

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-2-78-89

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ МАТРИКСА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОЙ ПЕЧЕНИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ОСТРОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ)

С.В. Готье^{1, 2}, М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, Н.А. Онищенко¹, И.М. Ильинский^{1, 2},
В.И. Севастьянов¹

¹ ФГБУ «Федеральный научный 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

Цель. На экспериментальной модели острой печеночной недостаточности проведен сравнительный анализ функциональной эффективности биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для регенерации поврежденной печени на основе биополимерных каркасного пористого и гидрогелевого матриксов. **Материалы и методы.** В качестве матриксов для БМКП использовали разрешенные к клиническому применению каркасный матрикс в виде губки из биополимерного наноструктурированного композиционного материала (БНКМ) на основе высокоочищенного бактериального сополимера поли (β-оксибутират-со-β-оксивалерат) и полиэтиленгликоля и гидрогелевый матрикс из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ). Клеточной компонентой БМКП были клетки печени и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга. Функциональную эффективность БМКП для регенерации поврежденной печени оценивали на экспериментальной модели острой печеночной недостаточности на крысах породы Вистар (n = 40) биохимическими, морфологическими и иммуногистохимическими методами. **Результаты.** При имплантации БМКП для регенерации поврежденной печени на основе каркасного БНКМ или гидрогелевого БМКГ матриксов летальность у крыс с острой печеночной недостаточностью отсутствовала, в то время как в контроле она составила 66,6%. Восстановление уровня активности цитолитических ферментов и белково-синтетической функции печени наступало к 9-м суткам после моделирования острой печеночной недостаточности в отличие от контрольной группы, в которой восстановление наступало только к 18–21-м суткам. Оба матрикса поддерживали жизнеспособность и функциональную активность печеночных клеток до 90 суток с формированием в БМКП кровеносных сосудов. Полученные данные подтверждают, что каркасный матрикс БНКМ и гидрогелевый матрикс БМКГ длительно (до 90 суток) сохраняют жизнедеятельность адгезированных клеток в составе БМКП, что позволяет использовать их для коррекции острой печеночной недостаточности. Вместе с тем гидрогелевый матрикс благодаря наличию биоактивных компонентов способствует созданию наилучших условий для адгезии и жизнедеятельности клеток, что ускоряет процессы регенерации в поврежденной печени по сравнению с БМКП на каркасном матриксе. **Заключение.** Обнаружена статистически достоверная разница между функциональной эффективностью исследованных БМКП на основе матриксов БМКГ и БНКМ. Для регенерации поврежденной печени более эффективными оказались БМКП на основе гидрогелевого матрикса БМКГ.

Ключевые слова: регенеративная медицина, острая печеночная недостаточность, экспериментальная модель, биомедицинский клеточный продукт, биodeградируемый матрикс, клетки печени, ММСК КМ.

Для корреспонденции: Севастьянов Виктор Иванович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (916) 173-41-84. E-mail: viksev@yandex.ru.

For correspondence: Sevastianov Victor Ivanovich. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (916) 173-41-84. E-mail: viksev@yandex.ru

INFLUENCE OF MATRIX NATURE ON THE FUNCTIONAL EFFICACY OF BIOMEDICAL CELL PRODUCT FOR THE REGENERATION OF DAMAGED LIVER (EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE LIVER FAILURE)

S.V. Gautier^{1, 2}, M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, N.A. Onishchenko¹, I.M. Iljinsky^{1, 2}, V.I. Sevastianov¹

¹ V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Aim. A comparative analysis of the functional efficacy of biomedical cell products (BMCP) for the regeneration of damaged liver based on biopolymer scaffolded porous and hydrogel matrices was performed on the experimental model of acute liver failure. **Materials and methods.** Matrices allowed for clinical use were employed for BMCP in the form of a sponge made from biopolymer nanostructured composite material (BNCM) based on a highly purified bacterial copolymers of poly (β -hydroxybutyrate-co- β -oxyvalerate) and polyethylene glycol and a hydrogel matrix from biopolymer microheterogeneous collagen-containing hydrogel (BMCH). Cellular component of BMCP was represented by liver cells and multipotent mesenchymal bone marrow stem cells. The functional efficacy of BMCP for the regeneration of damaged liver was evaluated on the experimental model of acute liver failure in Wistar rats ($n = 40$) via biochemical, morphological, and immunohistochemical methods. **Results.** When BMCP was implanted to regenerate the damaged liver on the basis of the scaffolded BNCM or hydrogel BMCH matrices, the lethality in rats with acute liver failure was absent; while in control it was 66.6%. Restoration of the activity of cytolytic enzyme levels and protein-synthetic liver function began on day 9 after modeling acute liver failure, in contrast to the control group, where recovery occurred only by days 18–21. Both matrices maintained the viability and functional activity of liver cells up to 90 days with the formation of blood vessels in BMCP. The obtained data confirm that scaffolded BNCM matrix and hydrogel BMCH matrix retain for a long time (up to 90 days) the vital activity of the adherent cells in the BMCP composition, which allows using them to correct acute liver failure. At the same time, hydrogel matrix due to the presence of bioactive components contributes to the creation of the best conditions for adhesion and cell activity which accelerate the regeneration processes in the damaged liver compared to BMCP on scaffolded matrix. **Conclusion.** A statistically significant difference was found between the functional efficacy of the BMCP studied based on BNCM and BMCH matrices. BMCP based on hydrogel BMCH matrix was more effective for the regeneration of damaged liver.

Key words: regenerative medicine, acute liver failure, experimental model, biomedical cell product, biodegradable matrix, liver cells, MMSC BM.

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире сохраняется неуклонный рост численности больных с заболеваниями печени, приводящими к развитию печеночной недостаточности (ПН). Именно поэтому ПН остается важной медико-социальной проблемой, занимая одно из первых мест среди причин временной нетрудоспособности и инвалидизации в трудоспособном возрасте и преждевременной смертности больных [1]. Затраты на лечение, реабилитацию и социальную поддержку больных с ПН ложатся тяжелым бременем на государственный бюджет.

ПН – патологическое состояние, которое обусловлено дефицитом нормально функционирующих гепатоцитов. С клинических позиций ПН можно рассматривать как синдром, который развивается в результате снижения массы функционирующих клеток печени ниже критического уровня и харак-

теризуется комплексными нарушениями метаболизма и дезинтоксикационной функции печени в сочетании с поражением головного мозга. Острая печеночная недостаточность (острая ПН) – грозное осложнение, возникающее при различных как терапевтических, так и хирургических заболеваниях печени. В основе патогенеза острой ПН лежат процессы некроза, апоптоза и некроапоптоза гепатоцитов, в результате чего при острой печеночной недостаточности летальность достигает 70–90%, несмотря на использование современных методов лечения [2]. По данным ВОЗ, в течение последующих 10–20 лет смертность от заболеваний печени возрастет в 2 раза [3].

