

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-1-122-134

ВЛИЯНИЕ СООТНОШЕНИЯ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ И ММСК КОСТНОГО МОЗГА В ИМПЛАНТИРУЕМЫХ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЯХ ПЕЧЕНИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, Н.А. Онищенко¹, М.Е. Крашенинников², А.О. Никольская¹,
Е.А. Волкова¹, И.М. Ильинский¹, Н.П. Можейко¹, В.И. Севастьянов¹, 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

Цель работы: выявить наиболее эффективное соотношение клеток печени и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) в имплантируемых клеточно-инженерных конструкциях (КИК), используемых для коррекции хронической печеночной недостаточности (ХПН). **Материалы и методы.** Для создания КИК печени использовался биополимерный имплантат – композиция гетерогенного коллагенсодержащего геля (БМКГ) (торговый знак *Сфера*[®] ГЕЛЬ), содержащая жизнеспособные клетки печени и ММСК КМ в следующих соотношениях – 1 : 1; 5 : 1 и 10 : 1 соответственно. КИК с различным соотношением клеток печени и ММСК КМ имплантировали в печень крыс с хронической печеночной недостаточностью (ХПН), которую моделировали путем заправки крыс ССЛ₄. Эффективность регуляторного воздействия КИК (с различным соотношением клеток) на восстановительные процессы в печени оценивали с помощью биохимических, морфологических и морфометрических методов на разных сроках после имплантации. **Результаты.** Установлено корригирующее воздействие КИК различного клеточного состава на биохимические и морфологические показатели печени при ХПН. При изучении КИК печени различного клеточного соотношения клеток печени и ММСК КМ (1 : 1; 5 : 1 и 10 : 1 соответственно) установлено, что наиболее оптимальным соотношением клеток в составе КИК является 5 : 1, т. к. при таком соотношении клеток имела место более отчетливая нормализация морфофункциональных показателей ткани печени при ХПН в течение 365 суток наблюдения при сохранении структурного гомеостаза самих КИК. **Заключение.** Эффективная коррекция хронической печеночной недостаточности может быть осуществлена с помощью имплантируемых КИК печени, в которых донорские клетки печени и ММСК КМ находятся в соотношении 1 : 1; 5 : 1 и 10 : 1. Анализ результатов пролонгированной коррекции структурных и функциональных показателей печени с помощью КИК позволяет рекомендовать предпочтительное использование КИК с соотношением клеток печени и ММСК КМ 5 : 1, т. к. длительное сохранение структурного гомеостаза в самих КИК позволяет прогнозировать их длительное регуляторное воздействие на ткань печени при ХПН, в том числе у реципиентов, находящихся в листе ожидания на трансплантацию печени.

Ключевые слова: печень, печеночная недостаточность, регенерация, трансплантация клеток, клеточно-инженерные конструкции, биоискусственные органы, биodeградируемые матриксы.

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

For correspondence: Shagidulin Murat Yunusovich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (499) 196-87-90. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

THE INFLUENCE OF THE RATIO OF LIVER CELLS AND BONE MARROW IN THE IMPLANTABLE CELL-ENGINEERING STRUCTURES OF THE LIVER ON THE RECOVERY EFFICIENCY OF FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL PARAMETERS IN CHRONIC LIVER FAILURE

M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, N.A. Onishchenko¹, M.E. Krashennnikov², A.O. Nikolskaya¹, E.A. Volkova¹, I.M. Iljinsky¹, N.P. Mogeiko¹, V.I. Sevastianov¹, S.V. Gautier^{1, 2}

¹ V.I. Shumakov National Medical 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 (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

Aim: to determinate the most effective liver cells and multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow (MMSC BM) ratio into implantable cell engineering constructions (CECs) used for chronic liver failure (CLF) correcting. **Materials and methods.** For creating liver CECs it was used a biopolymer implant – a composition of a heterogeneous collagen-containing gel (BMCG) (Sphero®GEL trademark) containing viable liver cells and MMSC BM in the following ratios – 1 : 1; 5 : 1 and 10 : 1 respectively. CECs with different ratios of liver cells and MMSC BM were implanted into liver of rats in which chronic liver failure (CLF), was modeled by using CCl₄. The effectiveness of the regulatory effects of CECs (with different cell ratios) on regenerative processes in livers were assessed by using biochemical, morphological and morphometric methods at different periods after their implantation. **Results.** Corrective effect of CECs with different cell composition on biochemical and morphological parameters of livers at chronic liver failure was established. During studying the liver CECs with various cell ratios of liver cells and MMSC BM (1 : 1; 5 : 1 and 10 : 1 respectively), it was found that the most optimal ratio of cells into the CECs is 5 : 1, because at this ratio of cells, there were a more distinct normalization of the morphological and functional liver parameters within 365 days after modeling CLF and maintenance of the structural homeostasis into the CECs. Themselves, which allows predicting their long-term regulatory effect on the liver tissue in CLF and maintaining its normal structural and functional state. **Conclusion.** The effective correction of chronic liver failure can be carried out by using the implanted liver CECs, in which donor liver cells and MMSC BM were presented in ratios – 1 : 1; 5 : 1 and 10 : 1. But analysis of prolonged correction of liver morphological and functional parameters at CECs using it was allow to recommend the preferences using of CECs with ratio 5 : 1, because prolonged preservation of structural homeostasis into these CECs makes possible to prognosticate their prolonged regulatory action on the liver tissue at CLF, especially for recipients on a waiting list for liver transplantation.

Key words: liver, liver failure, regeneration, cell transplantation, cell-engineering construction, bioartificial organs, biodegradable matrices.

ВВЕДЕНИЕ

Неуклонный рост хронических заболеваний печени [1, 2], приводящий к ее необратимому повреждению, обуславливает поиск эффективных методов лечения [3, 4]. Общепринято, что пока единственным эффективным методом лечения больных с декомпенсированной печеночной недостаточностью, приводящим к выраженному клиническому эффекту с полной социальной реабилитацией больного, является трансплантация печени [5]. Однако на пути выполнения необходимого количества таких операций стоит непреодолимое препятствие – повсеместный и возрастающий дефицит донорских органов; именно поэтому число пациентов, находящихся в листе ожидания, продолжает неуклонно увеличиваться [6, 7]. Все вышеизложенное указывает на необходимость

поиска новых, эффективных и доступных методов лечения печеночной недостаточности.

Попытки восстановления функции необратимо поврежденной печени путем трансплантации клеточного материала начали предприниматься в мире, начиная с 70-х годов прошлого столетия, и в XXI веке возможности клеточной терапии заболеваний печени продолжают интенсивно изучаться [8–12], в том числе для коррекции состояния больных перед трансплантацией печени.

К настоящему времени проведен ряд исследований по применению с этой целью клеток печени (КП) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) [13–19]. При этом оказалось, что после внутривенной трансплантации взвеси как изолированных гепатоцитов, так

и ММСК КМ корригирующий эффект от их применения при хронической печеночной недостаточности (ХПН) был непродолжителен. К недостаткам трансплантации изолированных аллогенных гепатоцитов относится их низкая выживаемость в новых изолированных условиях из-за развития реакции отторжения после трансплантации и невозможность за короткие сроки в полной мере интегрироваться с тканями реципиента. Внутривенное введение ММСК КМ не может обеспечить условий для их трансдифференцировки, адгезии и образования ассоциатов клеток, способных встраиваться в структуру печени, взаимодействовать между собой и длительно функционировать, стимулируя и поддерживая восстановительные процессы в поврежденной печени [20]. Анализ причин непродолжительности сроков корригирующего действия трансплантации клеточных суспензий привел нас к необходимости разработки технологии изготовления имплантируемых в печень клеточно-инженерных конструкций (КИК), способных создать условия для образования и длительного функционирования клеточных ассоциатов из клеток донорской печени и ММСК КМ за счет прикрепления их на 3-мерных биосовместимых и биodeградируемых матриксах.

