

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-60-72

КОРРЕКЦИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ПУТЕМ ИМПЛАНТАЦИИ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ: МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, Н.А. Онищенко¹, А.В. Гречина², М.Е. Крашенинников⁴,
А.О. Никольская¹, Е.А. Волкова¹, Н.П. Можейко¹, Н.А. Бояринова², А.В. Люндун⁴,
Г.А. Пьявченко², Л.И. Давыдова³, А.Ю. Архипова^{5, 6}, В.Г. Бозуш³, С.В. Готье^{1, 2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

³ ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация

⁴ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Российская Федерация

⁵ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

⁶ МГУ-ППИ, Шэньчжэнь, КНР

Цель: на экспериментальной модели хронической печеночной недостаточности (ХПН) изучить эффективность коррекции морфофункциональных характеристик состояния печени с помощью имплантируемых в нее клеточно-инженерных конструкций (КИК). **Материалы и методы.** Опыты проведены на крысах-самцах породы Вистар (n = 80) в возрасте 6–8 месяцев с исходной массой 230–250 г. Моделирование ХПН осуществляли путем затравки крыс 60% масляным раствором CCl₄ по модифицированной схеме в течение 42 суток. В качестве матрикса для изготовления КИК использовали микрогель на основе рекомбинантного спидроина rS1/9. Клеточным компонентом КИК служили аллогенные клетки печени (КП) и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (ММСК КМ) здорового донора. Эффективность корригирующего воздействия имплантируемых КИК оценивали на экспериментальной модели ХПН (n = 60) в двух группах крыс: 1-я группа – контроль (n = 20), в паренхиму поврежденной печени вводили 1 мл физиологического раствора; 2-я группа – экспериментальная (n = 40), в паренхиму поврежденной печени имплантировали КИК, содержащие аллогенные КП и ММСК КМ в соотношении 5 : 1 в объеме 1 мл. Для осуществления длительного наблюдения за состоянием КИК их маркировали путем дополнительного включения в состав Цитодекса-3. Эффективность регуляторного воздействия КИК на восстановительные процессы в печени оценивали с помощью биохимических, морфологических и морфометрических методов, а также метода проточной цитофлуометрии на сроке 90 суток после имплантации. **Результаты.** В контрольной группе летальность при моделировании ХПН составила 25%. Летальность в экспериментальной группе с ХПН при имплантации КИК отсутствовала. Установлено корригирующее воздействие КИК на используемые биохимические и морфологические показатели состояния печени при ХПН в течение 90 суток наблюдения при сопутствующем сохранении структурного гомеостаза клеток в имплантируемых КИК. **Заключение.** Использование КИК, имплантируемых в печень, позволяет осуществлять эффективную коррекцию ХПН путем активации восстановительных процессов в поврежденной печени, которая обусловлена длительным сохранением структурного гомеостаза клеток, включенных в состав КИК.

Ключевые слова: регенеративная медицина, коррекция хронической печеночной недостаточности, матрикс, микрогель, клетки печени, ММСК КМ, клеточно-инженерные конструкции.

Для корреспонденции: Шагидулин Мурат Юнусович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 196-87-90. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

Corresponding author: Murat Shagidulin. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 196-87-90. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

TREATMENT OF CHRONIC LIVER DISEASE USING CELL-ENGINEERED CONSTRUCTS: MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS

M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, N.A. Onishchenko¹, A.V. Grechina², M.E. Krasheninnikov⁴, A.O. Nikolskaya¹, E.A. Volkova¹, N.P. Mogeiko¹, N.A. Boiarinova², A.V. Lyundup⁴, G.A. Piavchenko², L.I. Davydova³, A.Yu. Arhipova^{5, 6}, V.G. Bogush³, S.V. Gautier^{1, 2}

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

³ Kurchatov Institute, Moscow, Russian Federation

⁴ RUDN University, Moscow, Russian Federation

⁵ Moscow State University, Moscow, Russian Federation

⁶ Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, China

Objective: to study the effectiveness of correcting the morphofunctional characteristics of the liver in an experimental model of chronic liver disease (CLD), using implanted cell-engineered constructs (CECs). **Materials and methods.** Experiments were carried out on male Wistar rats (n = 80) aged 6–8 months with an initial weight of 230–250 g. CLD was modeled by inoculating the rats with 60% CCl₄ oil solution for 42 days based on a modified scheme. Microgel based on recombinant spidroin rS1/9 was used as a matrix for CECs fabrication. Allogeneic liver cells (LCs) and multipotent bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) from a healthy donor were used as the cellular component of the CECs. The effectiveness of the corrective effect of the implanted CECs was assessed in an experimental CLD model (n = 60) in two groups of rats: Group 1 (control, n = 20, 1 mL of saline solution was injected into the damaged liver parenchyma) and Group 2 (experimental, n = 40, CECs containing allogeneic LCs and BM-MSCs in a 5 : 1 ratio in a volume of 1 mL were implanted into the damaged liver parenchyma). For long-term monitoring of the CEC state, the CECs were labeled by additional inclusion in Cytodex-3. The effectiveness of the regulatory effect of CECs on regenerative processes in the liver was evaluated using biochemical, morphological and morphometric techniques, as well as by flow cytometry at 90 days after implantation. **Results.** In the control group, the mortality rate in CLD was 25%. There was no death in the experimental group with CLD after CEC implantation. The CECs were found to have a corrective effect on the biochemical and morphological parameters of the liver in CLD during 90 days of follow-up, with concomitant preservation of structural cellular homeostasis in the implanted CECs. **Conclusion.** Implantation of CECs in the liver facilitates effective correction of CLD by activating regenerative processes in the damaged liver, which is due to long-term preservation of structural cellular homeostasis in the CECs.

Keywords: regenerative medicine, chronic liver disease treatment, matrix, microgel, liver cells, bone marrow-derived mesenchymal stem cells, cell-engineered constructs.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних десятилетий в нашей стране, как и во всем мире, выявлен значительный рост числа тяжелых хронических заболеваний печени, приводящих к декомпенсированной хронической печеночной недостаточности (ХПН). Заболевание характеризуется прогрессирующим течением, что требует осуществления постоянных корригирующих воздействий. Среди применяемых методов лечения трансплантация печени является наиболее эффективным и единственно радикальным в отношении длительного выживания больных методом лечения хронических болезней печени в терминальной стадии [1, 2].

Основной задачей современного этапа развития трансплантологии остается обеспечение доступ-

ности трансплантации органов всем нуждающимся пациентам. Потребность в трансплантации печени составляет ежегодно не менее 20 на 1 млн населения [1]. Однако прогрессивно нарастающий дефицит донорских органов ограничивает применение этого высокотехнологического вида помощи, в связи с чем число пациентов, находящихся в листе ожидания, продолжает расти [2–5]. Неуклонный рост хронических заболеваний печени [3], приводящий к ее необратимому повреждению, требует поиска новых эффективных методов лечения.

Анализ работ, проведенных в области трансплантологии и искусственных органов, свидетельствует о появлении принципиально нового подхода к восстановительному лечению поврежденных жизненно важных органов, основанного на технологиях

тканевой инженерии и регенеративной медицины (ТИРМ) [6].

В связи с вышеизложенным разработка биомедицинских технологий поддержки функций печени у пациентов при декомпенсированной ХПН, и особенно у пациентов, находящихся в листе ожидания трансплантации печени, является актуальным направлением современной медицины [5].

Одним из ведущих направлений ТИРМ является разработка методов коррекции функций пораженной печени при ХПН путем создания новой функционально активной ткани печени, способной на определенный срок устранить дефицит функций поврежденной печени, особенно в предтрансплантационном периоде.

К настоящему времени проведен ряд исследований по применению клеточно-инженерных конструкций (КИК), в состав которых входили матриксы из биополимерных материалов, клетки печени (КП) и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (ММСК КМ) [7, 8]. Однако исследований по применению микрогеля на основе рекомбинантных спидроинов для изготовления КИК с целью коррекции и лечения ХПН мы в литературе не обнаружили.

