

## **СПОНТАННАЯ И ЛПС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В ДИНАМИКЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ**

**Останин А.А., Старостина Н.М., Меледина И.В., Шипунов М.В.,  
Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Черных Е.Р.**

*Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия*

**Резюме.** Исследовали уровень продукции 26 цитокинов, секретируемых клетками крови больных циррозом печени (ЦП;  $n = 20$ ), в динамике проведения клеточной терапии (КТ). Курс КТ включал в/в инфузию аутологичных костномозговых МНК в дозе  $1,3 \pm 0,3 \times 10^9$  (Ме  $1,0 \times 10^9$ ) и через 14 сут. – в/в инфузию генерированных *in vitro* МСК в дозе  $22,3 \pm 5,0 \times 10^6$  (Ме  $16,0 \times 10^6$ ). Больные были обследованы 3-кратно: до начала КТ, через 2-3 сут. после введения МНК и по завершении КТ (через 2-3 сут. после введения МСК). Цитокин-секреторную функцию клеток цельной крови оценивали в 24-часовых культурах в отсутствие стимуляции и в ответ на липополисахарид (ЛПС). Группу контроля составили 10 здоровых доноров крови. Проведение КТ с использованием аутологичных костномозговых клеток (МНК и МСК) у больных ЦП не вызывало развития побочных (аллергических или токсических) реакций, было безопасным и хорошо переносимым. По сравнению с донорами больные ЦП (особенно класса В+С по Child-Pugh) отличались исходно повышенной продукцией ряда цитокинов и хемокинов. Так, отмечалось статистически значимое усиление спонтанной продукции IL-9, MIP-1 $\beta$  и IP-10, а также отчетливый тренд к возрастанию TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES и Eotaxin. При этом клетки крови больных ЦП сохраняли чувствительность к стимулирующему действию ЛПС. Так, продукция 11 из 26 цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-9, IL-15, IL-17, IL-7, IL-8, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , Eotaxin) в ответ на ЛПС значительно превышала нормативные значения. Трансплантация костномозговых МНК оказывала минимальное влияние на продукцию цитокинов. В то же время введение МСК приводило к статистически значимому снижению спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции, соответственно, 20 и 18 из 26 анализов, включая про-/противовоспалительные и иммунорегуляторные цитокины, хемокины и ростовые факторы. Нормализация цитокин-секреторной функции у больных ЦП после трансплантации МСК свидетельствует об ослаблении воспалительной активности клеток крови и снижении их реактивности к эндотоксину. Супрессивный эффект МСК на продукцию цитокинов был дозозависимым и наиболее ярко проявлялся у пациентов с декомпенсированным (класс В+С по Child-Pugh) ЦП вирусной этиологии.

**Ключевые слова:** мультиплексный анализ, цитокины, клетки крови, цирроз печени, клеточная терапия, костномозговые МНК и МСК

### **Адрес для переписки:**

Останин Александр Анатольевич  
Научно-исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии  
630099, Россия, г. Новосибирск, Ядринцевская ул., 14.  
Тел.: 8 (383) 236-03-29.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: [ostanin62@mail.ru](mailto:ostanin62@mail.ru); [ct\\_lab@mail.ru](mailto:ct_lab@mail.ru)

### **Address for correspondence:**

Ostanin Alexander A.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: 7 (383) 236-03-29.  
Fax: 7 (383) 222-70-28.  
E-mail: [ostanin62@mail.ru](mailto:ostanin62@mail.ru); [ct\\_lab@mail.ru](mailto:ct_lab@mail.ru)

### **Образец цитирования:**

А.А. Останин, Н.М. Старостина, И.В. Меледина,  
М.В. Шипунов, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных,  
«Спонтанная и ЛПС-индуцированная продукция 26  
цитокинов, секретируемых клетками крови больных  
циррозом печени в динамике клеточной терапии»  
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 63-78.  
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-63-78

© Останин А.А. и соавт., 2016

### **For citation:**

A.A. Ostanin, N.M. Starostina, I.V. Meledina, M.V. Shipunov,  
O.Yu. Leplina, E.Ya. Shevela, E.R. Chernykh, "Spontaneous  
and LPS-induced production of 26 cytokines secreted by blood  
cells of patients with liver cirrhosis during of cell therapy", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18,  
no. 1, pp. 63-78. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-63-78

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-63-78>

## SPONTANEOUS AND LPS-INDUCED PRODUCTION OF 26 CYTOKINES SECRETED BY BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS DURING OF CELL THERAPY

Ostanin A.A., Starostina N.M., Meledina I.V., Shipunov M.V.,  
Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Chernykh E.R.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** The objective of the present study was to assess the level of 26 cytokines secreted by peripheral blood cells of the patients with liver cirrhosis (LC;  $n = 20$ ) during the cell therapy (CT). All the patients were administered with intravenously injected autologous bone marrow-derived mononuclear cells (MNCs) in a dose of  $1.3 \pm 0.3 \times 10^9$  (Me  $1.0 \times 10^9$ ) followed by 14 days later intravenous injection of ex vivo generated mesenchymal stromal cells (MSCs) in a dose of  $22.3 \pm 5.0 \times 10^6$  (Me  $16.0 \times 10^6$ ). The patients were examined before the CT, 2-3 days after the administration of MNCs and, then, 2-3 days after the introduction of MSCs. Cytokine-secretory function of peripheral blood cells was evaluated in a 24-hour whole blood cultures both in the absence of any stimulation and in response to lipopolysaccharide (LPS). The control group consisted of 10 healthy donors. The administration of patients' bone marrow cells (both MNCs and MSC) was safe and well tolerated and caused no any adverse (toxic or allergic) events. Compared with donors, LC patients (especially, with class B+C by Child-Pugh) differed by an initially increased production of several cytokines and chemokines. Actually, there was a statistically significant increase of the spontaneous production of IL-9, MIP-1 $\beta$ , and IP-10, as well as a distinct trend to an increase in TNF $\alpha$ , IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, of MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES and Eotaxin. Moreover, the blood cells of LC patients were susceptible to the stimulatory effect of LPS, and the LPS-induced production of 11 out of 26 cytokines (IL-1ra, IL-6, IL-9, IL-15, IL-17, IL-7, IL-8, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , Eotaxin) significantly exceeded the normative values. Transplantation of bone marrow MNCs had minimal impact on cytokine production. Meanwhile, the MSCs introduction resulted in a significant decrease in spontaneous and LPS-induced production of, respectively, 20 and 18 analytes including pro-/anti-inflammatory and immunoregulatory cytokines, chemokines and growth factors. The normalization of cytokine-secretory function following transplantation of MSCs revealed in the patients with LC indicates the weakening of an inflammatory activity of circulating blood cells and the decrease in their reactivity to endotoxin. MSC suppressive effect on cytokine production was dose-dependent, and most pronounced in patients with decompensated LC (class B+C by Child-Pugh) of viral etiology.

*Keywords:* multiplex assay; cytokines; blood cells; liver cirrhosis; cell therapy; bone marrow MNC & MSC

### Введение

Среди различных подходов к лечению цирроза печени (ЦП) трансплантация костномозговых клеток (КМК) привлекает большое внимание. В отличие от трансплантации печени, признанной сегодня единственным эффективным методом лечения цирроза, данная стратегия не лимитирована наличием донорского органа, не требует иммуносупрессивной терапии и может рассматриваться в качестве временного пособия или альтернативы органной трансплантации [9, 17, 43, 49].

Экспериментальные исследования в модели ЦП показали, что КМК способны мигрировать и интегрироваться в поврежденной печени, улучшая ее функции, и что позитивный эффект КМК ассоциирован с подавлением апоптоза гепато-

цитов, дифференцировкой трансплантируемых и эндогенных стволовых/прогениторных клеток в гепатоциты, подавлением фиброза и активацией фибролиза [35, 43, 44, 46, 51]. Несмотря на то, что точные механизмы действия КМК до конца не ясны, успешные доклинические исследования при отсутствии эффективных методов лечения ЦП послужили поводом для активных клинических испытаний. Их результаты показали безопасность трансплантации КМК и способность трансплантируемых клеток улучшать функции печени, что проявляется возрастанием сывороточного альбумина и снижением тяжести цирроза у больных с гепатитами вирусной и токсической этиологии [21, 23, 29, 33, 42, 50].

Центральная роль в патогенезе ЦП отводится воспалительному процессу, который поддержи-

ваются иммунными клетками и коррелирует с тяжестью и осложнениями ЦП [19, 34, 58]. Фиброз является ответной реакцией на хроническое воспаление, и подавление воспалительной активности представляется важной мишенью в лечении ЦП [24, 41, 45]. В этой связи было высказано предположение, что клинический эффект КМК может быть в значительной степени обусловлен их иммуномодулирующей активностью. Особый интерес в этом плане привлекли мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые наряду с их широким дифференцировочным потенциалом способны оказывать противовоспалительный эффект и обладают анти-апоптотической и анти-фибротической активностью [27, 32, 37, 54].

Действительно, клинические испытания МСК при ЦП показали безопасность их внутривенного введения и улучшение показателей функции печени в течение нескольких месяцев после трансплантации [22, 33, 38, 59].

Ранее нами были проведены пилотные клинические исследования, которые показали безопасность и эффективность трансплантации КМК у больных ЦП [2, 4]. Учитывая потенциальную роль МСК в ограничении воспаления, был разработан новый протокол терапии ЦП, включающий комбинацию мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга с последующим введением аутологичных МСК. Клинические исследования показали безопасность и улучшение функций печени на фоне введения МНК и МСК [5]. Тем не менее, вопрос о способности вводимых клеток оказывать противовоспалительный эффект и сравнительной характеристике иммуномодулирующего эффекта МНК и МСК остается открытым.

**Целью настоящего исследования** явилась характеристика иммуномодулирующего эффекта клеточной терапии, в том числе в сравнении краткосрочных эффектов МНК и МСК. Для этого у 20 пациентов, рекрутированных в исследование, до начала терапии, после введения МНК и после инфузии МСК оценивалась продукция 26 цитокинов клетками крови.