Эти принципы и были положены в основу работ по созданию имплантируемых клеточно-инженерных конструкций вспомогательной печени [21–28]. Однако вопрос о наиболее эффективном соотношении клеточного материала в составе КИК, способном обеспечить и длительно поддерживать регуляторное воздействие этих клеток на восстановительные процессы в поврежденной печени, не до конца изучен.

Основываясь на полученных ранее результатах, мы предположили, что соотношение клеток печени и ММСК КМ в имплантируемых КИК должно играть важную роль в восстановлении и длительном поддержании их регуляторного воздействия на функциональные и морфологические показатели ткани поврежденной печени при ХПН прежде всего за счет длительного поддержания клеточного гомеостаза в самих КИК, которое должно обеспечиваться соотношением входящих в него клеток.

Цель настоящего исследования – выявить оптимальное соотношение клеток печени и ММСК КМ в составе КИК, которое способно обеспечить длительное поддержание состояния клеточного гомеостаза в самих КИК и тем самым оптимизировать регуляторное воздействие КИК на ткань поврежденной печени при ХПН в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты на животных проводились с 9 до 19 часов при комнатной температуре ($t = 22\text{--}24^\circ\text{C}$).

Все манипуляции с животными проводили 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).

Модель ХПН создавали на крысах-самцах линии Вистар в возрасте 6–8 месяцев, весом 200–350 г ($n = 132$), из которых 27 крыс (20,45%) погибло на этапе моделирования ХПН. Для изготовления КИК дополнительно использовали 25 крыс-самцов линии Август в возрасте 5–6 месяцев, весом 150–200 г.

При изготовлении КИК печени использовали аллогенные клетки печени (КП) и аллогенные ММСК КМ в соотношении 1 : 1; 5 : 1; 10 : 1 соответственно, а также биосовместимый матрикс – композиция биополимерного микроструктурированного гетерогенного имплантируемого коллагенсодержащего гидрогеля БМКГ (торговый знак *Сферо*® ГЕЛЬ, ТУ 9398-001-54969743-2008, ФСР 2012/13033 от 15.07.2015 г., производитель АО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Россия), имеющий регламент технологического изготовления, разрешенный для медицинского применения. Характеристические свойства БМКГ: 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 биорезорбции БМКГ – до 9 месяцев.

Моделирование хронической печеночной недостаточности проводили путем пролонгированной заправки крыс четыреххлористым углеродом в собственной модификации: А.О. Никольская, З.З. Гоникова, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, В.И. Севастьянов (2017). Контроль адекватности созданных моделей оценивали по уровню летальности и выживаемости животных, состоянию биохимических показателей крови и морфологическим характеристикам состояния печени и самих КИК. Животных, выживших после моделирования хронической печеночной недостаточности, выводили из эксперимента с соблюдением принципов гуманности на 28–30, 90, 180, 270 и 365-е сутки путем внутрибрюшинного введения тиопентала натрия в дозировке, вызывающей остановку дыхания. При коррекции ХПН путем имплантации КИК с различным клеточным составом в паренхиму поврежденной печени иммуносупрессию не применяли. Все экспериментальные животные, выжившие после моделирования ХПН, были разделены на 4 группы (табл.).

Выделение аллогенных клеток печени (КП) осуществляли из эксплантированной печени ($n = 25$) по традиционной методике бесперфузионным методом, получали от 5×10^6 до 10×10^6 клеток/мл. Выделение и культивирование ММСК КМ производили по

Таблица

Распределение животных по группам в опытах с имплантацией КИК, имеющих в своем составе различное соотношение КП и ММСК КМ (2–4-я группы) для коррекции хронической печеночной недостаточности

The distribution of animals in groups in experiments with implantation of CECs of different ratios of cell composition (2–4 groups) for the correction of chronic liver failure

Группы	Различные варианты применения клеточного материала (на матриксах и в виде суспензии)	Крысы	
		Вистар	Август
1	Контроль (физраствор)	35	–
2	Аллогенные КП : ММСК = 1 : 1 на матриксе БМКГ	20	5
3	Аллогенные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ	30	10
4	Аллогенные КП : ММСК = 10 : 1 на матриксе БМКГ	20	10
Всего:		105	25

В.И. Шумакову, Н.А. Онищенко (2009) (n = 25). Со-культивирование клеток печени и ММСК костного мозга в разном соотношении перед имплантацией осуществляли в течение 3 суток.

Коррекцию хронической печеночной недостаточности проводили путем имплантации КИК с различным соотношением клеток (табл.) в паренхиму поврежденной печени животного на 49-е сутки от начала моделирования хронической печеночной недостаточности (т. е. на 7-е сутки после окончания моделирования хронической печеночной недостаточности). В качестве маркера зон имплантации в печень сокультивированных КП и ММСК КМ в составе КИК на длительные сроки использовали матрикс «Цитодекс-3».

Для оценки эффективности коррекции ХПН в разных сериях и группах опытов использовали комплекс клинических, биохимических, морфологических и иммуногистохимических методов исследования.

Методы лабораторной диагностики

Забор крови у крыс осуществляли под эфирным наркозом путем насечки кончика хвоста. Функцию печени оценивали на биохимическом анализаторе Reflotron™ («Roche», Швейцария) при использовании специальных тест-полосок Reflotron™: на 7, 14, 21, 28, 60, 90, 180, 270, 365-е сутки после окончания моделирования ХПН.

Методы морфологической и иммуногистохимической оценки биоптатов ткани печени и зон введения клеточно-инженерных конструкций (КИК)

Для морфологических исследований осуществляли биопсию здоровой печени при ХПН без коррекции – контроль и с коррекцией, причем исследования проводили в зонах имплантации КИК и вне зон имплантации КИК на 28–30, 90, 180, 270, 365-е сутки эксперимента. Оценивали данные световой микроскопии с окрашиванием срезов гематоксилином и

эозином, по Ван-Гизону, по Маллори, по Массону и на PAS-реакцию. Использовали микроскоп Leica DM 6000 B и камеру 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 (Leica Camera AG, Германия). Морфометрически определяли: наличие цирроза (подсчет количества ложных долек); удельную площадь соединительной ткани (в % соотношении к общей площади среза печени) [29, 30]; осуществляли подсчет количества гепатоцитов с признаками жировой дистрофии, с дегенерирующими ядрами и внутриядерными липидными включениями; количество двуядерных гепатоцитов; площадь кровеносных сосудов и желчных протоков.

