамики. Так, уже на 4-й неделе развития эпителиальные клетки кишки экспрессируют эпителиальный специфический антиген — ESA. Можно видеть ряды интенсивно окрашенных клеток, тянущихся от двенадцатиперстной кишки в печень. Через неделю уже практически все эпителиальные клетки печени экспрессируют этот белок (рис. 1А). Позднее, по мере дифференцировки гепатобластов, экспрессия ESA постепенно снижается, смещается к периферии печени и к крупным сосудам, а затем исчезает. В definitivo печени данный протеин присутствует только в клетках внутрипеченочных желчных протоков. Таким образом, можно заключить, что экспрессия ESA характерна для гепатобластов и незрелых гепатоцитов. Подтверждением этого является и установленная нами экспрессия ESA в регенерирующей печени человека: мы наблюдали мелкие ESA⁺ клетки в зонах некрозов и воспаления (рис. 1Б), что может отражать процесс дифференцировки стволовой клетки печени в гепатоциты. Учитывая, что ESA может экспрессироваться не только клетками энтодермы, но и клетками мезодермального эпителия [12], не исключено, что эта предполагаемая стволовая клетка может быть локализована в синусоидах печени.

Изучение динамики экспрессии специфического антигена гепатоцитов и билиарного гликопротеина CD66a позволило установить, что, появляясь на 4–5 неделях гестации, экспрессия этих протеинов нарастает, и к 13–14 неделям они присутствуют во всех гепатоцитах (рис. 1В, Г). Таким образом, данные белки появляются уже в достаточно дифференцированных гепатоцитах, и их присутствие характеризует зрелый фенотип этих клеток. Появление в регенерирующих гепатоцитах именно этих белков может быть использовано как признак завершения их дифференцировки и показатель функциональной зрелости данных клеток после повреждения печени.

Эпителиальный мембранный антиген экспрессируется в различных эпителиях преимущественно на апикальной поверхности клеток, в зрелой печени он присутствует на апикальной поверхности холангиоцитов [13]. Эпителиальные клетки передней кишки с самых ранних сроков эмбриогенеза экспрессируют этот белок. Однако ни на одном из изученных сроков гестации ЕМА не был выявлен в гепатоцитах человека (рис. 1Д). Таким образом, с ранних сроков развития основной эпителиальный клеточный тип печени — гепатоциты — имеет фенотипические отличия от энтодермального эпителия.

С другой стороны, мезенхимальные клетки в области закладки печени экспрессируют не только маркеры мезенхимальных клеток виментин и десмин, но и белки цитоскелета эпителиальных клеток — цитокератины 18 и 19. Причем последние в клетках мезенхимы и в синусоидах в момент закладки печени экспрессируются намного интенсивнее, чем в гепатобластах (рис. 2А).