Используемый в работе рекомбинантный спидроин rS1/9 создан на основе белка, ген которого был ранее разработан, синтезирован и клонирован в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [9]. Рекомбинантный спидроин rS1/9 является аналогом природного белка каркасной нити паутины паука-кругопряда *Nephila clavipes* – спидроина 1, молекулярная масса 94 кДа и изоэлектрическая точка pI = 10,3, т. е. положительно заряжен во всем диапазоне физиологических значений pH. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что 2D- и 3D-материалы/изделия на основе rS1/9 характеризуются отсутствием токсичности и аллергенности, медленной резорбцией в организме животных, способностью поддерживать адгезию и пролиферации разных типов клеток [10]. Из раствора рекомбинантного спидроина rS1/9 был сформирован гидрогель, из которого путем механического дробления был получен микрогель, представляющий собой суспензию микрогелевых частиц размером от 100 до 300 мкм, обладающих выраженным регенеративным эффектом [11].

Цель работы: на экспериментальной модели ХПН исследовать возможность долгосрочной коррекции и восстановления функций печени с помощью имплантации клеточно-инженерной конструкции на основе микрогеля из rS1/9, содержащего аллогенные клетки печени и ММСК КМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач экспериментальные исследования проводили на крысах-самцах породы Вистар ($n = 80$) в возрасте 6–8 месяцев с исходной массой 230–250 г. Животных содержали в условиях вивария при температуре 18–20 °С на смешанном рационе питания при свободном доступе к воде. Эксперименты на животных проводили с 9 до 19 часов при комнатной температуре ($t = 22–24$ °С), что исключало суточные колебания митотической активности клеток печени, относительная влажность равнялась 50–65%, цикл освещения был двенадцатичасовым, а смена объема воздуха помещения в час была десятикратной. Рацион вивария для крыс был стандартным: животные питались комбинированным кормом для лабораторных животных (микробиологический статус соответствовал ГОСТ Р 51849-2001 «Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных 55 животных»), фильтрованная водопроводная вода *ad libitum* доставлялась в стандартных питьевых бутылочках (микробиологический статус воды соответствовал СанПиН 2.1.4.1074-01 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения»). Эксперименты и все манипуляции с животными выполняли согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Осуществляли моделирование ХПН путем пролонгированной заправки крыс-самцов породы Вистар четыреххлористым углеродом по модифицированной нами схеме в течение 42 суток [8].

Донорами аллогенных клеток печени (КП) и ММСК КМ были крысы-самцы породы Вистар в возрасте 5–6 месяцев, весом 150–230 г.

Работа по выделению клеток и их культивированию проводилась в соответствии с общими принципами осуществления культуральных исследований. Приготовление культуры ММСК КМ осуществляли по общепринятой методике [8].

Приготовление культуры КП, ее использование также осуществляли по известной методике [12].

При изготовлении КИК сначала проводили предварительное сокультивирование изолированных КП ($2,5–4,0 \times 10^6$ клеток/см³) и ММСК КМ ($0,5–0,8 \times 10^6$ клеток/см³) в течение 3 суток, используя определенное соотношение этих клеток (КП : ММСК КМ = 5 : 1). В культуру сокультивированных клеток дополнительно вносили 150 мкл суспензии микрогеля на основе rS1/9 для их адгезии и добавляли Цитодекс-3 (объем 150 мкл) для приобретения возможности оценки состояния клеточного материала в составе

КИК на длительных сроках после имплантации их в печень.

На 7-е сутки после окончания затравки крысы, выжившие после моделирования ХПН ($n = 60$), были разделены на 2 группы опытов. Группа 1 – контроль ($n = 20$), в которой в паренхиму печени животным вводили физиологический раствор (ХПН + 1,0 мл физиологического раствора,). Группа 2 – экспериментальная ($n = 40$), в паренхиму печени путем ее обкалывания вводили КИК, состоящие из микрогеля rS1/9, аллогенных КП и ММСК КМ = 5 : 1, а также Цитодекс-3 в объеме 1 мл.

Культивирование дрожжей, выделение и очистку рекомбинантного спидроина rS1/9, приготовление гидрогеля и микрогеля на его основе проводили, как описано ранее, в соответствии с ранее опубликованным протоколом [11].

Анализ морфологии поверхности гидрогеля осуществляли на микроскопе CamscanS2 (Cambridge Instruments, Великобритания). Изображения были получены с помощью программного обеспечения MicroCapture (SMA, Россия).

Контроль адекватности созданных моделей ХПН и эффективности коррекции возникших морфофункциональных нарушений в печени с помощью КИК оценивали по уровню летальности и выживаемости животных, по морфологическим и морфометрическим характеристикам состояния печени, а также самих КИК. Функциональную эффективность применения КИК оценивали по значениям биохимических показателей крови. После моделирования ХПН и использованной терапии выживших животных выводили из эксперимента на 90-е сутки путем внутрибрюшинного введения тиопентала натрия в дозировке, вызывающей остановку дыхания. На аутопсии биоптаты печени подвергались морфологическим и морфометрическим исследованиям. Иммуносупрессию не применяли.

Прижизненный забор крови у крыс для биохимических исследований осуществляли под эфирным наркозом путем насечки кончика хвоста. Функцию печени (АлАТ, АсАТ, ЩФ) исследовали на биохимическом анализаторе Reflotron™ («Roche», Швейцария) при использовании специальных тест-полосок Reflotron.

Для морфологических исследований использовали печень от животных групп 1 и 2. Изучали состояние регенерационных процессов в печени, как в зонах имплантации КИК, так и вне зон имплантации КИК. Оценивали данные световой микроскопии при окрашивании срезов гематоксилином и эозином, по Маллори, по Ван-Гизону (микроскоп Leica DM 6000 В с камерой Leica LTDCN 9435, Германия).

Морфометрический анализ осуществляли с использованием морфометрической программы

ImageScopeM (ООО «Системы для микроскопии и анализа», Россия) с использованием микроскопа Leica DM 1000 и камеры Leica LTDCN 9435 DFC 295 (LeicaCamera AG, Германия). Морфометрически определяли: наличие цирроза (подсчет количества ложных долек); удельную площадь соединительной ткани (в % отношении к общей площади среза печени) [13, 14]; осуществляли подсчет количества двуядерных гепатоцитов (на 10 полей зрения при увеличении $\times 400$), гепатоцитов с признаками жировой дистрофии, гепатоцитов с дегенерирующими ядрами и внутриядерными липидными включениями; площадь кровеносных сосудов и желчных протоков (в ‰).

Для верификации и структурного анализа срезов ткани печени проводили обработку изображений с помощью AI (Artificial Intelligence) анализа. Данный метод является эффективным способом анализа и представления полученных результатов [15, 16] и позволяет наглядно дифференцировать структуры в ткани на основе ее тинкториальных свойств.

Преобразование изображений гистологических срезов печени в виде трехмерного пространства было выполнено в программе MATLAB (MATLAB Corporation, USA). Выделяли следующие типы структур: «оксифильная цитоплазма гепатоцитов», «базофильные ядра гепатоцитов», «волоконистая соединительная ткань», «межклеточное вещество» и «пустые пространства (просвет сосудов, адипоциты)». Исходное изображение было преобразовано в серую шкалу. После этого была построена трехмерная 3D-модель с учетом добавленных констант для каждого серошкального изображения. Построенные модели и псевдоокрашивание были индивидуальны для каждого изображения [17].

Для контроля жизнеспособности клеток в первичной культуре использовали окраску метиленовым синим [18].

Проводили также подсчет концентрации Т-регуляторных клеток ($CD4^+$, $CD25^+$, FoxP3) в крови, которые отражают степень иммунной толерантности организма на аллогенные клетки в составе КИК, используя проточный цитофлуориметр (BeckmanCoulter, США). Для этого лимфоциты крови метили крысиными антителами $CD4^+$, $CD25^+$ и FoxP3 фирмы «eBioscience» (США).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью компьютерного статистического пакета Biostat; достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента с учетом поправки Бонферонни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$ (Статистический пакет, рекомендованный ВОЗ, EpiInfo 5.0). Актуриальную выживаемость животных в течение года после моделирования ХПН (контроль) и на фоне ее коррекции путем им-

плантации КИК рассчитывали по Kaplan–Meier при помощи статистического пакета программы Statistica for Windows, v. 12.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Жизнеспособность первичной культуры ММСК КМ составляла $94 \pm 2\%$. Клеточная суспензия, приготовленная из донорской печени, содержала $\sim 95\text{--}98\%$ гепатоцитов и $\sim 5\text{--}2\%$ непаренхиматозных клеток, жизнеспособность их составляла $76 \pm 4\%$. Разделение клеток на паренхиматозные и непаренхиматозные не проводили.