Комплексная оценка затрат общества позволяет прогнозировать экономическую эффективность внедрения новых технологий, основывающихся на принципах регенеративной медицины и тканевой

инженерии [4, 5], и это обстоятельство обуславливает необходимость продолжения поиска новых, эффективных и доступных методов лечения печеночной недостаточности. К настоящему времени уже проведен ряд исследований по применению клеток печени (КП) и мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (ММСК КМ) для лечения патологических состояний печени [4, 5]. Однако оказалось, что для эффективного и длительного функционирования изолированных КП и МСК КМ необходимо вводить их в организм реципиента не в виде суспензии, а имплантировать в форме биомедицинского клеточного продукта (БМКП) – клеточно-инженерной конструкции, состоящей из биорезорбируемого матрикса (носителя), нагруженного предварительно сокультивированными ассоциатами клеток донорской печени и ММСК КМ [6, 7].

В качестве матрикса в БМКП были выбраны биополимерные материалы, которые наиболее часто используют в качестве носителей в тканевой инженерии и регенеративной медицине [8–14].

Цель настоящего исследования состояла в проведении сравнительного анализа функциональной эффективности БМКП для регенерации поврежденной печени на основе твердотельного пористого и гидрогелевого матрикса из биополимерных материалов на экспериментальной модели острой печеночной недостаточности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные животные

Сравнительная оценка функциональной эффективности БМКП для регенерации печени на основе гидрогелевого и каркасного матрикса проведена на 40 крысах породы Вистар (250–280 г) и 5 крысах породы Август (150–180 г). 20 крыс из общего количества крыс породы Вистар были использованы для изучения жизнеспособности клеток, адгезированных на этих матриксах, и для получения клеточного материала. Акклиматизацию и содержание лабораторных животных осуществляли в соответствии с ГОСТ ISO 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными».

Состав БМКП для регенерации печени

Матрикс

Были выбраны два вида биополимерных 3D-матрикса: гидрогелевый и каркасный.

А. Биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ), представляющий собой композицию гетерогенного гидрогеля, выпускаемую в инъекционной форме (рег. уд.

№ ФСР 2012/13033 от 01.02.2012 г., производитель АО «БИОМИР сервис», Россия). БМКГ состоит из микрочастиц сшитого коллагена, диспергированных в гомогенном гидрогеле, содержащем экстрагированные низко- и высокомолекулярные компоненты внеклеточного матрикса тканей животного происхождения. В настоящее время имплантируемые материалы на основе БМКГ используются в клинической практике для устранения дефектов мягких и хрящевых тканей [11, 12]. Из существующего линейного ряда БМКГ оптимальным для клеточно-инженерных конструкций [6] является БМКГ со следующими характеристиками: средний размер микрочастиц – $145,79 \pm 0,09$ мкм; модуль упругости – 1170 ± 12 Па; модуль вязкости – $62,9 \pm 7,9$ Па; набухаемость – не ниже $86,6 \pm 3,0$ масс.%; время резорбции – от 6 до 12 месяцев в зависимости от места имплантации.

Б. Губка из биополимерного наноструктурированного композиционного материала (БНКМ) на основе высокоочищенного бактериального сополимера поли(β-оксибутират-со-β-оксивалерат) и полиэтиленгликоля (рег. уд. № ФСР 2012/13032 от 01.02.2012 г., производитель АО «БИОМИР сервис», Россия). Характеристики каркасного БНКМ-матрикса: диаметр пористой губки – 10 ± 2 мм; толщина – $1,2 \pm 0,5$ мм; масса – 6,0–12,0 мг; пористость – не менее $95 \pm 2\%$; размер макропор – 300 ± 100 мкм. В ранее проведенных работах была доказана способность матрикса БНКМ поддерживать адгезию и пролиферацию клеточных культур [13, 14].

Клеточная компонента БМКП

Клеточными компонентами БМКП для регенерации печени были клетки печени (КП) и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (ММСК КМ). Выделение аллогенных КП у экспериментальных животных осуществляли из трансплантированной печени, а выделение аутологичных КП – из резецированной левой латеральной и медиальной долей печени [15, 16]. Выделение и культивирование ММСК КМ осуществляли по стандартной методике [17]. Выделяли КП и осуществляли сокультивирование КП и ММСК костного мозга в соотношении КП : ММСК КМ = 5 : 1 в течение 3 суток.

Общий объем исследований свойств матрикса по жизнеспособности адгезированных на них клеток составил 120 экспериментов (табл. 1).

Матриксные свойства имплантируемых материалов БНКМ и БМКГ (способность поддерживать адгезию и пролиферацию клеток) оценивали *in vitro* на культурах клеток печени линии HepG₂, клеток печени и ММСК КМ.

Таблица 1

Общий объем исследования свойств матриц *in vitro* (n = 120)**The total volume of studies of the matrix properties *in vitro* (n = 120)**

Группы	Матрикс	Клеточный материал	Количество		Контролируемые показатели
			животных	экспериментов	
1	БНКМ	Нер G ₂	–	30	Адгезия и жизнеспособность клеток
2	БНКМ	Клетки печени	5	30	Адгезия и жизнеспособность клеток
3	БНКМ	ММСК КМ		15	Адгезия и жизнеспособность клеток
4	БМКГ	Клетки печени	5	15	Адгезия и жизнеспособность клеток
5	БМКГ	ММСК КМ		15	Адгезия и жизнеспособность клеток
6	БМКГ	КП + ММСК КМ		15	Адгезия и жизнеспособность клеток
Итого			10	120	

Экспериментальная модель острой печеночной недостаточности

Моделирование острой печеночной недостаточности (острой ПН) проводили путем резекции 65–70% паренхимы печени (левой и медиальной доли) [7].

Контроль адекватности созданной модели острой ПН оценивали по уровню летальности и выживаемости животных, состоянию биохимических показателей крови.

Животных, выживших после моделирования острой печеночной недостаточности, разбивали на контрольную и опытные группы (табл. 2).

Имплантацию БМКП для регенерации печени на основе двух матриц и различного клеточного состава осуществляли спустя 3 суток после резекции печени в брыжейку тонкой кишки животного.

Методы исследования

Для оценки функциональной эффективности БМКП для регенерации печени на экспериментальной модели острой ПН использовали комплекс клинических, биохимических, морфологических и иммуногистохимических методов исследования.

Определение жизнеспособности клеток перед имплантацией

Жизнеспособность клеток, прикрепившихся к матриксу, определяли по методу Mosmann [18], а

жизнеспособность выделенных, культивированных и сокультивированных КП и ММСК КМ перед имплантацией определяли по окраске трипановым синим [18, 19].

Методы лабораторной диагностики степени выраженности острой ПН

Забор крови у крыс осуществляли под эфирным наркозом путем насечки кончика хвоста. Функцию печени у крыс оценивали на биохимическом анализаторе Reflotron™ («Roche», Швейцария) при использовании специальных тест-полосок Reflotron™: на 3, 5, 7, 9, 14, 18 и 21 и 90-е сутки после моделирования острой ПН. Содержание общего белка в крови крыс определяли на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab Prime» (Финляндия) и на рефрактометре (Россия).

Иммуногистохимические исследования активности клеток печени в составе БМКП

Для иммуногистохимического выявления активно функционирующих клеток в составе БМКП, имплантированных в печень, был применен иммунопероксидазный метод с антителами к цитокератину 18 (ДАКО, Дания), к антимитохондриальным антителам (BIOGENIEX, США) и метод с гепатоцитспецифическим антигеном (ДАКО, Дания). Исследования выполнены на люминесцентном микроскопе DM 1000 (Leica, Германия).

