ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ В ПЕЧЕНЬ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ДЛИТЕЛЬНУЮ ПОДДЕРЖКУ ПРОЦЕССОВ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ В ПОВРЕЖДЕННОЙ ПЕЧЕНИ

Шагидулин М.Ю.[1, 2], Онищенко Н.А.[1, 2], Крашенинников М.Е.[1], Ильинский И.М.[1, 2], Люндуп А.В.[3], Севастьянов В.И.[1], Можейко Н.П.[1], Готье С.В.[1, 2]

[1] ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России (директор – академик РАМН, проф. С.В. Готье), Москва, Российская Федерация

[2] Кафедра трансплантологии и искусственных органов (зав. – академик РАМН, проф. С.В. Готье) ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (ректор – член-кор. РАМН, проф. П.В. Глыбочко), Москва, Российская Федерация

[3] НИИ молекулярной медицины (директор – проф. В.Н. Николенко) ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (ректор – член-кор. РАМН, проф. П.В. Глыбочко), Москва, Российская Федерация

Цель исследования. Разработка метода пролонгированной восстановительной регенерации поврежденной печени. **Материалы и методы.** На крысах Вистар с хроническим фиброзирующим повреждением печени (n = 70) выполнено 3 группы опытов: I гр. (n = 20) – контроль; во II гр. (n = 20) трансплантировали суспензию клеток печени; в III гр. (n = 30) в печень трансплантировали клеточно-инженерные конструкции (КИК): клетки печени и ММСК КМ в биодеградируемом геле «*Сферо*®ГЕЛЬ-лонг». Восстановительную регенерацию оценивали, используя биохимические и морфологические методы на 30, 60, 90 и 180-е сут. **Результаты.** Показано, что во II и III гр. достоверно ускоряются процессы восстановительной регенерации в поврежденной печени по сравнению с I гр. Нормализация биохимических показателей во II и III гр. наступала в сроках до 30 сут вместо 90 сут в I группе. Нормализация морфологических показателей, степень дефиброзирования и жизнеспособность гепатоцитов более выражена и пролонгирована в III гр. на всех сроках. Выявлена интеграция КИК структурами печени с формированием новых желчных протоков через 90 и 180 сут. **Заключение.** Более высокий уровень и пролонгированные сроки регенерации печени при трансплантации КИК обусловлены созданием в КИК биологически адекватных условий для пролонгированной жизнедеятельности клеток, включенных в их структуру.

Ключевые слова: печеночная недостаточность, трансплантация клеток, клеточно-инженерные конструкции.

CELL-ENGINEERING DESIGNS TRANSPLANTED INTO LIVER PROVIDE WITH PROLONGED SUPPORT OF RECOVERY PROCESSES IN DAMAGED LIVER

Shagidulin M.Y.[1, 2], Onischenko N.A.[1, 2], Krasheninnikov M.E.[1], Iljinsky I.M.[1, 2], Lyundup A.V.[3], Sevastyanov V.I.[1], Mogeiko N.P.[1], Gautier S.V.[1, 2]

[1] Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs (Head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gautier), Moscow, Russian Federation

[2] Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs (Head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gautier); Laboratory of Strategy and Monitoring of The Transplantology Development (Head laboratory – S.M. Khomyakov), Moscow, Russian Federation

[3] Research Institute of Molecular Medicine (Head – prof. V.N. Nikolenko) I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Rector – corresponding member of RAMSci, prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation

Aim is to develop a method for a prolonged support of recovery processes in damaged liver. **Materials and methods.** It was carried out 3 groups of experiments on Wistar rats with the modeling of chronic fibrotic liver injury (n = 70): I group control (n = 20); in the II group (n = 20) a suspension of liver cells was transplanted into liver; in the III group (n = 30) cell-engineering designs (CED), which contained liver cells and BM MMSC, enclosed in a heterogeneous biodegradable gel "*Sphero*®GEL-long" were transplanted into damaged liver. The activity of recovery processes was evaluated by using biochemical and morphological methods in dynamics on 30, 60, 90

and 180 days. **Results.** It was shown that in the II and III gr. significantly accelerated the recovery processes in damaged livers compared with the I gr. The normalization of biochemical parameters took place in II and III during 30 days instead of 90 days in the I group. However, the normalization of morphological signs of hepatocytes theirs viability and a degree of defibrotic changes in liver were more pronounced and prolonged in the III group. A study showed integration of CED by liver structures with formation of new bile ducts after 90 and 180 days. **Conclusion.** Higher levels and prolonged periods of recovery processes in damaged liver after CED transplantation were due to the creation of biologically appropriate conditions for prolonged cell activity, included in their structure (donor liver cells and BM MMSC).

Key words: liver failure, cell transplantation, cell-engineering design.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых, более эффективных и доступных методов лечения острой и хронической печеночной недостаточности (ПН) остается одной из актуальных проблем современной медицины, так как смертность и нетрудоспособность при заболеваниях печени по-прежнему занимает одно из первых мест и не имеет тенденции к снижению [1, 2].

В последние 30 лет во всем мире стали разрабатываться новые методы лечения ПН, основанные на применении клеточных технологий [3–8]. Эти новые биотехнологии ставят своей задачей не только восстановление функциональной активности поврежденных клеток печени, с обратимой стадией дистрофических изменений, но и осуществление стимуляции сохранившегося резерва пролиферации клеток печени для увеличения пула жизнеспособных паренхиматозных клеток, прежде всего гепатоцитов.

Показано, что при трансплантации суспензии аллогенных изолированных гепатоцитов как в эксперименте [9], так и в клинике [10–12] удается достигнуть компенсации нарушенных функций печени. Однако степень выраженности возникающей компенсации и ее длительность определяются: с одной стороны – тяжестью (обратимостью) исходного повреждения печени реципиента клеток, а с другой – сроками сохранения жизнеспособности и регуляторной активности донорских гепатоцитов после их трансплантации.

Известно, что изолированные аллогенные гепатоциты после трансплантации характеризуются

Готье Сергей Владимирович – академик, проф., директор ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва, Российская Федерация; зав. кафедрой трансплантологии и искусственных органов ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (ректор – член-корр. РАМН, проф. П.В. Глыбочко), Москва, Российская Федерация. *Шагидулин Мурат Юнусович* – к. м. н., зав. отделом экспериментальной трансплантологии и искусственных органов того же центра; доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов (зав. – академик РАМН, проф. С.В. Готье) ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (ректор – член-корр. РАМН, проф. П.В. Глыбочко). *Онищенко Нина Андреевна* – д. м. н., проф., зав. лабораторией биотехнологий стволовых клеток того же центра; проф. той же кафедры. *Крашенинников Михаил Евгеньевич* – к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории стволовых клеток того же центра. *Ильинский Игорь Михайлович* – д. м. н., проф., зав. отделом клинической патологии того же центра; проф. той же кафедры. *Люндуп Алексей Валерьевич* – к. м. н., зав. отделом биомедицинских исследований НИИ молекулярной медицины (директор – проф. В.Н. Николенко) ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (ректор – член-корр. РАМН, проф. П.В. Глыбочко), Москва, Российская Федерация. *Севастьянов Виктор Иванович* – д. б. н., проф., зав. отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии того же центра. *Можейко Наталия Павловна* – к. м. н., врач патологоанатомического отделения того же центра.