Структура поверхности микрогеля была проанализирована с помощью СЭМ. Микрогель представляет собой микрочастицы со средним размером от 100 до 300 мкм и ярко выраженной рельефной поверх-

ностью; поверхностные элементы гидрогеля включают наноструктуры диаметром от 100 до 300 нм и микроструктуры размером от 10 до 30 мкм (рис. 1).

После получения первичной культуры клеток мы считали необходимым осуществить их предварительное культивирование для устранения стрессорного повреждения в процессе выделения, а также для активизации их клеточных функций. Для этого ММСК КМ культивировали в течение 7 суток, а затем сокультивировали с введенными в культуру КП в течение последующих 3 суток. Сокультивирование клеток выполняли не только в стационарном, но и во вращательном режиме (1,5–2,0 об/мин) для имитации условий массообмена, обеспечиваемого с помощью кровообращения, т. к. только в этих условиях можно обеспечить длительную жизнеспособность и проли-

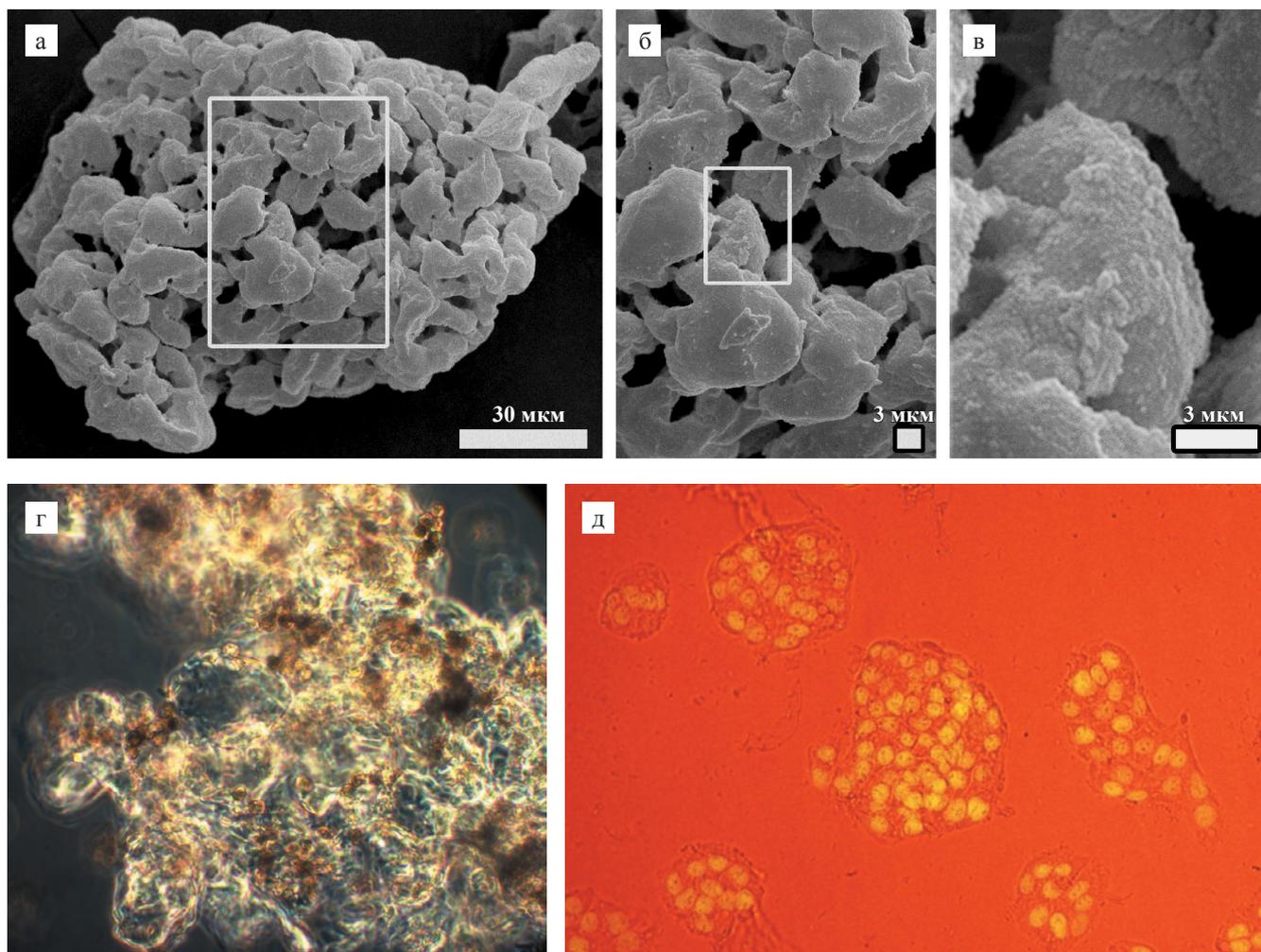


Рис. 1. Структура микрогеля на основе rS1/9: а – СЭМ-изображение частицы микрогеля, масштабная линейка 30 мкм; б и в – увеличенное изображение области в белой рамке, масштабная линейка 3 мкм; г – сокультивация КП и ММСК КМ на rS1/9, фазовый контраст, $\times 400$; д – окраска на специфический гепатоцитарный ядерный антиген 4 (HNF-4), флуоресцентная микроскопия + фазовый контраст, $\times 200$

Fig. 1. Structure of rS1/9-based microgel: а – SEM image of microgel particle (scale bar = 30 μm); б and в – enlarged image of the area in a white frame (scale bar = 3 μm); г – Co-cultivation of LCs and BM-MSCs on rS1/9, phase contrast microscopy images (400 \times magnification); д – Staining for specific hepatocyte nuclear antigen 4 (HNF-4), fluorescence microscopy + phase contrast (200 \times magnification)

феративную активность КП при сокультивировании с ММСК КМ. Для определения пригодности rS1/9 для адгезии КП провели исследования, которые подтвердили активную адгезию КП на поверхности rS1/9.

В процессе моделирования ХПН летальность составила 25%. Далее в контрольной группе (группа 1) после окончания затравки гибель животных не прекратилась: погибло 5 крыс из 20 (25%), что, по нашему мнению, подтверждает адекватность выбранной модели формирования ХПН. В экспериментальной группе (группа 2) летальности на этом сроке (90 суток) не было. Актуриальная выживаемость на этапе затравки и при лечении представлена на рис. 2.

На начальном этапе исследований изучали нормальную структуру ткани печени. Выявлена однородная паренхима печени, образованная печеночными балками из гепатоцитов, с расположенными между ними синусоидными капиллярами в виде щелевидных пространств, а также определялось наличие эндотелия и просвета капилляров и вен (рис. 3, а–в).

После окончания затравки (42 суток) на 7-е сутки выявляли: изменения балочной структуры печеночных долек, выраженный полиморфизм паренхиматозных клеток, жировую дистрофию гепатоцитов, кариорексис, кариолизис, некроз гепатоцитов. Выявляли массивную жировую дистрофию гепатоцитов и формирование ложных долек (рис. 3, г–е).

К 90-м суткам после моделирования ХПН в контрольной группе наступала субтотальная перестройка гисто-архитектоники печени с замещением нормальной паренхимы ложными дольками. Склеротические

изменения (фиброз) проявлялись образованием коллагеновых волокон по ходу портальных трактов и формированием порто-портальных и порто-центральных септ с образованием ложных долек. Выявлялись очаговые некрозы гепатоцитов, расширение и полнокровие синусоидов и полнокровие центральных вен. В паренхиме печени отмечали редкую лимфоидно-клеточную инфильтрацию, пролиферацию гистиобластов и гистоцитов. В экспериментальной группе к 90-м суткам наблюдали существенно меньшую выраженность токсического поражения печени по сравнению с контролем. Отмечали отчетливо выраженную положительную динамику восстановления печеночной паренхимы. Архитектоника печени практически полностью восстанавливалась, отмечался регресс жировой дистрофии и переход ее в мелкокапельную форму, выявляли восстановление структуры печеночной дольки. Появлялись сохраненные гепатоциты без признаков дистрофии вокруг вен; архитектура балок восстанавливалась, формирование ложных долек не определялось (рис. 3, ж), тогда как в контроле имели место появление ложных долек и выраженная белковая дистрофия гепатоцитов, склероз и фиброз паренхимы печени.

