DOI: 10.15825/1995-1191-2015-3-50-57

# ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ, ЗАСЕЛЕННЫХ В МАКРОПОРИСТЫЕ АЛЬГИНАТ-ЖЕЛАТИНОВЫЕ МАТРИЦЫ, КРЫСАМ С ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Д.В. Грицай<sup>1</sup>, А.С. Лебединский<sup>1</sup>, О.В. Оченашко<sup>1</sup>, Е.Ю. Рогульская<sup>1</sup>, Ю.А. Петренко<sup>1</sup>, В.И. Лозинский<sup>2</sup>, Р.В. Иванов<sup>2</sup>, А.Ю. Петренко<sup>1</sup>

1 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

<sup>2</sup> Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Российская Федерация

Цель. Изучить терапевтический потенциал криоконсервированных клеток фетальной печени, заселенных в макропористые альгинат-желатиновые матрицы, при имплантации в сальник крыс с печеночной недостаточностью. Материалы и методы. Печеночную недостаточность индуцировали введением 2-ацетиламинофлуорена с последующим проведением частичной гепатэктомии. В сальник крыс имплантировали макропористые альгинат-желатиновые матрицы, заселенные криоконсервированными аллогенными клетками фетальной печени (КФП). Матрицы дополнительно покрывали альгинатной оболочкой (для предотвращения заселения клетками хозяина). Длительность эксперимента после формирования модели и имплантации составила 4 нед. В крови определяли ряд гепатоспецифических показателей, морфологию печени исследовали гистологически. Клетки, заселенные в альгинат-желатиновые матрицы, визуализировали флуоресцентным красителем, состояние матриц после имплантации оценивали гистологически. Результаты. Имплантация макропористых матриц здоровым крысам сопровождалась их интенсивным заселением клетками хозяина. Нанесение дополнительной капсулы из альгината на матрицу практически предотвращало это явление. Имплантация макропористых матриц, заселенных криоконсервированными КФП и покрытых альгинатным гелем, животным с печеночной недостаточностью приводила к значительному улучшению гепатоспецифических показателей крови в печени крыс и сопровождалась позитивными изменениями морфологии печени экспериментальных животных. Через 4 нед. в имплантированных матрицах были выявлены клетки и образованный ими экстраклеточный матрикс. Заключение. Приведенные результаты свидетельствуют, что широкопористые альгинат-желатиновые матрицы, заключенные в оболочку из альгината, являются перспективными носителями клеток для разработки биоинженерных эквивалентов печени.

Ключевые слова: клетки фетальной печени, альгинат-желатиновые матрицы, имплантация, печеночная недостаточность.

# TRANSPLANTATION OF CRYOPRESERVED FETAL LIVER CELLS SEEDED INTO MACROPOROUS ALGINATE-GELATIN SCAFFOLDS IN RATS WITH LIVER FAILURE

D.V. Grizay<sup>1</sup>, A.S. Lebedinsky<sup>1</sup>, O.V. Ochenashko<sup>1</sup>, O.Yu. Rogulska<sup>1</sup>, Yu.A. Petrenko<sup>1</sup>, V.I. Lozinsky<sup>2</sup>, R.V. Ivanov<sup>2</sup>, A.Yu. Petrenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup> A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Aim**. To study the therapeutic potential of cryopreserved fetal liver cells seeded into macroporous alginategelatin scaffolds after implantation to omentum of rats with hepatic failure. **Materials and methods**. Hepatic failure was simulated by administration of 2-acetyl aminofluorene followed partial hepatectomy. Macroporous

**Для корреспонденции:** Петренко Александр Юрьевич. Адрес: 61015, Украина, ул. Переяславская, 23. Тел. +38 (057) 373-41-35. E-mail: payua@yahoo.com.