Для корреспонденции: Шагидулин Мурат Юнусович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Телефон: (499) 196 87 90; моб. 8 (915) 260 82 84. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

Gauthier Sergey Vladimirovich – academician of RAMSci, prof., Head Academican V.I. Shumakov federal research center of transplantology and artificial organs, Moscow, Russian Federation. Head of transplantology and artificial organs department I.M. Setchenov First Moscow state Medical University (rector – corresponding member of RAMSci, prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation. *Shagidulin Murat Yunusovich* – cand. of med. sci., Head of experimental transplantology and artificial organs department, at the same center. Department of transplantology and artificial organs (head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gauthier) I.M. Setchenov First Moscow state Medical University (rector – corresponding member of RAMSci, prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation. *Onishchenko Nina Andreevna* – doctor. of med. sci., prof., Head of the Laboratory of biotechnology stem cells at the same center; department of transplantology and artificial organs (head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gauthier) I.M. Setchenov First Moscow state Medical University (rector – corresponding member of RAMSci, prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation. *Krasheninnikov Mikhail Evgenievich* – cand. of bio. sci., Senior Research Fellow of Stem Cells Laboratory at the same center. *Ilyinsky Igor Mikhailovich* – doctor. of med. sci., prof., Head of Clinical Pathology Department at the same center. Department of transplantology and artificial organs (head – academician of RAMSci, prof. S.V. Gauthier) I.M. Setchenov First Moscow state Medical University (rector – corresponding member of RAMSci, prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation. *Lyundup Alexey Valerievich* – cand. of med. sci., Head of Department Research Institute of Molecular Medicine (Head – prof. V.N. Nikolenko), I.M. Setchenov First Moscow State Medical University (rector – corresponding member of RAMSci, prof. P.V. Glybochko), Moscow, Russian Federation. *Sevastyanov Viktor Ivanovich* – doctor. of med. sci., prof., Head of the department of biomedical technologies and tissue engineering at the same center. *Mozheiko Natalia Pavlovna* – cand. of med. sci., the doctor of Clinical Pathology Department at the same center.

For correspondence: Shagidulin Murat Yunusovich. Adress: Russia, 123182, Moscow, Schukinskaya st., 1. Phone: (499) 196 87 90; mob. 8 (915) 260 82 84. E-mail: dr.shagidulin @ mail.ru

непродолжительностью сроков (до нескольких месяцев) их индуцирующего воздействия на процессы восстановительной регенерации [11], и это проявляется рецидивами клинических проявлений ПН особенно у больных с циррозом печени.

Полагают, что непродолжительные сроки индуцирующего воздействия взвеси изолированных гепатоцитов вызваны рядом причин: использованием клеток донорской печени с крайне низким содержанием собственных активно функционирующих стволовых/прогениторных (клеток Ито) [13]; отсутствием в используемой взвеси донорских клеток таких структур, которые бы формировали условия для их прикрепления и контактного взаимодействия с образованием клеточных ассоциатов типа печеночных долек; отсутствием защиты аллогенных клеток от иммунного отторжения в организме реципиента.

Для устранения причин, сокращающих сроки индуцирующего воздействия суспензии клеток донорской печени на процессы восстановительной регенерации в поврежденной печени, должен быть разработан и применен новый тип имплантируемых вспомогательных устройств, обеспечивающих условия для пролонгированного сохранения жизнеспособности и регуляторной активности донорских клеток, включенных в их структуру.

Целью настоящего исследования явилась разработка новой технологии клеточной терапии тяжелых повреждений печени путем трансплантации клеточно-инженерных конструкций, создающих условия для пролонгированного обеспечения жизнеспособности и регуляторной активности клеток донорской печени, включенных в их структуру для повышения надежности и длительности их восстановительного воздействия на поврежденную печень реципиента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. *Принцип создания трансплантируемых клеточно-инженерных конструкций* основывался на оптимизации условий для пролонгированного сохранения жизнеспособности и регуляторной активности клеток донорской печени, включенных в их структуру. Для этого наряду с клетками донорской печени в структуру клеточно-инженерных конструкций нами были включены активно функционирующие стволовые/прогениторные клетки, которые при предварительном сокультивировании с клетками донорской печени способствовали образованию клеточных ассоциатов. Для пролонгированного обеспечения контактного взаимодействия этих клеток и прикрепления их друг к другу после трансплантации в печень с сохранением способности к образованию гепатоидных структур типа печеночных долек клеточные ассоциаты смешивали с гетерогенным биополимерным биодеградируемым гелем «*Сферо*®ГЕЛЬ-лонг».

В качестве стволовых/прогениторных клеток, способных активно поддерживать регенераторный и пролиферативный процесс в поврежденной печени реципиента, нами использовались аллогенные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК КМ), которые используются в эксперименте и клинике для активации и перепрограммирования репаративных процессов в поврежденной печени, так как являются непременными участниками восстановительного морфогенеза печени и оказывают свое регуляторное воздействие на систему стволовых/прогениторных клеток печени и прежде всего на звездчатые клетки или клетки Ито [14].

ММСК КМ включались нами в структуру клеточно-инженерных конструкций и по другой причине – для торможения (или блокирования) отторжения аллогенных клеток донорской печени после трансплантации клеточно-инженерных конструкций, так как в многочисленных исследованиях были продемонстрированы их иммуно-толерогенные свойства [15, 16].

В качестве носителя для обеспечения контактного взаимодействия и длительного функционирования трансплантируемых клеточных ассоциатов нами была использована отечественная композиция гетерогенного имплантируемого геля «*Сферо*®ГЕЛЬ-лонг», который, несмотря на клиническое применение [17], не использовался для изготовления клеточно-инженерных конструкций (биомодулей), депонирующих клетки печени.

Оригинальность принципа создания трансплантируемых клеточно-инженерных конструкций для пролонгированной коррекции функции поврежденной печени подтверждена выдачей авторам статьи патента на изобретение [18].

2. *Подготовка клеток печени и ММСК КМ для изготовления трансплантируемой клеточно-инженерной конструкции.*

Для приготовления ассоциатов клеток печени и ММСК КМ в качестве доноров клеток использовали крыс-самцов породы Вистар/Август весом 150–170 г (n = 40). Крыс оперировали, используя для анестезии Zoletil – 100 в дозе 5 мг/100 г веса.

Приготовление первичной культуры клеток печени осуществляли бесперфузионным методом по общепринятой методике [19]. Разделение клеток на паренхиматозные и непаренхиматозные не производили.

Приготовление культуры ММСК КМ осуществляли по описанной нами ранее методике [20]. Для эксперимента использовали клетки 1-го и 2-го пассажа. Общий срок культивирования клеточного ма-

териала составлял 10 суток. Полученный материал представлял собой прикрепившиеся к пластику распластанные фибробластоподобные клетки (ММСК КМ) и считался пригодным для трансплантации, так как сохранял пролиферативную активность и не содержал погибшие клетки.