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). Актуальную выживаемость животных рассчитывали по Kaplan–Meier при помощи статистического пакета программы Statistica for Windows, v.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Коррекция хронической печеночной недостаточности с помощью КИК

Модель устойчивой хронической печеночной недостаточности создавали путем токсического повреждения печени крыс CCl_4 по модифицированной нами схеме в течение 42 суток. Используемая модификация усиливала токсическое повреждение печени (летальность на этапе затравки составила

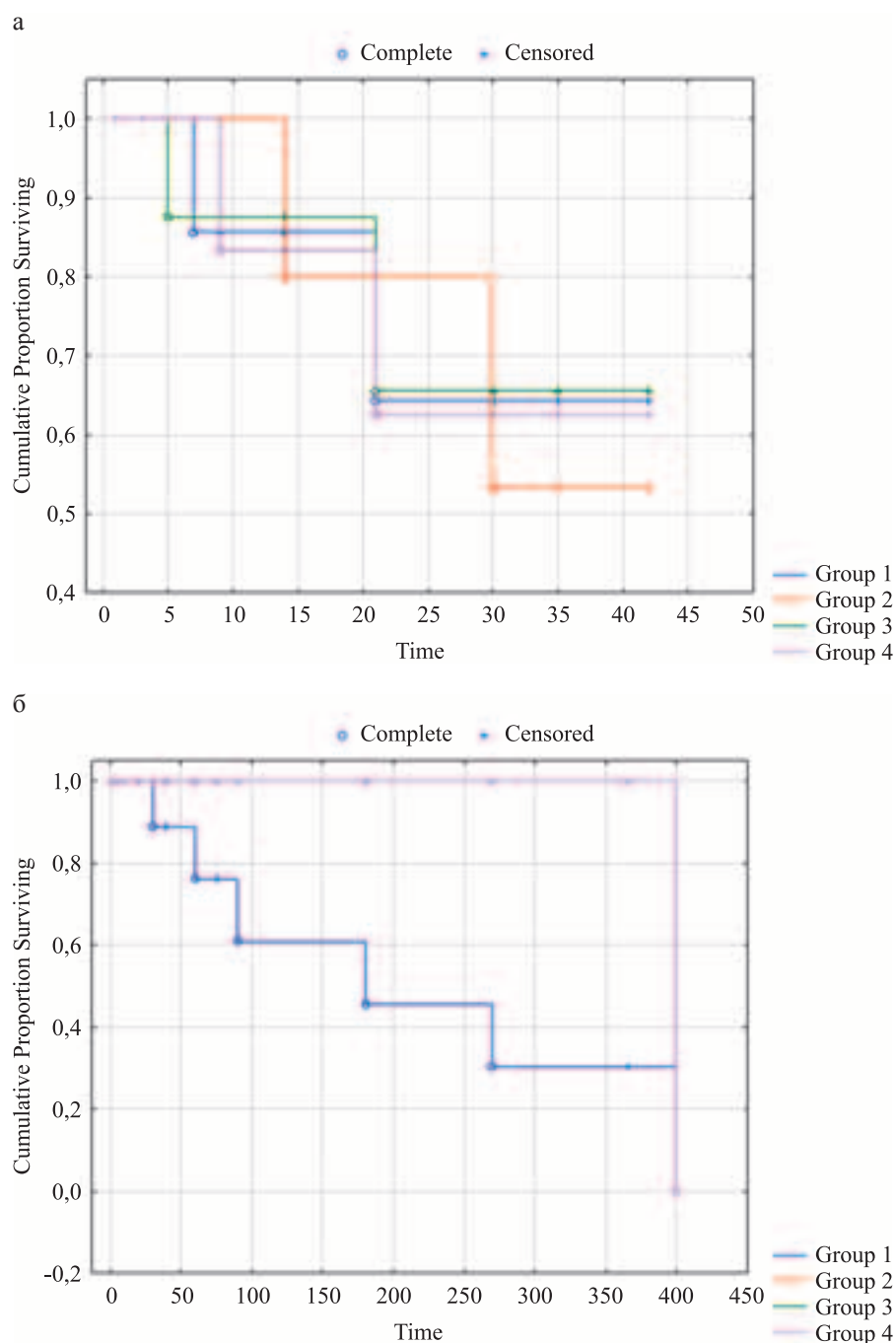


Рис. 1. Актуриальная выживаемость животных (по Каплану–Майеру): а – при моделировании ($p = 0,98393$) и б – лечении ($p = 0,00397$) хронической печеночной недостаточности

Fig. 1. Actual survival of animals (according to Kaplan–Meier) with: а – modeling ($p = 0.98393$) and б – treatment ($p = 0.00397$) of chronic liver failure

20,45%). Актуриальная выживаемость на этапе заправки и при коррекции представлена на рис. 1.

Развитие устойчивого токсического повреждения печени после моделирования ХПН сопровождалось длительным нарушением функциональных показателей печени: АлАТ, АсАТ и ЩФ в течение 90–180 суток (рис. 2, б, г, е) и появлением уже в выделенной группе контроля (без терапии) дополнительной летальности. Так, из оставшихся в живых 35 крыс после моделирования ХПН на протяжении всего срока

эксперимента погибло еще 17 крыс, и таким образом, летальность в группе контроля дополнительно составила 48,6%. Отсутствие летальности в пролеченных группах путем имплантации КИК позволяло нам прийти к заключению, что коррекция ХПН является эффективной при использовании КИК с различным клеточным составом.

При коррекции ХПН с помощью КИК (табл.) сравнивали также эффективность корректирующего воздействия КИК в зависимости от соотношения