Для объективизации полученных результатов осуществляли количественную и полуколичественную оценку структурных изменений, возникающих в ткани печени при ХПН без лечения и при использовании КИК. Были проведены морфометрические исследования состояния клеток паренхимы печени (подсчет количества гепатоцитов с признаками жи-

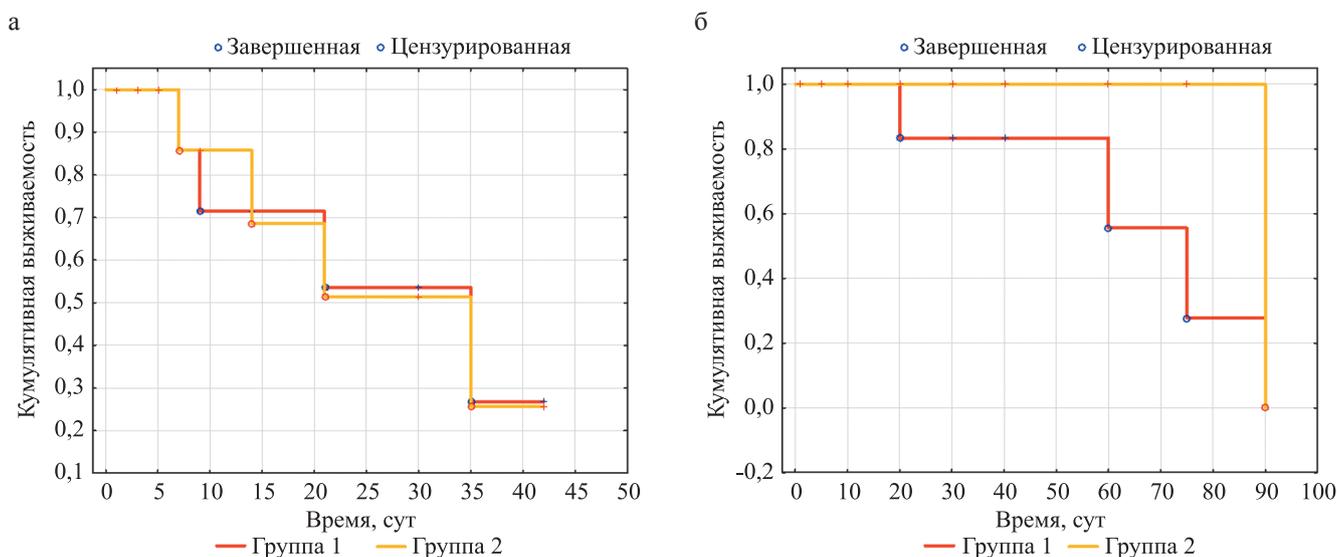


Рис. 2. Актуриальная выживаемость животных (по Каплану–Майеру): а – в процессе моделирования ХПН: Gehan’s Wilcoxon Test (Spreadsheet1) $WW = -1,000$, $Sum = 670,00$, $Var = 76,32$, $Test\ statistic = -0,037655$, $p = 0,96996$; б – в процессе лечения ХПН: Gehan’s Wilcoxon Test (Spreadsheet1) $WW = -11,00$, $Sum = 238,00$, $Var = 62,632$, $Test\ statistic = -1,32676$, $p = 0,18459$

Fig. 2. Actuarial survival (according to Kaplan–Meier estimate): а – during CLD modeling: Gehan’s Wilcoxon Test (Spreadsheet1) $WW = -1,000$, $Sum = 670.00$, $Var = 76.32$, $Test\ statistic = -0.037655$, $p = 0.96996$; б – during CLD treatment: Gehan’s Wilcoxon Test (Spreadsheet1) $WW = -11.00$, $Sum = 238.00$, $Var = 62.632$, $Test\ statistic = -1.32676$, $p = 0.18459$