Сокультивирование клеток печени и ММСК КМ осуществляли в ростовой среде в соотношении 5:1 в течение 3 суток. После этого клеточный материал (клетки печени и ММСК КМ от аллогенного донора) в сумарной дозе 8–10 × 10^6 клеток на 1 реципиента (крысы) смешивали с носителем «*Сферо*®ГЕЛЬ-лонг» (250 мкл) и такую тканеинженерную конструкцию дробно вводили в поврежденную печень. С целью верификации трансплантированных гепатоцитов и ММСК КМ на длительных сроках путем микроскопии часть клеточного материала адгезировали на «Цитодекс».

«*Сферо*®ГЕЛЬ-лонг» (ЗАО «БИОМИР сервис», Москва) представляет собой гетерогенный имплантируемый гель со средним размером микрочастиц ~ 150 мкм, набухаемостью не менее 87%, pH = 4,8–7,2 и временем биорезорбции «*Сферо*®ГЕЛЯ» до 1 года.

3. *Моделирование хронической печеночной недостаточности* проводили для оценки корригирующих возможностей трансплантируемых клеток – в виде клеточной суспензии и клеточно-инженерных конструкций. Для этого в опытах на крысах-самцах породы Вистар весом 250–260 г (n = 90) моделировали хроническое токсическое фиброзирующее повреждение печени путем курсового введения CCL_4 на персиковом масле в течение 42 суток по модифицированной нами схеме. Гибель животных к концу затравки составила 20%. После моделирования ПН все животные были разделены на 3 группы; в I (контрольной) группе (n = 20) крысам на 7-е сутки после моделирования ПН дробно вводили в печень физиологический раствор (650 мкл); во II (2-й контрольной) группе (n = 20) на 7-е сутки после моделирования ПН дробно трансплантировали в печень суспензию аллогенных клеток печени в дозе 8–10 × 10^6 клеток в том же объеме (650 мкл); в III (опытной) группе (n = 30) на 7-е сутки после моделирования ПН дробно трансплантировали аллогенные сокультивированные клетки печени и ММСК КМ в составе матрикса «*Сферо*®ГЕЛЬ-лонг» в суммарной дозе 8–10 × 10^6 клеток в том же объеме (650 мкл). Иммуносупрессивную терапию в этих опытах не проводили.

Манипуляции на животных проводили с 9 до 12 часов при комнатной температуре (t = 22–24 °C), что исключало суточные колебания митотической активности клеток П. Работа выполнялась в соответствии с требованиями, изложенными в приказе МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и в приложении к приказу МЗ СССР № 565 от 04.10.1977 г.; а также в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 1973 г.; Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) № 1045–73 от 1973 г. и постановлением правительства Москвы от 1 октября 2002 года № 819–ПП.

4. *Оценка коррекции клинических (биохимических) и морфологических изменений в ткани печени*_после моделирования ПН и трансплантации клеток в виде клеточной суспензии и клеточно-инженерных конструкций проводили через 30, 60, 90 и 180 суток. На этих сроках в сыворотке крови у животных измеряли динамику изменения концентрации печеночных трансаминаз АлАТ, АсАТ и щелочной фосфатазы с помощью тест-полосок Reflotron™ («Roche», Швейцария). Гистологические исследования ткани печени и зон трансплантации в нее клеток печени и клеточно-инженерных конструкций проводили в парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. На гистологических препаратах в 200 полях зрения подсчитывали общее количество печеночных клеток с одновременным подсчетом количества двуядерных гепатоцитов и количества гепатоцитов с признаками жировой дистрофии и дегенерирующими ядрами и с внутриядерными липидными включениями. Проводили также окраску срезов на соединительную ткань по Маллори, Массону; а также проводили PAS-реакцию. Для характеристики клеточных культур проводили фазово-контрастную микроскопию, а также микроскопию по Номарскому, позволяющую получить псевдотрехмерное изображение.

Достоверность различий в результатах биохимического исследования крови и гистологического исследования клеточного состава ткани печени в исследуемых группах оценивали с помощью критерия t Стьюдента, считая их статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методами световой микроскопии было установлено, что суспензия клеток, приготовленная из донорской печени, содержала 95–98% гепатоцитов, 5–2% непаренхиматозных клеток, а количество жизнеспособных клеток по окраске трипановым синим в среднем составляло 76 ± 4%, так как выделяли их из неперфузированной печени.

Сокультивирование выделенных клеток печени и ММСК КМ проводили до смешивания их со «*Сферо*®ГЕЛЕМ» для предварительного образования клеточных ассоциатов, обеспечивающих контактное взаимодействие этих клеток в соста-

ве трансплантированных клеточно-инженерных конструкций.

После завершения моделирования хронического токсического фиброзирующего повреждения печени в организме экспериментальных животных (через 42 суток затравки) наблюдали развитие клинических признаков ПН и тяжелые структурные нарушения в печени. Уже на 43-и и 45-е сутки от начала затравки животных (1-е и 3-и сутки после окончания затравки) на фоне изменения балочного строения печеночных долек в печени отмечался выраженный полиморфизм паренхиматозных клеток, жировая дистрофия гепатоцитов, проявляющаяся появлением в большом количестве гепатоцитов с дегенерирующими ядрами и с внутриядерными липидными включениями на фоне достоверного снижения количества двуядерных гепатоцитов. Указанные изменения в структуре паренхиматозных клеток достоверно сохранялись в течение 90 суток после окончания затравки животных по сравнению с интактными животными (табл.). Уже на ранних сроках (7-е сутки) после окончания затравки отмечалась цирротическая трансформация печени, и эти нарушения прогрессировали к 60-м и 90-м суткам после окончания затравки в I группе животных (1-я контрольная группа) за счет разрастания соединительной ткани и формирования внутридолькового фиброза (рис. 1).

Ранние фиброзные изменения в печени этих животных (1-я контрольная группа) сопровождались цитолитическими процессами в паренхиматозных клетках, и это нашло отражение в нарушении биохимических показателей сыворотки крови, которые проявлялись повышением активности аминотрансфераз и щелочной фосфатазы (рис. 2).

При исследовании АлАТ, АсАТ и щелочной фосфатазы было установлено резкое повышение этих показателей в течение первых 2 недель, но особенно в течение первой недели после затравки: активность АлАТ повышалась более чем в 4,5 раза, АлАТ – более чем в 3 раза, а щелочной фосфатазы – почти в 5 раз. К концу первого месяца исследуемые показатели снижались, но оставались на достоверно более высоком уровне по сравнению с интактными животными в течение 90 суток.