## Материалы и методы

В исследование были включены 10 здоровых доноров крови (5 мужчин и 5 женщин, средний возраст 45 лет) и 20 больных ЦП – 10 мужчин и 10 женщин, средний возраст 50 лет. Диагноз хронического гепатита с исходом в ЦП устанавливали на основании данных клинического, лабораторного и гистологического анализа. В соответствии с классификацией цирроза печени по Child-Pugh класс А диагностировался у 13 (65%), класс В у

6 (30%) пациентов и класс С у 1 (5%) больного. Причиной ЦП в 60% случаев (12/20) являлся хронический вирусный гепатит С. Оставшиеся 40% случаев (8/20) были представлены ЦП не-вирусной этиологии, включая токсический ЦП (n = 4); аутоиммунный ЦП (n = 2); первичный билиарный ЦП (n = 1); и первичный билиарный ЦП в сочетании с аутоиммунным компонентом (n = 1). Клеточную терапию (КТ) и лабораторный мониторинг, одобренные решением Локального этического комитета, проводили после получения письменного информированного согласия больных.

Критериями включения в исследование являлись: 1) клинический диагноз ЦП, подтвержденный гистологическим исследованием; 2) возраст не старше 70 лет; 3) наличие письменного информированного согласия. Критерии исключения: 1) несоответствие критериям включения; 2) активный алкоголизм, употребление наркотических средств; 3) ВИЧ-инфекция, СПИД; 4) декомпенсированные заболевания легких и сердца; 5) кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода или спонтанный перитонит при госпитализации; 6) наличие гепатоцеллюлярной карциномы или других онкологических заболеваний; 7) острые инфекции; 8) тромбоцитопения (ниже  $50 \times 10^9/\text{л}$ ); 9) психические нарушения; 10) неспособность пациента подписать информированное согласие. Базисная терапия включала проведение детоксикационной терапии и назначение гепатозащитных средств, антиоксидантов, пищеварительных ферментов и диуретиков (при наличии асцита и отеков).

В соответствии с утвержденным протоколом, у больного в условиях операционной при проведении трепанобиопсии из крыла подвздошной кости получали аспират костного мозга. Дальнейшие манипуляции по сепарации и культивированию клеток проводились в условиях лаборатории на основе лицензий на трансплантацию костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (ФС-54-01-002049) и применение клеточных технологий (ФС-54-01-001780). Фракцию МНК костного мозга выделяли стандартно в градиенте плотности фикола-верографина. Затем основную часть (70-80%) полученных костномозговых МНК ресуспендировали в 200 мл 0,9% раствора натрия хлорида с 5% альбумина и в этот же день вводили пациенту внутривенно капельно. Остальные МНК использовали для генерации МСК в соответствии с рекомендациями по получению клеточных продуктов мезенхимального происхождения [10]. Кратко: костномозговые МНК культивировали в течение 14 дней в питательной

среде а-МЕМ с 10% сыворотки телят в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора, обновляя среду каждые 3-4 дня. За сутки до окончания культивирования культуральную среду, содержащую сыворотку телят, замещали средой, содержащей 10% аутологичной сыворотки пациента. Через 24 ч клеточный монослой дважды отмывали 0,9% раствором хлорида натрия и подвергали трипсинизации с использованием 0,25% раствора трипсина с версеном (1:1). Полученные МСК подсчитывали и оценивали жизнеспособность клеток с использованием трипанового синего. Затем МСК ресуспендировали в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида с 5% альбумина и вводили пациенту внутривенно капельно.

Больные ЦП были обследованы 3-кратно: до начала клеточной терапии (n = 20), через 2-3 сут. после введения МНК (n = 20) и по завершении КТ (через 2-3 сут. после введения МСК, n = 15). Забор венозной и капиллярной крови проводили утром натощак по общепринятым правилам. Общий анализ крови осуществляли на гемоанализаторе «HEMA-Screen 13» (Швейцария – Италия).

Продукцию цитокинов определяли в культурах клеток цельной крови. Для этого гепаринизированную (20 ЕД/мл) венозную кровь разводили в 5 раз средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина, и культивировали в течение 24 ч в круглодонных, стерильных пробирках в присутствии липополисахарида (ЛПС, *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл, а также в отсутствие митогенной стимуляции (спонтанная продукция). Культивирование проводили при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего собирали супернатанты и хранили полученные образцы при -80 °С до тестирования.

Концентрацию 26 цитокинов (IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Eotaxin, FGF-basic, G-CSF, IFNγ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNFα, VEGF) в супернатантах цельной крови оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя [1, 12]. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества лейкоцитов и выражали в пг/мл/10<sup>6</sup> лейкоцитов.

Математическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки достоверности раз-

личий использовали непараметрические критерии: Вилкоксона–Манна–Уитни и Вилкоксона (для связанных выборок). Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмана ( $r_s$ ). Для оценки различий по уровню какого-либо признака между несколькими (> 2) выборками проводили дисперсионный однофакторный анализ с использованием непараметрического Н-критерия Краскела–Уоллиса.

## Результаты

Курс КТ включал в/в инфузию костномозговых МНК в дозе  $1,3 \pm 0,3 \times 10^9$  клеток (Me  $1,0 \times 10^9$ ; интерквартильный диапазон  $0,37-2,1 \times 10^9$ ) и через 14 сут. – в/в инфузию генерированных *in vitro* МСК в дозе  $22,3 \pm 5,0 \times 10^6$  клеток (Me  $16,0 \times 10^6$ ; интерквартильный диапазон  $10,3-27,4 \times 10^6$ ). По данным проточной цитофлюориметрии количество CD34<sup>+</sup> и CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> клеток в популяции костномозговых МНК составляло  $4,6 \pm 0,5$  и  $0,6 \pm 0,08\%$  соответственно. Популяция МСК содержала 85-95% клеток, экспрессирующих специфичные маркеры (CD73, CD90, CD105), и минимальное количество клеток, экспрессирующих «линейные» маркеры: CD3 ( $3,9 \pm 1,55\%$ ), CD20 ( $5,3 \pm 1,30\%$ ), CD16 ( $5,6 \pm 1,72\%$ ), CD14 ( $5,6 \pm 2,28\%$ ), HLA-DR ( $1,1 \pm 0,57\%$ ) и CD34 ( $0,69 \pm 0,28\%$ ). Жизнеспособность клеток была не менее 95-97%. Проведение клеточной терапии с использованием аутологичных костномозговых клеток (МНК и МСК) у больных ЦП не вызывало развития побочных (аллергических или токсических) реакций, было безопасным и хорошо переносимым.

Сравнительная оценка параметров общего и биохимического анализов крови больных ЦП в динамике проводимой терапии показала, что по завершении КТ снижался уровень трансаминаз (АСТ – с 79 до 50 Ед/л,  $p_U = 0,15$ ; и АЛТ с 72 до 43 Ед/л,  $p_U < 0,05$ ) и нормализовалось абсолютное количество циркулирующих лейкоцитов (с  $4,9$  до  $7,6 \times 10^9$ /л;  $p_U < 0,05$ ). В то же время исходные изменения большинства других показателей, характеризующих известные лабораторные синдромы фиброзного поражения печени, имели относительно стойкий характер и за столь короткий срок наблюдения (в среднем 16-17 сут.) значимо не менялись.

Для исследования цитокин-секреторной функции клеток крови больных ЦП нами был использован методический прием, основанный на оценке уровня спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции 26 цитокинов

в 24-часовых культурах цельной крови. Полученные значения уровня цитокинов (пг/мл) были стандартизированы по количеству клеток-продуцентов (пг/мл/10<sup>6</sup> лейкоцитов). Кроме того, для удобства восприятия материала, анализируемые 26 цитокинов были разбиты на 4 подгруппы

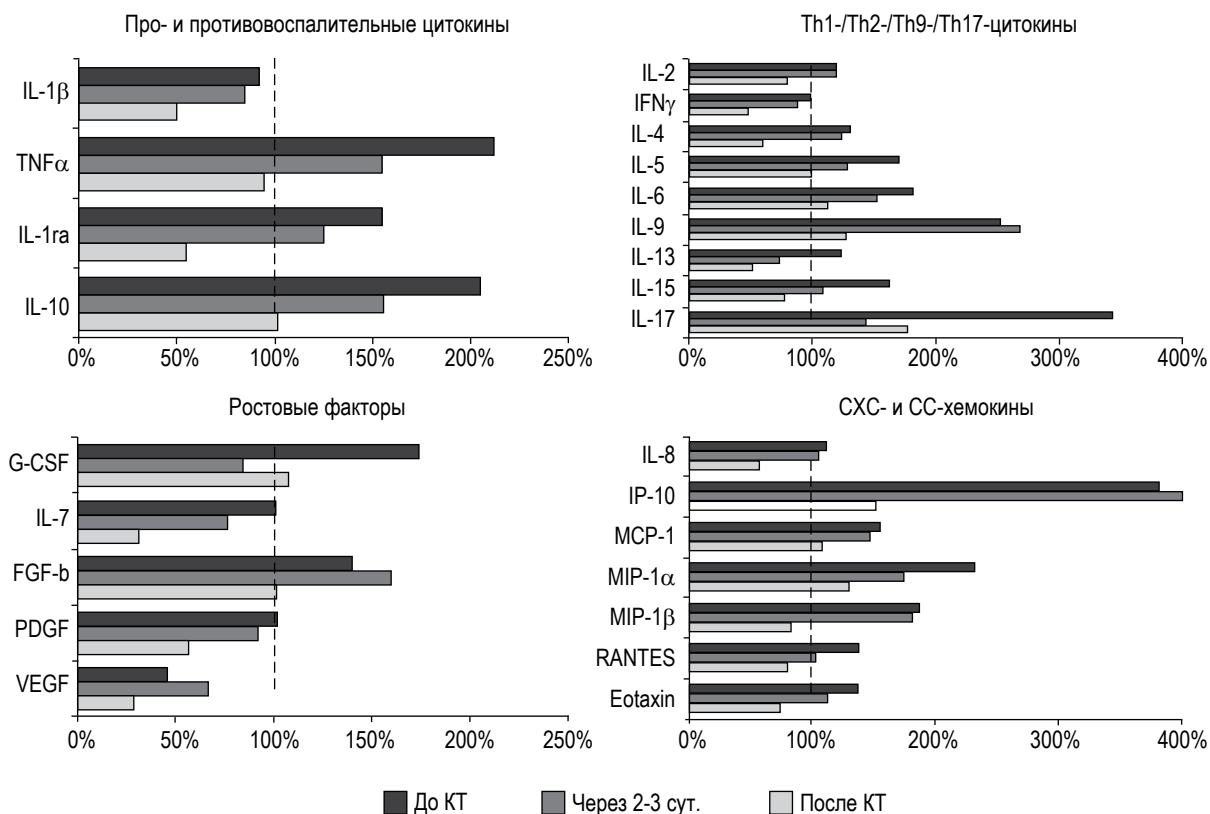
(семейства): про/противовоспалительные цитокины (n = 4); иммунорегуляторные Th1-/Th2-/Th9-/Th17-цитокины (n = 10); ростовые факторы (n = 5) и хемокины (n = 7).