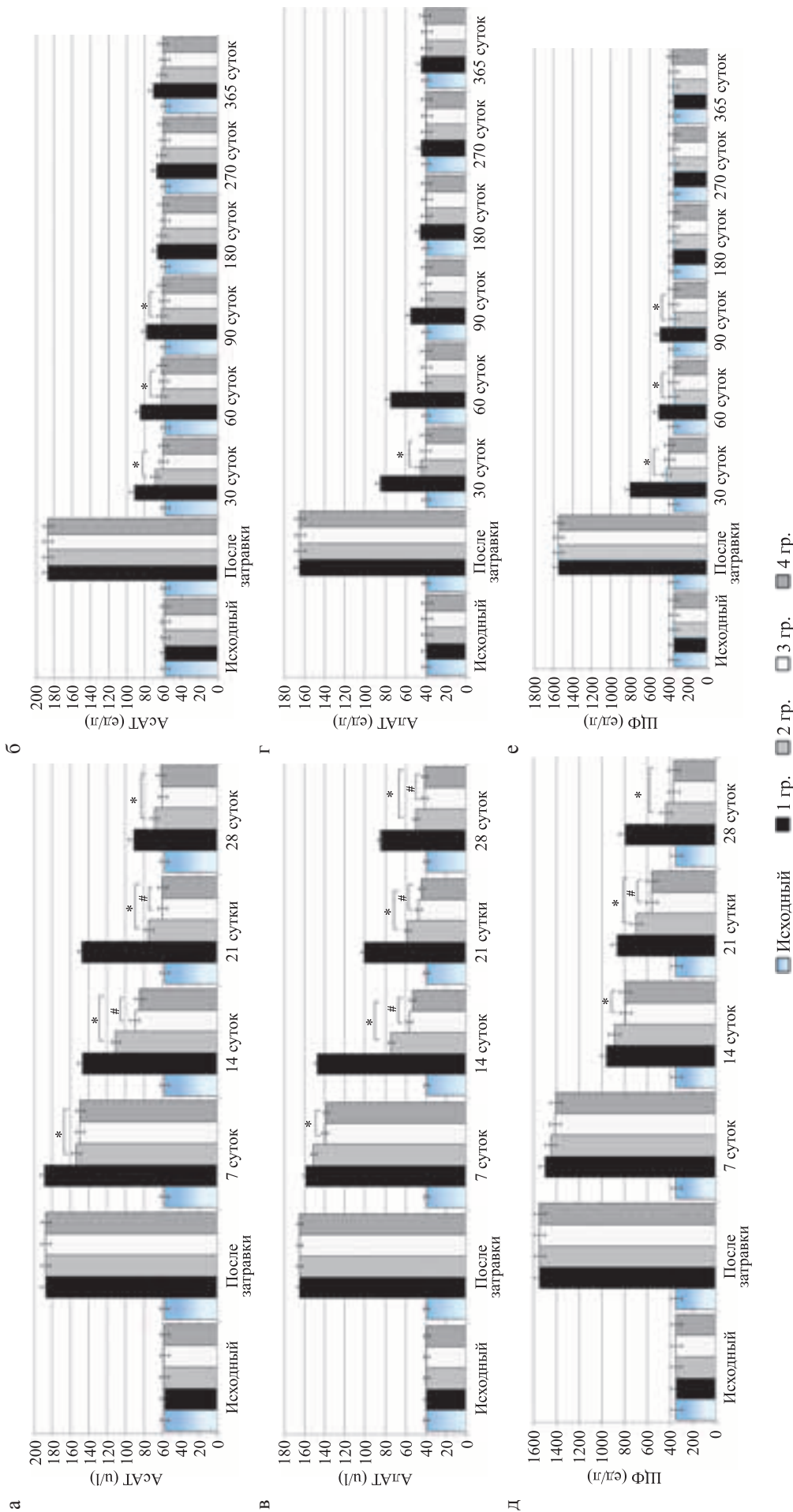


Рис. 2. Динамика нормализации уровня АсАТ, АлАТ и ЩФ в сыворотке крови крыс после моделирования хронической печеночной недостаточности и имплантации КИК на основе матрикса БМКГ. АсАТ для здоровых животных норма – до 60 ед/л; АлАТ для здоровых животных норма – до 40 ед/л; ЩФ для здоровых животных норма – до 350 ед/л. а, в, д – срок наблюдения 28 суток; б, г, е – срок наблюдения 365 суток. 1-я гр. – контроль (физраствор); 2-я гр. – аллогенные КПК : ММСК = 1 : 1 на матриксе БМКГ; 3-я гр. – аллогенные КПК : ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ; 4-я гр. – аллогенные КПК : ММСК = 10 : 1 на матриксе БМКГ. * – различие достоверно по сравнению с уровнем ферментов в контроле (1-я группа), $p < 0,05$; # – различие достоверно по сравнению с уровнем ферментов в группе 2, $p < 0,05$

Fig. 2. Dynamics of normalization of AST, ALT and ALP levels in the serum of rats after modeling chronic liver failure and implantation of BMCG matrix. AST for healthy animals is the norm – up to 60 units/l; ALT for healthy animals is the norm – up to 40 units/l; ALP for healthy animals is the norm – up to 350 units/l. а, в, д – observation period of 28 days; б, г, е – the observation period is 365 days. 1 gr. – control (physical solution); 2 gr. – allogeneic LC : MMSC = 1 : 1 on the BMCG matrix; 3 gr. – allogeneic LC : MMSC = 5 : 1 on the BMCG matrix; 4 gr. – allogeneic LC : MMSC = 10 : 1 on the BMCG matrix. * – the difference is significant compared with the level of enzymes in the control (group 1), $p < 0.05$; # – the difference is significant compared with the level of enzymes in group 2, $p < 0.05$

клеток, используемых в их составе (клетки печени и ММСК КМ).

Сравнительную оценку эффективности применения КИК различного соотношения клеточного состава для коррекции хронической печеночной недостаточности проводили путем изучения динамики восстановления биохимических и морфологических показателей печени реципиента в течение 365 суток для выявления оптимального соотношения клеточного состава, используемого в КИК. Наше исследование показало, что более быстрый темп восстановления биохимических показателей (АлАТ, АсАТ, ЩФ) отмечался во всех группах (кроме 1-й группы контроля) в течение первых 28–30 суток (рис. 2, а, в, д).

При сравнении динамики исследуемых показателей опытных групп было установлено, что во всех исследуемых группах происходило снижение показателей цитолиза. При дальнейшем наблюдении во всех группах с коррекцией хронической печеночной недостаточности биохимические показатели, характеризующие цитолитический синдром, оставались в пределах нормы, тогда как в контроле (1-я группа) эти показатели были повышенными в течение 180 суток (рис. 2, б, г, е).

Таким образом, при оценке влияния КИК различного соотношения клеточного состава на восстановление функции печени мы отметили, что в экспериментальных группах функциональные показатели восстанавливались до нормы в течение первых 30 суток и оставались в дальнейшем в пределах нормы.

Поскольку высокий темп нормализации функциональных показателей в течение первых 30 суток и отсутствие воспалительного инфильтрата вокруг имплантированных КИК (см. ниже) на протяжении 90 суток был отмечен в группе, где использовались КП и ММСК КМ в отношении 5 : 1, то для выявления морфологических восстановительных процессов в печени считали обоснованным изучить морфологические характеристики паренхимы печени. В препаратах печени, где использовались в составе КИК КП и ММСК КМ в соотношении 5 : 1 (группа 3), к 30-м суткам отмечалась значительно меньшая выраженность токсического поражения печени по сравнению с контролем. Это проявлялось в регрессе жировой дистрофии и переходе ее в мелкокапельную форму (более благоприятную и обратимую), в восстановлении структуры печеночной долики, в появлении сохранных гепатоцитов вокруг вен и в восстановлении архитектоники балок. Балочная архитектоника печени после моделирования хронической печеночной недостаточности и коррекции с помощью КИК в 3-й группе восстановилась на 30-е сутки и практически не отличалась от нормальной печени, формирование ложных долек не опреде-

лялось, тогда как в контроле имело место появление ложных долек.

Следующей реперной точкой нами был выбран срок 90 суток после имплантации КИК с клеточным материалом. Мы полагали, что эта точка является определяющей, т. к. если к этому сроку сохраняется и усиливается зафиксированная на более ранних сроках тенденция к регенерации, то наша гипотеза о возможности эффективной коррекции хронической печеночной недостаточности путем применения метода клеточных технологий правомочна и должна быть подтверждена.

К 90-м суткам после окончания заправки в контрольной группе (1-я группа – без коррекции) в печени отмечали субтотальную перестройку гистоархитектоники печени с замещением нормальной паренхимы ложными долями. Склеротические изменения (фиброз) проявлялись образованием коллагеновых волокон по ходу портальных трактов и формированием порто-портальных и портоцентральных септ, с образованием ложных долек. Присутствовали очаговые некрозы гепатоцитов. Имело место расширение и полнокровие синусоидов и полнокровие центральных вен. В паренхиме редкая лимфоидно-клеточная инфильтрация и пролиферация гистиобластов и гистиоцитов. Пролиферации желчных протоков мы не наблюдали.

При сравнительной оценке восстановления морфологического состояния печени реципиента на 90-е сутки исследования наиболее отчетливо выраженная положительная динамика восстановления печеночной паренхимы была выявлена в группе 3, где в КИК использовались КП и ММСК КМ в соотношении 5 : 1. Гистологическое исследование позволило установить, что к этому сроку в исследуемых группах архитектоника печени полностью восстанавливала свою структуру по сравнению с контролем и практически не отличалась от нормальной печени (рис. 3, в). Гепатоциты были без признаков дистрофии, тогда как в контроле имели место выраженная белковая дистрофия гепатоцитов, склероз и фиброз паренхимы печени (рис. 3, а).