For correspondence: Petrenko Alexander Yurievich. Address: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov 61015, Ukraine. Tel. +38 (057) 373-41-35. E-mail: payua@yahoo.com.

alginate-gelatin scaffolds, seeded with allogenic cryopreserved fetal liver cells (FLCs) were implanted into rat omentum. To prevent from colonization of host cells scaffolds were coated with alginate gel shell. Serum transaminase activity, levels of albumin and bilirubin as markers of hepatic function were determined during 4 weeks after failure model formation and scaffold implantation. Morphology of liver and scaffolds after implantation were examined histologically. **Results.** Macroporous alginate-gelatin scaffolds after implantation to healthy rats were colonized by host cells. Additional formation of alginate gel shell around scaffolds prevented the colonization. Implantation of macroporous scaffolds seeded with cryopreserved rat FLCs and additionally coated with alginate gel shell into omentum of rats with hepatic failure resulted in significant improvement of hepatospecific parameters of the blood serum and positive changes of liver morphology. The presence of cells with their extracellular matrix within the scaffolds was confirmed after 4 weeks post implantation. **Conclusion.** The data above indicate that macroporous alginate-gelatin scaffolds coated with alginate gel shell are promising cell carriers for the development of bioengineered liver equivalents.

Key words: fetal liver cells, alginate-gelatin scaffolds, implantation, hepatic failure.

В настоящее время единственным методом коррекции терминальных стадий печеночной недостаточности является ортотопическая трансплантация печени. Однако такой подход ограничивается количеством донорских органов. Трансплантация изолированных гепатоцитов в настоящее время остается малоэффективной из-за сложности получения, слабого приживления и массовой гибели клеток после трансплантации [1]. В связи с этим актуальным является поиск альтернативных методов коррекции печеночной недостаточности. Среди таких методов большое внимание уделяется разработке различных биоинженерных эквивалентов печени, способных обеспечить долговременное поддержание жизнеспособности гепатических клеток с сохранением ими печень-специфических функций. Было описано несколько типов биоинженерных систем, способствующих функционированию гепатоцитов, таких как заключение их в гидрогелевые микросферы [2], децеллюляризированные фрагменты печени [3], макропористые полимерные матрицы [4] или биополимерные гели [5].

Недавно нами был описан новый широкопористый носитель клеток на основе альгината и желатина [6]. Было установлено, что модификация альгинатной матрицы путем ковалентного прикрепления желатина (в качестве якорного сайта) к поверхности стенок пор способствовало эффективной адгезии и пролиферации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга взрослого человека в составе носителя. Клетки пролиферировали внутри носителя и были способны к направленной дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях *in vitro*. Вопрос о способности этих матриц поддерживать рост гепатических клеток в системах *in vitro* и *in vivo* остается невыясненным.

В качестве клеточной компоненты биоинженерных конструкций искусственной печени перспективным является использование стволовых клеток и клеток-предшественников гепатоцитов. Существенным преимуществом клеток-предшественников фетальной печени по сравнению со зрелыми гепатоцитами является высокая пролиферативная активность первых из них [7] и меньшая чувствительность к факторам криоконсервирования [2, 8], что позволяет создавать запас криоконсервированных клеток, пригодных для трансплантации.

Показано, что клетки фетальной печени (КФП) при трансплантации сингенным крысам и мышам легко интегрируются в паренхиму реципиента, способны к пролиферации и дифференцировке в гепатоциты и клетки эпителия желчных протоков [9, 10]. При этом следует отметить, что длительность пролиферации КФП зависит от наличия селективных сигналов гепатического повреждения. В отсутствие таковых трансплантированные клетки быстро дифференцируются и практически не делятся [9, 11].

В связи с вышеизложенным в данной работе была использована одна из моделей, обеспечивающих селективные преимущества трансплантированным клеткам. Суть модели заключается в сочетании введения крысам 2-ацетиламинофлуорена (ААФ), ингибирующего пролиферацию гепатоцитов хозяина, с последующей частичной гепатэктомией (ЧГЭ), которая действует как сигнал к пролиферации гепатических клеток-предшественников.

Успешность гетеротопической трансплантации биоинженерных эквивалентов печени во многом зависит от выбора места имплантации, способного обеспечить иммобилизованные клетки кислородом, питательными веществами и трофическими факторами. Исследования показали, что лучшими сайтами гетеротопической трансплантации служат брыжейка и сальник, способствующие васкуляризации тканеинженерных конструкций [12, 13].