Таблица 2

Распределение животных по группам при имплантации БМКП для регенерации печени различного клеточного состава для коррекции острой печеночной недостаточности**Distribution of animals by groups with BMCP implantation for liver regeneration of different cell composition for correction of acute liver failure**

Группы	Клеточный материал на матриксах	Крысы	
		Вистар	Август
1	Контроль (физраствор) в брыжейку	15	–
2	Аутологичные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БНКМ	5	–
3	Аутологичные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ	5	–
4	Аллогенные КП : аллогенные ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ	5	5
Всего		30	5

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью компьютерного статистического пакета Biostat; достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента с учетом поправки Бонферони. Достоверными считали различия при $p < 0,05$ (Статистический пакет, рекомендованный ВОЗ, EpiInfo 5.0). Актуриальную выживаемость животных рассчитывали по Kaplan–Meier при помощи статистического пакета программы Statistica for Windows, v.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании клеток печени линии HepG₂ на каркасном матриксе БНКМ в течение 3 суток были выявлены прикрепленные клетки (рис. 1, а).

После 10 дней перфузии каркасного матрикса БНКМ культуральной средой (DMEM + 10% FCS + гентамицин 50 мкг) с культурой клеток линии HepG₂ с помощью программного комплекса «Virtual Anatomist» были выявлены клетки, прикрепившие-

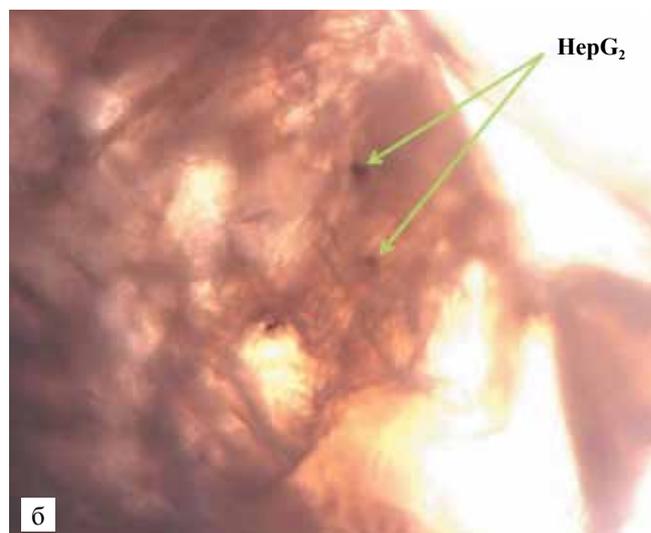
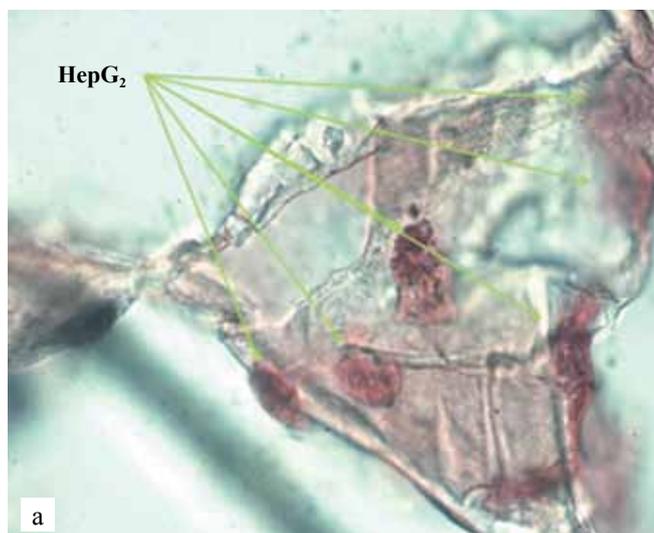


Рис. 1. Клетки печени линии HepG₂: а – адгезированные на матриксе БНКМ после 3 суток культивирования; иммерсионная микроскопия, ×1000; б – прикрепившиеся на матриксе БНКМ при культивировании в течение 10 суток; иммерсионная микроскопия, ×100. Стрелками указаны клетки, прикрепившиеся к матриксу

Fig. 1. HepG₂ line liver cells: а – adhered to a BNCM matrix after 3 days of culturing. Immersion microscopy. Microscope ×1000; б – attached to a BNCM matrix upon culturing for 10 days: immersion microscopy. Microscope ×100. Arrows indicate cells attached to the matrix

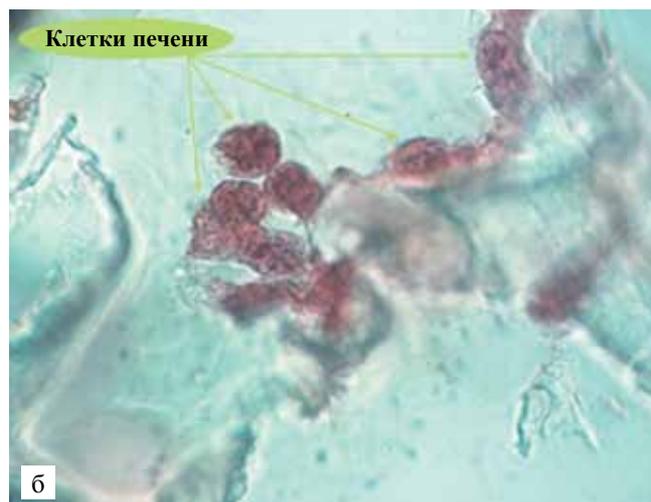


Рис. 2. Клетки печени: а – клетка, прикрепившаяся к матриксу БНКМ при культивировании в течение 3 суток; б – адгезированные на матриксе БНКМ после 10 суток культивирования; иммерсионная микроскопия, ×1000. Стрелками указаны прикрепившиеся клетки к матриксу

Fig. 2. Liver cells: а – attached to a BNCM matrix after culturing for 3 days; б – adhered to a BNCM matrix after 10 days of culturing. Immersion microscopy. Microscope ×1000. Arrows indicate cells attached to the matrix

ся на матриксе, что свидетельствовало о наличии адгезивных свойств БНКМ относительно клеток линии HepG₂ (рис. 1, б). Аналогичные результаты были получены при культивировании каркасного матрикса БНКМ с клетками печени и ММСК КМ (рис. 2).

Методами МТТ по Mosmann (выявление митохондриального дыхания жизнеспособных клеток) и прижизненного окрашивания трипановым синим было установлено, что $81 \pm 4\%$ клеток HepG₂ и

$76 \pm 4\%$ клеток печени в течение 10 суток сохраняли свою жизнеспособность на матриксе БНКМ (рис. 3).

При изучении жизнеспособности и пролиферативной активности клеток при культивировании на гидрогелевом матриксе БМКГ оказалось, что в течение первых 3–5 суток КП и ММСК КМ активно пролиферируют с образованием микроколоний (рис. 4 и 5).