На 90-е сутки исследования в группе 2, где в КИК использовались КП и ММСК КМ в соотношении 1 : 1, также отмечались восстановительные процессы в паренхиме поврежденной печени, и наличие этих восстановительных процессов мы связываем с присутствием в составе КИК ММСК КМ, в то время как восстановление дезинтоксикационной функции печени было менее интенсивно по отношению к группам 3 и 4 (рис. 2, б, г, е). Обусловлено это, очевидно, недостаточным количеством пересаженных клеток печени. В группе 4, где в КИК использовались КП и ММСК КМ в соотношении 10 : 1, также отмечали

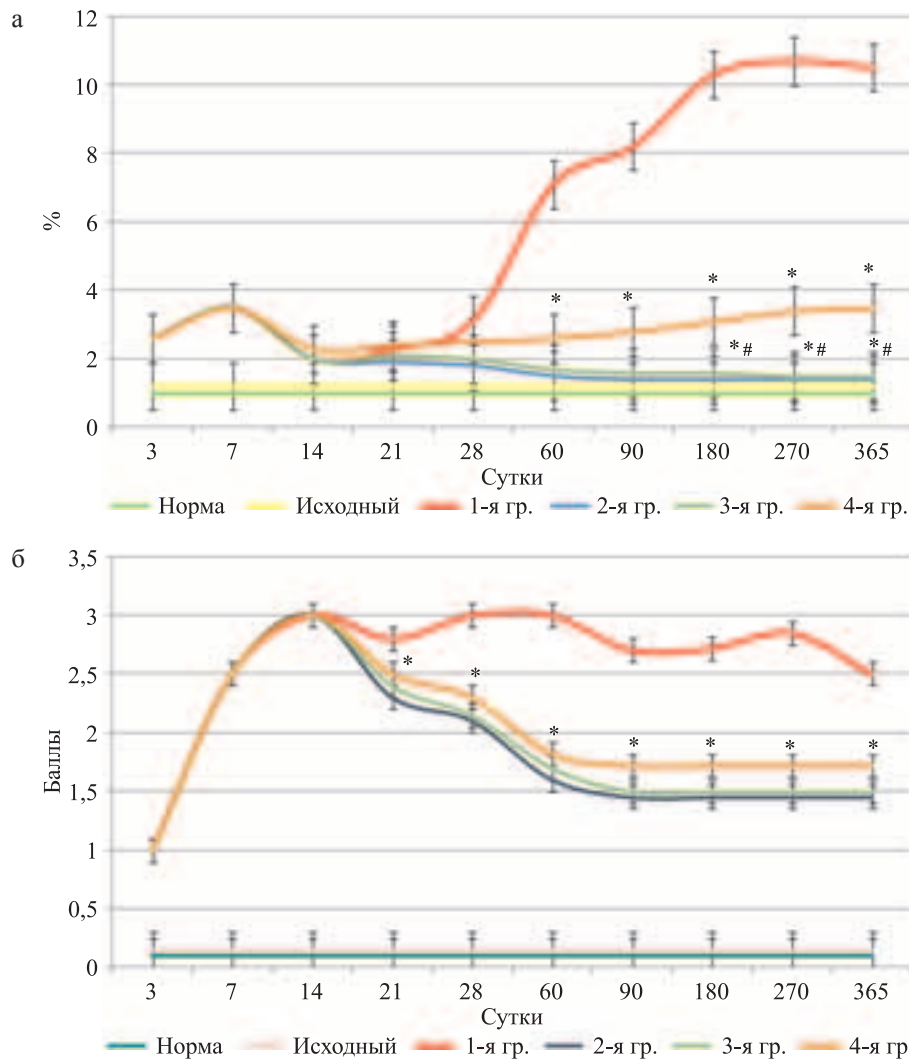


Рис. 3. Динамическая морфометрическая оценка состояния непаренхиматозных структур печени крыс при моделировании хронической печеночной недостаточности и имплантации КИК в разных группах: а – изменение удельной площади соединительной ткани; б – подсчет количества ложных долек в печени; 1-я гр. – контроль (физраствор); 2-я гр. – аллогенные КП : ММСК = 1 : 1 на матриксе БМКГ; 3-я гр. аллогенные КП : ММСК = 5 : 1 на матриксе БМКГ; 4-я гр. – аллогенные КП : ММСК = 10 : 1. * – различие достоверно по сравнению с уровнем показателя в печени крыс в контроле (1-я группа), $p < 0,05$

Fig. 3. Dynamic morphometric assessment of the state of non-parenchymal structures of the rat liver in simulations of chronic liver failure and implantation of CEC in different groups: а – change in specific area of connective tissue; б – counting the number of false lobes in the liver; gr. 1 – control (physical solution); gr. 2 – allogeneic LC : MMSC = 1 : 1 on the BMCG matrix; gr. 3 – allogeneic LC : MMSC = 5 : 1 on the BMCG matrix; gr. 4 – allogeneic LC : MMSC = 10 : 1. * – Difference significantly compared with the level of the indicator in the liver of rats in the control (group 1), $p < 0.05$

восстановительные процессы в паренхиме поврежденной печени.

На сроке 180 суток после окончания затравки CCl_4 в препаратах печени контрольной группы (1-я группа – без коррекции) сохранялась крупно- и мелко-капельная очаговая жировая дистрофия и дегенерация гепатоцитов, паренхиматозная и гидропическая дистрофия гепатоцитов и очаговые некрозы гепатоцитов, расширение и полнокровие синусоидов и полнокровие центральных вен. В паренхиме печени отмечалась редкая лимфоидно-клеточная инфильтрация и пролиферация гистиобластов и гистцитов. Склеротические изменения (фиброз) проявлялись об-

разованием коллагеновых волокон по ходу портальных трактов и формированием порто-портальных и портоцентральных септ, с образованием ложных долек, диагностировался склероз и цирроз печени.

При увеличении сроков наблюдения (до 180 суток) во всех группах леченных пациентов также имела место положительная динамика восстановления паренхимы печени и усиление процессов ее дефибрирования. При использовании КИК, содержащих КП и ММСК КМ (гр. 3) отмечено полное восстановление архитектоники печени: нормальная балочная структура печени, гепатоциты без признаков жировой дегенерации.

На сроке 270 суток после окончания затравки CCl_4 в препаратах печени контрольной группы выявлялись более выраженные изменения, чем на 180-е сутки, и пролиферации желчных протоков в них не выявлялось.

Через 270 и 365 суток после имплантации КИК с разным соотношением клеток в препаратах печени, так же как и на более ранних сроках (90 и 180 суток), сохранялась нормальная архитектура печени, встречались двудерные и гиперплазированные гепатоциты.

На сроке 365 суток после окончания затравки в печени процессы, наблюдаемые в 1-й группе (контроль) на сроке 270 суток, становились еще более выраженными, в то время как в группах 2, 3, 4 наблюдали морфологическую картину, ближе к нормальной архитектонике печени.

Для количественной оценки изменений, возникающих в структуре печени при хронической печеночной недостаточности без коррекции и при хронической печеночной недостаточности с коррекцией мы провели морфометрическое исследование состояния непаренхиматозных структур (определение удельной площади соединительной ткани и количества ложных долек в печени) на разных сроках в течение 365 суток в группах. Было установлено, что под влиянием клеточной терапии происходит восстановление как паренхимы, так и непаренхиматозных структур в группах с коррекцией ПН. В группе 3 темп восстановления непаренхиматозных структур был быстрым. Это подтверждает динамическое морфометрическое исследование снижения удельной площади соединительной ткани печени, количества ложных долек в ней (рис. 3).

Для объективизации полученных результатов была проведена количественная морфометрическая оценка состояния гепатоцитов на всех сроках после имплантации КИК печени после моделирования ХПН.

Анализ полученных результатов показал, что КИК с КП и ММСК КМ в течение всего срока наблюдения (365 суток) стимулируют восстановительные процессы в печени. Это выражалось в снижении количества гепатоцитов с признаками жировой дистрофии, с дегенерирующими ядрами и внутриядерными липидными включениями, и в повышении количества двудерных гепатоцитов, в увеличении площади кровеносных сосудов и желчных протоков по сравнению с контрольной группой.