Целью настоящей работы явилось изучение терапевтического потенциала криоконсервированных клеток фетальной печени, заселенных в макропористые альгинат-желатиновые матрицы, при имплантации в сальник крыс с печеночной недостаточностью.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили белые крысы линии Вистар. Содержание животных и экспериментальные манипуляции проводили согласно требованиям этического комитета ИПКиК НАНУ, согласованных с правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях».

КФП выделяли из плодов крыс 15 дней гестации (выявление спермиев в вагинальных мазках самок считали первым днем беременности) в стерильных условиях комбинированным энзиматико-механическим методом. Для этого фрагменты печени извлекали из эмбрионов и объединяли в чашке Петри. Ткани обрабатывали 0,25% раствором трипсина в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 5 мин при 20°. Фрагменты печени аккуратно разделяли пинцетом и переносили в пробирку для последующей механической дезинтеграции на одиночные клетки с помощью вибратора [14]. Активность фермента инактивировали добавлением 5-кратного объема среды, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку. После механической обработки (30 сек) содержимое пробирки пропускали через нейлоновый фильтр для удаления оставшихся фрагментов ткани. Показатель жизнеспособности свежеизолированной суспензии по методу прокрашивания трипановым синим составлял  $90,6 \pm 5,9\%$ .

Полученную клеточную суспензию криоконсервировали по трехэтапной программе замораживания [15] с начальной скоростью 1 °С/мин до – 40 °С и сидингом при –7 °С, со скоростью 10 °С/мин от –40 до –80 °С с последующим погружением в жидкий азот. Среда криоконсервирования содержала 250 мМ сахарозы, 5 мМ KCl, 1,6 мМ Na<sub>2</sub>HPO4, 0,4 мМ KH<sub>2</sub>PO4, 0,8 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,2 мМ CaCl<sub>2</sub> (pH 7,4) и 10% ДМСО. Хранение клеток осуществляли при – 196 °С в условиях низкотемпературного банка ИПКиК НАНУ в течение 2–3 мес.

Перед использованием в эксперименте КФП отогревали, отмывали от криопротектора и оценивали их жизнеспособность (как описано выше), которая составляла 73,0 ± 3,6%. После этого клетки заселяли в макропористые альгинат-желатиновые губки диаметром 5 мм и толщиной 2 мм, полученные методом криотропного структурирования [6]. Средний диаметр пор губки составляет 106,2 ± 39,6 мкм – этого достаточно для свободного проникновения клеток, а пористость – не менее 80% [6]. Заселение осуществляли по методу, описанному в работе [16]. Для этого использовали 2 шприца объемом 1 мл, соединенных между собой эластичной пластиковой трубкой. В один из шприцев помещали пористый полимерный носитель, диаметр которого совпадал с внутренним диаметром шприца. Во второй шприц помещали 100 мкл суспензии клеток (5 × 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> клеток/мл) в среде культивирования. Затем путем поочередных мягких поступательно-возвратных туров поршней шприцев медленно насыщали носитель клетками. Насыщенные клетками скаффолды инкубировали в шприце в течение 3 ч при 37 °C. Матрицы, заселенные клетками, покрывали оболочкой из альгината путем двукратного повторения цикла последовательного переноса в 1,2% раствор альгината натрия, приготовленный на физиологическом растворе (0,15 M NaCl, 25 мМ HEPES, pH 7,4), с последующим формированием кальций-альгинатного геля в течение 5 мин в этом же растворе, содержащем 100 мМ CaCl<sub>2</sub>.

КФП в составе макропористых альгинат-желатиновых матриц культивировали в среде DMEM (Sigma, США), дополненной 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота (РАА, Австрия), 2 мМ L-глутамина, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности с заменой среды каждые 3 сут. Для визуализации КФП в составе матриц клетки окрашивали флуоресцеиндиацетатом (ФДА).