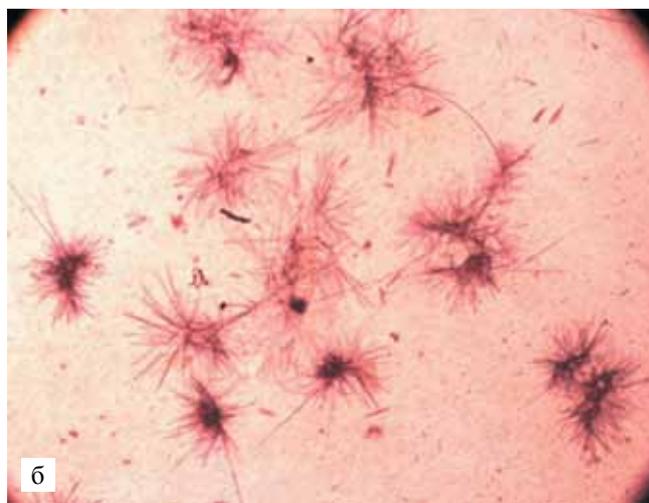
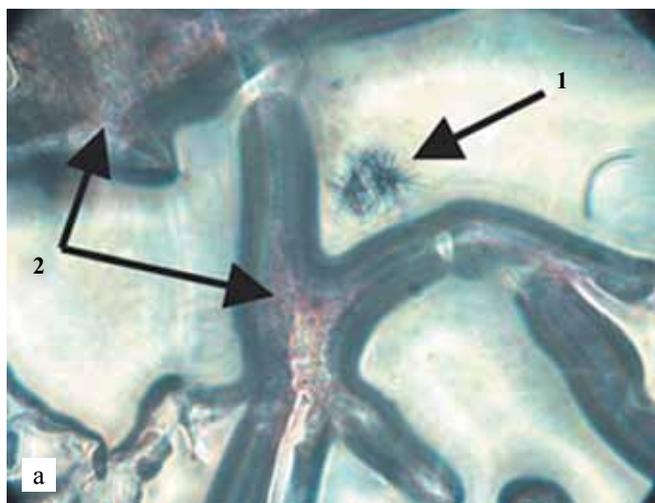


Рис. 3. Визуализация реакции МТТ (выявление жизнеспособных прикрепившихся клеток по Mosmann) для HepG₂ на матриксе БНКМ: а – иммерсионная микроскопия: 1 – кристаллы на месте ранее живой клетки при реакции МТТ; 2 – трабекулы матрикса; $\times 400$; б – фазовый контраст; $\times 100$

Fig. 3. Visualization of the MTT reaction (detection of viable attached cells by Mosmann) for HepG₂ on a BNCM matrix: а – immersion microscopy: 1 – crystals replacing a previously living cell with the MTT reaction; 2 – the matrix trabecula; $\times 400$; б – phase contrast; $\times 100$

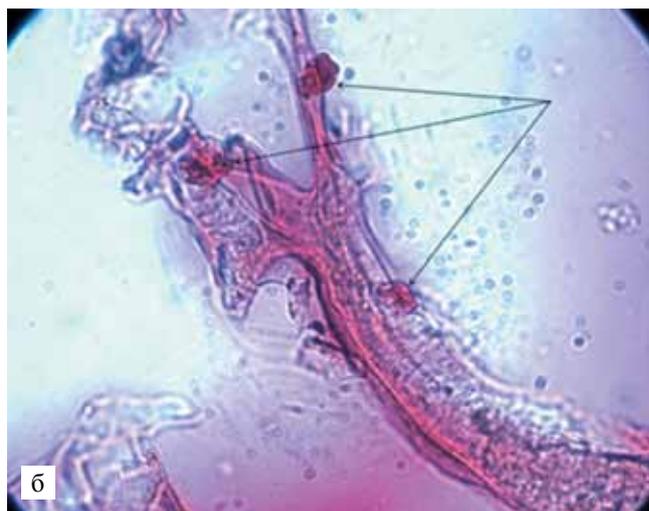


Рис. 4. Жизнеспособные клетки печени на матриксе БМКГ после 10 суток культивирования: а – кристаллы на месте ранее живых клеток при реакции МТТ по Mosmann. $\times 200$; б – клетки не включают краситель при окрашивании трипановым синим; фазово-контрастная микроскопия. $\times 200$

Fig. 4. Viable liver cells on a BMCH matrix after 10 days of culturing: а – crystals replacing previously living cells with the MTT reaction by Mosmann. $\times 200$; б – cells do not include dye when stained with trypan blue; phase contrast microscopy. $\times 200$

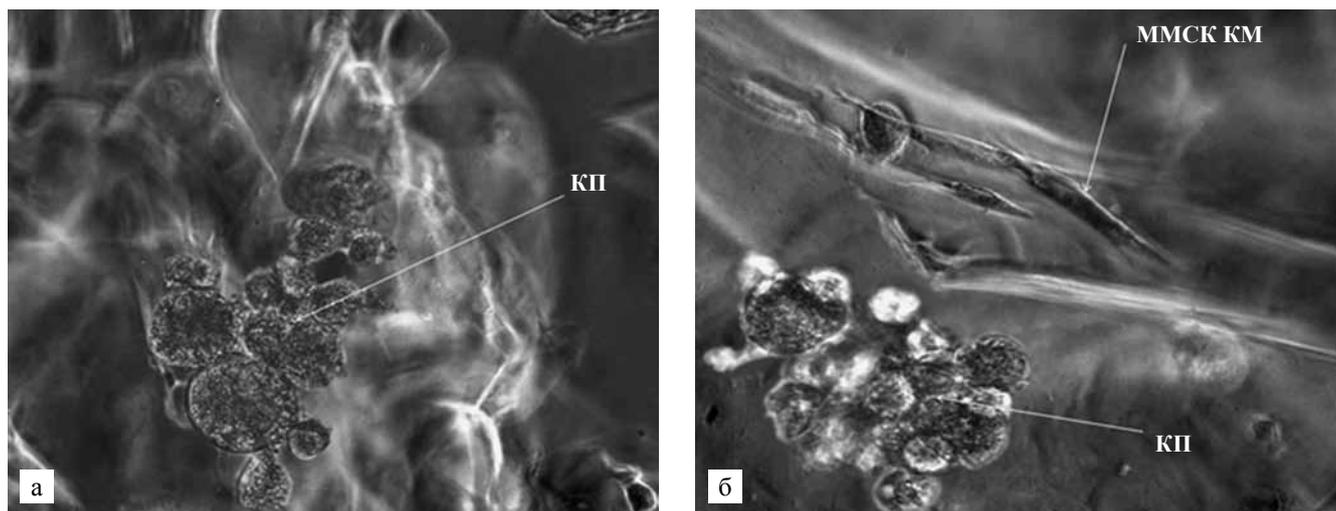


Рис. 5. Пролиферация клеток КП и ММСК КМ с образованием микроколоний на 5-е сутки культивирования в матриксе БМКГ: а – клетки печени; б – КП + ММСК КМ. Фазово-контрастная микроскопия. ×200

Fig. 5. Proliferation of LC and MMSC BM cells with the formation of microcolonies on Day 5 of culturing on a BMCH matrix: a – liver cells; б – LC + MMSC BM. Phase contrast microscopy. ×200

Функциональная активность БМКП для регенерации печени на модели острой печеночной недостаточности

Модель острой печеночной недостаточности создавала сублетальный дефицит печеночной ткани: летальность в контроле у крыс составила 66,6% (табл. 3) и сопровождалась у выживших животных типичными изменениями клинико-биохимических показателей функции печени (рис. 6) в течение 18–21 суток (общее время наблюдения за животными при острой печеночной недостаточности составило 90 суток), что подтверждало адекватность созданной модели острой печеночной недостаточности.