По сравнению с донорами клетки крови больных ЦП отличались более высокой спонтанной

**ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦП В ДИНАМИКЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ**

Группы	Цитокины	Спонтанная продукция (пг/мл/10 <sup>6</sup> лейкоцитов)			
		Доноры (n = 10)	Больные ЦП до начала КТ (n = 20)	Через 2-3 сут. (n = 20)	По завершении КТ (n = 15)
Про- и противовоспалительные	IL-1 $\beta$	38 (8-59)	35 (18-66)	31 (8,5-53)	13,4 (4,3-27) <sup>#</sup>
	TNF $\alpha$	42 (20-77)	89 (30-125)	65 (15-97)	40 (10-82) <sup>#</sup>
	IL1-ra	53 (24-88)	82 (45-130)	66 (38-94)	29 (17-63) <sup>##</sup>
	IL-10	3,9 (3,4-8,1)	8 (4-12)	6,1 (3,6-9)	4,0 (2,0-7) <sup>#</sup>
Иммунорегуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-2	0,5 (0,4-0,7)	0,6 (0,5-0,9)	0,6 (0,4-0,8)	0,4 (0,2-0,6) <sup>#</sup>
	IFN $\gamma$	204 (189-312)	202 (136-361)	179 (126-252)	97 (52-170) <sup>**.</sup> <sup>##</sup>
	IL-12	4,9 (2,2-6,8)	3,0 (1,6-6,9)	5,2 (1,4-7)	3,0 (1,3-6)
	IL-4	9,4 (7,7-10,8)	12,3 (10-15,4)	11,7 (8,1-15,3)	5,6 (3,8-9,6) <sup>##</sup>
	IL-5	0,7 (0,5-0,8)	1,2 (0,9-1,5)	0,9 (0,7-1,7)	0,7 (0,3-0,9) <sup>##</sup>
	IL-6	493 (103-939)	897 (493-1489)	755 (430-1340)	559 (88-733) <sup>#</sup>
	IL-9	7,5 (6,2-11)	19 (7,6-44) <sup>*</sup>	20,2 (10,6-31) <sup>**</sup>	9,6 (5,1-24)
	IL-13	4,6 (4-5,2)	5,7 (2,5-8)	3,4 (2,0-5,5)	2,4 (1,8-4,7) <sup>#</sup>
	IL-15	4,6 (2,5-7,6)	7,5 (4-11,4)	5,0 (3,1-9,8)	3,6 (1,6-5,9) <sup>#</sup>
Ростовые факторы	IL-17	0,9 (0,5-4,9)	3,1 (1,5-13,6)	1,3 (0,9-6,8)	1,6 (0,9-3,6)
	G-CSF	9,6 (7-31)	16,7 (7-37)	8,2 (3,1-28)	10,4 (3,8-22)
	IL-7	8,1 (1,7-11,5)	8,0 (1,7-14,1)	6,2 (1,9-14)	2,6 (1,0-4,9) <sup>#</sup>
	FGF-b	0,5 (0,3-0,6)	0,7 (0,5-1,7)	0,8 (0,5-1,0)	0,5 (0,2-0,7) <sup>#</sup>
	PDGF	133 (85-153)	136 (55-210)	122 (58-284)	76 (28-139) <sup>*,#</sup>
СХС- и СС-хемокины	VEGF	16,3 (1,6-36)	7,5 (2,6-27)	11 (1,6-29)	4,8 (1,9-24)
	IL-8	1940 (956-2193)	2175 (1276-3653)	1996 (1388-3844)	1124 (472-2244) <sup>#</sup>
	IP-10	94 (49-178)	361 (245-970) <sup>*</sup>	400 (170-1157) <sup>**</sup>	144 (73-214) <sup>##</sup>
	MCP-1	899 (527-1490)	1402 (830-2258)	1332 (788-2718)	982 (396-1854)
	MIP-1 $\alpha$	58 (24-131)	135 (73-276)	102 (68-197)	76 (20-130) <sup>#</sup>
	MIP-1 $\beta$	431 (190-507)	810 (400-1840) <sup>*</sup>	788 (526-1720) <sup>**</sup>	363 (238-1058) <sup>#</sup>
	RANTES	473 (346-529)	658 (430-1046)	486 (331-857)	383 (198-538) <sup>#</sup>
Eotaxin	64 (48-77)	88 (69-140)	73 (54-115)	48 (33-88) <sup>#</sup>	

**Примечание.** Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). \* – p < 0,05 и \*\* – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с донорами; # – p < 0,05 и ## – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).



**Рисунок 1. Изменение уровня спонтанной продукции цитокинов клетками крови больных ЦП в динамике клеточной терапии (КТ)**

**Примечание.** Здесь и на рисунке 2 данные представлены в виде %, рассчитанного относительно среднего уровня здоровых доноров, принятого за 100% (пунктирная линия) по формуле:

$(\text{Ме цитокинов у больных ЦП} / \text{Ме цитокинов у доноров}) \times 100\%$ .

продукцией цитокинов из всех 4 функциональных групп. Усиление спонтанной продукции TNFα, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MCP-1, MIP-1α, RANTES и Eotaxin проявлялось в виде тенденции, тогда как возрастание IL-9, MIP-1β и IP-10 было статистически значимым (табл. 1). Через 2-3 сут. после введения костномозговых МНК характер спонтанной секреции цитокинов клетками крови больных ЦП значимо не менялся. Тем не менее регистрировалось умеренное снижение исходно повышенной продукции TNFα, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP-1α и RANTES.

По завершении курса КТ, т.е. через 2-3 сут. после введения МСК, регистрировалось статистически достоверное снижение большинства цитокинов (20/26), включая про/противовоспалительные (4/4) и иммунорегуляторные цитокины (7/10), хемокины (6/7) и ростовые факторы (3/5). Характерно, что продукция этих цитокинов снижалась до уровня нормы и не отличалась от донорских значений, за исключением IFNγ и PDGF, средний уровень которых по сравнению с донорами был снижен. Диаграммы, представленные на рисунке 1, дополнительно иллюстри-

руют изменение спонтанной продукции цитокинов у больных ЦП в динамике КТ относительно среднего уровня здоровых доноров, принятого за 100%.

Хорошо известно, что практически все гены цитокинов являются индуцибельными. Для того чтобы оценить секреторный потенциал клеток-продуцентов в условиях митогенной стимуляции, мы использовали бактериальный ЛПС (эндотоксин), который активирует лейкоциты (гранулоциты, лимфоциты, моноциты) через TLR4. Из данных таблицы 2 видно, что по сравнению с донорами у больных ЦП отмечалось значимое усиление ЛПС-стимулированной продукции 11 из 26 цитокинов – IL-1ra, IL-6, IL-9, IL-15, IL-17, IL-7, IL-8, IP-10, MIP-1α, MIP-1β, Eotaxin. Введение костномозговых МНК значимо не меняло ЛПС-стимулированную продукцию цитокинов по сравнению с исходным уровнем. Тем не менее, после введения МНК отмечалось умеренное ослабление индуцированной продукции IL-17 и Eotaxin, уровень которых уже не отличался от нормативного. Вместе с тем продукция 3 цитокинов (G-CSF, IL-10 и VEGF) уси-