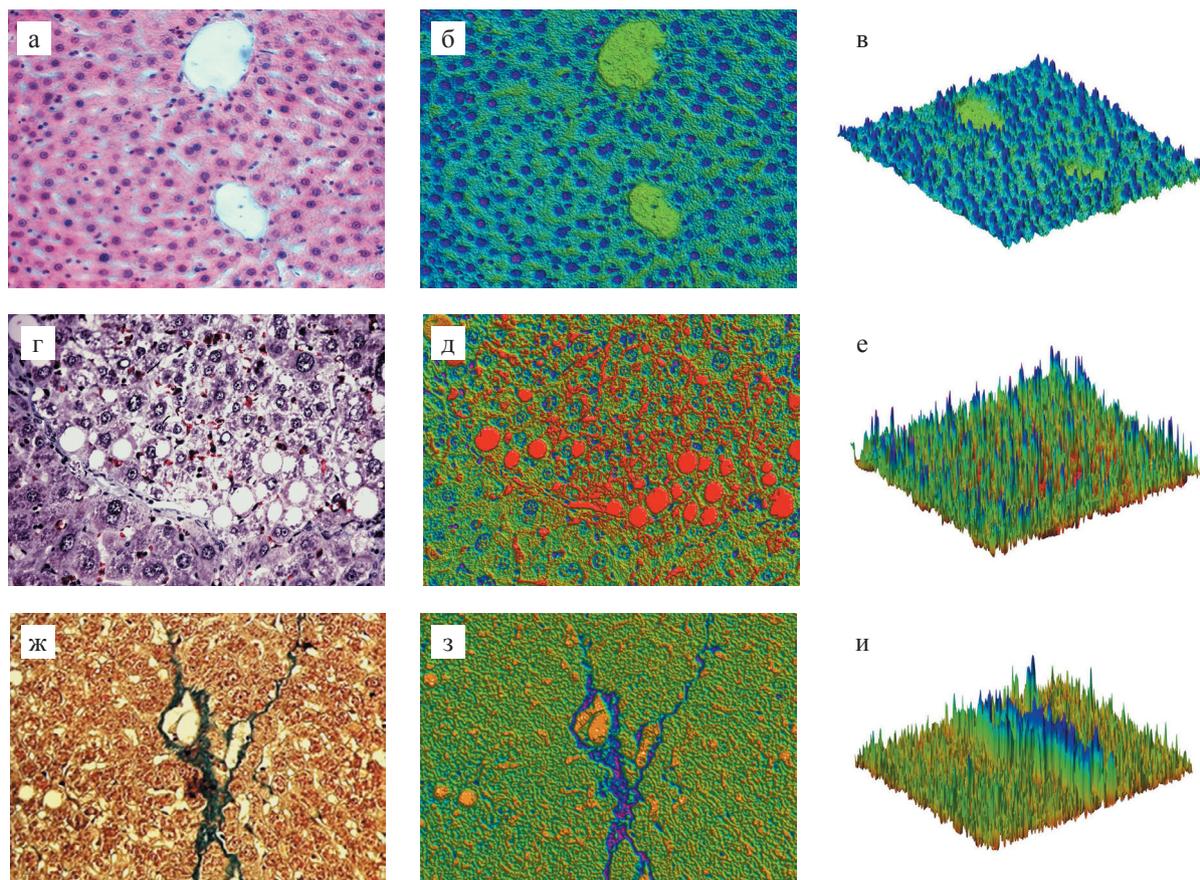


Рис. 3. Гистологические и псевдоокрашенные 2D- и 3D-препараты печени: а – гистологические препараты здоровой печени: центральная часть дольки с сохранными структурами с наличием двух центральных вен, балочное строение не нарушено, зернистая белковая дистрофия гепатоцитов, незначительное расширение синусоидов, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; б, в – на псевдоокрашенных 2D и 3D выявлена общая структура паренхимы органа без патологических изменений, гепатоциты с оксифильной окраской цитоплазмы и базофильными ядрами и нормальным соотношением ядер и цитоплазмы, синусоидальные капилляры не расширены, цитоплазма гепатоцитов псевдоокрашена голубым, ядра – синим, синусоидальные пространства и просвет сосудов – зеленым, базофильные ядра гепатоцитов – сиреневый; г – гистологический препарат печени на 7-е сутки после окончания моделирования ХПН: начальное формирование фиброзной ткани, очаговая белковая зернистая дистрофия гепатоцитов, значительная группа клеток в состоянии баллонной дистрофии и некроза, очаговая крупно- и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, расширение и полнокровие синусоидов, в паренхиме редкая лимфоидно-клеточная инфильтрация, окраска по Ван-Гизону, $\times 400$; д, е – жировая дистрофия гепатоцитов со сдвигом ядерно-цитоплазматического соотношения: гепатоциты с увеличенным объемом цитоплазмы, выявляются участки фиброза, на псевдоокрашенных 2D и 3D (д, е) изображениях цитоплазма гепатоцитов – зеленый цвет, ядра гепатоцитов – синий и фиолетовый цвет для выраженных гиперхромных тинкториальных свойств, красный цвет для пустых мест, преимущественно в гепатоцитах с жировой дистрофией; ж – гистологический препарат печени на 90-е сутки: ХПН + имплантация КИК с КП и ММСК КМ (группа 2), центральная часть дольки с сохранными структурами, окраска по Ван-Гизону, $\times 200$; з, и – цитоплазма гепатоцитов зеленого цвета, их ядра – синего и фиолетового при выраженной гиперхромной тинкториальности, преобладающие пустые места в гепатоцитах с жировой дистрофией – красного цвета

Fig. 3. Histological and pseudostained 2D and 3D liver preparations: а – tissue specimens of healthy liver: Central part of the lobule with preserved structures with the presence of two central veins. Balloon structure is not disturbed, granular hepatocyte dystrophy, slight expansion of sinusoids. H&E staining ($200\times$ magnification); б, в – pseudo-stained 2D and 3D images revealed the general structure of organ parenchyma without pathological changes. Hepatocytes with oxyphilic staining of cytoplasm and basophilic nuclei and a normal nuclear-cytoplasmic ratio, sinusoidal capillaries were not dilated. Hepatocyte cytoplasm is pseudostained in blue, nuclei are blue, sinusoidal spaces and vascular lumen are green, basophilic hepatocyte nuclei are lilac; г – liver tissue specimen on day 7 after the end of CLD modeling: initial formation of fibrous tissue, focal proteinaceous granular degeneration of hepatocytes, significant group of cells in a state of ballooning degeneration and necrosis. Focal large- and small-drop fatty degeneration in hepatocytes. Sinusoidal dilatation and plethora. Rare lymphoid-cell infiltration in the parenchyma. Van Gieson's staining ($400\times$ magnification); д, е – fatty degeneration of hepatocytes with a shift in nuclear-cytoplasmic ratio: hepatocytes with increased volume of cytoplasm. Areas of fibrosis are identified. On pseudo-stained 2D and 3D (д, е) images, hepatocyte cytoplasm is green, hepatocyte nuclei are blue and purple for pronounced hyperchromic tinctorial properties. Red color for empty spaces, predominantly in hepatocytes with fatty degeneration; ж – liver tissue specimen at day 90: CLD + CEC implantation with LCs and BM-MSCs (group 2). Central part of the lobule with preserved structures. Van Gieson's staining ($200\times$ magnification); з, и – hepatocyte cytoplasm is green, their nuclei are blue and purple with pronounced tinctorial properties, the prevailing empty spaces in hepatocytes with fatty degeneration are red

ровой дистрофии, с дегенерирующими ядрами, с внутриядерными липидными включениями и подсчет количества двуядерных гепатоцитов), а также непаренхиматозных структур (определение удельной площади соединительной ткани и количества ложных долек в печени), включая площадь кровеносных сосудов и желчных протоков в ткани печени на сроке 90 суток после моделирования ХПН (рис. 4, а, б).

При морфометрическом исследовании состояния непаренхиматозных структур (определение удельной площади соединительной ткани и количества ложных долек в печени) на сроке 90 суток было установлено, что под влиянием КИК происходит восстановление паренхимы печени, а также снижение удельной площади соединительной ткани печени (рис. 4, а) и количества ложных долек в ней (рис. 4, б). В то же время в контрольной группе происходило увеличение этих показателей до 8,2 и 2,8% соответственно.

Было установлено также, что при лечении с помощью КИК (экспериментальная группа 2) происходит быстрое и достоверное снижение количества гепатоцитов – с признаками жировой дистрофии, с дегенерирующими ядрами, с внутриядерными липидными включениями – и более выраженное достоверное повышение количества двуядерных гепатоцитов. Причем вышеуказанные изменения сочетались с выраженным позитивным клиническим эффектом. На сроке 90 суток отмечали также нормализацию площади кровеносных сосудов и желчных протоков в ткани печени по сравнению с контрольной группой (рис. 4, в–з).

Вышеприведенные исследования позволили заключить, что восстановительные процессы как в непаренхиматозных, так и в паренхиматозных структурах ткани печени при ХПН интенсифицируются только при использовании КИК с аллогенными КП и ММСК КМ.

Выявленные особенности регенерации печени при использовании КИК с аллогенными КП и ММСК КМ обусловили необходимость изучения гистологического состояния самих КИК и примыкающей к ним ткани печени на сроке 90 суток после имплантации.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что аллогенные КП в составе КИК при имплантации в печень реципиента в течение длительного времени (90 суток) сохраняют свою жизнеспособность и пролиферативную активность, причем без признаков их отторжения, несмотря на отсутствие иммуносупрессии (рис. 5, а–е).

Гистологический и модельный трехмерный анализ состояния гепатоцитов в КИК, имплантированных в паренхиму печени при ХПН, показал, что структурные изменения гепатоцитов в составе КИК хорошо различимы в гистологических препаратах. Они четко идентифицируются различным цветовым окрашиванием, что позволяет выделять разные

структуры. Таким образом, имплантация КИК, содержащих микрогель на основе rS1/9 и аллогенные КП и ММСК КМ, приводит к положительным структурным изменениям в паренхиме печени на фоне длительного сохранения, развития и поддержания нормального структурного гомеостаза гепатоцитов в составе КИК.

Можно полагать, что длительное отсутствие отчетливо выраженных признаков иммунного отторжения КИК, содержащих в своем составе аллогенные клетки (КП и ММСК КМ), является следствием локальной реализации присущих ММСК КМ иммуномодулирующих и толерогенных свойств, которые защищают КИК от их иммунного отторжения и позволяют им длительно и эффективно функционировать.

Исследование крови на содержание Т-регуляторных клеток методом проточной цитофлуометрии подтвердило, что у крыс с ХПН, леченных методом имплантации КИК с аллогенными КП и ММСК КМ, через 90 суток, так же как и у здоровых, отмечалось сохранение в крови исходного уровня концентрации $CD4^+$, $CD25^+$, $Foxp3^+$ Т-регуляторных клеток (рис. 6).

В то же время по сравнению с контрольной группой в экспериментальной группе к 90-м суткам имело место достоверное повышение содержания этого пула Т-регуляторных клеток. Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что поддержание в течение длительного времени жизнеспособности пересаженных аллогенных КП и ММСК КМ в составе КИК обусловлено индуцируемой и поддерживаемой ММСК КМ иммунологической толерантностью в организме.

Параллельно выполненные исследования функционального состояния печени путем динамического измерения биохимических показателей сыворотки крови подтвердили развитие устойчивого токсического повреждения печени сразу после моделирования ХПН. Развитие ХПН сопровождалось тяжелым нарушением функциональных показателей печени: АлАТ, АсАТ и ЩФ сразу в течение первых 7 суток после окончания затравки были резко повышены у животных 1-й и 2-й групп. Однако в экспериментальной группе с имплантацией КИК в течение первых 30 суток наблюдался быстрый темп нормализации исследуемых биохимических показателей (АлАТ, АсАТ, ЩФ) и их полное восстановление к концу срока наблюдения.

При дальнейшем наблюдении в группе животных с имплантацией КИК биохимические показатели, характеризующие цитолитический синдром, оставались в пределах нормы, тогда как в контроле (группа 1) эти показатели оставались повышенными в течение 90 суток. Это объясняет 25% летальность на исследуемом сроке в контрольной группе.