Исследования по имплантации альгинат-желатиновых матриц с иммобилизированными КФП и без них проводили на 35 взрослых крысах самцах. На первом этапе альгинат-желатиновые матрицы имплантировали в сальник 5 крыс. Другой группе из 5 крыс имплантировали матрицы, покрытые оболочкой из альгината. Из остальных 25 животных было сформировано 3 группы экспериментальных животных. Группу 1, контрольную, составили животные, которые не подвергались никаким воздействиям – одновозрастная норма – 5 крыс. Животные оставшихся двух групп подвергались формированию ААФ/ЧГЭ модели печеночной недостаточности. Для формирования модели ААФ вводился из расчета 30 мг/кг массы тела в течение 5 сут интрагастрально в виде масляного раствора. На пятые сутки проводилась частичная гепатэктомия (ЧГЭ) по Хиггинсу с удалением 68% массы печени. Одновременно с проведением частичной гепатэктомии в большой сальник имплантировали макропористые альгинат-желатиновые матрицы, покрытые альгинатной капсулой. Животным группы 2 (10 крыс) имплантировали матрицы без клеток, а животным группы 3 (10 крыс) – матрицы с иммобилизированными в них клетками фетальной печени крыс.

Период наблюдения за животными после формирования модели и имплантации макропористых губок составил 4 нед. На 7, 14, 21 и 28-е сут проводился забор крови у животных для биохимических исследований. В полученной сыворотке крови спектрофотометрически определяли содержание альбумина, общего билирубина, а также активность маркерных ферментов повреждения печени: аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Для биохимических исследований использовались стандартные биохимические наборы Lahema.

Препараты для гистологического исследования готовили по общепринятой методике. После фиксации препараты промывали, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином (образцы печени) или азур-эозином (альгинат-желатиновые губки) по общепринятым методикам и анализировали с помощью светового микроскопа.

Полученные результаты обрабатывали статистически и представляли как М ± m. Достоверность различий оценивали, используя непараметрический метод Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На предварительном этапе исследования оценивали состояние макропористых матриц после их имплантации крысам, а также реакцию организма животных на эту процедуру. Для этого полимерные носители (scaffolds) на основе альгината, модифицированные путем химического присоединения к поверхности пор молекул желатина, имплантировали в сальник интактных животных. На рис. 1, а приведена гистология альгинат-желатиновой губки через 2 нед. после имплантации. Видно, что матрицы интенсивно заселялись клетками хозяина. Большинство клеток были распластаны на поверхности пор и имели фибробластоподобную морфологию, местами образуя плотный слой. В образцах выявлялись волокна соединительно-тканной природы. В просветах части пор встречались эритроциты. Следует отметить, что явных признаков воспалительной реакции не наблюдалось, полное заживление хирургического шва происходило в течение 3–4 дней.

Для предотвращения заселения клетками хозяина макропористые альгинат-желатиновые матрицы покрывали капсулой путем обработки раствором альгината натрия с последующим формированием слоя ионотропного геля в кальций-содержащем растворе. Для проверки эффективности такого покрытия модифицированные альгинат-желатиновые губки также подсаживали в сальник крыс. Через 2 нед. после подсадки клеточные элементы внутри имплантата практически не выявлялись (рис. 1, б). Следует отметить, что поверх альгинатной оболочки наблюдался тонкий слой соединительной ткани, образованный клетками реципиента.

Учитывая, что Са-альгинатная оболочка может угнетать жизнедеятельность клеток в матрице, исследовали ее влияние на поведение КФП в условиях культивирования *in vitro*. Для этого альгинат-желатиновые матрицы заселяли клетками, как описано нами ранее [16], а затем покрывали альгинатной оболочкой и помещали в условия культуры.