ТАБЛИЦА 2. ЛПС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦП В ДИНАМИКЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Группы	Цитокины	ЛПС-индуцированная продукция (пг/мл/10 <sup>6</sup> лейкоцитов)			
		Доноры (n = 10)	Больные ЦП до начала КТ (n = 20)	Через 2-3 сут. (n = 20)	По завершении КТ (n = 15)
Про- и противовоспалительные	IL-1 $\beta$	431 (285-500)	529 (314-1066)	652 (290-770)	261 (138-460) <sup>#</sup>
	TNF $\alpha$	848 (748-1187)	1310 (465-2157)	1705 (645-3606)	520 (297-1617) <sup>#</sup>
	IL-1-ra	239 (139-295)	424 (210-748) <sup>*</sup>	429 (292-547) <sup>*</sup>	247 (141-364) <sup>#</sup>
	IL-10	25 (13,7-58)	62 (20-177)	91 (48-157) <sup>*</sup>	46 (26-88)
Иммунорегуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-2	9,2 (5,6-11,1)	9,9 (1,3-17,4)	9,6 (5,0-11,7)	5,4 (2,7-10)
	IFN $\gamma$	483 (322-705)	520 (345-769)	545 (344-676)	268 (107-451) <sup>##</sup>
	IL-12	6,8 (4,6-11,2)	9,4 (6-24)	9,8 (5,8-18)	3,0 (2,2-5,3) <sup>*,##</sup>
	IL-4	15,2 (12,9-21,7)	21,3 (16,4-29,5)	23,2 (16,4-29)	13 (6,1-19) <sup>##</sup>
	IL-5	1,0 (0,7-2,8)	1,2 (0,8-1,8)	1,3 (0,9-2,2)	0,9 (0,4-1,1) <sup>#</sup>
	IL-6	2742 (1813-3478)	5966 (2834-9410) <sup>*</sup>	7661 (4755-9131) <sup>**</sup>	4243 (1621-5204) <sup>#</sup>
	IL-9	14,4 (11,1-15,5)	35 (22-50) <sup>**</sup>	25 (17-64) <sup>*</sup>	15 (11-32) <sup>#</sup>
	IL-13	5,3 (3,9-7,7)	6,5 (3,8-9,4)	6,5 (4,0-8,6)	3,5 (1,7-5,5) <sup>#</sup>
	IL-15	2,4 (0,9-3,1)	4,2 (2,1-6,7) <sup>*</sup>	3,5 (2,0-6,9) <sup>*</sup>	2,1 (1,3-3,0) <sup>#</sup>
	IL-17	24 (16,6-31,3)	39 (21-52) <sup>*</sup>	33 (18-53)	18 (11-39) <sup>#</sup>
Ростовые факторы	G-CSF	123 (48-145)	185 (83-311)	274 (193-420) <sup>**</sup>	203 (110-270)
	IL-7	3,4 (1,5-5,0)	6,4 (2,7-13) <sup>*</sup>	8,8 (3,0-11) <sup>*</sup>	2,3 (1,3-4,1) <sup>#</sup>
	FGF-b	2,5 (1,5-3,5)	3,7 (1,6-5,2)	3,4 (2,2-5,5)	1,7 (0,9-2,8) <sup>#</sup>
	PDGF	464 (309-587)	392 (118-582)	382 (255-577)	159 (105-405)
	VEGF	45,5 (36,5-57,5)	71 (41-88)	80 (51-115) <sup>*</sup>	33 (28-50) <sup>#</sup>
СХС- и СС-хемокины	IL-8	2383 (1922-3416)	3955 (2846-5854) <sup>*</sup>	4716 (2952-8347) <sup>*</sup>	2226 (1293-8369)
	IP-10	576 (292-743)	1090 (664-1697) <sup>*</sup>	951 (518-1765) <sup>*</sup>	250 (150-718) <sup>##</sup>
	MCP-1	211 (148-370)	331 (221-736)	344 (198-758)	164 (111-490)
	MIP-1 $\alpha$	522 (454-674)	783 (547-1017) <sup>*</sup>	869 (582-1027) <sup>*</sup>	440 (263-883) <sup>#</sup>
	MIP-1 $\beta$	755 (497-944)	1611 (1133-2974) <sup>**</sup>	1875 (997-3753) <sup>**</sup>	1235 (771-2164)
	RANTES	811 (736-927)	1237 (544-1792)	1390 (635-1722)	656 (368-1854)
	Eotaxin	75 (60-92)	122 (78-144) <sup>*</sup>	95 (68-147)	67 (30-124) <sup>#</sup>

**Примечание.** Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). \* – p < 0,05 и \*\* – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с донорами; # – p < 0,05 и ## – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (U – непараметрический критерий Вилкоксона –Манна–Уитни).

ливалась, и их уровень значимо превышал таковой у доноров.

По завершении курса КТ, т.е. через 2-3 сут. после введения МСК (табл. 2 и рис. 2) ЛПС-реактивность циркулирующих лейкоцитов у больных ЦП значимо снижалась. По сравне-

нию с исходными значениями регистрировалось уменьшение уровня секреции 18 из 26 цитокинов, включая Th1-/Th2-/Th9-/Th17-цитокины (9/10), ростовые факторы (3/5), хемокины (3/7) и про/противовоспалительные цитокины (3/4). За исключением IL-12 (продукция которого сни-

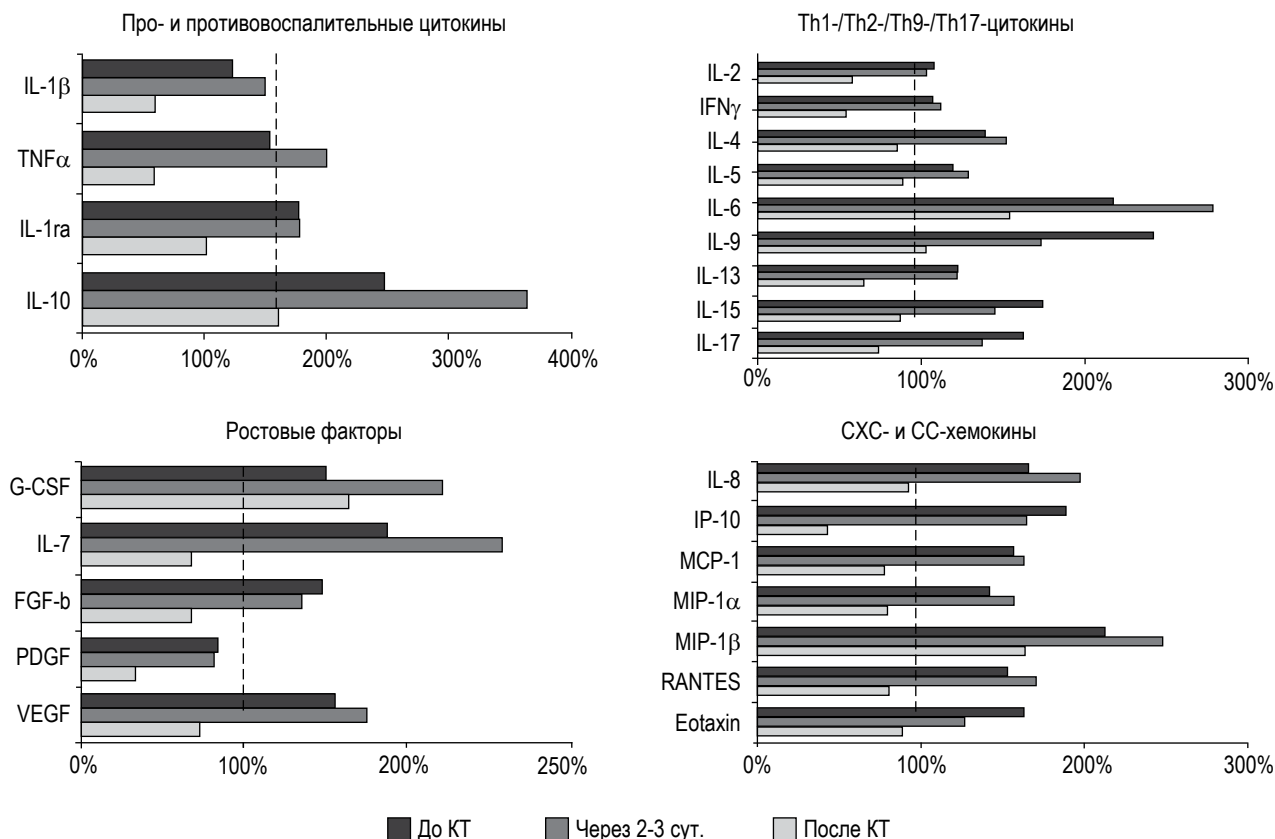


Рисунок 2. Изменение уровня ЛПС-индуцированной продукции цитокинов клетками крови больных ЦП в динамике клеточной терапии (КТ)

ТАБЛИЦА 3. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ СПОНТАННОЙ И ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗЛИЧНЫМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ГРУППАМ, У БОЛЬНЫХ ЦП В ДИНАМИКЕ ПРОВЕДЕНИЯ КТ

Продукция цитокинов	Группы цитокинов	До начала КТ	Через 2-3 сут. (после инфузии МНК)	По завершении КТ (2-3 сут. после инфузии МСК)
Спонтанная	Про- и противовоспалительные (n = 4)	180 (123-209)	140 (103-156)	75 (45-99)
	Th1/Th2/Th9/Th17 (n = 10)	147 (120-182)	122 (106-144)	79 (60-113)**.#
	Ростовые факторы (n = 5)	102 (99-140)	85 (76-92)	57 (32-100)*
	Хемокины (n = 7)	156 (138-233)	148 (103-183)	84 (75-131)*.#
ЛПС-индуцированная	Про- и противовоспалительные (n = 4)	166 (139-213)	190 (165-282)	82 (61-143)
	Th1/Th2/Th17 (n = 10)	139 (120-175)	141 (123-153)	80 (59-90)**.##
	Ростовые факторы (n = 5)	150 (148-156)	176 (136-223)	68 (67-72)*.#
	Хемокины (n = 7)	163 (153-189)	165 (157-198)	81 (78-93)*.#

**Примечание.** Данные (% , Me и интерквартильный диапазон) рассчитаны относительно среднего уровня продукции цитокинов клетками крови здоровых доноров, принятого за 100% по формуле: (Me цитокинов у больных ЦП / Me цитокинов у доноров) × 100%.

\* – p < 0,05 и \*\* – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (до начала КТ);

# – p < 0,05 и ## – p < 0,01 – достоверность различия по сравнению с показателями через 2-3 сут. после начала КТ (W – непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок).