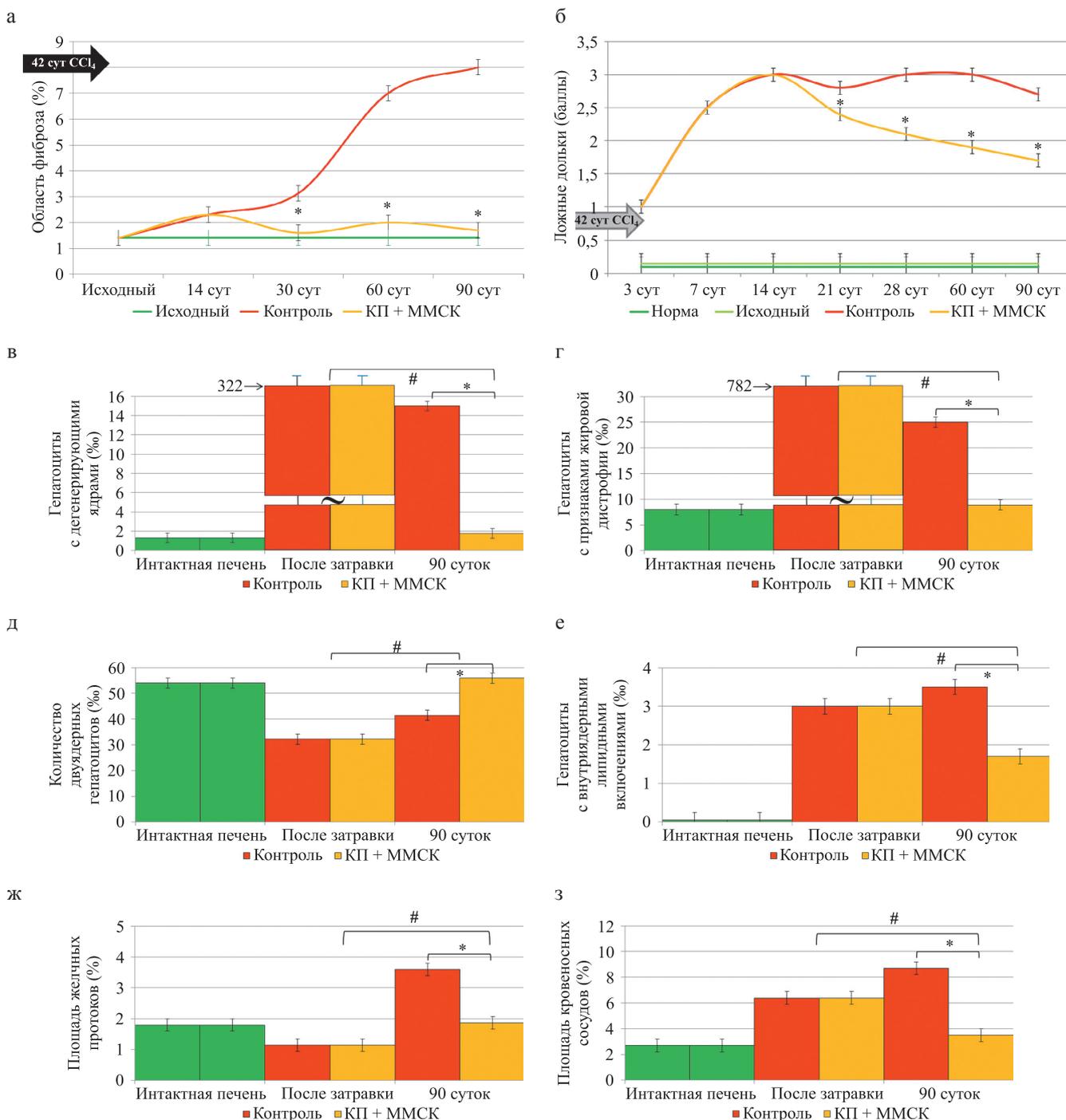


Рис. 4. Динамическая морфометрическая оценка состояния непаренхиматозных структур при моделировании ХПН без и с имплантацией КИК на сроке 90 суток: а – изменение удельной площади соединительной ткани (%), у intactных животных среднее значение показателя удельной площади соединительной ткани составляло 1,4%; б – изменение количества ложных долек в печени; в-з – динамическая морфометрическая оценка состояния характеристик гепатоцитов печени крыс, желчных протоков и кровеносных сосудов при моделировании ХПН без и с имплантацией КИК на сроке 90 суток. 1-я группа – контроль (физиоствор); 2-я группа – применение КИК с аллогенными КП: ММСК КМ = 5 : 1. * – различие достоверно по сравнению с уровнем показателя в печени крыс в контроле (1-я группа), $p < 0,05$; # – различие достоверно по сравнению с уровнем показателя в печени крыс в период после затравки, $p < 0,05$

Fig. 4. Dynamic morphometric assessment of the state of nonparenchymal structures in CLD simulation without and with CEC implantation at day 90: а – change in the specific area of the connective tissue (%). In intact animals, the average value of the specific area of the connective tissue was 1.4%; б – change in the number of false lobules in the liver; в-з – dynamic morphometric assessment of the characteristics of rat liver hepatocytes, bile ducts and blood vessels in CLD simulation without and with CEC implantation at day 90. Group 1 – control (saline); group 2 – CEC with allogeneic LCs : BM-MSCs = 5 : 1. * – the difference is significant compared to the level of this indicator in the liver of control rats (group 1); $p < 0.05$; # – the difference is significant in comparison with the level this indicator in the liver of rats after inoculation, $p < 0.05$