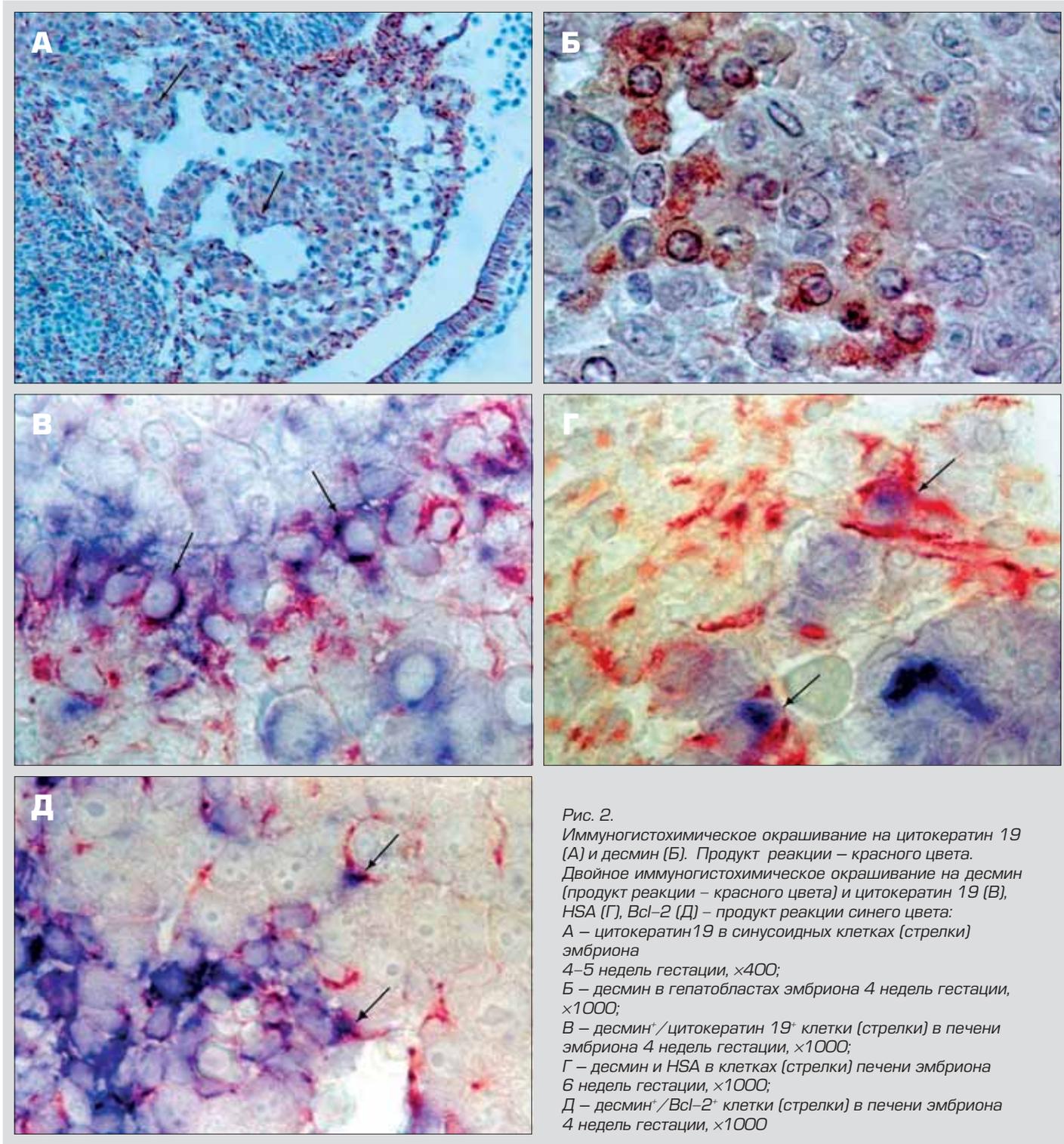
Более того, маркер перисинусоидальных клеток печени (имеющих мезодермальное происхождение) — десмин на 4–7 неделях гестации присутствует не только в перисинусоидальных клетках печени (клетках Ито) и в мезенхимных клетках поперечной перегородки, но и в гепатобластах. Уровень экспрессии десмина в последних — слабый, но

отдельные гепатобласты окрашиваются достаточно интенсивно (рис. 2Б). После седьмой недели гестации экспрессия десмина в мезенхимных и перисинусоидальных клетках человека постепенно снижается и к 12-й неделе прекращается полностью. В дальнейшем десмин в печени человека можно выявить только в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов.

Интереснейшей находкой нашего исследования стало выявление клеток, одновременно экспрессирующих десмин и цитокератины (рис. 2В). Кроме того, клетки, экспрессирующие десмин, и HSA-позитивные клетки находятся в непосредственной близости друг к другу (рис. 2Г). Поскольку HSA — белок, который ранее обнаруживался только в фетальных и зрелых гепатоцитах [14, 15], такая картина позволяет предположить, что десмин-позитивные клетки могут дифференцироваться в гепатоциты.