Из рис. 2, а, видно, что через трое суток культивирования в составе альгинат-желатиновых губок криоконсервированные КФП оставались жизнеспособными, так как были способны метаболизировать ФДА. При этом образованный флуоресцеин равномерно распределялся в объеме клеток, что позволяло оценивать их форму. Этот подход выявил высокую гетерогенность клеток фетальной печени: значительная их часть имела округлую форму,



Рис. 1. Гистологические срезы макропористых альгинат-желатиновых матриц через 14 сут после подсадки в сальник крыс: а – матрица без альгинатной оболочки; б – матрица, покрытая альгинатной оболочкой. Окрашивание азур-эозином. ×200

Fig. 1. Histological sections of macroporous alginate-gelatin scaffolds in 14 days after implantation into rat omentum: a - scaffold without alginate gel shell;  $\delta - scaffold$  coated with alginate gel shell. Azure-eosin staining.  $\times 200$ 



Рис. 2. Альгинатная губка, заселенная КФП, на 3-и (а), 7-е (б) и 14-е (в) сут культивирования. Прижизненное окрашивание флуоресцеин диацетатом. ×250

Fig. 2. Alginate sponge, seeded with FLCs on the 3rd (a), 7th ( $\delta$ ) and 14th (B) day of culture. Vital staining with fluorescein diacetate (FDA).  $\times 250$ 

встречались также клетки с несколько вытянутой или отростчатой морфологией. На 7-е сут культивирования (рис. 2, б) доля распластанных клеток значительно возрастала, местами они образовывали тяжи. Напротив, доля клеток округлой формы снижалась, а на 14-е сут (рис. 2, в) эти клеточные элементы составляли лишь незначительную часть содержимого губки. В то же время распластанные клетки составляли подавляющее большинство и образовывали близкий к монослою массив, равномерно покрывающий поверхности пор матрицы.

Для оценки терапевтического эффекта КФП заселяли в макропористые альгинат-желатиновые матрицы, затем покрывали их альгинатной капсулой и подсаживали в сальник крыс с экспериментальной патологией печени (группа 3). Позитивным контролем (группа 1) служили одновозрастные животные, которые не подвергались никаким воздействиям, а негативным (группа 2) – животные с модельной печеночной недостаточностью ААФ/ЧГЭ, которым в сальник имплантировали альгинат-желатиновые матрицы без клеток.

Формирование модели ААФ/ЧГЭ приводило к значительной смертности животных, пик которой приходился на 2–3 нед. после частичной гепатэктомии. В группе 2, которой на фоне сформированной модели были введены макропористые альгинат-желатиновые матрицы без клеток, смертность в конце периода наблюдения составила 40%. В группе 3, которой имплантировали матрицы с иммобилизованными КФП, смертность на 28-й день после трансплантации была значительно ниже и составила 20%.

Уровень альбумина (табл.) резко снижался после проведения ЧГЭ в обеих группах с модельной печеночной недостаточностью ААФ/ЧГЭ (группы 2 и 3) с минимумом на 7-е сут. При этом в группе 2 показатель оставался достоверно ниже контрольных значений в течение всего периода наблюдения. В группе 3 достоверное снижение показателя на-

#### Таблица

# Изменение биохимических показателей сыворотки крови крыс с моделью ААФ/ЧГЭ после имплантации в сальник криоконсервированных клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых альгинатных губках (n = 5–10)