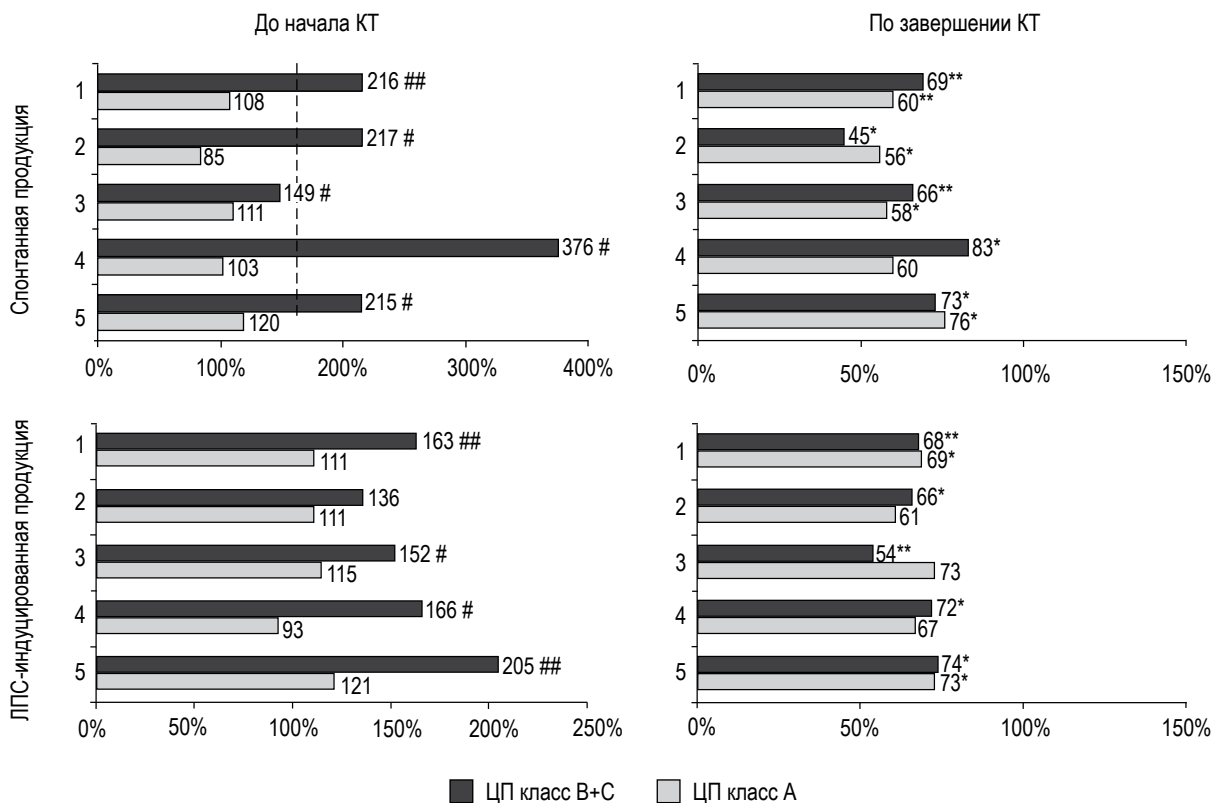


жалась ниже нормы), профиль цитокинов, секретируемых клетками крови больных ЦП в ответ на эндотоксин, после окончания КТ достоверно не отличался от показателей здоровых доноров.

В обобщенном виде данные, характеризующие изменение относительного уровня спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции цитокинов у больных ЦП в динамике проведения КТ представлены в таблице 3. Видно, что до начала лечения интенсивность продукции практически всех цитокинов, относящихся к различным семействам, у больных ЦП по сравнению с донорами была увеличена в среднем на 40-80% как в спонтанных, так и в ЛПС-стимулированных культурах. Исключением являлись ростовые факторы, базальная секреция которых была сопоставима с донорскими значениями. Очевидно, что циркулирующие лейкоциты больных ЦП *in*

*situ* находятся в функционально активном состоянии, поскольку способны спонтанно синтезировать различные цитокины/хемокины на более высоком уровне, чем клетки крови здоровых доноров. Несмотря на это лейкоциты, больных ЦП сохраняют ЛПС-реактивность, т.е. не находятся в состоянии анергии к эндотоксину.

Через 2-3 сут. после в/в инфузии аутологичных костномозговых МНК регистрировалось незначительное (примерно на 20%) снижение уровня спонтанной секреции про/противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов и ростовых факторов, тогда как ЛПС-индуцированная продукция либо значимо не менялась (Th1/Th2/Th1 цитокинов и хемокинов), либо даже усиливалась (про/противовоспалительных цитокинов и ростовых факторов). По завершении курса КТ, через 2-3 сут. после в/в инфузии аутологичных



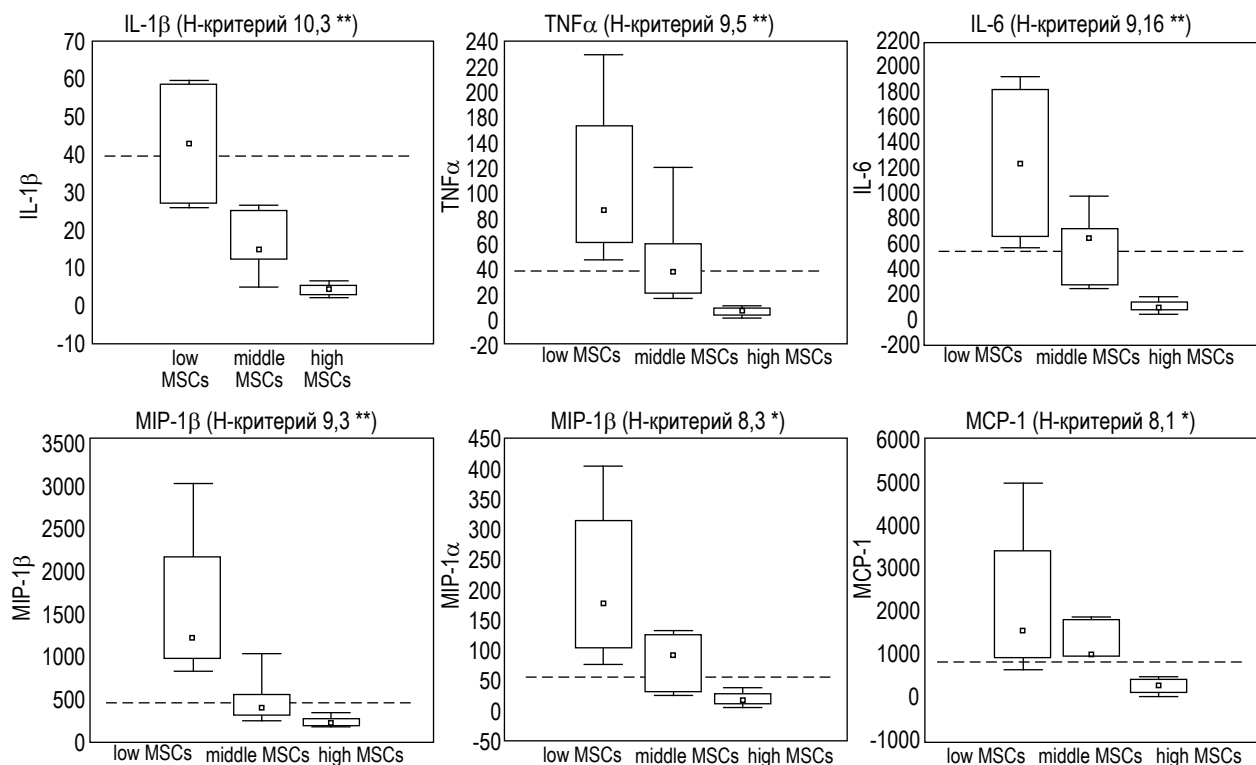
**Рисунок 3. Изменение в динамике клеточной терапии уровня спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции цитокинов в подгруппах больных, различающихся по тяжести и этиологии ЦП**

**Примечание.** Данные представлены в виде медианных значений, рассчитанных относительно среднего уровня продукции цитокинов клетками крови здоровых доноров, принятого за 100% по формуле:

(Ме цитокинов у больных ЦП / Ме цитокинов у доноров) × 100%.

ЦП класс А – подгруппа больных ЦП класса А невирусной этиологии (n = 5). ЦП В+С – подгруппа больных ЦП класса В+С вирусной этиологии (n = 5). 1 – все цитокины (n = 26); 2 – про/противовоспалительные (n = 4); 3 – Th1/Th2/Th9/Th17 (n = 10); 4 – ростовые факторы (n = 5); 5 – хемокины (n = 7).

\* – p < 0,05 и \*\* – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (до начала КТ); # – p < 0,05 и ## – p < 0,01 – достоверность различия по сравнению с показателями ЦП класс А (W – непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок).



**Рисунок 4. Межгрупповые различия больных ЦП по уровню спонтанной продукции цитокинов/хемокинов после завершения КТ в зависимости от дозы вводимых МСК**

**Примечание.** Показаны различия по уровню IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , и MIP-1 $\beta$  в подгруппах больных, у которых доза вводимых MSCs была < 10,3 млн клеток («low MSCs»; Me – 6,35 млн; n = 4), в интервале 10,4-27,3 млн («middle MSCs»; Me – 16,5 млн; n = 6) и > 27,4 млн («high MSCs»; Me – 40,0 млн; n = 4). Данные получены при проведении дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса и представлены в виде медиан, интерквартильного диапазона, диапазона минимальных и максимальных значений. Пунктирной линией показан средний уровень (Me) спонтанной продукции цитокинов/хемокинов в подгруппе здоровых доноров (n = 10).

\* –  $p < 0,05$  и \*\* –  $p < 0,01$  – значимость H-критерия Краскела–Уоллиса.

МСК, исходно высокая цитокин-секреторная активность клеток крови больных ЦП как в спонтанных, так и в ЛПС-стимулированных культурах снижалась в среднем до 60-80% относительно нормального уровня.

Наиболее ярко корригирующий эффект трансплантации МСК на цитокин-секреторную функцию циркулирующих лейкоцитов проявлялся в подгруппе больных ЦП класса В+С вирусной этиологии. Из данных рисунка 3 видно, что именно эти пациенты, в отличие от больных ЦП класса А невирусной этиологии, характеризовались гиперпродукцией цитокинов различных функциональных групп как в отсутствие стимуляции, так и в ответ на эндотоксин. По завершении курса КТ интенсивность как спонтанной, так и ЛПС-индуцированной продукции цитокинов в обеих подгруппах больных ЦП достоверно снижалась до 60-70% относительно нормы. Но учитывая более высокий исходный уровень секреции цитокинов у больных ЦП класса В+С ви-

русной этиологии, можно заключить, что ингибирующий эффект трансплантируемых клеток в этой группе был более выраженным.