Было отмечено, что при имплантации БМКП для регенерации поврежденной печени на основе каркасного БНКМ или гидрогелевого БМКГ матриксов летальность у крыс с острой печеночной недостаточностью отсутствовала, в то время как в контроле летальность составила 66,6%.

При анализе результатов динамики уровня активности ферментов цитолитического синдрома

было выявлено повышение активности АлАТ к 3-м суткам, АсАТ и ЩФ – к 5-м суткам после резекции печени. В дальнейшем уровень ферментов, характеризующих цитолиз, в экспериментальных группах достоверно снижался как по сравнению с их уровнем на 3-и сутки, так и по отношению к контролю (1-я гр.) в аналогичные сроки. Исходных величин исследуемые показатели достигали к 9-м суткам после резекции.

Более ускоренный темп нормализации показателей функции печени происходил в группе животных с БМКП на основе гидрогелевого матрикса БМКГ.

Что касается темпа восстановления белково-синтетической функции печени в экспериментальной группе 2 (БМКП на каркасном матриксе), то он был ниже, чем в группах 3, 4 (БМКП с гидрогелевым матриксом).

Гистологическое исследование состояния БМКП на основе матриксов БНКМ и БМКГ у крыс через 90 суток после моделирования острой печеночной

Таблица 3

Летальность животных при моделировании острой печеночной недостаточности и ее коррекции при имплантации БМКП для регенерации поврежденной печени различного состава
Lethality of animals in the simulation of acute liver failure and its correction with BMCP implantation for the regeneration of damaged liver of various compositions

Серия	Группы	Внутригрупповая летальность	
		Абс.	%
Острая печеночная недостаточность (крысы)	1. Контроль (n = 15)	10	66,6
	2. Аутологичные КП : ММСК = 5 : 1 на БНКМ (n = 5)	0	0
	3. Аутологичные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ (n = 5)	0	0
	4. Аллогенные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ (n = 5)	0	0

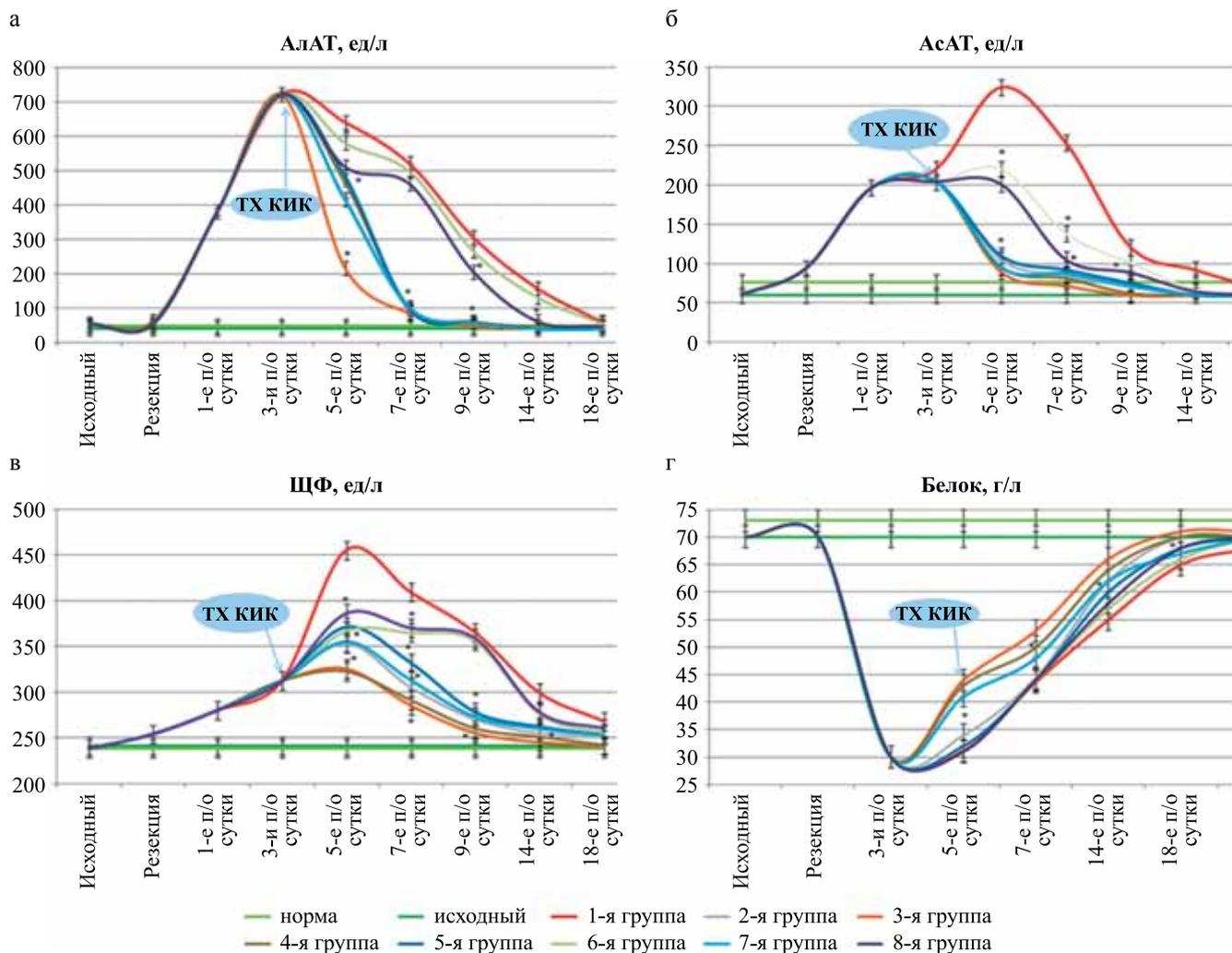


Рис. 6. Динамика восстановления уровня ферментов цитолиза и показателя синтетической функции печени в плазме крови крыс при моделировании острой печеночной недостаточности и имплантации БМКП для регенерации поврежденной печени в группах 2–4 по сравнению с контролем (1 группа опытов – острой печеночной недостаточности без БМКП): 1-я группа – контроль (физиологический раствор); 2-я группа – аутологичные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БНKM; 3-я группа – аутологичные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ; 4-я группа – аллогенные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ. * – различие достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Fig. 6. Dynamics of the recovery of the cytolysis enzyme level and the index of the synthetic liver function in rat blood plasma in the simulation of acute hepatic failure and implantation of BMCP for the regeneration of damaged liver in groups 2–4 compared to control (group 1 in studies – acute liver failure without BMCP): Group 1 – control (physiological solution); Group 2 – autologous LC : MMSC = 5 : 1 on a BNKM matrix; Group 3 – autologous LC : MMSC = 5 : 1 on a BMCH matrix; Group 4 – allogeneic LC : MMSC = 5 : 1 on a BMCH matrix. * – the difference is significant compared to control ($p < 0.05$)

недостаточности и имплантации БМКП позволило выявить явление резорбции матриксов и сохранение содержащихся в них клеток на фоне поддержания нормальной функции печени (рис. 7–9).