E	Этапы эксперимента					
1 руппы животных	0 точка	День проведе- ния ЧГЭ	7-е сут после ЧГЭ	14-е сут после ЧГЭ	21-е сут после ЧГЭ	28-е сут после ЧГЭ
Содержание альбумина, г/л						
1	$41,9 \pm 0,9$	$44,1 \pm 1,8$	$44,4 \pm 3,7$	$42,1 \pm 0,4$	$42,5 \pm 0,2$	$43,1 \pm 3,2$
	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)	(n = 5)
2	$42,6 \pm 1,1$	$37,4 \pm 1,0$	$19,3 \pm 1,9*$	$28,2 \pm 3,2*$	$32,4 \pm 2,6$	$33,5 \pm 0,9*$
	(n = 10)	(n = 10)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 6)	(n = 6)
3	$43,1 \pm 0,9$	$39,7 \pm 1,2$	27,1 ± 2,4*#	$33,9 \pm 2,8*$	$35,1 \pm 1,7$	$36,2 \pm 1,9$
	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 8)	(n = 8)
Содержание билирубина, мкмоль/л						
1	$8,69 \pm 1,7$	$9,55 \pm 0,6$	$8,97 \pm 1,0$	$9,35 \pm 1,3$	$8,02 \pm 1,2$	$7,54 \pm 1,0$
2	$8,45 \pm 1,2$	$13,75 \pm 0,7$	$29,93 \pm 3,2*$	$14,90 \pm 1,6*$	$12,42 \pm 1,6*$	$13,09 \pm 2,1*$
3	$8,91 \pm 1,8$	$13,55 \pm 0,7$	$13,58 \pm 1,2^{*^{\#}}$	$12,38 \pm 1,4*$	$9,86 \pm 2,5$	$11,92 \pm 3,2$
Активность АСТ, Ед/л						
1	$131,6 \pm 7,1$	$168,9 \pm 12,2$	$135,2 \pm 11,2$	$127,8 \pm 6,5$	$128,0 \pm 5,4$	$130,0 \pm 5,1$
2	$128,7 \pm 8,2$	$176,6 \pm 11,3$	$203,5 \pm 8,1*$	202,9 ± 13,4*	$176,6 \pm 17,6^*$	$132,1 \pm 7,3$
3	$131,8 \pm 7,1$	$179,2 \pm 7,4$	177,7 ± 7,4 <sup>#</sup>	$170,0 \pm 10,3*$	138,9 ± 2,1#	$135,0 \pm 123,4$
Активность АЛТ, Ед/л						
1	$77,9 \pm 4,3$	$79,6 \pm 6,1$	$74,1 \pm 6,2$	$79,0 \pm 8,1$	$75,9 \pm 7,6$	$76,7 \pm 4,2$
2	$76,7 \pm 5,1$	83,6±2,6	$104,0 \pm 6,6*$	$117,9 \pm 4,3*$	$129,2 \pm 9,5*$	$81,2 \pm 7,1$
3	$77,5 \pm 3,6$	85,2 ± 4,4	80,2 ± 6,5 <sup>#</sup>	$92,1 \pm 4,2^{\#}$	$77,3 \pm 4,4^{\#}$	$76,8 \pm 5,6$

Changes of biochemical parameters of the blood serum in rats with 2AAF/PHE model after implantation into rat omentum of the cryopreserved fetal liver cells, seeded into macroporous alginate-gelatin scaffolds (n = 5–10)

блюдалось только на 7-е и 14-е сут, а пик снижения показателя на 7-е сут сглаживался ( $p \le 0,05$  по сравнению с группой 2). Подобная динамика наблюдалась в содержании общего билирубина. Имплантация макропористых альгинат-желатиновых матриц, заселенных криоконсервированными КФП, также позволила сгладить резкое повышение показателя на 7-е сут после гепатэктомии ( $p \le 0,05$  по сравнению с группой 2), а на 21-е и 28-е сут нормализовать показатель, чего не наблюдалось в группе 2.

Активность аминотрансфераз (см. табл.) в группе 2 повышалась на 7–21-е сут после ЧГЭ, а к 28-м сут возвращалась к нормальному уровню. Имплантация матриц с иммобилизированными КФП нивелировала повышение активности АСТ на 7-е и 21-е сут после введения, а АЛТ – в течение всего периода наблюдения (р ≤ 0,05 по сравнению с группой 2).

На 21-е сут после ЧГЭ исследовали морфологию печени. Из рис. 3, а, видно, что у животных группы 2 на гистологических срезах печени, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдались серьезные патологические изменения органа: нарушение его архитектоники, дегенеративные изменения гепатоцитов и дуктулярная реакция, что в целом характерно для такой экспериментальной модели [17]. У животных группы 3, которым имплантировали матрицы с иммобилизованными КФП, морфологические изменения органа не были так резко выражены: при микроскопировании гистологических образцов выявлялись участки печени с нормальной трабекулярной структурой.