Биохимические и структурные изменения в печени, возникшие и сохраняющиеся в течение 90 суток, свидетельствовали об устойчивости созданной нами модели ПН и о пригодности ее для изучения особенностей корригирующих эффектов клеточ-

Таблица

Гистологическая характеристика гепатоцитов печени крыс после моделирования хронического токсического повреждения без и на фоне трансплантации суспензии гепатоцитов (II группа) и клеточно-инженерных конструкций (III группа)

Показатели в ‰	Интактная печень (норма)	Токсическое повреждение печени	I контроль (CCL_4 + физ. р-р) n = 20					II контроль (CCL_4 + ТХ гепатоцитов) n = 20					III опытная группа (CCL_4 + ТХ КИК) n = 30					
			Срок после введения физ. р-ра, сут					Срок после ТХ гепатоцитов, сут					Срок после ТХ КИК, сут					
			7	14	30	60	90	7	14	30	60	90	7	14	30	60	90	180
Г с признаками жировой дистрофии	8 ± 1	* 782 ± 81	* 895 ± 87	* 509 ± 86	* 372 ± 3,5	* 125 ± 15	* 25 ± 7,0	* 786 ± 85	* 312 ± 32	* 58 ± 8 **	* 18,0 ± 5,3	* 13,0 ± 3,7	* 760 ± 81	* 270,3 ± 28	* 39 ± 10 **	12 ± 5	9 ± 1	8 ± 2
Г с дегенерирующими ядрами	1,3 ± 0,3	* 322 ± 31	* 308 ± 41	* 184 ± 21	* 131 ± 18	* 68,8 ± 10,3	* 15 ± 3,2	* 207 ± 23	* 128 ± 16	* 28 ± 7 **	* 12,0 ± 4,1	* 9,0 ± 2,4	* 202 ± 21	* 72 ± 8,4	* 20,1 ± 5,2 **	* 5,4 ± 0,8	* 3,1 ± 0,4 #	1,5 ± 0,12
Кол-во двуядерных Г	54,8 ± 7,2	* 32,2 ± 5,1	* 30,1 ± 6,8	* 27,7 ± 2,1	* 29,2 ± 2,6	* 35,1 ± 5,1	* 41,6 ± 3,7	* 31,2 ± 6,0	* 26,2 ± 5,1	* 38,3 ± 2,8 **	* 41,0 ± 3,1	* 43,1 ± 2,9	* 26,4 ± 2,3	* 32,0 ± 4,3	44 ± 3,8 **	48 ± 5,1	54 ± 4,1 #	56,3 ± 5,4
Г с внутриядерными липидными включениями	–	* 3 ± 0,5	* 28,8 ± 3,7	* 35,7 ± 3,5	* 15,0 ± 1,8	* 7,8 ± 0,7	* 3,5 ± 0,4	* 30,5 ± 4,1	* 23,8 ± 3,7	* 4,1 ± 1,0 **	* 2,7 ± 0,3	* 2,0 ± 0,1	* 25,8 ± 2,1	* 17,7 ± 3,3	* 3,5 ± 0,7 **	* 2,0 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с нормой; ** – $p < 0,05$ по сравнению с 30-ми сутками в I контрольной группе; # – $p < 0,05$ по сравнению с 90-ми сутками во II контрольной группе.

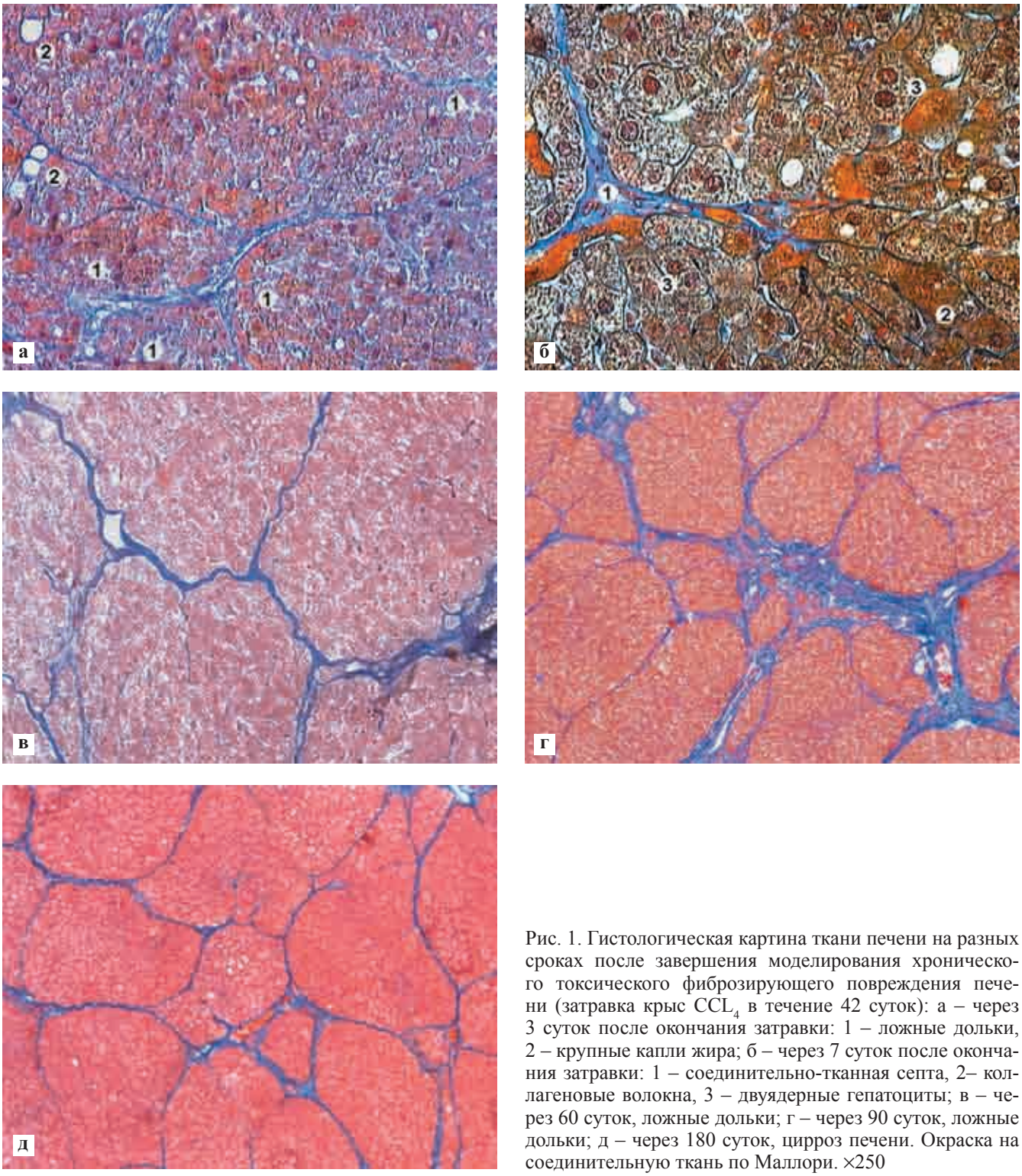


Рис. 1. Гистологическая картина ткани печени на разных сроках после завершения моделирования хронического токсического фиброзирующего повреждения печени (затравка крыс CCL_4 в течение 42 суток): а – через 3 суток после окончания затравки: 1 – ложные дольки, 2 – крупные капли жира; б – через 7 суток после окончания затравки: 1 – соединительно-тканная септа, 2– коллагеновые волокна, 3 – двуядерные гепатоциты; в – через 60 суток, ложные дольки; г – через 90 суток, ложные дольки; д – через 180 суток, цирроз печени. Окраска на соединительную ткань по Маллори. ×250

но-инженерных конструкций (III группа опытов) и суспензии свежевыделенных изолированных гепатоцитов (II группа опытов, 2-й контроль).