Установленный факт экспрессии клетками мезенхимы и синусоидными клетками печени цитокератинов, а гепатоцитами — десмина в одни и те же сроки гестации указывает на общность этих клеток и возможность трансдифференцировки одного клеточного типа в другой. Похожие результаты были получены нами ранее [16] при изучении пренатального развития печени крысы — на 11–13 дни гестации все клетки железы экспрессируют десмин, затем в цитоплазме большей части десмин⁺ клеток появляются цитокератины 8 и 18, а десмин постепенно исчезает, и клетки становятся типичными гепатобластами. Оставшаяся часть десмин⁺ клеток никуда не исчезает, они остаются в контакте с гепатобластами, а затем с гепатоцитами, и представляют собой десмин⁺ клетки Ито.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что существует альтернативный кишечной энтодерме источник развития гепатобластов, а именно — мезенхима поперечной перегородки. Более того, наличие в гепатобластах и синусоидных клетках маркера перисинусоидальных клеток печени десмина позволяет выделить конкретную популяцию клеток, развивающихся из мезенхимы, а затем дающих начало гепатоцитам. Такой популяцией, очевидно, являются перисинусоидальные клетки. В литературе имеются данные о тесной связи пролиферации овальных клеток, которые, с одной стороны, рассматриваются как потомки стволовых клеток печени [5], а с другой — ничем не отличаются от гепатобластов [17], с пролиферацией перисинусоидальных клеток [18, 19], что указывает на тесную функциональную взаимосвязь между ними. Более того, в последние годы опубликованы работы, прямо или косвенно свидетельствующие о том, что перисинусоидальные клетки могут дифференцироваться в эпителий. Так, установлено [20], что в период печеночного гемопоэза у мышей и у человека стромальные элементы микроокружения, основную массу которых составляют перисинусоидальные клетки, одновременно экспрессируют маркеры мезенхимных и эпителиальных клеток *in vitro*. Методами двойного иммуногистохимического окрашивания было показано, что покоящиеся перисинусоидальные клетки крысы и человека экспрессируют специфический маркер эпителиальных клеток E-кадгерин как *in vivo*, так и *in vitro* [21]. Также было обнаружено, что перисинусоидальные клетки человека *in vitro* [22] и перисинусоидальные клетки трески [23] экспрессируют цитокератины. Результаты ранее проведенных нами экспериментов по органотипическому культивированию эмбриональной печени крыс и по культивированию чистой популяции перисинусоидальных клеток, в которых было показано, что *in vitro* они приобретают фенотип гепатобластов/гепатоцитов, позволили впервые описать мезенхимально-эпителиальную трансформацию перисинусоидальных клеток [24], что еще больше подтверждает наши предположения.



Для выяснения стволовых потенций мезенхимных клеток печени были изучены закономерности экспрессии маркеров стволовых и прогениторных клеток в пренатальном онтогенезе печени человека и в ходе регенерации печени. Результаты изучения экспрессии маркеров прогениторных клеток показали, что почти во всех клетках мезенхимы, окружающей печень, и в большинстве её синусоидных клеток, в том числе и в десмин⁺ (рис. 2Д), происходит экспрессия антиапоптотического протеина Vcl-2 с четвертой до седьмой недели гестации включительно. Этот белок присутствовал также в единичных гепатоцитах. Очевидно, что данный паттерн экспрессии Vcl-2 (являющегося одним из маркеров прогениторных клеток) может свидетельствовать о

стволовых потенциях синусоидных клеток печени и клеток окружающей её мезенхимы, в том числе и десмин-позитивных клеток.

C-met является рецептором к фактору роста гепатоцитов (сильному митогену для этих клеток) и рассматривается в качестве одного из маркеров стволовых клеток [25]. В конце четвертой – начале пятой недели внутриутробного развития выявлена слабая экспрессия C-met в гепатобластах, причём немного интенсивнее окрашивались клетки на периферии печени (рис. 3А), особенно в области мезенхимы поперечной перегородки. На 6–8 неделях гестации экспрессия C-met в гепатоцитах становилась еще более неоднородной: более ярко окрашивались гепатобласты (рис. 3Б)

и свободно лежащие гепатоциты, тогда как в «плотно упакованных» гепатоцитах экспрессия была намного слабее. В центральных отделах печени также были выявлены $C\text{-met}^+$ клетки. Они были близки по своим морфологическим признакам к гепатоцитам, интенсивность их окрашивания была умеренной.

В эти же сроки (4–9 недель гестации) экспрессия $C\text{-met}$ была выявлена в мелких, очевидно, синусоидных, клетках, и в них она была намного более интенсивной, чем в гепатобластах и гепатоцитах. Синусоидные $C\text{-met}^+$ клетки были локализованы в основном на периферии печени, а в некоторых местах клетки образовывали кластеры (рис. 3В). Такие же клетки внутри печени можно было видеть около сосудов, но они были единичными. $C\text{-met}^+$ клетки выявлялись в синусоидах печени и в более поздние сроки пренатального развития (как минимум, до 14-й недели гестации).