При гистологическом исследовании зон имплантации БМКП, в состав которых входил гидрогелевый матрикс БМКГ, спустя 90 суток были обнаружены не только явления резорбции матрикса с образованием фиброзной ткани, но и группы гепатоцитов, среди которых встречались жизнеспособные (подтверждено иммуногистохимическим методом с антителами к митохондриальным антигенам

гепатоцитов (рис. 9, б), а также наблюдали ММСК КМ и вновь образованные сосуды (рис. 9, в).

При имплантации БМКП для регенерации печени на каркасном и гидрогелевом матриксах животным с моделью острой печеночной недостаточности происходит более быстрое (по сравнению с контролем) восстановление функции поврежденной печени (нормализация показателей цитолиза и синтетической функции печени). Однако БМКП на гидрогелевом матриксе БМКГ обладает более выраженными функциональными свойствами, чем каркасный матрикс БНKM. При культивировании

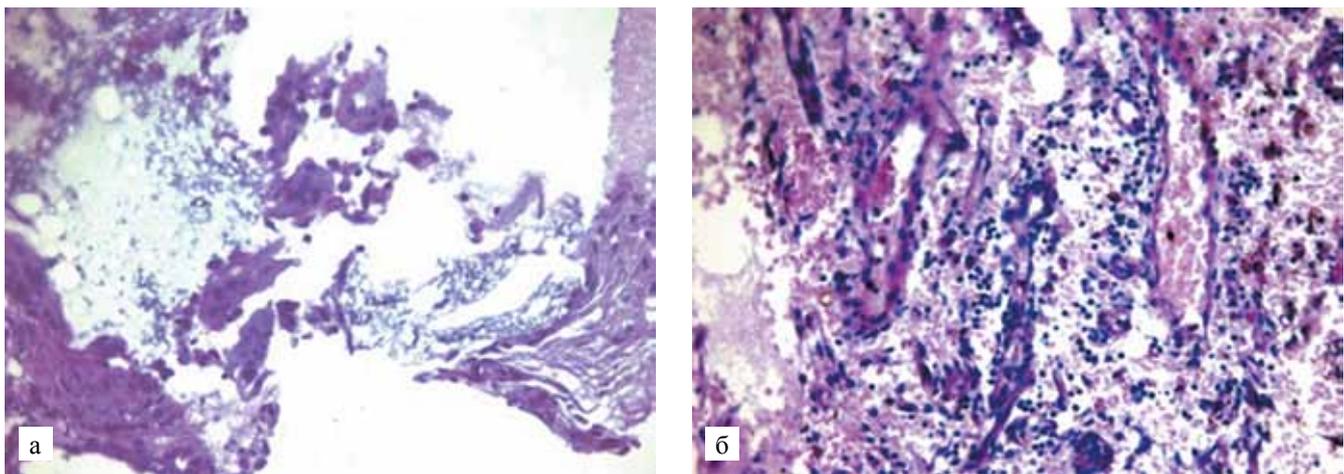


Рис. 7. Гистологические препараты клеточно-инженерных конструкций в зоне имплантации (брыжейка тонкой кишки) у крыс на 90-е сутки после моделирования острой печеночной недостаточности и имплантации БМКП для регенерации поврежденной печени: а – резорбция матрикса БНКМ с иммобилизованными клетками печени и ММСК КМ; гепатоциты неодинакового размера, в некоторых клетках отмечается распад ядер, также встречаются единичные мононуклеарные клетки; PAS-окраска; $\times 400$; б – новообразованные сосуды среди ММСК КМ в матриксе БНКМ; выраженное спазмирование сосудов, очаговые кровоизлияния; PAS-окраска; $\times 200$

Fig. 7. Histological preparations of cell-engineered structures in the implantation area (small bowel mesentery) in rats on Day 90 after modeling acute hepatic failure and implantation of BMCP for the regeneration of damaged liver: a – resorption of a BNCM matrix with immobilized liver cells and MMSC BM, hepatocytes of unequal size, in some cells, nuclear decay is observed, single mononuclear cells are also found. PAS-staining. $\times 400$; б – newly formed vessels among the MMSC BM in a BNCM matrix, pronounced vasoconstriction, focal hemorrhages, PAS-staining. $\times 200$

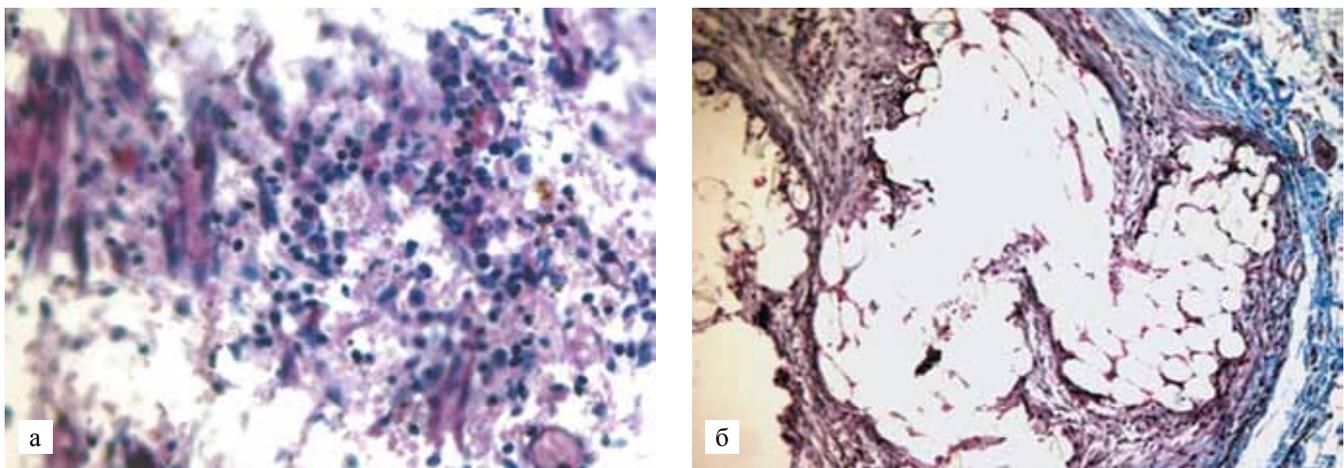


Рис. 8. Гистологические препараты БМКП для регенерации поврежденной печени (на основе матрикса БМКГ) в зоне имплантации на 90-е сутки эксперимента: а – резорбция матрикса, PAS – окраска, $\times 200$; б – формирование фиброзной ткани вокруг матрикса, окраска по Массону, $\times 100$

Fig. 8. Histological preparations of BMCP for the regeneration of damaged liver (based on a BMCH matrix) in the implantation area on Day 90 of the study: a – resorption of the matrix, PAS-staining, $\times 200$; б – formation of fibrous tissue around the matrix, Masson staining, $\times 100$

с гидрогелевым матриксом клетки печени адгезируются в большом количестве на единицу объема матрикса, а после имплантации БМКП на основе БМКГ в ткани резорбция гидрогелевого матрикса не вызывает пролиферативно-воспалительной реакции окружающих тканей. Имплантация БМКП для регенерации печени с гидрогелевым матриксом более эффективно предотвращала угнетение синте-

тической функции печени уже на начальных сроках после резекции печени (моделирования острой печеночной недостаточности) по сравнению с имплантацией БМКП с каркасным матриксом. Наилучший результат наблюдали при имплантации БМКП, состоящих из гидрогелевого матрикса БМКГ, ассоциатов аутологических клеток печени и ММСК КМ (группа 3).