Снижение цитокин-секреторной активности клеток крови больных ЦП в динамике проведения КТ могло быть обусловлено либо непосредственным действием трансплантированных МСК, либо отсроченным эффектом костномозговых МНК. Поэтому на следующем этапе был проведен корреляционный анализ между количеством трансплантируемых клеток (МНК и МСК) и концентрацией цитокинов в культурах клеток крови. Корреляционный анализ не выявил какой-либо значимой взаимосвязи между количеством МНК и уровнем спонтанной продукции цитокинов, определяемых как на 2-3 сутки после введения МНК (за исключением TNF $\alpha$ ,  $r_s = -0,51$ ;  $p = 0,025$ ), так и по завершении курса КТ.

В то же время достаточно большой спектр цитокинов, спонтанно секретируемых клетка-

ми крови больных ЦП, обратно коррелировал с количеством трансплантированных МСК. В частности, были выявлены статистически значимые взаимосвязи дозы вводимых МСК с уровнем продукции про- и противовоспалительных цитокинов ( $\text{TNF}\alpha$   $r_s = -0,81$ ;  $p = 0,0004$ ;  $\text{IL-1}\beta$   $r_s = -0,75$ ;  $p = 0,002$ ;  $\text{IL-1ra}$   $r_s = -0,68$ ;  $p = 0,007$ ;  $\text{IL-10}$   $r_s = -0,56$ ;  $p = 0,03$ ), иммунорегуляторных цитокинов ( $\text{IL-6}$   $r_s = -0,81$ ;  $p = 0,0004$ ;  $\text{IL-15}$   $r_s = -0,79$ ;  $p = 0,0001$ ), ростовых факторов ( $\text{G-CSF}$   $r_s = -0,64$ ;  $p = 0,013$ ) и хемокинов ( $\text{IL-8}$   $r_s = -0,59$ ;  $p = 0,025$ ;  $\text{MCP-1}$   $r_s = -0,73$ ;  $p = 0,003$ ;  $\text{MIP-1}\alpha$   $r_s = -0,74$ ;  $p = 0,002$ ;  $\text{MIP-1}\beta$   $r_s = -0,76$ ;  $p = 0,001$ ), оцениваемых на 2-3 сутки после трансплантации МСК.

Зависимость уровня спонтанной продукции цитокинов от дозы трансплантируемых МСК четко визуализируется при проведении дисперсионного однофакторного анализа. В качестве примера на рисунке 4 представлены данные по уровню продукции  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{MCP-1}$ ,  $\text{MIP-1}\alpha$ , и  $\text{MIP-1}\beta$  в подгруппах больных, у которых доза вводимых МСК была  $< 10,3$  млн клеток ( $\text{Me} - 6,35$  млн), в интервале  $10,4-27,3$  млн ( $\text{Me} - 16,5$  млн) и  $> 27,4$  млн клеток ( $\text{Me} - 40,0$  млн). Хорошо видно, что  $\text{H}$ -критерий Краскела–Уоллиса, отражающий межгрупповые различия по тому или иному цитокину/хемокину, варьировал от 8,1 до 10,3 и был высоко значимым ( $p < 0,05$  и  $< 0,01$ ).

## Обсуждение

Провоспалительный статус у пациентов с ЦП является известным феноменом, и выраженность воспаления ассоциирована с тяжестью ЦП и развитием внепеченочных осложнений [3, 19, 34, 58]. Поскольку воспалительная реакция является триггером и поддерживает развитие фиброза, значительный интерес в лечении ЦП отводится противовоспалительным стратегиям [41]. Действительно, подавление воспаления благоприятствует регенерации печени при острой печеночной недостаточности [47, 57] и позитивно сказывается на функциях печени при тяжелых формах алкогольной болезни [7, 52].

В настоящей работе мы исследовали влияние аутологичных КМК на выраженность воспалительной реакции у больных ЦП и охарактеризовали в сравнении эффект МНК и МСК.

Клинико-лабораторный анализ в группе 20 рекрутированных пациентов показал, что проведение клеточной терапии не сопровождалось развитием побочных эффектов, и к моменту завершения лечения (в среднем через 16-17 сут. после введения МНК) у пациентов уже отмечались первые позитивные сдвиги в виде снижения транс-

аминаз и нормализации исходно сниженного количества лейкоцитов.

Оценка цитокин-секреторной активности клеток крови показала, что по сравнению с донорами больные ЦП исходно отличались повышенной продукцией ряда про-/противовоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов, хемокинов и ростовых факторов. При анализе спонтанной продукции цитокинов клетками крови 3 из 26 цитокинов ( $\text{IL-9}$ ,  $\text{MIP-1}\beta$  и  $\text{IP-10}$ ) были достоверно повышены, а возрастание еще 10 цитокинов ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1ra}$ ,  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-5}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-13}$ ,  $\text{MCP-1}$ ,  $\text{MIP-1}\alpha$ ,  $\text{RANTES}$  и  $\text{Eotaxin}$ ) проявлялось в виде тренда. При этом клетки крови больных ЦП сохраняли чувствительность к стимулирующему действию ЛПС. Более того индуцированная эндотоксином продукция 11 из 26 цитокинов ( $\text{IL-1ra}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-9}$ ,  $\text{IL-15}$ ,  $\text{IL-17}$ ,  $\text{IL-7}$ ,  $\text{IL-8}$ ,  $\text{IP-10}$ ,  $\text{MIP-1}\alpha$ ,  $\text{MIP-1}\beta$ ,  $\text{Eotaxin}$ ) значимо превышала нормативные значения.

Полученные результаты согласуются с данными о возрастании концентрации провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-17}$ ), хемокинов ( $\text{IL-8}$ ,  $\text{IP-10}$ ) в сыворотке крови и более активной продукции хемокинов циркулирующими моноцитами [11, 19, 25]. С другой стороны, эти результаты свидетельствуют об участии циркулирующих лейкоцитов в поддержании воспалительного статуса при ЦП и возможности использования клеток цельной крови при исследовании эффективности противовоспалительной терапии.

Трансплантация костномозговых МНК оказывала минимальное влияние на спонтанную продукцию цитокинов, которое проявлялось незначительным снижением продукции  $\text{IL-4}$  и  $\text{IL-5}$ . В то же время трансплантация МСК приводила к статистически достоверному снижению спонтанной продукции 20 из 26 анализируемых цитокинов, включая все 4 медиатора из группы про-/противовоспалительных цитокинов ( $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1ra}$ ,  $\text{IL-10}$ ), 7 из 10 иммунорегуляторных цитокинов ( $\text{IL-2}$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-5}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-13}$ ,  $\text{IL-15}$ ), 6 из 7 хемокинов ( $\text{IL-8}$ ,  $\text{IP-10}$ ,  $\text{MIP-1}\alpha$ ,  $\text{MIP-1}\beta$ ,  $\text{RANTES}$ ,  $\text{Eotaxin}$ ) и 3 из 5 ростовых фактора ( $\text{IL-7}$ ,  $\text{FGF-b}$ ,  $\text{PDGF}$ ).

По сравнению с донорами у больных ЦП отмечалось значимое усиление ЛПС-стимулированной продукции  $\text{IL-1ra}$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-9}$ ,  $\text{IL-15}$ ,  $\text{IL-17}$ ,  $\text{IL-7}$ , а также хемокинов:  $\text{IL-8}$ ,  $\text{IP-10}$ ,  $\text{MIP-1}\alpha$ ,  $\text{MIP-1}\beta$ ,  $\text{Eotaxin}$ . После введения МНК регистрировалось умеренное ослабление индуцированной продукции  $\text{IL-17}$  и  $\text{Eotaxin}$ . Вместе с тем дополнительно усиливалась продукция  $\text{G-CSF}$ ,  $\text{IL-10}$  и  $\text{VEGF}$ , и их уровень значимо превышал таковой у доноров.

В свою очередь трансплантация МСК сопровождалась значимым снижением 18 из 26 цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-1ra), иммунорегуляторные цитокины (IFN $\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (IL-7, VEGF, FGF-b) и хемокины (IP-10, MIP-1 $\alpha$ , Eotaxin). За исключением IL-12 (продукция которого снижалась ниже нормы), профиль цитокинов, секретируемых клетками крови больных ЦП в ответ на ЛПС, после окончания КТ достоверно не отличался от показателей здоровых доноров.

Нормализация спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции цитокинов после трансплантации МСК, свидетельствует об ослаблении воспалительной активности клеток крови и снижении их реактивности к эндотоксину. Супрессорный эффект МСК на цитокин-секреторную функцию клеток может опосредоваться через различные паракринные механизмы, поскольку хорошо известно, что МСК активно продуцируют широкий спектр иммуносупрессорных медиаторов (IDO, PGE2, TGF- $\beta$ , HGF, TSG-6, HLA-G, galectin-3 и др.) [15, 28, 31, 48]. ЛПС и активация его рецептора TLR4 имеют прямое отношение к развитию фиброза, поскольку в условиях повышенной проницаемости кишечной стенки эндотоксин попадает в циркуляцию и может активировать клетки крови к продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также подавлять экспрессию ингибиторного TGF- $\beta$ 1 псевдореператора, что приводит к активации фиброгенной активности звездчатых клеток/миофибробластов [8, 56]. Поэтому снижение реактивности клеток крови к ЛПС может ограничивать их профиброгенную активность.

Сравнивая иммуномодулирующие эффекты МНК и МСК можно заключить, что они существенно различались. Действие МНК проявлялось умеренным снижением исходно повышенной спонтанной продукции про- и противовоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1ra), хемокинов (MIP-1 $\alpha$ , RANTES), а также Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), обладающих профиброгенной активностью [20, 36, 40, 55]. Эффект МНК в отношении ЛПС-стимулированной продукции цитокинов проявлялся умеренным ослаблением синтеза IL-17 и Eotaxin, уровень которых уже не отличался от нормативного, а также значимым усилением продукции IL-10, G-CSF и VEGF, обладающих, по данным литературы, иммуносупрессорной активностью [14, 18, 30].