Сравнительный анализ динамического изучения биохимических показателей сыворотки крови и морфологических изменений в печени показал, что клеточная терапия ПН обоими методами также сопровождалась цитолитическими процессами в паренхиматозных клетках печени. Выявленные изменения проявлялись достоверным повышением АлАТ, АсАТ, щелочной фосфотазы в сыворотке крови (рис. 2), а также достоверным повышением в ткани печени количества гепатоцитов с признаками жировой дистрофии, с дегенерирующими ядрами и с внутриядерными липидными включениями на фоне снижения количества двуядерных гепатоцитов, что, хотя и косвенно, свидетельствовало о торможении пролиферативной (митотической) активности гепатоцитов (табл.). Между тем в сравниваемых группах (II и III группы) указанные

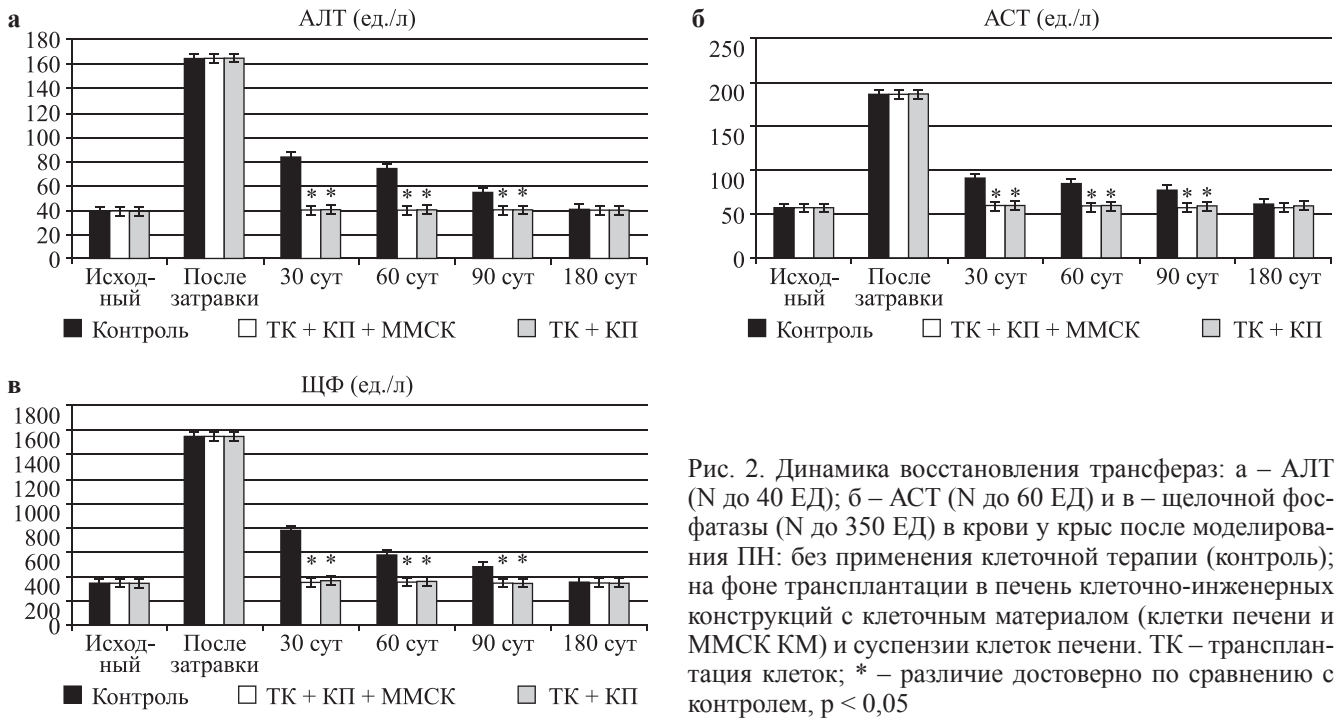


Рис. 2. Динамика восстановления трансфераз: а – АЛТ (N до 40 ЕД); б – АСТ (N до 60 ЕД) и в – щелочной фосфатазы (N до 350 ЕД) в крови у крыс после моделирования ПН: без применения клеточной терапии (контроль); на фоне трансплантации в печень клеточно-инженерных конструкций с клеточным материалом (клетки печени и ММСК КМ) и суспензии клеток печени. ТК – трансплантация клеток; * – различие достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,05$

показатели отклонялись от нормы достоверно меньше и достигали нормальных значений раньше – к 30-м суткам вместо 90-х суток в 1-й группе, где клеточная терапия не проводилась.

Следует отметить также, что достоверных различий в темпе нормализации ферментов цитолиза во II и III группах нами не было выявлено, однако темп нормализации гистологических характеристик гепатоцитов к 30-м суткам во II группе достоверно отставал от темпа нормализации этих показателей в III группе (табл.). Кроме того, нами было отмечено, что темп дефиброзирования ткани поврежденной печени к 90-м суткам и 180-м суткам после применения клеточной терапии во II группе опытов был ниже, чем в III группе с трансплантацией клеточно-инженерных конструкций, так как в структуре печеночной ткани крыс из II группы встречались островки соединительной ткани (рис. 3), тогда как в III группе опытов к этим срокам они практически полностью отсутствовали на фоне полного восстановления структуры ткани печени (рис. 4).

Если учесть, что во II и III группах опытов для клеточной терапии было применено суммарно одинаковое количество клеток (в III группе количество клеток печени было даже меньше), то очевидно обнаруженные различия во II и III группах опытов можно связать с более низкой выживаемостью неприкрепленных (изолированных) аллогенных клеток печени во II группе из-за отсутствия какой-либо защиты их от иммунного отторжения. Очевидно,

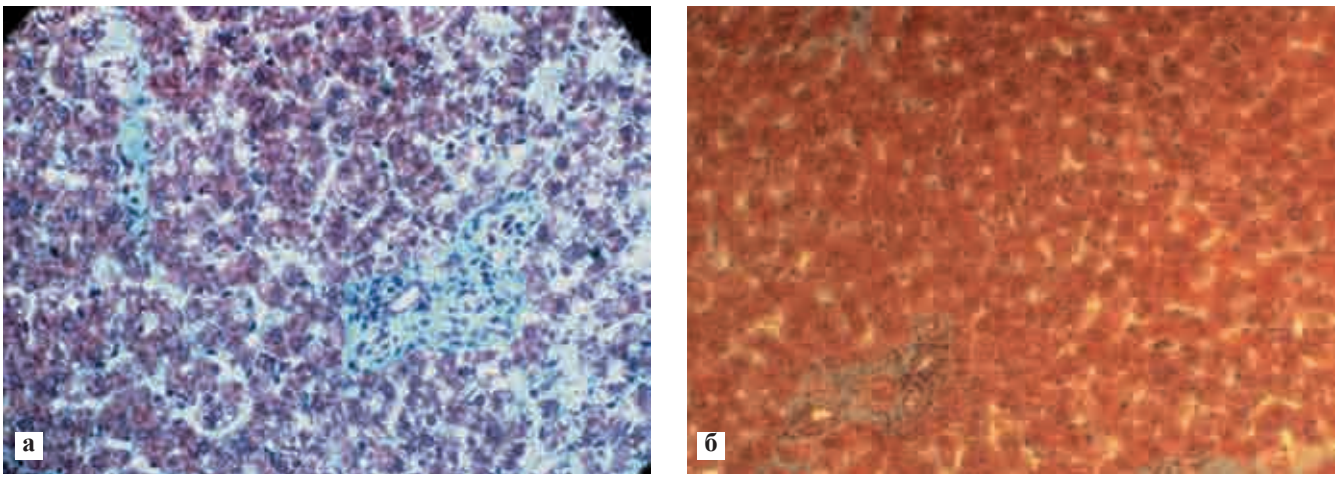


Рис. 3. Гистологическая картина печеночной ткани после моделирования ПН и трансплантации суспензии клеток печени через 90 и 180 суток: а – через 90 суток (микроскопия по Номарскому); б – через 180 суток. Окрашивание по Масону. ×200