В ходе регенерации печени человека мы также выявили $C\text{-met}$ -позитивные синусоидные клетки в зонах некро-воспалительных изменений (рис. 3Г). Кроме того, клетки такой же локализации и морфологии экспрессировали ESA (см. рис. 1Б).

Присутствие $C\text{-met}$ в мезенхимных клетках (интенсивная экспрессия), гепатобластах (умеренная экспрессия) и гепатоцитах (слабая экспрессия) позволяет говорить о существовании клеток с переходным фенотипом и предполагать, что синусоидные клетки, экспрессирующие $C\text{-met}$, могут быть предшественниками гепатоцитов, то есть данный протеин появляется в клетках, имеющих мезенхимное происхождение, становятся на путь дифференцировки в эпителий. Учитывая то, что $C\text{-met}$ является рецептором к фактору роста гепатоцитов, который также называют рассеивающим фактором [26, 27], можно предположить также, что экспрессирующие данный белок клетки являются подвижными и могут далее распространяться в другие области печени. По мере дифференцировки клеток экспрессия рецептора к фактору роста гепатоцитов постепенно уменьшается (о чем свидетельствует снижение интенсивности окрашивания дифференцированных клеток — гепатоцитов). Наличие единичных $C\text{-met}^+$ клеток около сосудов позволяет предполагать, что эти клетки могут поступать в печень не только из мезенхимы поперечной перегородки, но и с кровью.