В то же время МСК оказывали четкое иммуносупрессивное влияние в отношении спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции цитоки-

нов как на уровне отдельных медиаторов, так и сформированных функциональных семейств/групп цитокинов (табл. 1-3). Характерно, что, несмотря на однонаправленное (ингибирующее) действие МСК на цитокин-секреторную функцию клеток крови, их эффект включал элемент иммуномодуляции. Так, супрессивный эффект МСК на продукцию цитокинов наиболее ярко проявлялся у пациентов с декомпенсированным ЦП вирусной этиологии, которые исходно отличались гиперпродукцией цитокинов, тогда как в оппозитной группе больных ЦП класса А невирусной этиологии ингибирующий эффект МСК был менее выраженным.

Поскольку введению МСК предшествовала трансплантация костномозговых МНК, нельзя было исключить, что наблюдаемая по завершении курса КТ нормализация цитокинового профиля связана с отсроченным влиянием МНК. Однако корреляционный анализ выявил наличие обратных взаимосвязей между количеством введенных МСК и уровнем продукции TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-10, IL-6, IL-15, G-CSF, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$ . В то же время доза МНК не коррелировала с продукцией цитокинов, определяемых как на 2-3 сутки после введения МНК (за исключением TNF $\alpha$ ,  $r_s = -0,51$ ;  $p = 0,025$ ), так и по завершении курса КТ. Таким образом, выраженный иммунорегуляторный эффект КТ, проявляющийся в нормализации цитокинового профиля, был обусловлен, прежде всего, действием МСК.

Экспериментальные исследования в модели фиброза печени свидетельствуют, что улучшение функции печени после трансплантации МСК сопряжено с подавлением воспалительной реакции и фиброгенеза [6, 16, 26, 53]. При этом эффект внутривенного введения МСК проявляется снижением экспрессии провоспалительных и профиброгенных цитокинов (мРНК IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  и TGF- $\beta$ ) и возрастанием сывороточного уровня IL-10 [60]. Тем не менее в тех же экспериментальных моделях ряд других авторов не обнаружили указанных эффектов МСК [13, 39]. Относительно сведений о противовоспалительном эффекте КМК у больных ЦП, такие данные полностью отсутствуют. С этой точки зрения нами впервые показано, что последовательное введение аутологичных костномозговых МНК и МСК больным ЦП нормализует цитокиновый профиль за счет снижения гиперпродукции цитокинов из различных функциональных групп.

Полученные нами данные отчасти согласуются с результатами Zhao W. с соавт. [60], однако в отличие от этих авторов мы выявили снижение исходно повышенной продукции как про-,

так и противовоспалительных цитокинов. Выявленные различия, очевидно, связаны с использованием авторами иного типа МСК (частично дифференцированных в гепатоцитарном направлении), с оценкой уровня только одного IL-10 в сыворотке крови (другие цитокины определялись по экспрессии генов с помощью RT-PCR), а также с патогенетическими особенностями фиброгенеза в модели CCL4-индуцированного поражения печени у животных (крыс) и ЦП у человека.

Определенными ограничениями наших исследований является, то, что исследуемая груп-

па была представлена относительно небольшим числом пациентов (n = 20). В работе не была исследована продолжительность иммуномодулирующего эффекта КТ. Кроме того, представлялось интересным проанализировать, сказываются ли изменения продукции цитокинов клетками крови на фиброгенной активности сыворотки крови. Дальнейшие проспективные исследования позволят ответить на ряд из этих вопросов, а также более полно (через 12-24 мес. наблюдения) оценить клиническую значимость аутологичной трансплантации костномозговых МНК и МСК в лечении больных ЦП.

## Список литературы / References

1. Останин А.А., Черных Е.Р. Сравнительная оценка уровня 17 цитокинов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флюориметрии // Цитокины и воспаление, 2005. Т. 4, № 2. С. 25-32. [Ostanin A.A., Chernykh E.R. The comparative analysis of 17 cytokines level in serum and whole blood of healthy donors using the Bio-Plex protein array system. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2005, Vol. 4, no. 2, pp. 25-32. (In Russ.)]
2. Черных Е.Р., Пальцев А.И., Старостина Н.М., Останин А.А., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Меледина И.В., Селихова Ю.Б., Демидчик С.Н., Никонов С.Д., Кожевников В.С., Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Козлов В.А. Аутологичные клетки костного мозга в комплексном лечении пациентов с хроническими гепатитами и циррозом печени // Гепатология, 2005. № 1 С. 30-36. [Chernykh E.R., Paltzev A.I., Starostina N.M., Ostanin A.A., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Meledina I.V., Selihova Yu.B., Demidchik S.N., Nikonov S.D., Kozevnikov V.S., Kulagin A.D., Lisukov I.A., Kozlov V.A. Autologous bone marrow cells in complex treatment of chronic hepatitis and cirrhosis. *Gepatologiya = Hepatology*, 2005, no. 1, pp. 30-36. (In Russ.)]
3. Черных Е.Р., Старостина Н.М., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Агапитова С.В., Шипунов М.В., Останин А.А., Козлов В.А. Цитокиновый профиль у больных хроническими вирусными гепатитами с фиброзом и циррозом печени // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 4. С. 539-546. [Chernykh E.R., Starostina N.M., Leplina O.Yu., Shevela E.Yu., Agapitova S.V., Shipunov M.V., Ostanin A.A., Kozlov V.A. Cytokine profile in patients with chronic virus hepatitis complicated with fibrosis and cirrhosis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 539-546. doi: 10.15789/1563-0625-2006-4-539-546 (In Russ.)]
4. Черных Е.Р., Старостина Н.М., Пальцев А.И., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Шипунов М.В., Селихова Ю.Б., Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Никонов С.Д., Останин А.А., Козлов В.А. Лечение цирроза печени с использованием трансплантации аутологичных клеток костного мозга // Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты / Под ред. Козлова В.А., Сенникова С.В., Черных Е.Р., Останина А.А. Новосибирск: Наука, 2009. С. 171-188. [Chernykh E.R., Starostina N.M., Paltzev A.I., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Shipunov M.V., Selihova Yu.B., Kulagin A.D., Lisukov I.A., Nikonov S.D., Ostanin A.A., Kozlov V.A. Treatment of liver cirrhosis using autologous bone marrow cell transplantation [Cell technologies. Theoretical and applied aspects. Edited by Kozlov V.A., Sennikov S.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A.]. Novosibirsk: Nauka, 2009, pp. 171-188.
5. Шевела Е.Я., Старостина Н.М., Пальцев А.И., Шипунов М.В., Желтова О.И., Меледина И.В., Хван Л.А., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Козлов В.А. Эффективность клеточной терапии при циррозе печени // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2015 (в печати). [Shevela E.Ya., Starostina N.M., Paltzev A.I., Shipunov M.V., Zheltova O.I., Meledina I.V., Hvan L.A., Leplina O.Yu., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kozlov V.A. The efficiency of cell therapy in liver cirrhosis. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine = Cell Technologies in Biology and Medicine*, 2015 (in press). (In Russ.)]
6. Abdel Aziz M.T., Atta H.M., Mahfouz S., Fouad H.H., Roshdy N.K., Ahmed H.H., Rashed L.A., Sabry D., Hassouna A.A., Hasan N.M. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin. Biochem.*, 2007, Vol. 40, no. 12, pp. 893-899.
7. Akriviadis E., Botla R., Briggs W., Han S., Reynolds T., Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 2000, Vol. 119, no. 6, pp. 1637-1648.
8. Aoyama T., Paik Y.H., Seki E. Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2010, Vol. 2010, article ID 192543, 8 p.
9. Bai Y.Q., Yang Y.X., Yang Y.G., Ding S.Z., Jin F.L., Cao M.B., Zhang Y.R., Zhang B.Y. Outcomes of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in decompensated liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 26, pp. 8660-8666.