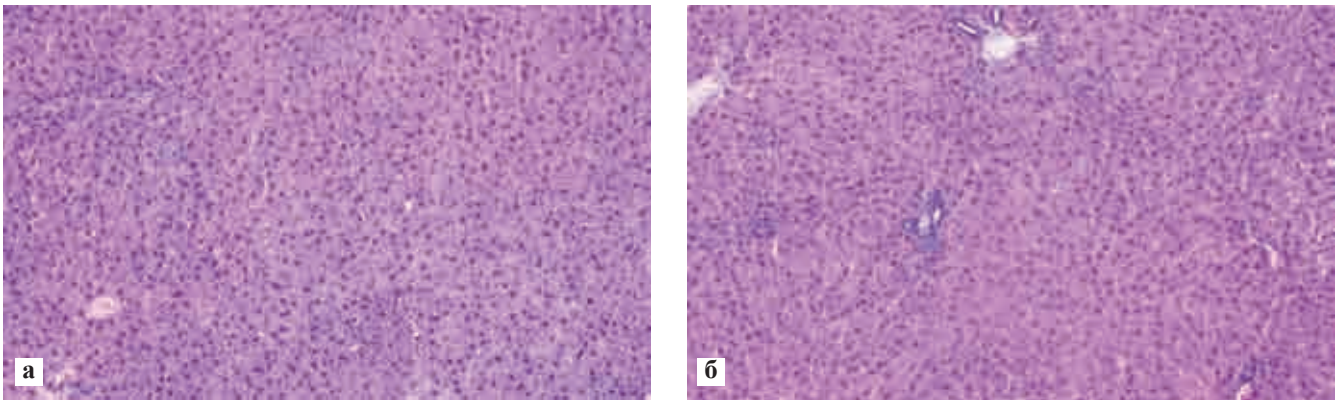


Рис. 4. Гистологическая картина печеночной ткани после моделирования ПН и трансплантации клеточно-инженерных конструкций (клетки печени + ММСК КМ в «*Сферо*®ГЕЛЕ») через 90 (а) и 180 (б) суток. Окрашивание гематоксилином и эозином. ×100

аналогичная ситуация возникает и в клинике при введении изолированных гепатоцитов, поэтому для пролонгирования коротких сроков корригирующего эффекта гепатоцитов при ПН проводят многократные инфузии суспензии этих клеток больным [11] для более длительной индукции восстановительных процессов в печени.

Действительно, в III группе аллогенные клетки донорской печени, сокультивированные с ММСК КМ и трансплантированные в виде ассоциатов в составе биоактивного матрикса «*Сферо*®ГЕЛЬ-лонг», продолжали лучше сохранять свою жизнеспособность и функциональную активность в печени по сравнению с изолированными клетками печени, применяемыми во II группе, не только через 90 суток после трансплантации, но и через 180 суток (рис. 5, 6).

В III группе через 90 суток в клеточных структурах трансплантированных клеточно-инженерных конструкций отмечается высокий уровень гликоген-аккумулирующей активности гепатоцитов (рис. 7, а), а сами конструкции оказываются функционирующими и полностью интегрированными печеночной тканью реципиента через 90 и 180 суток после их трансплантации. Об этом свидетельствует длительное сохранение упорядоченности в расположении печеночных клеток, их жизнеспособность и образование новых коллекторов функционирующих желчных протоков, примыкающих к структурам трансплантированных клеточно-инженерных конструкций (рис. 7, б).

Так как трансплантированные клетки печени и ММСК КМ были аллогенными, можно предположить также, что более высокая выживаемость и функциональная активность клеток печени при трансплантации их в составе клеточно-инженерного биомодуля обусловлена в том числе иммуно-толерогенными свойствами ММСК КМ [16], которые, участвуя в образовании клеточных ассоциатов, создают благоприятные условия для при-

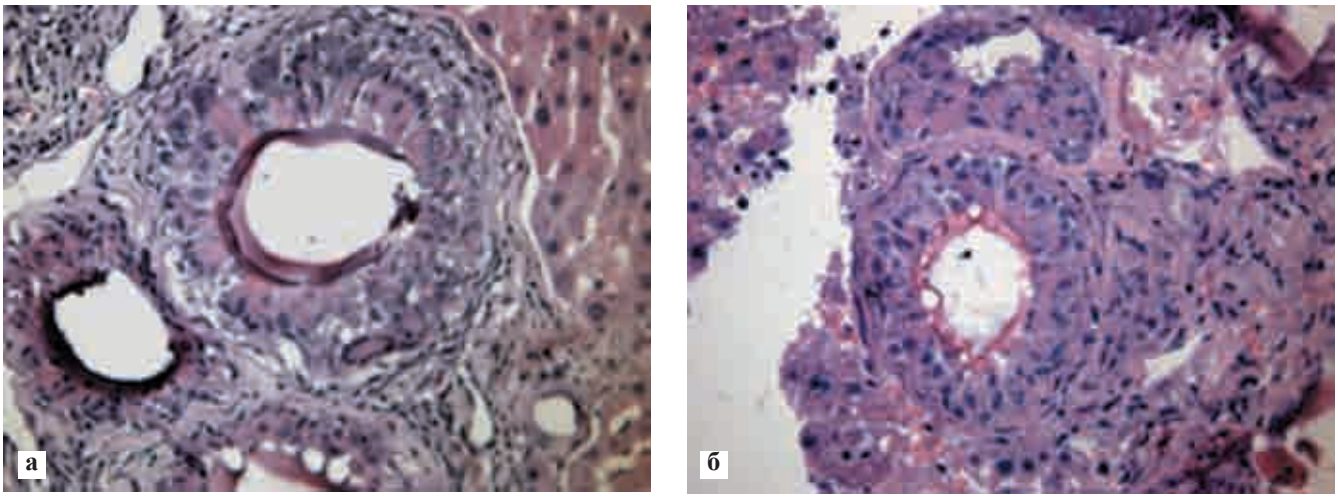


Рис. 5. Состояние клеточно-инженерных конструкций, содержащих ассоциаты клеток печени и ММСК КМ, через 90 и 180 суток после их трансплантации в поврежденную печень экспериментальных животных. Жизнеспособные клетки донорской печени видны в структуре трансплантированных клеточно-инженерных конструкций: а – через 90 суток; б – через 180 суток. Окраска гематоксилин-эозином. ×400