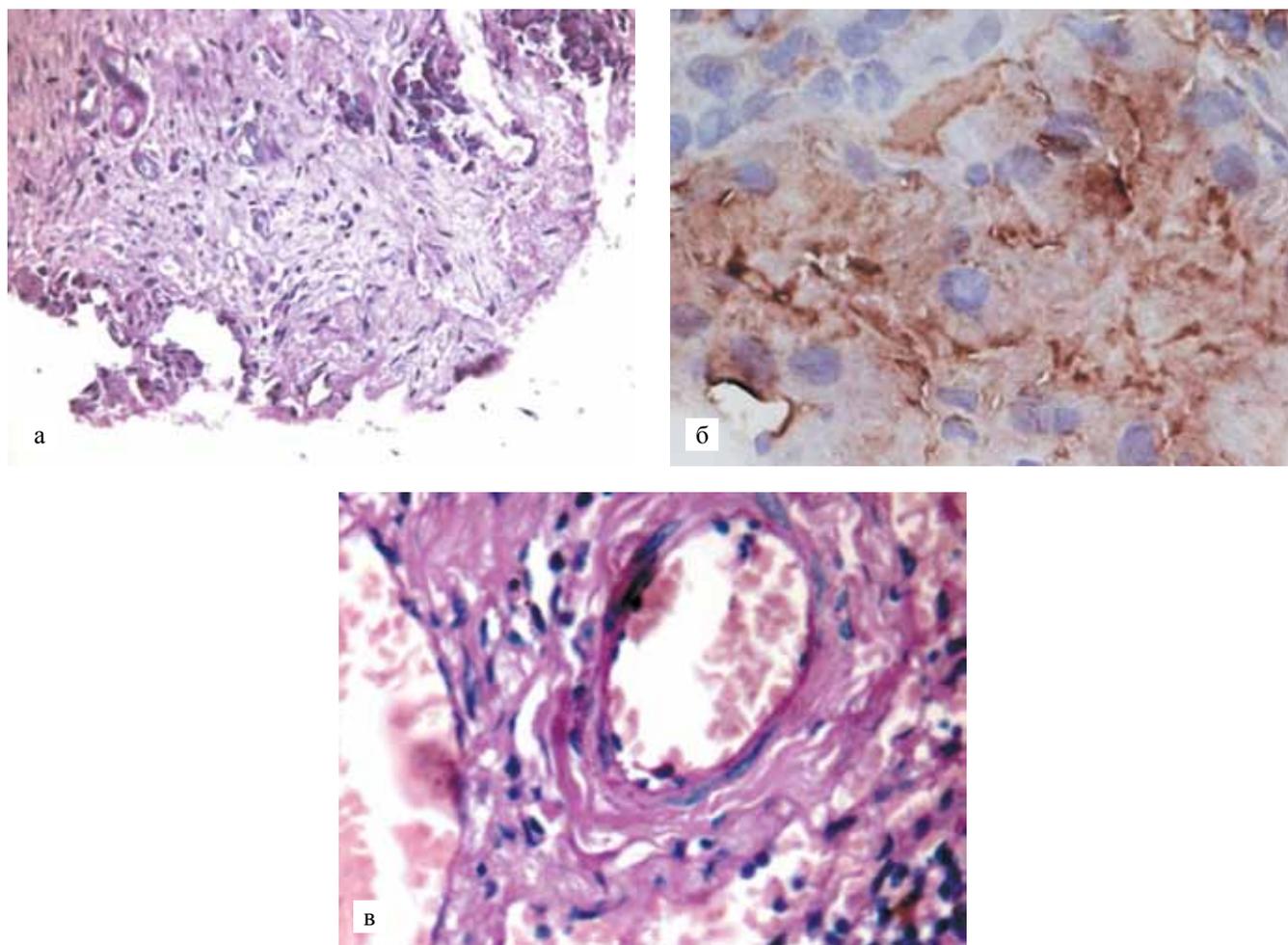


Рис. 9. Гистологические препараты БМКП в зоне имплантации (брыжейка тонкой кишки) на 90-е сутки после моделирования острой печеночной недостаточности и имплантации БМКП: а – матрикс БМКГ с иммобилизованными клетками печени и ММСК костного мозга; группы гепатоцитов, окруженные формирующейся фиброзной тканью; PAS-окраска, $\times 200$; б – иммуногистохимическое окрашивание клеток печени на специфические митохондриальные антигены гепатоцитов, $\times 630$; в – новообразованная артерия мышечного типа в зоне имплантации КИК; PAS-окраска, $\times 400$

Fig. 9. Histological preparations of BMCP in the implantation area (small bowel mesentery) on Day 90 after modeling acute liver failure and implantation of BMCP: а – а BMCH matrix with immobilized liver cells and bone marrow MMSC; groups of hepatocytes, surrounded by an emerging fibrous tissue, PAS-staining, $\times 200$; б – immunohistochemical staining of liver cells for specific mitochondrial antigens of hepatocytes, $\times 630$; в – a newly formed muscle type artery in the BMCP implantation area, PAS-staining, $\times 400$

Феномен более низкого темпа восстановления белково-синтетической функции печени во 2-й группе с каркасным матриксом БНКМ по сравнению с группами 3, 4 с гидрогелевым матриксом БМКГ, возможно, связан с наличием биоактивных компонентов внеклеточного матрикса в его составе [20]. Отметим, что гидрогелевый матрикс БМКГ относится к тканевым миметикам, обеспечивающим для роста клеток сходное с внеклеточным матриксом микроокружение [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные подтверждают, что каркасный матрикс из биополимерного нанострук-

турированного композиционного материала и гидрогелевый матрикс из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля длительно (до 90 суток) сохраняют жизнедеятельность адгезированных клеток в составе биомедицинских клеточных продуктов, что позволяет рекомендовать предложенные матриксы для коррекции острой печеночной недостаточности. Вместе с тем гидрогелевый матрикс благодаря наличию биоактивных компонентов способствует созданию наилучших условий для адгезии и жизнедеятельности клеток, что ускоряет процессы регенерации в поврежденной печени по сравнению с биомедицинским клеточным продуктом на каркасном матриксе.