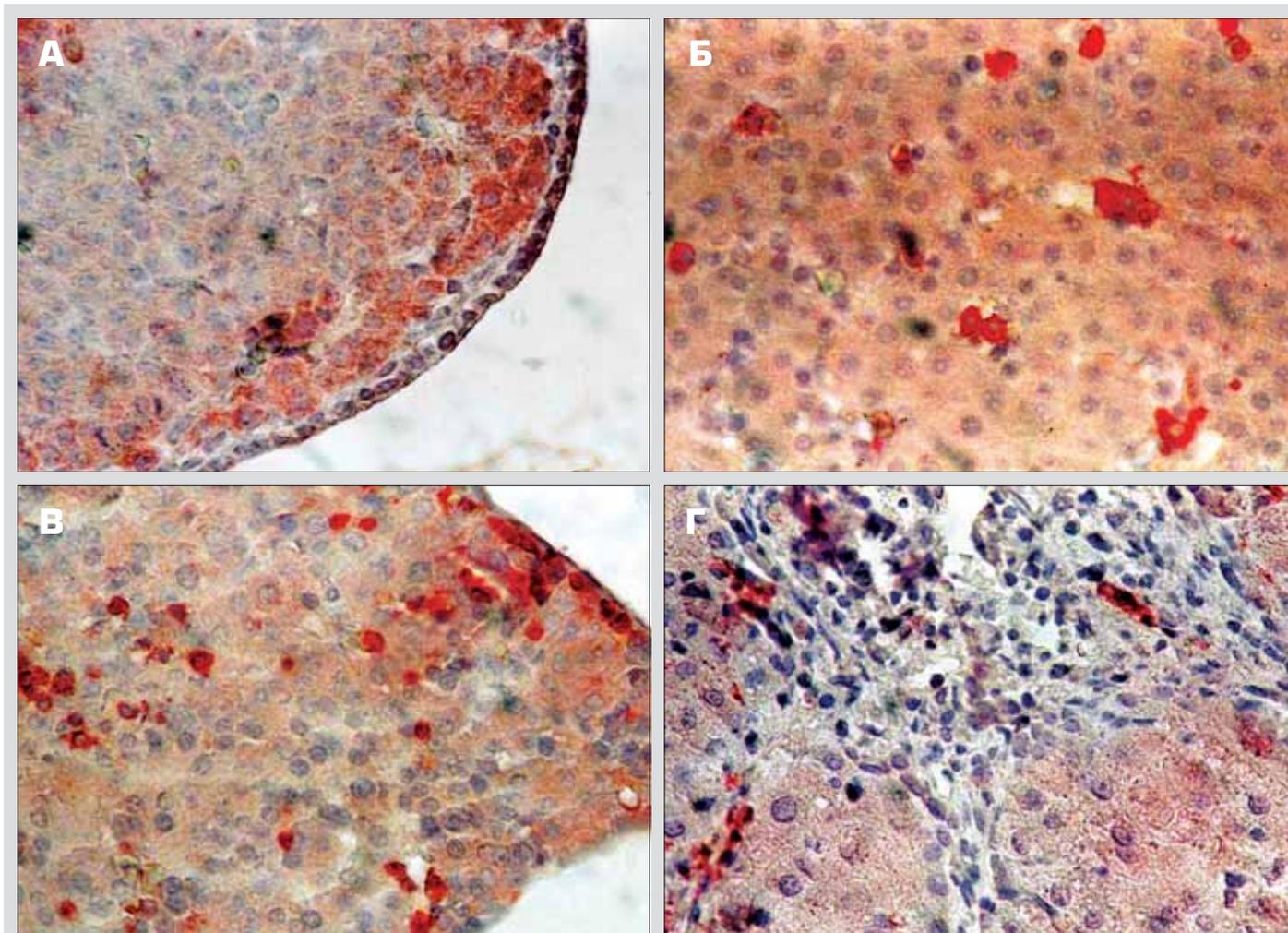


Рис. 3. Экспрессия $C\text{-met}$ в эмбриогенезе (А, Б, В) и при регенерации (Г). Продукт иммуногистохимической реакции — красного цвета, $\times 400$:

А — в гепатобластах эмбриона 4 недель гестации;

Б — в гепатобластах эмбриона 7 недель гестации;

В — видны кластеры клеток в синусоидах и на периферии печени эмбриона 7 недель гестации;

Г — в зоне воспаления при хроническом гепатите

С 4,5–5 недель гестации все гепатобласты слабо экспрессировали C-kit (CD117) — рецептор к фактору стволовых клеток, маркер кроветворных стволовых клеток. Через неделю периферия печени на границе с мезенхимой окрашивалась сильнее, а с 5,5–6 недели около сосудов появлялись ярко окрашенные единичные гепатоциты (максимальное число таких клеток выявлено на 7-й неделе гестации) и единичные отростчатые синусоидные клетки (рис. 4А). Последние сохранялись в печени на всех изученных нами сроках гестации.

Удивительной находкой стало обнаружение экспрессии C-kit в гепатоцитах регенерирующей печени крысы. Через сутки после частичной гепатэктомии можно было видеть единичные и сгруппированные гепатоциты. Их число оставалось неизменным до конца эксперимента (рис. 4Б). Через двое суток после введения нитрата свинца появлялись единичные и сгруппированные C-kit-позитивные гепатоциты, через 3 суток их число снижалось, и к 5 суткам такие клетки исчезали. Мы также обнаружили экспрессию C-kit в синусоидных клетках: через сутки после начала экспериментов выявлялись многочисленные мелкие вытянутые клетки,

экспрессирующие этот белок (рис. 4В). По мере восстановления паренхимы печени в ходе регенерации число их несколько уменьшалось.

Похожие закономерности были установлены и при изучении регенерации печени человека — C-kit-позитивные клетки выявлены в зонах портального некроза и воспаления, также экспрессия этого рецептора обнаружена в синусоидных клетках (рис. 4Г). Число C-kit⁺ клеток зависело от тяжести гепатита: оно нарастало пропорционально тяжести заболевания, достигало максимума при умеренном гепатите, а затем постепенно снижалось.

Полученные результаты, таким образом, также подтверждают стволовые потенции синусоидных клеток печени. Присутствие C-kit в гепатобластах на ранних сроках гестации (4,5–5 недели), по-видимому, указывает на чувствительность этих клеток к фактору стволовых клеток. Установлено, что выделенные из печени C-kit⁺ клетки делятся в культуре, и в них появляется альбумин [28], то есть они могут быть предшественниками гепатоцитов. Учитывая, что C-kit является маркером кроветворных стволовых клеток, можно предположить, что в период становления печеночного кроветворения