После окончания эксперимента (28-е сут после ЧГЭ) была предпринята попытка оценить состояние имплантированных матриц и заселенных в них клеток. Из рис. 4 видно, что альгинат-желатиновые матрицы не биодеградировали, сохраняли свою макропористую структуру. Вокруг матриц была образована оболочка грануляционной ткани. В порах матриц обнаруживались клетки и соединительнотканный матрикс, местами просматривались скопления эритроидных клеток.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что имплантация широкопористых матриц, заселенных криоконсервированными КФП, крысам с модельной печеночной недостаточностью приводит к снижению смертности животных, улучшению гепатоспецифических показателей крови и

*Примечание*. \* – р ≤ 0,05 относительно группы 1; <sup>#</sup> – р ≤ 0,05 относительно группы 2; количество животных в группах, указанное в графах таблицы «содержание альбумина», соответствует всем показателям.



Рис. 3. Морфология печени крыс групп 2 (а) и 3 (б) через 21 сут после ЧГЭ. ×200: а – участки некротизированных гепатоцитов, нарушение трабекулярного строения, дуктулярная реакция, воспалительная инфильтрация; б – формирование трабекул, участки некроза

Fig. 3. Liver morphology of group 2 rats (a) and group 3 rats (6) in 21 days after partial hepatectomy.  $\times 200$ : a – loci of necrotic hepatocytes, abnormality of trabecular meshwork, ductular reaction, inflammatory infiltration;  $\sigma$  – trabeculation, necrotic patches



Рис. 4. Гистологический срез альгинат-желатиновой матрицы, заселенная КФП и покрытая оболочкой из альгината, через 28 сут после подсадки в сальник крыс со сформированной моделью ААФ/ЧГЭ. Окрашивание азур-эозином, ×100

Fig. 4. Histological section of alginate-gelatin scaffold seeded with FLCs and coated with alginate gel shell in 28 days after implantation into rat omentum with 2–Acetylaminofluorene (AAF) / partial hepatectomy (PH) model

морфологии печени. Схожие изменения нами были установлены ранее при инъекционном введении криоконсервированных КФП в селезенку крыс с экспериментальным циррозом [18]. В совокупности эти данные указывают на высокий терапевтический потенциал КФП. Однако селезенка не может быть использована для введения большого количества клеток, тем более в составе трехмерных матриц.

В настоящей работе впервые для имплантации использовали широкопористые альгинат-желатиновые матрицы, хорошо зарекомендовавшие себя в качестве носителя клеток в культуре [6]. При имплантации в сальник крыс альгинат-желатиновые матрицы не вызывали воспалительной реакции у животных, сохраняли присущую им широкопористую структуру в течение, по крайней мере, 4 нед. Эти данные свидетельствует об их медленной биодеградации и возможности применения в качестве скаффолда для разработки биоинженерных эквивалентов печени. В то же время широкопористые матрицы после имплантации в сальник заселялись клетками хозяина, и таким образом, не были способны обеспечивать иммуноизоляцию, и соответственно, жизнеспособность заселенных в них клеток. Модификация матриц путем их покрытия альгинатной оболочкой не препятствовала пролиферации клеток в культуре и позволила предотвратить массовое заселение широкопористых альгинат-желатиновых матриц при имплантации.