При морфометрическом анализе полученных нами результатов на сроке 90 суток (рис. 4) в сравниваемых группах наиболее предпочтительная динамика была выявлена нами в группе при сочетанном применении КП и ММСК КМ в отношении 5 : 1

(3-я группа). Причем эта динамика имела место на протяжении всего срока наблюдения (365 суток).

Приведенные выше исследования функции печени и ее морфологического состояния позволили нам прийти к заключению, что восстановительные процессы в паренхиме печени и непаренхиматозных структурах печени при хронической печеночной недостаточности интенсифицируются при использовании различных вариантов клеточной терапии, но наиболее эффективно и интенсивно процессы восстановительной регенерации происходили в группах, где в КИК использовались КП и ММСК КМ в соотношении 5 : 1.

На следующем этапе исследования проводилось исследование морфологического состояния зон пересаженных клеток в составе КИК (гр. 2–4). Было выявлено, что использование КИК с аллогенными КП, где соотношение КП : ММСК = 10 : 1, приводило к разрастанию соединительной ткани вокруг КИК (рис. 5, в).

При сопоставлении площади соединительной ткани вокруг КИК при использовании КП : ММСК КМ в соотношении 1 : 1 (2-я группа) и КП : ММСК КМ в соотношении 5 : 1 (3-я группа) мы не отметили принципиальных различий (рис. 5, а и б). Однако учитывая необходимость присутствия в составе КИК достаточного количества КП для длительной коррекции хронической печеночной недостаточности и полученные результаты по восстановлению дезинтоксигирующей функции печени в группе 3, мы сочли целесообразным предпочесть использование КИК, в которых соотношение КП к ММСК КМ составляло 5 : 1, тем более что биохимические результаты по коррекции хронической печеночной недостаточности указывали на эффективность клеток КИК при этом соотношении.

Сравнительное исследование состояния КИК показало, что при использовании КИК с соотношением клеток печени и ММСК КМ 5 : 1 (гр. 3) в зонах КИК уже на 90-е сутки после имплантации и до конца срока наблюдения (365 суток) имеет место пролиферация гепатоцитов, новообразование сосудов и желчных протоков (рис. 6).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что КИК с оптимизированным составом клеток при имплантации в печень могут служить основой для формирования *de novo* новых центров регенерации печени, которые способны обеспечивать свое пролонгированное функционирование и оказывать пролонгированное биорегуляторное воздействие на ткань печени, обеспечивая эффективную восстановительную регенерацию поврежденной печени, а также коррекцию печеночной недостаточности.

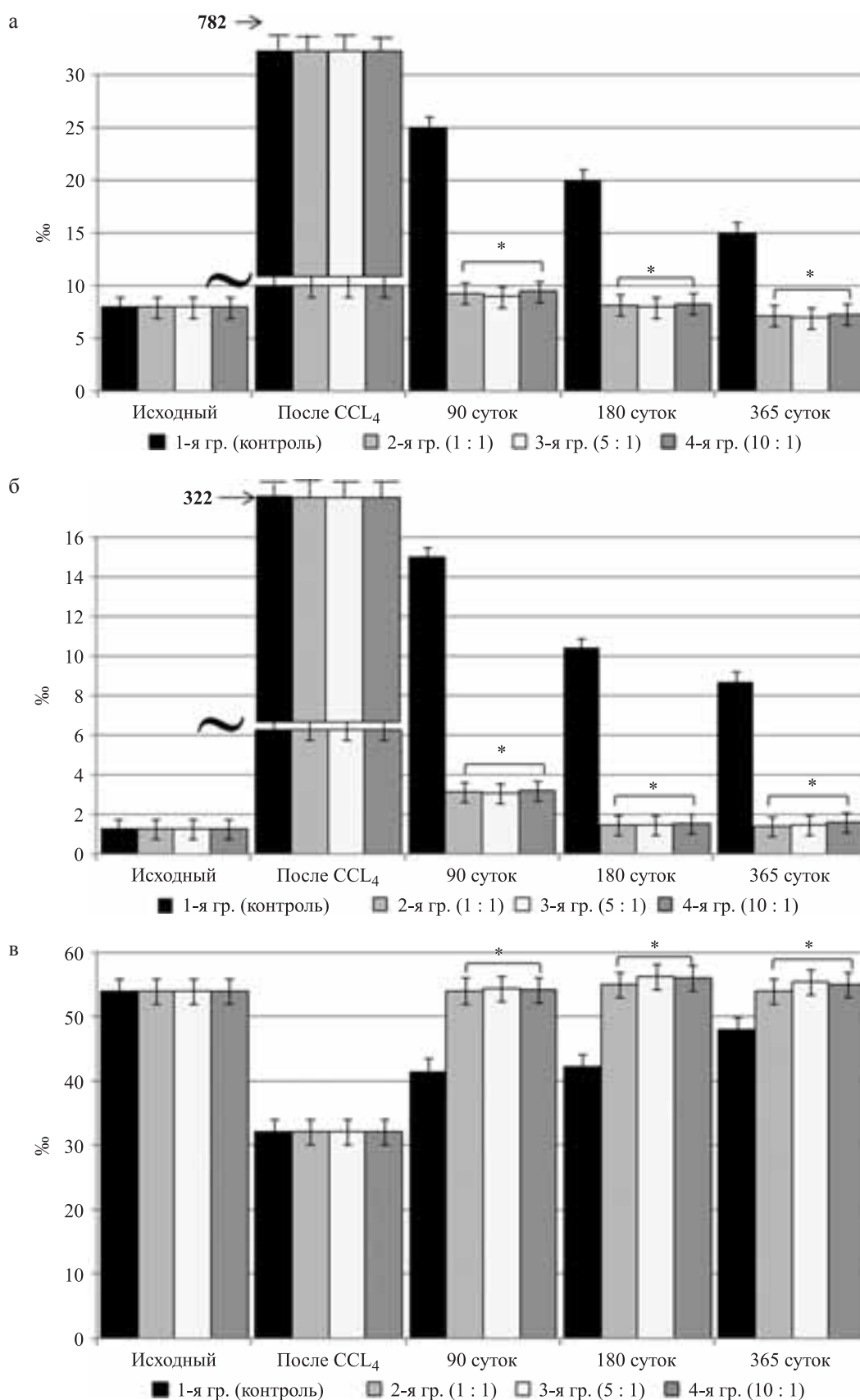


Рис. 4. Динамическая морфометрическая оценка состояния гепатоцитов и сосудистых структур печени крыс при моделировании хронической печеночной недостаточности и имплантации КИК в разных группах: а – гепатоциты с жировой дистрофией; б – гепатоциты с дегенерирующими ядрами; в – двоядерные гепатоциты

Fig. 4. Dynamic morphometric assessment of the state of hepatocytes and vascular structures of the rat liver in simulations of chronic liver failure and implantation of CEC in different groups: а – hepatocytes with fatty dystrophy; б – hepatocytes with degenerating nuclei; в – binuclear hepatocytes