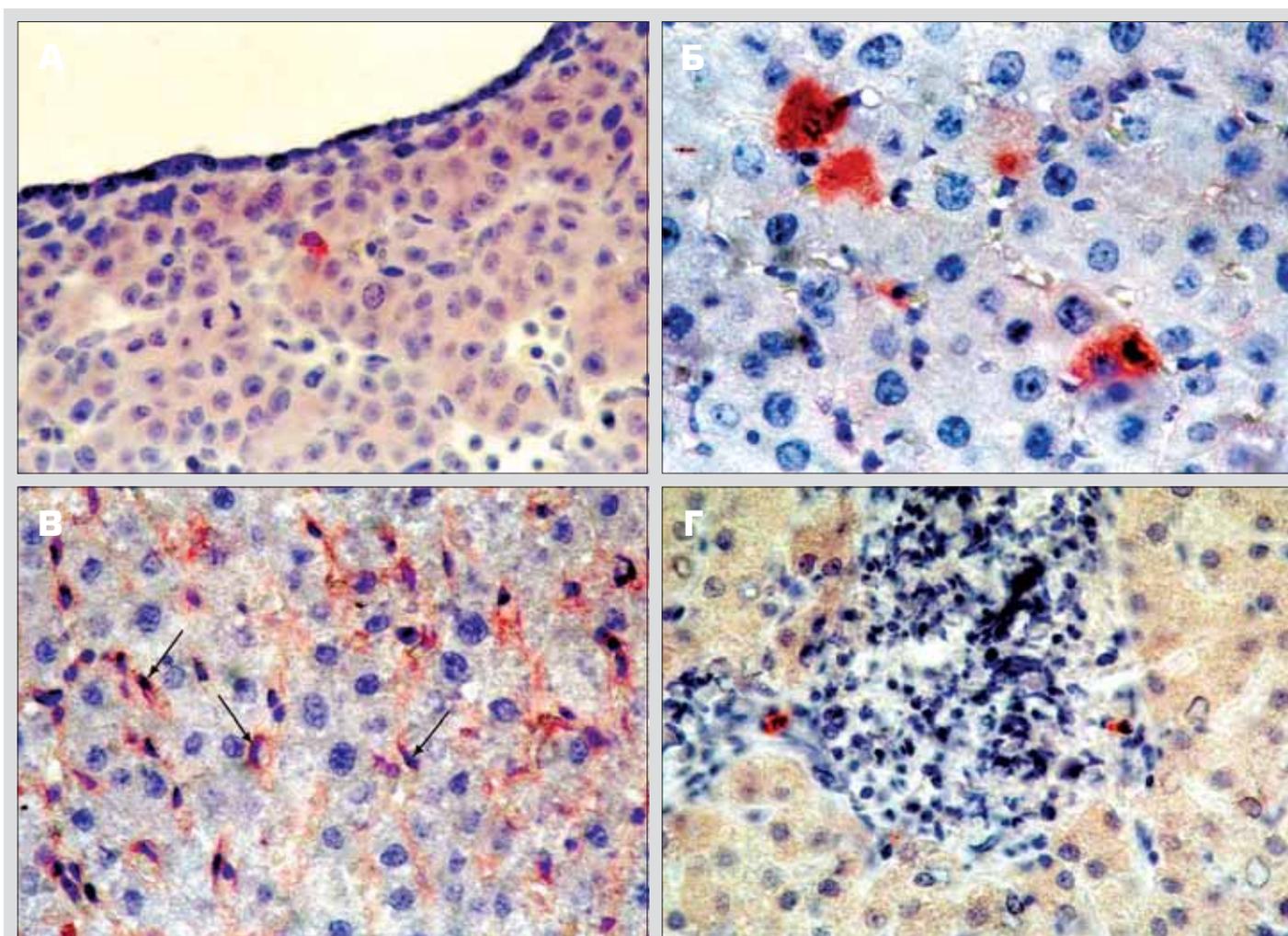


Рис. 4. Экспрессия C-kit в эмбриогенезе (А) и при регенерации (Б, В, Г). Продукт иммуногистохимической реакции — красного цвета, $\times 400$:

А — в синусоидных клетках эмбриона 5–6 недель гестации;

Б — в гепатоцитах крысы через 3 суток после частичной гепатэктомии;

В — в синусоидных клетках (стрелки) печени через 3 суток после частичной гепатэктомии;