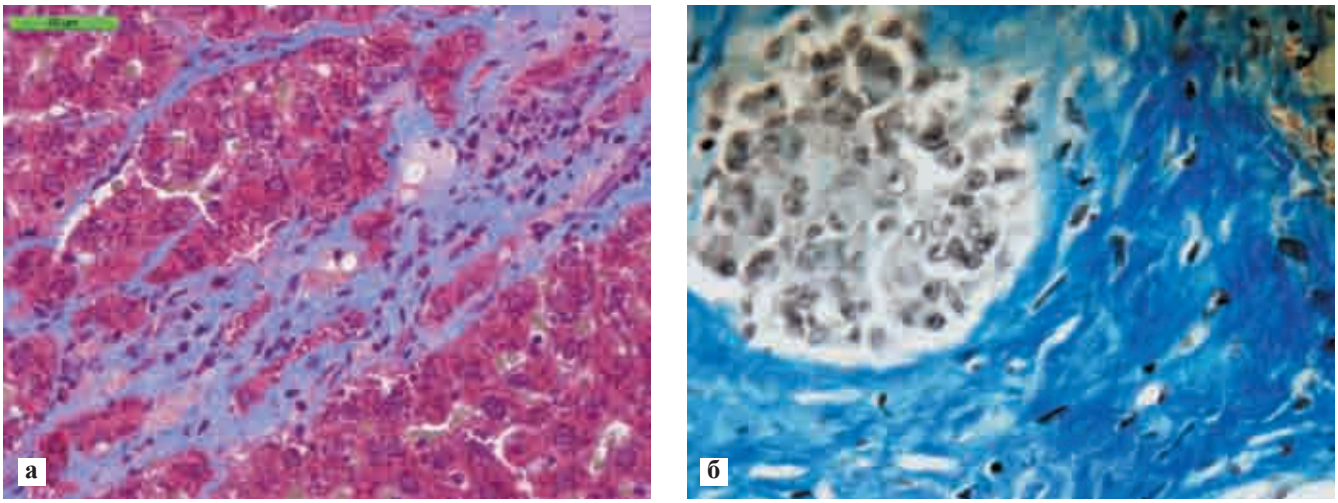
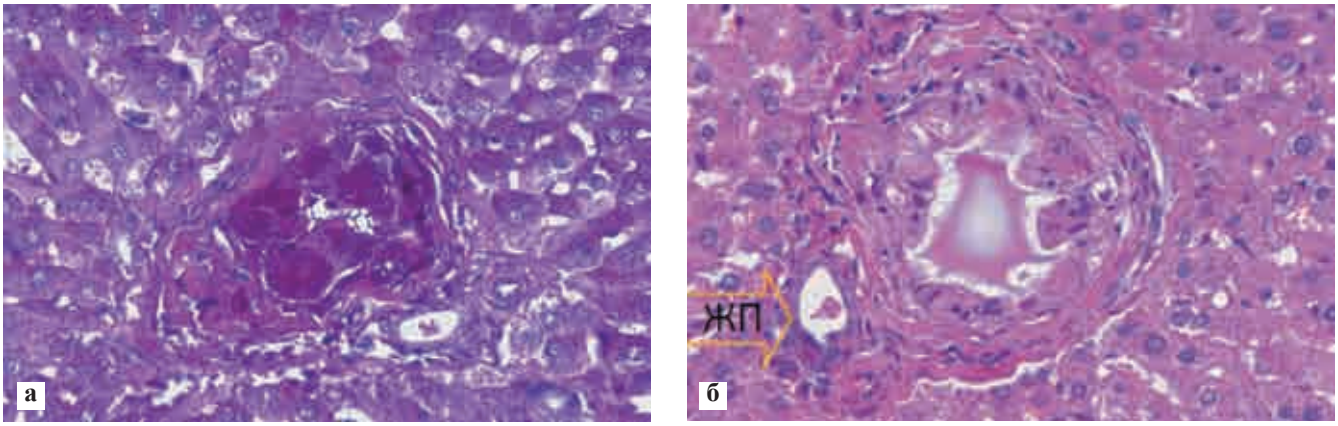


Рис. 6. Гистологическая картина печеночной ткани после моделирования ПН и трансплантации суспензии донорских клеток печени. Соединительная ткань в печени и вокруг трансплантированных клеток печени: а – 90 суток после трансплантации; б – 180 суток после трансплантации. Окрашивание по Масону. ×400



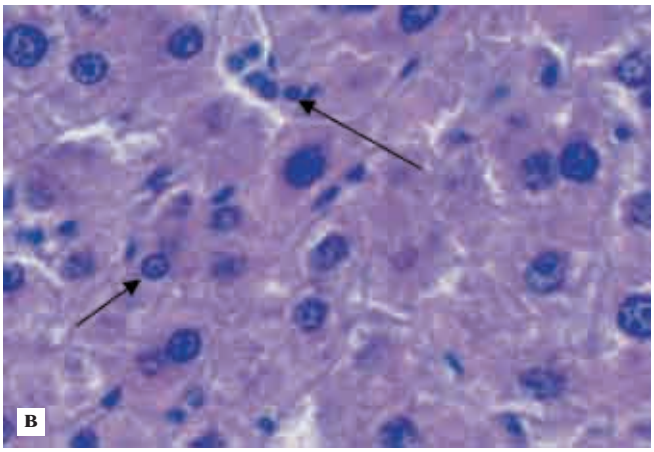


Рис. 7. Состояние клеточно-инженерных конструкций, содержащих ассоциаты клеток печени и ММСК КМ, через 90 суток после их трансплантации в поврежденную печень экспериментальных животных: а – высокая аккумуляция гликогена гепатоцитами; PAS-реакция, ×400; б – жизнеспособные клетки донорской печени в структуре трансплантированной клеточно-инженерной конструкции и вновь образованные желчные протоки (ЖП) по периферии клеточно-инженерной конструкции; окраска гематоксилин-эозином, ×400; в – регенераторные пролиферативные изменения гепатоцитов: появление более мелких новообразованных гепатоцитов (стимуляция пролиферации), встречаются двуядерные гепатоциты; окраска гематоксилином и эозином, ×1000

живления и функционирования аллогенных гепатоцитов.

Более выраженная и пролонгированная жизнеспособность клеток донорской печени после трансплантации их в составе клеточно-инженерных конструкций предопределяет высокую и длительную регуляторную активность этих клеток в организме, за счет которой наступает более выраженная, длительная и эффективная поддержка процессов восстановительной регенерации в ткани поврежденной печени, так как в ней идет образование новых гепатоцитов в результате происходящих митозов (рис. 7, в).

Вышеизложенные результаты позволяют прийти к заключению, что использование клеточно-инженерных конструкций (биомодулей) для лечения хронической ПН является более предпочтительным, чем использование суспензии клеток печени.