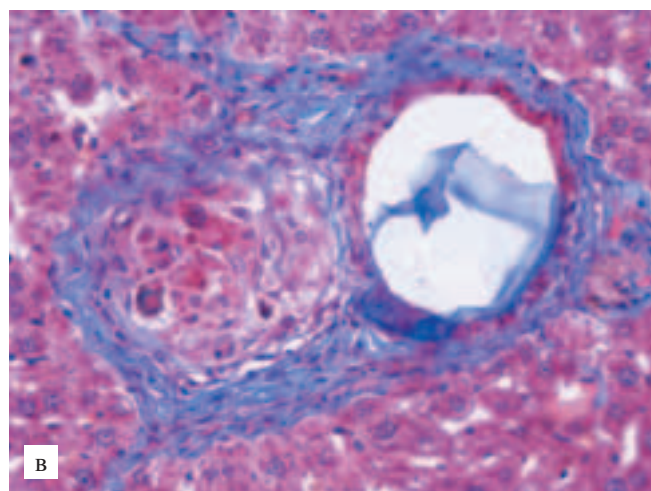
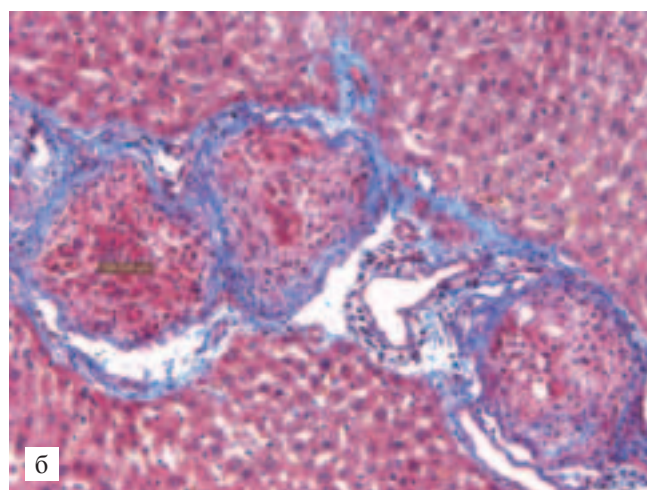
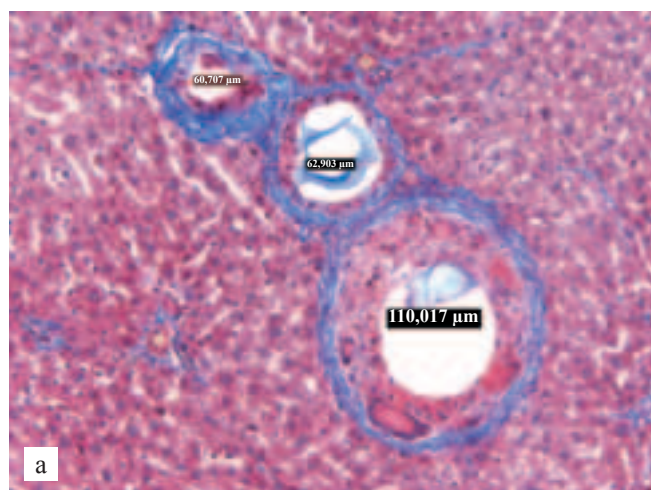


Рис. 5. Гистологические препараты печени в зоне имплантации КИК с различным клеточным составом на 90-е сутки после моделирования хронической печеночной недостаточности: а – аллогенные КП : ММСК КМ = 1 : 1 (2-я группа); б – аллогенные КП : ММСК КМ = 5 : 1 (3-я группа); в – аллогенные КП : ММСК КМ = 10 : 1 (4-я группа). Окраска по Массону. $\times 400$

Fig. 5. Histological preparations of the liver in the CEC implantation zone with different cellular composition on the 90th day after the modeling of chronic liver failure: а – allogeneic LC : MMSC BM = 1 : 1 (2nd group); б – allogeneic LC : MMSC BM = 5 : 1 (group 3); в – allogeneic LC : MMSC BM = 10 : 1 (4th group). Masson staining. $\times 400$

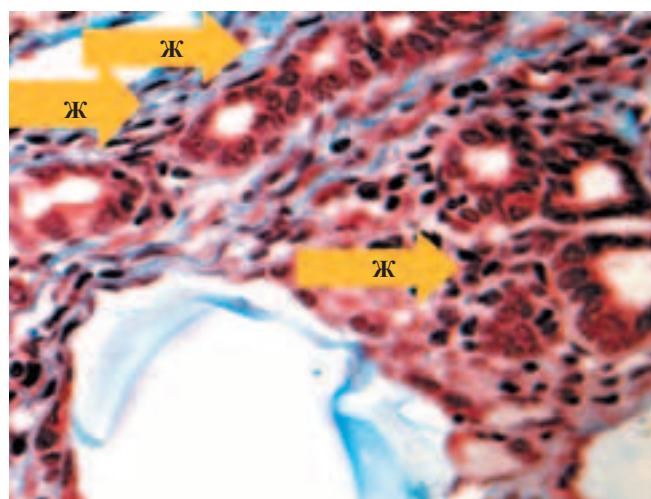


Рис. 6. Гистологические препараты печени в зоне имплантации КИК (КП : ММСК КМ = 5 : 1) на основе матрикса БМКГ на разных сроках после моделирования хронической печеночной недостаточности: 365 суток после имплантации КИК. Аллогенные КП и ММСК КМ (3-я группа). Сформированные желчные протоки (Ж). Окраска по Массону. $\times 400$

Fig. 6. Histological preparations of the liver in the CEC implantation zone (LC : MMSC BM = 5 : 1) based on BMCG matrix at different times after modeling chronic liver failure: 365 days after implantation CEC. Allogeneic LC and MMSC BM (3rd group). Formed bile ducts (Ж). Masson staining. $\times 400$

ВЫВОДЫ

Разработана новая технология клеточной терапии тяжелых повреждений печени путем трансплантации клеточно-инженерных конструкций, создающих условия для пролонгированного обеспечения жизнеспособности и регуляторной активности клеток печени и ММСК КМ, иммобилизованных на биодеградируемом носителе БМКГ.

Для коррекции хронической печеночной недостаточности по предлагаемой технологии наиболее эффективным клеточным составом КИК являются клетки печени и ММСК КМ в соотношении 5 : 1.

При хронической печеночной недостаточности имплантация клеточно-инженерных конструкций с соотношением клеток печени и ММСК КМ 5 : 1 обеспечивает значительно более ранний регресс функциональных нарушений (к 30-м суткам вместо

180 суток в контроле) и снижение летальности животных с 48,6 до 0%. При этом происходят позитивные изменения в печени реципиентов: пролиферация и длительное выживание гепатоцитов; формирование новых желчных протоков и сосудов печени.

Проведенное исследование состояния клеточно-инженерных конструкций указывает на их интеграцию в структуру печеночной ткани с образованием в ней новых коллекторов функционирующих желчных протоков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В опытах с моделированием хронической печеночной недостаточности получены доказательства, которые свидетельствуют, что эффективная коррекция хронической печеночной недостаточности может быть осуществлена с помощью клеточных технологий. Установлено также, что важным условием эффективной коррекции возникающих нарушений является пролонгированное регуляторное воздействие используемого клеточного материала на поврежденную печень. Такое воздействие может быть обеспечено с помощью КИК, в которых созданы условия для пролонгированной жизнедеятельности донорских клеток, в процессе которой они оказывают регуляторное воздействие на восстановительные процессы в поврежденной печени. Нами показано, что оптимальным соотношением клеток печени и ММСК КМ является соотношение 5 : 1, которое обеспечивает эффективное восстановление морфофункциональных показателей поврежденной печени.