Г — в воспалительном инфильтрате при хроническом гепатите

(6–7 недели гестации), а также при регенерации печени часть гепатоцитов может образовываться из кроветворных стволовых клеток. Однако массовое участие кроветворных стволовых клеток в развитии гепатоцитов вызывает сомнения, поскольку в гистогенезе печени число $C-kit^+$ клеток не было достаточно большим, чтобы определять течение и исход данных событий. Более вероятно, на наш взгляд, что кроветворные стволовые клетки играют определенную роль в восстановлении пула региональных стволовых клеток, по-видимому — синусоидных. Это подтверждают и данные других авторов. Показано, что в 3–8% $CD34^+$ клеток ($CD34$ — один из маркеров кроветворных стволовых клеток), изолированных из печени человека 14–22 недель гестации, могут экспрессироваться цитокератины, десмин и некоторые другие маркеры перисинусоидальных клеток [29], что не исключает возможности дифференцировки $CD34^+$ стволовой кроветворной клетки в десмин-позитивную перисинусоидальную клетку, а затем — в цитокератин-позитивный гепатобласт. Однако, учитывая малочисленность $C-kit$ -позитивных клеток в эмбриональной печени, очевидно, что число таких гепатоцитов вряд ли будет значительным.

Обнаружение экспрессии $C-kit$ в многочисленных синусоидных клетках печени и в единичных гепатоцитах в ходе регенерации также позволяет сделать вывод, что, несмотря на отсутствие в печени овальных клеток, может происходить активация регионального стволового компартмента, локализованного в синусоидах. Можно предположить, что $C-kit^+$ синусоидные клетки дают начало гепатобластам, также экспрессирующим $C-kit$. Поскольку гепатобласты являются клетками дифференцирующимися, в ходе этого процесса они постепенно утрачивают способность экспрессировать рецептор к фактору стволовых клеток, и мы видим лишь единичные $C-kit^+$ гепатоциты.