Это объясняется тем, что для перепрограммирования хронически нарушенного процесса восстановительной регенерации в печени необходимо длительное (а точнее постоянное) поступление в тканевые регенерационные ниши поврежденной печени комплекса рост-стимулирующих факторов и регуляторных тканеспецифических цитокинов, индуцирующих и поддерживающих восстановительный процесс в поврежденной печени. Пролонгированная активация восстановительных процессов в печени у больных с ПН является надежным фактором перепрограммирования регенераторных процессов (с фиброзирующего типа регенерации на дефиброзирующий тип) и восстановления нарушеных функций печени, а также фактором, который должен увеличить сроки и качество жизни больных с ПН, в том числе больных, включенных в лист ожидания на трансплантацию печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В опытах на крысах с моделью хронического фиброзирующего повреждения печени показано, что трансплантация клеток донорской печени, приготовленных как в виде суспензии, так и в виде клеточно-инженерных конструкций (биомодулей), способствует ускоренной нормализации показателей функции печени по сравнению с контролем (опыты без применения клеток донорской печени). Однако темп нормализации гистологических характеристик поврежденных гепатоцитов, а также темп дефиброзирования ткани фибротически поврежденной печени при использовании одинакового количества клеток в виде суспензии, как и в составе клеточно-инженерных конструкций, был более выражен и ускорен к 90-м и 180-м суткам наблюдения в опытах с трансплантацией в печень ткане-инженерных конструкций.

Более высокий темп восстановительной регенерации печени и длительное сохранение его (до 180 суток наблюдения) при использовании клеточно-инженерных конструкций обусловлены созданием в этих конструкциях биологически адекватных условий для пролонгированной жизнедеятельности клеток (клеток донорской печени и ММСК КМ), включенных в их структуру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дифференциальная диагностика и лечение внутренних болезней: Руководство для врачей. Т. 2. Болезни органов пищеварения. Под ред. А.И. Хазанова. М., 2003: 281–306.
   Differential diagnostics and treatment of internal diseases: The management for doctors. Diseases of digestive organs. Under the editorship of A.I. Hazanova. M., 2003: 281–306.
2. *Murphy S.L., Xu J., Kochanek K.D.* Deaths: Preliminary Data for 2010. Nat. Vital. Stat. Rep. 2012; 60: 1–51.
3. *Hughes R.D., Mitry R.R., Dhawan A.* Current status of hepatocyte transplantation // Transplantation. 2012; 93: 342–347.
4. *Nussler A., Konig S., Ott M.* Present status and perspectives of cell-based therapies for liver disease // J. Hepatol. 2006; 45: 144–159.
5. *Smets F., Najimi M.S.F., Sokal E.M.* Cell transplantation in the treatment of liver diseases // Pediatr. Transplant. 2008; 12: 6–13.
6. *Stutchfield B.M., Forbes S.J., Wigmore S.J.* Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease // Liver Transpl. 2010; 16: 827–836.
7. *Yamato M.* Current status of regenerative medicine from the viewpoint of tissue engineering. Trends in the sciences. 2009; 14: 36–43.
8. *Yu Y., Fisher J.E., Lillegard J.B., Rodysill B.* Cell therapies for liver diseases // Liver Transpl. 2012; 18: 9–21.
9. *Rodrigues D., da Silveira T.R., Matte U.* Freshly isolated hepatocyte transplantation in acetaminophen-induced hepatotoxicity model in rats. Arq. Gastroenterol. 2012; 49: 291–295.
10. *Fitzpatrick E., Mitry R.R., Dhawan A.* Human hepatocyte transplantation: State of the art // J. Intern. Med. 2009; 266: 339–357.
11. *Pietrosi G., Vizzini G.B., Gruttadauria S., Gridelli B.* Clinical applications of hepatocyte transplantation // World J. Gastroenterol. 2009; 7: 2074–2077.
12. *Ribes-Koninckx C., Pareja Ibars E., Agrasot M.Á.C.* Clinical outcome of hepatocyte transplantation in four pediatric patients with inherited metabolic diseases // Cell. Transplantation. 2012; 21: 2267–2282.
13. *Гумерова А.А., Киясов А.П., Калигин М.С.* Участие клеток Ито в гистогенезе и регенерации печени // Клет. транспл. и ткан. инженерия. 2007; 2 (4): 39–46.
    Gumerova A.A., Kiyasov A.P., Kaligin M.S. Participation Ito cells in the histogenesis and regeneration of the liver // Klet. transpl. and tkan. inzheneriya. 2007; 2 (4): 39–46.
14. *Онищенко Н.А., Люндуп А.В., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М.Е.* 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; VI (2): 73–87.
    Onishchenko N.A., Lyundup A.V., Shagidulin M.Y., Krasheninnikov M.E. The sinusoidal cells of the liver and bone marrow cells as a single functional component regulatory system reductive morphogenesis in a healthy and damaged liver // Klet. transpl. and tkan. inzheneriya. 2011; VI (2): 73–87.
15. *Климович В.Б.* Стволовые клетки как иммуномодуляторы при использовании клеточных технологий // Клеточные технологии для регенеративной медицины. СПб.: Изд. политехн. ун-та, 2011: 62–86.
    Klimovitch V.B. Stem cells as immunomodulators using cellular technology // Kletochnye technology for regenerative medicine. SPb.: Izd. Politehn. un Press, 2011: 62–86.

16. *Charles R., Lu L., Qian S., Fung J.* Stromal cell-based immunotherapy in transplantation // Immunotherapy. 2011; 3: 1471–1485.
17. *Севастьянов В.И., Перова Н.В., Немец Е.А., Сургученко В.А., Пономарева А.С.* Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине // Биосовместимые материалы (учебное пособие). Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011: 237–252.
Sevastiyanov V.I., Perova N.V., German E., Surguchenko V.A., Ponomareva A.S. Examples of experimental and clinical use of biocompatible materials for regenerative medicine // Biocompatible materials (textbook). Ed. V.I. Sevastianova and M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011: 237–252.
18. *Готье С.В., Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Севастьянов В.И.* Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент № 2010110063/14(014141) от 03.03.2011.
Gauthier S.V., Shagidulin M.Y., Onishchenko N.A., Krasheninnikov M.E., Sevastiyanov V.I. The method and graft for treating hepatic insufficiency. Patent number 2010110063/14 (014141) from 03.03.2011.
19. *Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Шмерко Н.П., Севастьянов В.И., Готье С.В.* Выживание клеток печени, иммобилизированных на 3D-матриксах при моделировании печеночной недостаточности // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2011; XIII (3): 59–66.
Shagidulin M.Y., Onishchenko N.A., Krasheninnikov M.E., Ilinskiy I.M., Mozheyko N.P., Shmerko N.P., Sevastiyanov V.I., Gauthier S.V. The survival of liver cells immobilized on 3-D modeling matrixes liver failure // Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. 2011. XIII (3): 59–66.
20. *Шумаков В.И., Крашенинников М.Е., Онищенко Н.А., Быстров В.А., Бриль А.Г., Абалмасов К.Г.* Культура клеток, содержащая клетки-предшественники остеогенеза, имплантант на ее основе и его использование для восстановления целостности кости. Патент № 2240135 от 20.11. 2004 г.
Shumakov V.I., Krasheninnikov M.E., Onishchenko N.A., Bystrov V.A., Brill A.G., Abalmasov K.G. Cell culture, comprising osteogenic precursor cells, the implant based on it and use it to restore the integrity of the bone. Patent number 2,240,135 from 20.11. 2004.