Имплантация КИК с оптимизированным составом клеточного материала, изготовленных в соответствии с вышеперечисленными требованиями, позволила создать технологию эффективной коррекции хронической печеночной недостаточности с помощью длительно (не менее 365 суток) функционирующих КИК. Биохимический, морфологический мониторинг изменений в печени при печеночной недостаточности и при имплантации КИК в ткань печени позволил доказать прямое морфофункциональное воздействие клеток КИК на поврежденную печень реципиента и интенсифицировать в ней восстановительные процессы, которые создают предпосылки к формированию *in situ* новых центров восстановительной регенерации в печени реципиента. Интенсификация восстановительных процессов в печени выражается в нивелировании дистрофических и воспалительных процессов, в повышении пролиферативной активности гепатоцитов, в торможении процессов фиброобразования и активации процессов дефиброобразования ткани печени (перепрограммирование процессов регенерации). К достоинствам разработанной нами новой технологии коррекции печеночной недостаточности с помощью длительно

функционирующих КИК относится также формирование в печени реципиента новых желчных протоков и сосудов, что может свидетельствовать о формировании *de novo* структур типа печеночной долики.

Важно подчеркнуть, что включение ММСК костного мозга в состав КИК наряду с аллогенными клетками печени стимулирует пролиферативную активность гепатоцитов, включенных в состав КИК, стимулирует в них образование новых коллекторов желчных протоков и сосудов, пролонгирующих их функционирование.

Разработка технологии коррекции хронической печеночной недостаточности с помощью КИК, а также результаты, полученные при использовании ее в опытах с моделированием хронической печеночной недостаточности позволяют рекомендовать разработанную нами технологию для использования в клинике у больных с печеночной недостаточностью, особенно у реципиентов, находящихся в листе ожидания на трансплантацию печени.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. WHO. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization, Geneva; 2016.
2. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015; 385: 117–171.
3. Forbes S, Strom S. Stem Cells and Hepatocyte Transplantation. *A Textbook of Liver Disease*. 2018: 84–97.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37591-7.00006-9>.
4. Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *J Hepatol*. 2015; 62 (1 Suppl): 157–169. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.040.
5. Готье СВ, Константинов БА, Цирульникова ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА, 2008: 246. Gauthier SV, Konstantinov BA, Tsiurul'nikova OM. Transplantation of the liver. M.: MIA, 2008: 246.
6. United Network for Organ Sharing. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.unos.org>.
7. Eurotransplant international foundation. Annual Report [Электронный ресурс] – Режим доступа: www.eurotransplant.nl/files/statistics.
8. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2012; 93: 342–347. doi: 10.1097/TP.0b013e31823b72d6.
9. Burkhardt B, Martinez-Sanchez JJ, Bachmann A, Ladurner R, Nüssler AK. Long-term culture of primary hepatocytes: new matrices and microfluidic devices. *Hepatology International*. 2014; 8: 14–22. doi: 10.1007/s12072-013-9487-3/.

10. Gupta S. Cell therapy to remove excess copper in Wilson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014; 1315, Issue 1: 70–80. doi: 10.1111/nyas.12450/.
11. Tanimizu N, Ichinohe N, Ishii M, Kino J, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Liver Progenitors Isolated from Adult Healthy Mouse Liver Efficiently Differentiate to Functional Hepatocytes In Vitro and Repopulate Liver Tissue. *Stem Cells*. 2016; 34, Issue 12: 2889–2901. doi: 10.1002/stem.2457/.
12. Yovchev MI, Xue Y, Shafritz DA, Locker J, Oertel M. Repopulation of the fibrotic/cirrhotic rat liver by transplanted hepatic stem/progenitor cells and mature hepatocytes. *Hepatology*. 2014; 59: 284–295. doi: 10.1002/hep.26615/.
13. Grompe M. Liver stem cells, where art thou? *Cell Stem Cell*. 2014; 15: 257–258. doi: 10.1016/j.stem.2014.08.004.
14. Ichinohe N, Tanimizu N, Ooe H et al. Differentiation capacity of hepatic stem/pro-genitor cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. *Hepatology*. 2013; 57: 1192–1202.
15. Mallanna SK, Duncan SA. Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2013; 26: Unit1G 4.
16. Irudayaswamy A, Muthiah M, Zhou L et al. Long-term fate of human fetal liver progenitor cells transplanted in injured mouse livers. *Stem Cells*. 2018; 36: 103–113.
17. Soeder Y, Loss M, Johnson CL, Hutchinson JA, Haarer J, Ahrens N et al. First-in-Human Case Study: Multipotent Adult Progenitor Cells for Immunomodulation After Liver Transplantation. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4 (8): 899–904. doi: 10.5966/sctm.2015-0002.
18. Dillmann J, Popp FC, Fillenberg B, Zeman F, Eggenhofer E, Farkas S et al. Treatment-emergent adverse events after infusion of adherent stem cells: the MiSOT-I score for solid organ transplantation. *Trials*. 2012; 15 (13): 211–221. doi: 10.1186/1745-6215-13-211.
19. Popp FC, Fillenberg B, Eggenhofer E, Renner P, Dillmann J, Benseler V et al. Safety and feasibility of third-party multipotent adult progenitor cells for immunomodulation therapy after liver transplantation – a phase I study (MISOT-I). *J Transl Med*. 2011; 28 (9): 124. doi: 10.1186/1479-5876-9-124.
20. Chistiakov DA. Liver regenerative medicine: advances and challenges. *Cells Tissues Organs*. 2012; 4 (196): 291–312.
21. Lee SY, Kim HJ, Choi D. Cell Sources, Liver Support Systems and Liver Tissue Engineering: Alternatives to Liver Transplantation. *International Journal of Stem Cells*. 2015; 8 (1): 36–47. doi: 10.15283/ijsc.2015.8.1.36.
22. Matsuzawa A, Matsusaki M, Akashi M. Construction of three-dimensional liver tissue models by cell accumulation technique and maintaining their metabolic functions for long-term culture without medium change. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Apr; 103 (4): 1554–1564. doi: 10.1002/jbm.a.35292. Epub 2014 Aug 12.
23. Sakai Y, Yamanouchi K, Ohashi K. Vascularized subcutaneous human liver tissue from engineered hepatocyte/fibroblast sheets in mice. *Biomaterials*. 2015; 65: 66–75. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.046.
24. Fujii M, Yamanouchi K, Sakai Y, Baimakhanov Z, Yamaguchi I, Soyama A et al. In vivo construction of liver tissue by implantation of a hepatic non-parenchymal/adipose-derived stem cellsheet. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 21. doi: 10.1002/term.2424.
25. Shu Q, Liu. Bioregenerative Engineering: Principles and Applications. Wiley-interscience A. John Wiley & Sons, inc., Hoboken, New Jersey Publication. 2007. 1053 p.
26. Zhang J, Zhao X, Liang L, Wang S. A decade of progress in liver regenerative medicine Review article. *Biomaterials*. 2018; 157: 161–176. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.027.
27. Sasaki K, Akagi T, Asaoka T, Eguchi H, Akashi M. Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique. *Biomaterials*. 2017; 133: 263–274.
28. Nicolas C, Hickey R, Chen H, Mao S, Higuera M, Wang Y, Nyberg S. Liver Regenerative Medicine: From Hepatocyte Transplantation to Bioartificial Livers and Bioengineered Grafts. *Stem Cells*. 2017; 35 (1): 42–50.
29. Ishak K et al. Гистологическая оценка стадии и степени хронического гепатита. *Клиническая гепатология*. 2010; 2: 8–11. Ishak K et al. Gistologicheskaya otsenka stadii i stepeni khronicheskogo gepatita. *Klinicheskaya gepatologiya*. 2010; 2: 8–11.
30. Автандилов ГГ. Медицинская морфометрия: руководство. М.: Медицина, 1990. 384. Avtandilov GG. Meditsinskaya morfometriya: rukovodstvo. M.: Meditsina, 1990. 384.

Статья поступила в редакцию 22.10.2018 г.
The article was submitted to the journal on 22.10.2018