Таким образом, использование биомедицинского клеточного продукта для коррекции и лечения острой печеночной недостаточности на основе гидроголевого матрикса из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля более предпочтительно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Готье СВ, Константинов БА, Цирульникова ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА, 2008. 246. Gautier SV, Konstantinov BA, Cirul'nikova OM. Transplantation of liver. M.: MIA, 2008. 246.
2. Исраилова ВК, Айткожин ГК. Современные представления о печеночной недостаточности и методы их лечения. *Вестн. КАЗМНУ*. 2012; 1: 36–44. Israilova VK, Aitkozhin GK. Sovremennye predstavleniya o pechenochnoj nedostatochnosti i metody ih lecheniya. *Vestn. KAZMNU*. 2012; 1: 36–44.
3. Плеханов АН. Острая печеночная недостаточность – проблемы и перспективы их решения. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2012; 5 (87). Часть 2: 150–159. Plekhanov AN. Ostraya pechenochnaya nedostatochnost' – problemy i perspektivy ih resheniya. *Vyulleten' VSNC SO RAMN*. 2012; 5 (87). Chast' 2: 150–159.
4. Онищенко НА, Люндуп АВ, Шагидулин МЮ, Крашенинников МЕ. Синусоидальные клетки печени и клетки костного мозга как компоненты единой функциональной системы регуляции восстановительного морфогенеза в здоровой и поврежденной печени. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2011; 2. Т. VI: 73–87. Onishchenko NA, Lyundup AV, Shagidulin MYu, Krashennnikov ME. Sinusoidal'nye kletki pecheni i kletki kostnogo mozga kak komponenty edinoj funkcional'noj sistemy regulyatsii vosstanovitel'nogo morfogeneza v zdorovoj i povrezhdennoj pecheni. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2011; 2. T. VI: 73–87.
5. Franquesa M, Hoogduijn MJ, Eggenhofer E, Pinxteren J, Christ B, Obermajer N, Pulin A et al. The MiSOT Study Group. Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation (MiSOT) Fourth Meeting: Lessons Learned from First Clinical Trials. *Transplantation*. 2013; 96 (3): 234–238.
6. Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенинников МЕ, Ильинский ИМ, Можейко НП, Люндуп АВ и др. Коррекция хронической печеночной недостаточности при трансплантации клеток печени в виде суспензии и клеточно-инженерных конструкций (экспериментальное исследование). *Вестник РАМН*. 2013; 4: 44–51. Gautier SV, Shagidulin MYu, Onishchenko NA, Krashennnikov ME, P'inskij IM, Mozhejko NP, Lyundup AV i dr. Korrekciya hronicheskoy pechenochnoj nedostatochnosti pri transplantacii kletok pecheni v vide suspenzii i kletочно-inzhenernykh konstrukcij (ehksperimental'noe issledovanie). *Vestnik RAMN*. 2013; 4: 44–51.
7. Онищенко НА, Шагидулин МЮ, Крашенинников МЕ, Великий ДА. Повреждения органов и тканей, требующие применения клеточных технологий. *Клеточные технологии для регенеративной медицины*. Под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой, М.М. Кольцовой. СПб.: Изд-во Политехн. ун-та. 2011: 25–43. Onishchenko NA, Shagidulin MYu, Krashennnikov ME, Velikij DA. Povrezhdeniya organov i tkaney, trebuyushchie primeneniya kletochnykh tekhnologij. *Kletochnye tekhnologii dlya regenerativnoj mediciny*. Pod red. G.P. Pinaeva, M.S. Bogdanovoj, M.M. Kol'covoj. SPb.: Izd-vo Politekh. un-ta. 2011: 25–43.
8. Allemann F, Mizuno S et al. Effect of hyaluronan on engineered articular cartilage extracellular matrix gene expression in 3-dimensional collagen scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res*. 2001; 55: 13–19.
9. Hedberg LE, Kroese-Deutman HC, Shih CK et al. Effect of varied release kinetics of the osteogenic thrombin peptide TP508 from biodegradable polymeric scaffolds on bone formation *in vivo* II. *J. Biomed. Mater. Res*. 2005; 72A (4): 343–353.
10. Tan W, Desai MS, Desai TA. Microfluidic patterning of cells in extracellular matrix biopolymers: effect of channel size, cell type, and matrix composition on pattern integrity. *Tissue Engineering*. 2003; 9 (2): 255–268.
11. Соловьева ИВ, Шестерня Н, Перова НВ, Севастьянов ВИ. Комбинированное применение биополимерного гетерогенного гидрогеля и гиалуроновой кислоты при остеоартрозе (первый опыт). *Врач*. 2016; 1: 12–17. Solov'eva IV, Shesternya N, Perova NV, Sevast'yanov VI. Kombinirovannoe primeneniye biopolimernogo geterogennoho gidrogelya i gialuronovoj kisloty pri osteoartroze (pervyj opyt). *Vrach*. 2016; 1: 12–17.
12. Соловьева ИВ, Перова НВ, Севастьянов ВИ. Возможности применения биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего геля при травмах и заболеваниях опорно-двигательного аппарата. *Современная медицина*. 2016; 2: 66–69. Solov'eva IV, Perova NV, Sevast'yanov VI. Vozmozhnosti primeneniya biopolimernogo mikrogeterogennoho kollagensoderzhashchego gelya pri travmah i zabolevaniyah oporno-dvigatel'nogo apparata. *Sovremennaya medicina*. 2016; 2: 66–69.
13. Немец ЕА, Ефимов АЕ, Егорова ВА, Тоневский АГ, Севастьянов ВИ. Микро- и наноструктурные характеристики трехмерных пористых носителей ЭластоПОВ®-3D. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2008; 45 (3): 345–347. Nemes EA, Efimov AE, Egorova VA, Tonevickij AG, Sevast'yanov VI. Mikro- i nanostrukturnye harakteristiki trekhmernykh poristykh nositelej EhlastoPOB®-3D. *Vyulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny*. 2008; 45 (3): 345–347.
14. Севастьянов ВИ, Немец ЕА, Волова ТГ, Марковцева МГ. Трехмерные пористые матриксы для трансплантации клеток на основе биodeградируемого бактериального сополимера «Биопластотан». *Перспективные материалы*. 2007; 6: 5–10. Sevast'yanov VI, Nemes EA, Volova TG, Markovceva MG. Trekhmernye poristye matriksy dlya transplantacii kletok na osnove biodegradiruемого bakterial'nogo sopolimera «Bioplastotan». *Perspektivnye materialy*. 2007; 6: 5–10.

15. Seglen O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods. Cell. Biol.* 1976; 13: 29–83.
16. Chen O, Kon J, Ooe H, Sasaki K, Mitaka T. Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture. *Nat. Protoc.* 2007; 2: 1197–1205.
17. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. М.: Лавр, 2009. 307. *Shumakov VI, Onishchenko NA. Biologicheskie rezervy kletok kostnogo mozga i korrekciya organnyh disfunkcij.* М.: Lavr, 2009. 307.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65: 55–63.
19. Chen O, Kon J, Ooe H, Sasaki K, Mitaka T. Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture. *Nat. Protoc.* 2007; 2: 1197–1205.
20. Патент РФ № 2433828 (2011). Севастьянов В.И., Перова Н.В. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Patent RF № 2433828 (2011). Sevast'yanov V.I., Perova N.V. In'ekcionnyj geterogennyj biopolimernyj gidrogel' dlya zamestitel'noj i regenerativnoj hirurgii i sposob ego polucheniya.
21. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering.* 2014; Part A, 20 (5, 6): 895–898.

Статья поступила в редакцию 19.01.2017 г.
The article was submitted to the journal on 19.01.2017

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

Подписной индекс нашего издания в каталоге «Газеты и журналы» – **80248**

Ф. СП-1		ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		80248 (индекс издания)	количество комплектов						
на 2017 год по месяцам											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Куда											
		(почтовый индекс)				(адрес)					
Кому											
		(фамилия, инициалы)									
Ф. СП-1				ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА		на журнал		80248 (индекс издания)			
		пв	место	ли-тер							
				ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ							
стои-мость		подписки		руб.		коп.		количество комплектов			
		пере-адресовки		руб.		коп.					
на 2017 год по месяцам											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Куда											
		(почтовый индекс)				(адрес)					
Кому											
		(фамилия, инициалы)									