Выдвинутая нами гипотеза о возможности развития гепатоцитов из мезенхимных клеток поперечной перегородки и о перисинусоидальных клетках, как региональных стволовых клетках печени, находит в последние годы все больше подтверждений в работах других исследователей. Так, установлена возможность образования гепатоцитов из мезенхимных клеток, выделенных из жировой ткани человека *in vitro* и *in vivo* [30] и из мезенхимных стволовых клеток *in vitro* [31, 32]. Было показано, что после трансплантации летально облученным крысам клеток красного костного мозга последние могут давать начало овальным клеткам и гепатоцитам [33]. Позднее подобные эксперименты с аналогичными результатами были проведены на мышах [6, 34, 35]. Появились данные об образовании перисинусоидальных клеток из стволовых кроветворных клеток у мышей [36]. И, наконец, в 2006 году опубликована статья, в которой впервые перисинусоидальные клетки рассматриваются как стволовые клетки, поскольку экспрессируют один из маркеров кроветворных стволовых клеток $CD133$ [37]. Подводя итог, можно сказать, что установленный нами факт существования в печени и окружающей ее мезенхиме клеток, сочетающих фенотипические признаки прогениторных клеток, перисинусоидальных клеток печени и гепатоцитов, свидетельствует о возможности развития гепатоцитов из десмин-позитивных клеток мезенхимы поперечной перегородки, что вплотную приближает нас к разгадке вопроса о региональной стволовой клетке печени, которой может являться популяция звездчатых перисинусоидальных клеток (клеток Ито).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 04-04-49164) и Федеральной целевой программы (государственный контракт 02.512.11.2052 от 27.02.2007).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Le Douarin N.M. An experimental analysis of liver development. *Med. Biol.* 1975; 53: 427–55.
2. Houssaint E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ.* 1980; 9: 269–79.
3. Desmet V.J. Embryology of the liver and intrahepatic biliary tract, and an overview of malformations of the bile duct. In: *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford—New York—Tokyo: Oxford University Press; 1992: 497–519.
4. Van Eyken P., Scot R., Desmet V. Intrahepatic bile duct development in the rat. *Lab. Invest.* 1988; 59: 52–9.
5. Fausto N. Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1990; 2: 1036–42.
6. Theise N.D., Badve S., Saxena R. et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells of mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. 2000a; 31: 235–40.
7. Theise N.D., Nimmakayalu M., Gardner R. et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000b; 32: 11–6.
8. Petersen B.E., Grossbard B., Hatch H. et al. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology*. 2003; 37: 632–40.
9. Higgins G.M., Anderson R.M. Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 1931; 12: 186–202.
10. Shinozuka H., Kubo Y., Katyal S.L. et al. Roles of growth factors and of tumor necrosis factor- α on liver cell proliferation induced in rats by lead nitrate. *Lab. Invest.* 1994; 71(1): 35–41.
11. Киясов А.П. Современные технологии морфологических исследований. Методическое пособие для студентов, аспирантов и врачей-патологов. Казань: КГМУ, 2001.
12. Latza U., Niedobitek G., Schwarting R. et al. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia. *J. Clin. Pathol.* 1990; 43: 213–19.
13. Pinkus G.S., Kurtin P.J. Epithelial membrane antigen — a diagnostic discriminant in surgical pathology: immunohistochemical profile in epithelial, mesenchymal, and hematopoietic neoplasms using paraffin sections and monoclonal antibodies. *Hum. Pathol.* 1985; 16(9): 929–40.
14. Kakar S., Muir T., Murphy L.M. et al. Immunoreactivity of Hep Par 1 in hepatic and extrahepatic tumors and its correlation with albumin in situ hybridization in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003; 119(3): 361–6.
15. Ramos-Vara J.A., Miller M.A., Johnson G.C. Immunohistochemical characterization of canine hyperplastic hepatic lesions and hepatocellular and biliary neoplasms with monoclonal antibody hepatocyte paraffin 1 and a monoclonal antibody to cytokeratin 7. *Vet. Pathol.* 2001; 38(6): 636–43.
16. Kiasov A.P., Van Eyken P., van Pelt J.F. et al. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: An immunohistochemical and morphometric study. *Differentiation*. 1995; 59: 253–8.
17. Киясов А.П., Гумерова А.А., Титова М.А. Овальные клетки — предполагаемые стволовые клетки печени или гепатобласты? Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2006; 2(4): 55–8.
18. Evarts R.P., Nakatsukasa H., Marsden E.R. et al. Cellular and molecular changes in the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res.* 1990; 50: 3439–44.
19. Paku S., Schnur J., Nagy P. et al. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am. J. Hepatol.* 2001; 158: 1313–23.
20. Chagraoui J., Lepage-Noll A., Anjo A. et al. Fetal liver consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*. 2003; 101: 2973–82.
21. Lim Y.S., Lee H.S. The expression of E-cadherin in human and rat hepatic stellate cells: evidence of epithelial-mesenchymal transition. *Taechan. Kan. Hakhoe. Chi.* 2002; 8: 90–9.
22. Lim Y.S., Kim K.A., Jung J.O. et al. Modulation of cytokeratin expression during in vitro cultivation of human hepatic stellate cells: evidence of transdifferentiation from epithelial to mesenchymal phenotype. *Histochem. Cell Biol.* 2002; 118: 127–36.
23. Senda T., Nomura R. The expression of cytokeratin in hepatic stellate cells of the cod. *Arch. Histochem. Cytochem.* 2003; 66: 437–44.
24. Киясов А.П., Гумерова А.А., Титова М.А. Мезенхимально-эпителиальная трансформация клеток Ито *in vitro*. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2006; 3: 150–3.
25. Ljubimova J.Y., Petrovic L.M., Wilson S.E. et al. Expression of HGF, its receptor c-met, c-myc, and albumin in cirrhotic and neoplastic human liver tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 1997; 45(1): 79–87.
26. Borowiak M., Garratt A.N., Westefeld T. et al. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(29): 10608–13.
27. Huh C.G., Factor V.M., Sanchez A. et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(13): 4477–82.
28. Corcelle V., Stieger B., Gjinovci A. et al. Characterization of two distinct liver progenitor cell subpopulations of hematopoietic and hepatic origins. *Exp. Cell Res.* 2006; 312(15): 2826–36.

29. Suskind D.L., Muench M.O. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34⁺ cytokeratin 7/8⁺ cells express markers for stellate cells. *J. Hepatol.* 2004; 40: 261–8.

30. Seo M.J., Suh S.Y., Bae Y.C. et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 328: 258–64.

31. Lee K.D., Kuo T.K., Whang-Peng J. et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.* 2004; 40: 1256–9.

32. Lange C., Bruns H., Kluth D. et al. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(15): 2394–97.

33. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999; 284: 1168–70.

34. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 2000; 6: 1229–34.

35. Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I. et al. Multiorgan, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001; 105: 369–77.

36. Baba S., Fujii H., Hirose T. et al. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J. Hepatol.* 2004; 40: 255–60.

37. Kordes C., Sawitza I., Müller-Marbach A. et al. CD133⁺ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 352(2): 410–17.

Поступила 16.06.2007