10. Burunova V.V., Suzdaltseva Y.G., Voronov A.V., Cheglakov I.B., Vakhrushev I.V., Yarygin K.N., Yarygin V.N. Development and introduction of production standards for cell products of mesenchymal origin. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2008, Vol. 145, no. 4, pp. 526-530.
11. Capone F., Guerriero E., Colonna G., Maio P., Mangia A., Castello G., Costantini S. Cytokine profile evaluation in patients with hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 28, pp. 9261-9269.
12. Carson R., Vignali D. Simultaneous quantitation of fifteen cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J. Immunol. Methods.*, 1999, Vol. 227, no. 1-2, pp. 41-52.
13. Carvalho A.B., Quintanilha L.F., Dias J.V., Paredes B.D., Mannheimer E.G., Carvalho F.G., Asensi K.D., Gutfilem B., Fonseca L.M.B., Resende C.M.C., Rezende G.F.M., Takiya C.M., de Carvalho A.C.C., Goldenberg R.C. S. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells*, 2008, Vol. 26, no. 5, pp. 1307-1314.
14. de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E. Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, 1991, Vol. 174, no. 5, pp. 1209-1220.
15. Doorn J., Moll G., Le Blanc K., van Blitterswijk C., de Boer J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2012, Vol. 18, no. 2, pp. 101-115.
16. Fang B., Shi M., Liao L., Yang S., Liu Y., Zhao R.C. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation*, 2004, Vol. 78, no. 1, pp. 83-88.
17. Forbes S.J., Newsome P.N. New horizons for stem cell therapy in liver disease. *J. Hepatol.*, 2012, Vol. 56, no. 2, pp. 496-499.
18. Gavalas N.G., Tsiatas M., Tsitsilonis O., Politi E., Ioannou K., Ziogas A.C., Rodolakis A., Vlahos G., Thomakos N., Haidopoulos D., Terpos E., Antsaklis A., Dimopoulos M.A., Bamias A. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *British J. Cancer.*, 2012, Vol. 107, pp. 1869-1875.
19. Goral V., Atayan Y., Kaplan A. The relation between pathogenesis of liver cirrhosis, hepatic encephalopathy and serum cytokine levels: what is the role of tumor necrosis factor  $\alpha$ ? *Hepatogastroenterology*, 2011, Vol. 58, pp. 943-948.
20. Huaux F., Liu T., McGarry B., Ullenbruch M., Phan S.H. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 4, pp. 2083-2092.
21. Khan A.A., Parveen N., Mahaboob V.S., Rajendraprasad A., Ravindrakrishna H.R., Venkateswarlu J. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study. *Transplant Proc.*, 2008, Vol. 40, no. 4, pp. 1140-1144.
22. Kharazimi P., Hellstrom P.M., Noorinayer B., Farzaneh F., Aghajani K., Jafari F., Telkabadi M., Atashi A., Honardoost M., Zali M.R., Soleimani M. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, Vol. 21, pp. 1199-1205.
23. Kim J.K., Park Y.N., Kim J.S., Park M.S., Paik Y.H., Seok J.Y., Chung Y.E., Kim H.O., Kim K.S., Ahn S.H., Kim do Y., Kim M.J., Lee K.S., Chon C.Y., Kim S.J., Terai S., Sakaida I., Han K.H. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant.*, 2010, Vol. 19, pp. 1237-1246.
24. Kisseleva T., Cong M., Paik Y., Scholten D., Jiang C., Benner C., Iwaisako K., Moore-Morris T., Scott B., Tsukamoto H., Evans S.M., Dillmann W., Glass C.K., Brenner D.A. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 2012, Vol. 109, no. 24, pp. 9448-9453.
25. Kochlios E., Foka P., Mavromara P. Modulation of monocyte/macrophage-derived cytokine and chemokine expression profile by persistent Hepatitis C virus (HCV) infection leads to chronic inflammation. *J. Mol. Biochem.*, 2012, Vol. 1, no. 1, pp. 40-53.
26. Lee M.J., Jung J., Na K-H., Moon J.S., Lee H-J., Kim J-H., Kim G., Kwon S-W., Hwang S-G., Kim G.J. Anti-fibrotic effect of chorionic platederived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl(4)-injured liver: potential application to the treatment of hepatic diseases. *J. Cell. Biochem.*, 2010, Vol. 111, no. 6, pp. 1453-1463.
27. Liang X., Ding D., Zhang Y., Tse H-F, Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplantation.*, 2014, Vol. 23, no. 9, pp. 1045-1059.
28. Liu Y., Zhang R., Yan K., Chen F., Huang W., Lv B., Sun C., Xu L., Li F., Jiang X. Mesenchymal stem cells inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of BV2 microglial cells through TSG-6. *J. Neuroinflammation*, 2014, Vol. 11, article 135.
29. Lyra A.C., Soares M.B., da Silva L.F., Fortes M.F., Silva A.G., Mota A.C., Oliveira S.A., Braga E.L., de Carvalho W.A., Genser B., dos Santos R.R., Lyra L.G. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.*, 2007, Vol. 13, pp. 1067-1073.

30. Martins A., Jiahuai Han J., Kim S.O. The multifaceted effects of granulocyte colony-stimulating factor in immunomodulation and potential roles in intestinal immune homeostasis. *IUBMB Life*, 2010, Vol. 62, no. 8, pp. 611-617.
31. Maumus M., Jorgensen C., Noel D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: Role of secretome and exosomes. *Biochimie*, 2013, Vol. 95, pp. 2229-2234.
32. Meier R.P.H., Muller Y.D., Morel P., Gonelle-Gispert C., Buhler L.H. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? *Stem. Cell Research*, 2013, Vol. 11, no. 3, pp. 1348-1364.
33. Mohamadnejad M., Namiri M., Bagheri M., Hashemi S.M., Ghanaati H., Zare Mehrjardi N., Kazemi Ashtiani S., Malekzadeh R., Baharvand H. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol.*, 2007, Vol. 13, pp. 3359-3363.
34. Neuman M.G. Cytokines – central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Research and Health*, 2003, Vol. 27, no. 4, pp. 307-316.
35. Okumoto K., Saito T., Haga H., Hattori E., Ishii R., Karasawa T., Suzuki A., Misawa K., Sanjo M., Ito J.I., Sugahara K., Saito K., Togashi H., Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J. Gastroenterol.*, 2006, Vol. 41, pp. 62-69.
36. O'Reilly S., Hugle T., Griffiths B., Krippner A., van Laar J.M. T cell derived IL-6 and IL-13 drive fibroblast fibrosis: implications for systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2012, Vol. 71, Suppl. 1, A46-A47.
37. Parekkadan B., van Poll D., Megeed Z., Kobayashi N., Tilles A.W., Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, Vol. 363, pp. 247-252.
38. Peng L., Xie D.Y., Lin B.L., Liu J., Zhu H.P., Xie C., Zheng Y.B., Gao Z.L. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology*, 2011, Vol. 54, pp. 820-828.
39. Popp F.C., Slowik P., Eggenhofer E., Renner P., Lang S.A., Stoeltzing O., Geissler E.K., Piso P., Schlitt H.J., Dahlke M.H. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem. Cells*, 2007, Vol. 25, no. 3, pp. 639-645.
40. Reiman R.M., Thompson R.W., Feng C.G., Hari D., Knight R., Cheever A.W., Rosenberg H.F., Wynn T.A. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect. Immun.*, 2006, Vol. 74, no. 3, pp. 1471-1479.
41. Rosenbloom J., Mendoza F.A., Jimenez S.A., Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease*, 2013, Vol. 1832, no. 7, pp. 1088-1103.
42. Saito T., Okumoto K., Haga H., Nishise Y., Ishii R., Sato C., Watanabe H., Okada A., Ikeda M., Togashi H., Ishikawa T., Terai S., Sakaida I., Kawata S. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem. Cells Dev.*, 2011, Vol. 20, pp. 1503-1510.
43. Saito T., Tomita K., Haga H., Okumoto K., Ueno Y. Bone marrow cell-based regenerative therapy for liver cirrhosis. *World J. Methodol.*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 65-69.
44. Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Aoyama K., Ishikawa T., Nishina H., Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 2004, Vol. 40, pp. 1304-1311.
45. Schuppan D., Kim Y.O. Evolving therapies for liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 5, pp. 1887-1901.
46. Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., Verfaillie C.M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 109, pp. 1291-1302.
47. Sgroi A., Gonelle-Gispert C., Morel P., Baertschiger R.M., Niclauss N., Mentha G., Majno P., Serre-Beinier V., Buhle L. Interleukin-1 receptor antagonist modulates the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 9, e25442.
48. Sioud M., Mobergslien A., Boudabous A., Floisand Y. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int. J. Oncology*, 2011, Vol. 38, no. 2, pp. 385-390.
49. Takami T., Terai S., Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 28, pp. 203-208.
50. Terai S., Ishikawa T., Omori K., Aoyama K., Marumoto Y., Urata Y., Yokoyama Y., Uchida K., Yamasaki T., Fujii Y., Okita K., Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem. Cells*, 2006, Vol. 24, pp. 2292-2298.
51. Terai S., Sakaida I., Yamamoto N., Omori K., Watanabe T., Ohata S., Katada T., Miyamoto K., Shinoda K., Nishina H., Okita K. An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem.*, 2003, Vol. 134, pp. 551-558.
52. Tilg H., Jalan R., Kaser A., Davies N.A., Offner F.A., Hodges S.J., Ludwiczek O., Shawcross D., Zoller H., Alisa A., Mookerjee R.P., Graziadei I., Datz C., Trauner M., Schuppan D., Obrist P., Vogel W., Williams R. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.*, 2003, Vol. 38, no. 4, pp. 419-425.

53. Tsai P.-C., Fu T.-W., Chen Y.-M.A., Ko T.-L., Chen T.-H., Shih Y.-H., Hung S.-C., Fu Y.-S. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. *Liver Transpl.*, 2009, Vol. 15, no. 5, pp. 484-495.
54. Usunier B., Benderitter M., Tamarat R., Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem. Cells International*, 2014, Vol. 2014, Article ID 340257, 26 p.
55. Weng S.-Y., Wang X.-Y., Tang Y., Kim Y.O., Molokanova O., Brombacher F., Boop T., Schild H.-J., Waisman A., Schuppan D. IL-4/IL-13 exacerbate liver fibrosis progression through alternatively activated macrophages. *J. Hepatol.*, 2015, Vol. 62, Suppl. 2, p. S474.
56. Yang L, Seki E. Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Front Physiol.*, 2012, Vol. 3, article 138, 18 p.
57. Yang Z.F., Ho D.W.Y., Ngai P., Lau C.K., Zhao Y., Poon R.T.P., Fan S.T. Antiinflammatory properties of IL-10 rescue small-for-size liver grafts. *Liver Transpl.*, 2007, Vol. 13, no. 4, pp. 558-565.
58. Zampino R., Marrone A., Restivo L., Guerrero B., Sellitto A., Rinaldi L., Romano C., Adinolfi L.E. Chronic HCV infection and inflammation: clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J. Hepatol.*, 2013, Vol. 5, no. 10, pp. 528-540.
59. Zhang Z., Lin H., Shi M., Xu R., Fu J., Lv J., Chen L., Lv S., Li Y., Yu S., Geng H., Jin L., Lau G.K.K., Wang F-S. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, Vol. 27 (Suppl. 2), pp. 112-120.
60. Zhao W., Li J.J., Cao D.Y., Li X., Zhang L.Y., He Y., Yue S.Q., Wang D.S., Dou K.F. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 18, no. 10, pp. 1048-1058.

---

**Авторы:**

**Останин А.А.** — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

**Старостина Н.М.** — к.м.н., заслуженный врач РФ, заведующая отделением иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

**Меледина И.В.** — к.м.н., врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

**Шипунов М.В.** — к.м.н., врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

**Леплина О.Ю.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

**Шевела Е.Я.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

**Черных Е.Р.** — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

**Authors:**

**Ostanin A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Starostina N.M.**, PhD (Medicine), Honored Doctor of the Russian Federation, Head, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Meledina I.V.**, PhD (Medicine), Doctor-Immunologist, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Shipunov M.V.**, PhD (Medicine), Doctor-Immunologist, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Leplina O. Yu.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Shevela E. Ya.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Chernykh E.R.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 04.09.2015  
Принята к печати 29.09.2015

Received 04.09.2015  
Accepted 29.09.2015