Через 4 нед. после трансплантации животным со сформированной моделью печеночной недостаточности (ААФ/ЧГЭ) в матрицах, заселенных КФП и покрытых альгинатной оболочкой, были выявлены клетки. К сожалению, в рамках данной работы не представилось возможным идентифицировать источник этих клеток, но учитывая, что при анализе исследуемых модифицированных матриц через 2 нед. после имплантации контрольным животным клетки не выявлялись, можно предположить, что они являются потомками КФП. Следует отметить, что положительный эффект от имплантации матриц, заселенных КФП, проявлялся уже через 1 нед. после ЧГЭ и сохранялся до конца срока наблюдения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что широкопористые альгинат-желатиновые матрицы, заключенные в оболочку из альгината, являются перспективными носителями клеток для разработки биоинженерных эквивалентов печени.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Soltys KA, Soto-Gutiérrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. J. Hepatol. 2010; 53: 769–774.
- Fuller BJ, Petrenko AY, Rodriguez JV, Somov AY, Balaban CL, Guibert EE. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. CryoLetters. 2013; 34: 432–452.
- 3. Zhou P1, Lessa N, Estrada DC, Severson EB, Lingala S, Zern MA et al. Decellularized Liver Matrix as a Carrier for Transplantation of Human Fetal and Primary Hepatocytes in Mice. Liver Transpl. 2011; 17: 418–427.
- Glicklis R1, Shapiro L, Agbaria R, Merchuk JC, Cohen S. Hepatocyte Behavior Within Three-Dimensional Porous Alginate Scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000; 67: 344–353.
- 5. Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенинников МЕ, Ильинский ИМ, Люндуп АВ, Севастьянов ВИ и др. Трансплантация клеточно-инженерных конструкций в печень обеспечивает длительную поддержку процессов восстановительной регенерации в поврежденной печени. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2013; 2: 65–75. Shagidulin MY, Onischenko NA, Krasheninnikov ME, Iljinsky IM, Lyundup AV, Sevastyanov VI et al. Cellengineering designs transplanted into liver provide with prolonged support of recovery processes in damaged liver. Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. 2013; 2: 65–75.
- 6. *Petrenko YA, Ivanov RV, Petrenko AY, Lozinsky VI.* Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *J. Mater. Sci: Mater Med.* 2011; 22: 1529–1540.
- Dollé L, Best J, Mei J, Al Battah F, Reynaert H, van Grunsven LA et al. The quest for liver progenitor cells: A practical point of view. J. Hepatol. 2010; 52: 117–129.

- Petrenko YA, Jones DRE, Petrenko AY. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem/progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium. Cryobiology. 2008; 57: 195–200.
- 9. Sandhu JS, Petkov PM, Dabeva MD, Shafritz DA. Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 1323–1334.
- Dabeva MD, Petkov PM, Sandhu J, Oren R, Laconi E, Hurston E et al. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. Am. J. Pathol. 2000; 156: 2017–2031.
- 11. *Oertel M, Menthena A, Chen YQ, Shafritz DA*. Properties of cryopreserved fetal liver stem/progenitor cells that exhibit long-term repopulation of the normal rat liver. *Stem Cells*. 2006; 24: 2244–2251.
- 12. *Ohashi K*. Liver tissue engineering: the future of liver therapeutics. *Hepatol. Res.* 2008; 38: S76–S87.
- 13. Sakai Y, Huang H, Hanada S, Niino T. Toward engineering of vascularized three-dimensional liver tissue equivalents possessing a clinically significant mass. *Biochem. Eng. J.* 2010; 48: 348–361.
- Petrenko AYu, Sukach AN. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Analytical Biochem*. 1991; 194: 326–332.
- Skorobogatova NG, Novikov AN, Fuller BJ, Petrenko AY. Importance of a three-stage cooling regime and induced ice nucleation during cryopreservation on colony-forming potential and differentiation in mesenchymal stem/ progenitor cells from human fetal liver. *CryoLetters*. 2010; 31: 371–379.
- 16. Петренко ЮА, Иванов РВ, Лозинский ВИ, Петренко АЮ. Сравнительное исследование методов заселения широкопористых носителей на основе альгинатного криогеля мезенхимальными стромальными клетками костного мозга человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2010; 4: 225–228. Petrenko YA, Ivanov RV, Lozinsky VI, Petrenko AY. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers. Bull Exp Biol Med. 2010; 4: 225–228.
- 17. Zhang W, Chen XP, Zhang WG, Zhang F, Xiang S, Dong HH et al. Hepatic non-parenchymal cells and extracellular matrix participate in oval cell-mediated liver regeneration. World J Gastroenterol. 2009; 15: 552–560.
- Ochenashko O., Nikitchenko Yu., Volkova N, Mazur SP, Somov AY, Fuller BJ et al. Functional hepatic recovery after xenotransplantation of cryopreserved fetal liver cells or soluble cell-factor administration in a cirrhotic rat model – are viable cells necessary? Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2008; 23: e275–282.

Статья поступила в редакцию 30.06.2014 г. The article was submitted to the journal on 30.06.2014