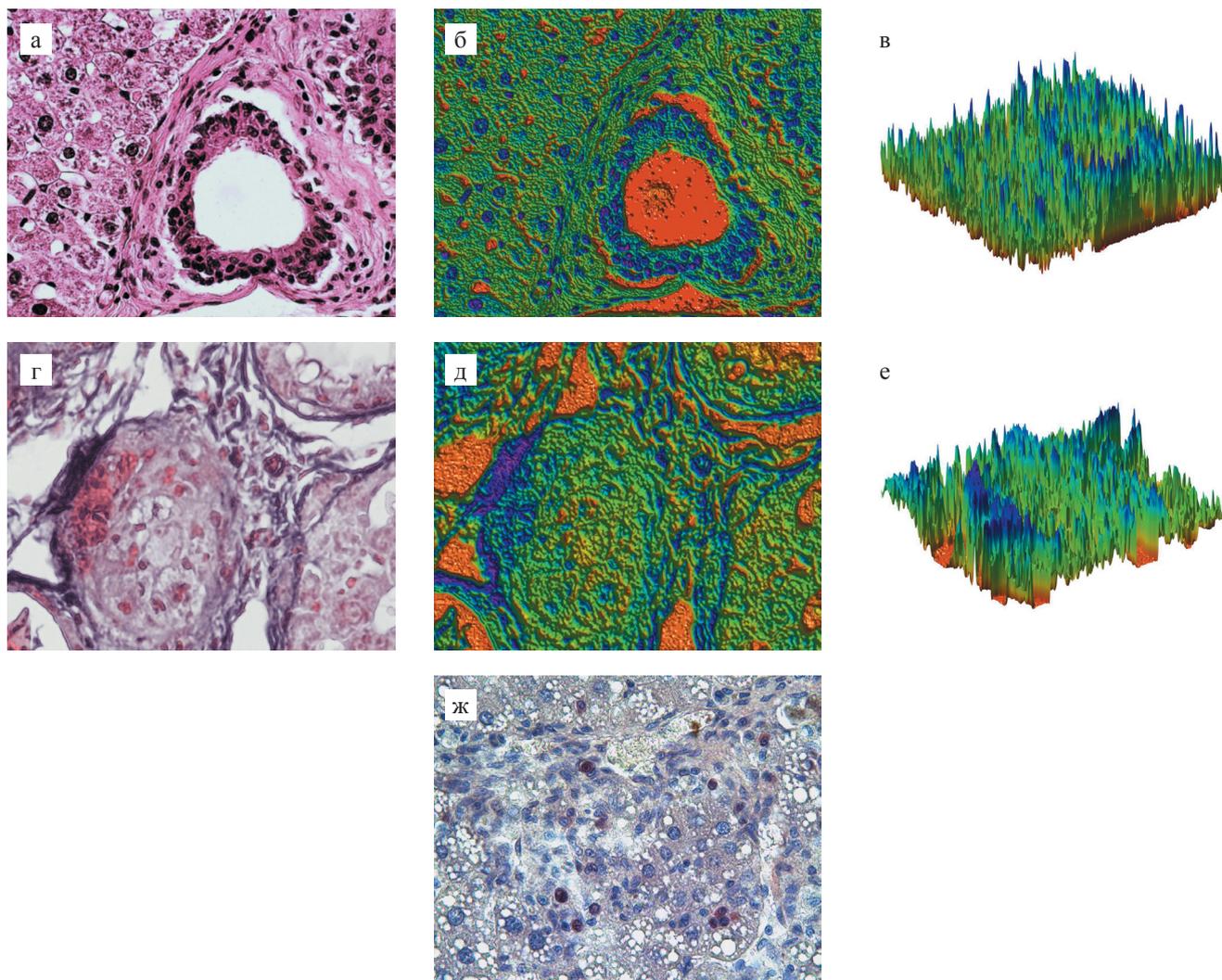


Рис. 5. Гистологическая структура КИК печени с аллогенными КП и ММСК КМ (2-я группа) на сроке 90 суток: а – пересаженные гепатоциты в составе КИК, окраска гематоксилином-эозином. $\times 400$; б, в – выявлены структурно развивающиеся нормальные гепатоциты, встречаются гипертрофические гепатоциты, ограниченные фиброзной соединительно-тканной капсулой, форма и соотношение ядер и цитоплазмы смещаются к нормальным параметрам гепатоцитов, на изображениях после псевдоокрашивания клеточная цитоплазма – зеленый цвет, ядра – синий цвет с фиолетовыми включениями, в более темных тонах ядра гепатоцитов в клеточно-инженерной конструкции, просвет псевдоокрашен красным; г – пересаженные гепатоциты в составе КИК, окраска гематоксилином-эозином. $\times 400$; д, е – после разрушения соединительно-тканной капсулы нормальные гепатоциты распространяются на соседние участки и замещают дистрофические гепатоциты, волокнистая соединительно-тканная капсула распадается, и рядом с ее первичной границей располагаются нормальные гепатоциты, на изображениях после псевдоокрашивания (д, е) нормальные гепатоциты: клеточная цитоплазма зеленого цвета, синие ядра, более темные ядра фиолетового цвета в клеточно-инженерной конструкции, просветы – красного цвета; ж – специфически PCNA-положительные клетки – светло-коричневые с темно-коричневыми ядрами, гепатоциты – оксифильные цитоплазмы и базофильные ядра, окрашивание PCNA по стандартным протоколам с дополнительным окрашиванием гематоксилином-эозином. $\times 100$

Fig. 5. Histological structure of hepatic CECs with allogeneic LCs and BM-MSCs (group 2) at day 90: a – transplanted hepatocytes as a part of CECs. H&E staining ($400\times$ magnification); б, в – there are structurally developing normal hepatocytes, hypertrophic hepatocytes, limited by fibrous connective tissue capsule, the shape and nuclear-cytoplasmic shifted to normal hepatocyte parameters. On the images after pseudo-coloring, the cell cytoplasm is green, nuclei are blue with purple inclusions, hepatocyte nuclei are in darker tones in a cell-engineered construct, the lumen is pseudo-stained red; г – transplanted hepatocytes as part of CECs. H&E staining ($400\times$ magnification); д, е – after destruction of the connective-tissue capsule, normal hepatocytes spread to neighboring areas and replace dystrophic hepatocytes. The fibrous connective tissue capsule disintegrates, and normal hepatocytes are located near its primary border. Images after pseudo-staining (д, е) show normal hepatocytes: cell cytoplasm is green, nuclei are blue, darker nuclei are purple in the cell-engineered construct, lumen is red; ж, specifically PCNA-positive cells – light brown with dark brown nuclei, hepatocytes – oxyphilic cytoplasm and basophilic nuclei, PCNA staining by standard protocols with additional H&E staining ($100\times$ magnification)

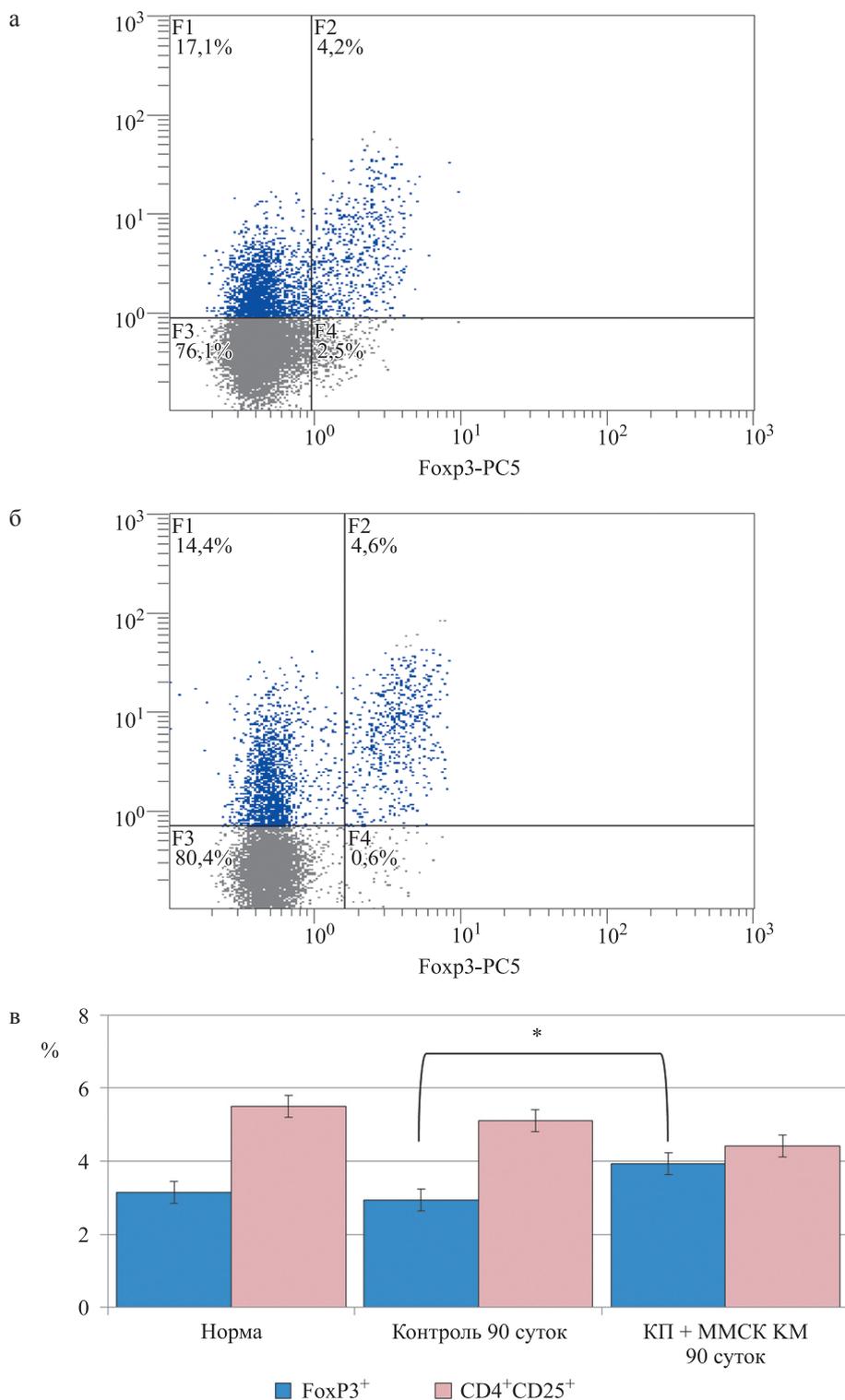


Рис. 6. Содержание CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ Т-регуляторных клеток в периферической крови крыс: а – норма; б – через 90 суток после моделирования ХПН и имплантации КИК, содержащих аллогенные КП и ММСК КМ, опыты без иммуносупрессии, проточная цитофлуориметрия; в – графическое изображение концентрации Т-лимфоцитов, содержащих маркеры CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ в периферической крови здоровых, контрольных крыс после моделирования ХПН и имплантации КИК, содержащих аллогенные КП и ММСК КМ, в экспериментах через 90 суток без иммуносупрессии (%), проточная цитофлуориметрия. * – p < 0,05 по отношению к норме

Fig. 6. Levels of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in the peripheral blood of rats: а – normal; б – day 90 after CLD modeling and implantation of CECs containing allogeneic LCs and BM-MSCs, experiments without immunosuppression. Flow cytometry; в – graphical representation of levels of T lymphocytes containing CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ markers in peripheral blood of healthy, control rats after CLD modeling and implantation of CECs containing allogeneic LCs and BM-MSCs, in experiments at day 90 without immunosuppression (%). Flow cytometry. * – p < 0.05 versus norm

Таким образом, быстрый темп нормализации ферментов цитолитического синдрома, гистологической структуры поврежденной ткани печени, большая выраженность снижения удельной площади соединительной ткани, а также сниженное количество гепатоцитов с жировой дистрофией и дегенерирующими ядрами в ткани печени крыс через 90 суток после окончания моделирования ХПН и использования КИК в экспериментальной группе позволяют констатировать, что имплантируемые КИК, изготовленные на основе rS1/9, в состав которых включены аллогенные КП и ММСК КМ в отношении 5 : 1, эффективно модулируют регенерационные процессы в ткани поврежденной печени, и это, очевидно, обусловлено длительно сохраняющимся морфофункциональным гомеостазом в новообразованной гепатоподобной структуре самих КИК, которая формируется и поддерживается после имплантации КИК факторами, продуцируемыми поврежденной печенью в организм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение возможности эффективной коррекции морфофункциональных нарушений в печени при моделировании ХПН с помощью КИК, имплантируемых в ткань печени, показало, что КИК, изготовленные на основе микрогеля rS1/9 и содержащие аллогенные КП и ММСК КМ в соотношении 5 : 1, способствуют активации регенерационных процессов в поврежденной печени и восстановлению ее функционального и морфологического состояния: развивается быстрая нормализация уровня цитолитических ферментов в крови, пролиферация гепатоцитов и снижение площади соединительной ткани в печени). Было установлено также, что на протяжении всего срока наблюдения в структурах имплантированных КИК отмечалось сохранение морфофункционального гомеостаза КП, включенных в их состав. Результаты проведенных исследований позволяют выдвинуть предположение, что клетки, включенные в состав КИК, становятся центрами формирования новообразованной и длительно функционирующей гепатоподобной ткани, которая, продуцируя биорегуляторные факторы, активизирует и поддерживает восстановительные процессы в поврежденной печени. Полученные результаты позволили также выдвинуть предположение, что длительное выживание и функционирование аллогенных КП в имплантируемых КИК обусловлено участием ММСК КМ и rS1/9, содержащихся в их составе, в поддержании иммунной толерантности организма, за счет которой КИК интегрируются в поврежденную печень и симбиотически поддерживают друг друга.

Наши исследования показали, что имплантация КИК в поврежденную печень создает новые многочисленные центры активации восстановительных

процессов. Эти центры были выявлены гистологически и проведенным трехмерным анализом структурных изменений в ткани печени и в КИК; выявляемые позитивные структурные изменения в печени оказались отчетливо заметны в гистологических препаратах и были также идентифицированы различным цветным окрашиванием структурных элементов печени в 2D- и 3D-изображениях.

Результаты проведенных исследований позволяют нам заключить, что имплантация КИК, созданных на основе микрогеля rS1/9 и содержащих аллогенные КП и ММСК КМ, может стать эффективным методом коррекции и лечения ХПН, а также поддержания функции поврежденной печени у больных, находящихся в листе ожидания на трансплантацию печени.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках соглашения № 075-15-2021-1357.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Трансплантология и искусственные органы: учебник / Под ред. акад. РАН С.В. Готье. М.: Лаборатория знаний, 2018; 319. *Transplantologija i iskusstvennye organy: uchebnik / Pod red. akad. RAN S.V. Gautier. M.: Laboratorija znaniy, 2018; 319.*
2. Готье СВ, Константинов БА, Цирульникова ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА, 2008; 246. *Gautier SV, Konstantinov BA, Cirul'nikova OM. Transplantacija pecheni. M.: MIA, 2008; 246.*
3. Mokdad A, Lopez A, Shahraz S, Lozano R, Mokdad A, Stanaway J et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC. Med.* 2014; 12: 145. doi: 10.1186/s12916-014-0145-y.
4. World health statistics 2021: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342703>.
5. www.eurotransplant.nl/files/statistics.
6. Atala A. Building Organs for the Future. *Transplantation.* 2016; 100: 1595–15956. doi: 10.1097/TP.0000000000001301.
7. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов / Под ред. акад. В.А. Ткачука. М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2017; 256. *Metodicheskie rekomendacii po provedeniju doklinicheskikh issledovanij biomedicinskih kletochnyh produktov / Pod red. akad. V.A. Tkachuka. M.: Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni M.V. Lomonosova, 2017; 256.*
8. Шагидулин МЮ. Разработка и экспериментальное исследование клеточно-инженерных конструкций

- печени для лечения печеночной недостаточности: дис. ... докт. мед. наук. М., 2015; 257. *Shagidulin MJu*. Razrabotka i jeksperimental'noe issledovanie kletочно-inzhenernyh konstrukcij pečeni dlja lečenija pečenočnoj nedostatočnosti. [Dissertation]. М., 2015; 257.
9. *Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI et al*. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009; 4 (1): 17–27. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.013.
 10. *Debabov V, Bogush V*. Recombinant Spidroins as the Basis for New Materials. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020; 6: 3745–3761. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c00109>.
 11. *Nosenko MA, Moysenovich AM, Zvartsev RV, Arkhipova AY, Zhdanova AS, Agapov II et al*. Novel Biodegradable Polymeric Microparticles Facilitate Scarless Wound Healing by Promoting Re-epithelialization and Inhibiting Fibrosis. *Front Immunol*. 2018; 9: 2851. doi: 10.3389/fimmu.2018.02851. eCollection 2018.
 12. *Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенинников МЕ, Севастьянов ВИ*. Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент № 2010110063/14(014141). 03.03.2011. *Gautier SV, Shagidulin MJu, Onishhenko NA, Krashe-ninnikov ME, Sevast'janov VI*. Sposob i transplantat dlja lečenija pečenočnoj nedostatočnosti. Patent № 2010110063/14(014141). 03.03.2011.
 13. *Автандилов ГГ*. Медицинская морфометрия: руководство. М.: Медицина, 1990; 384. *Avtandi-lov GG*. Medicinskaja morfometrija: rukovodstvo. М.: Medicina, 1990; 384.
 14. *Ishak K et al*. Гистологическая оценка стадии и степени хронического гепатита. *Клиническая гепатология*. 2010; 2: 8–11. *Ishak K et al*. Gistologičeskaja ocenka stadii i stepeni hroničeskogo gepatita. *Kliničeskaja gepatologija*. 2010; 2: 8–11.
 15. *Pradhan P, Guo S, Ryabchykov O, Popp J, Bocklitz TW*. Deep learning a boon for biophotonics? *J Biophotonics*. 2020; 13: e201960186. <https://doi.org/10.1002/jbio.201960186>.
 16. *Rivenson Y, Wang H, Wei Z et al*. Virtual histological staining of unlabelled tissue-autofluorescence images via deep learning. *Nat Biomed Eng*. 2019; 3: 466–477. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0362-y>.
 17. *Macenko M, Niethammer M, Marron JS, Borland D, Woosley JT, Guan X et al*. A method for normalizing histology slides for quantitative analysis. *2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*. 2009: 1107–1110. doi: 10.1109/ISBI.2009.5193250.
 18. *Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME et al*. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*. 2013; 87 (8): 1315–1530. doi: 10.1007/s00204-013-1078-5.

*Статья поступила в редакцию 17.05.2022 г.
The article was submitted to the journal on 17.05.2022*