

ВЫЖИВАНИЕ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА 3D-МАТРИКСАХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Шмерко Н.П., Андриянова А.А., Аврамов П.В., Немец Е.А., Севастьянов В.И., Готье С.В.

ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова»
Минздравсоцразвития РФ, Москва

В работе предложен и изучен новый способ коррекции печеночной недостаточности путем трансплантации в брыжейку тонкой кишки биомодуля (клетки печени, иммобилизованные на биосовместимом и биodeградируемом 3-мерном матриксе *ЭластоПОБ*[®]) – «вспомогательная печень». Установлено, что в опытах с моделированием острой печеночной недостаточности у собак (резекция 65–70% ткани печени) и трансплантацией биомодуля на 9–14-й день происходит восстановление нарушенных биохимических показателей (содержание общего белка, лактата, ферментов цитолиза, протромбинового индекса и других коагулологических показателей). Выявление живых клеток с фенотипом гепатоцитов и новообразованных полнокровных сосудов в деградируемом матриксе через 90 суток после трансплантации биомодулей позволяет предполагать эффективность предложенного метода для коррекции острой печеночной недостаточности.

Ключевые слова: печеночная недостаточность, иммобилизованные гепатоциты, устройство для поддержки печени.

SURVIVAL OF LIVER CELLS, IMMOBILIZED ON 3D-MATRIXES, IN LIVER FAILURE MODEL

Shagidulin M.Y., Onishchenko N.A., Krasheninnikov M.E., Iljinsky I.M., Mogeiko N.P., Shmerko N.P., Andriyanova A.A., Avramov P.V., Nemets E.A., Sevastjanov V.I., Gautier S.V.

Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,
Moscow

It was examined a new method for correction of hepatic failure by transplantation of liver support biounit (liver cells, immobilized on biocompatible and biodegradable 3D-matrixes *ElastoPOB*[®]) into small intestine mesentery. It was determined that after modeling of acute hepatic failure on dogs by 65–70% liver resection) and transplantation liver support biounit the restoration of disturbed biochemical indices (such as total protein, lactate, cytolytic enzymes-ALT, AST, ALP, LDH, fibrinogen, protrombine index and others) took place more rapidly on 9–14th day instead of 18th day in control.

It was made a preposition about efficiency of the suggested method for correction both acute hepatic failure because even 90 days after transplantation of liver support biounit alive hepatocytes and neogenic plethoric vessels, growing through matrix were revealed.

Key words: hepatic failure, immobilized hepatocytes, liver support unit.

Статья поступила в редакцию 14.06.11 г.

Контакты: Шагидулин Марат Юнусович, к. м. н., доцент, зав. отделом экспериментальной трансплантологии и искусственных органов.

Тел. 8-921-935-51-91, e-mail: dr.shagidulin@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Из-за повсеместной нехватки донорских органов около 30–50% потенциальных реципиентов с хроническими заболеваниями жизненно важных органов умирают, так и не дождавшись трансплантации [6]. Смертность в листе ожидания у реципиентов печени достигает 15–25% [20]. Прогрессирующее увеличение количества больных с печеночной недостаточностью (ПН), высокая инвалидизация, а также смертность среди людей молодого и трудоспособного возраста указывают на недостаточную эффективность существующих консервативных и хирургических методов лечения данной патологии и на необходимость поиска новых, более эффективных методов лечения [2, 12]. В этой связи большой интерес представляют современные биотехнологии, основанные на проведении клеточной терапии у больных с ПН.

Известно, что восстановительная регенерация печени обусловлена пролиферацией гепатоцитов и их внутриклеточной регенерацией [1], однако у больных с ПН она снижена и не восполняет развившийся устойчивый дефицит функционирующих гепатоцитов.

В связи с этим одним из направлений регенерационной клеточной терапии стало применение донорских гепатоцитов либо путем трансплантации их в подкожную клетчатку, селезенку, брюшную полость и паренхиму печени, либо путем временного подключения биореакторов (культиваторов) с микрофрагментами ткани печени или изолированными гепатоцитами в экстракорпоральных контурах перфузионных систем типа «биоискусственная печень» [11, 13, 18]. Между тем указанные способы клеточной терапии ПН имеют существенные недостатки, главными из которых являются короткие сроки выживания донорских изолированных гепатоцитов (до 4–5 часов) и соответственно короткие сроки их корригирующего воздействия на печень больного. Для увеличения сроков выживания изолированных гепатоцитов в биореакторах (до 1–2 суток) применяют метод их предварительной посадки на микроносители [18], который обеспечивает условия для контактного взаимодействия клеток и повышает выживаемость и резистентность гепатоцитов к действию повреждающих факторов. Однако использование гепатоцитов на микроносителях или в виде микрофрагментов ткани печени в перфузионных системах сталкивается не только с биологическим ограничением сроков их функционирования, но и с техническими проблемами обеспечения адекватных условий для их жизнедеятельности. Среди таких проблем:

– необходимость использования специальных измельчителей для получения фрагментов заданного размера, что повышает опасность инфицирования донорского материала;

- необходимость включения в контур перфузионных систем дополнительных технических узлов для оксигенации и детоксикации крови (плазмы) больного, а также управления ими, что существенно повышает себестоимость метода;
- необходимость использования в биореакторах микрофрагментов печени в смеси с частицами пористого биосовместимого носителя, которые предотвращают слипание микрофрагментов и обеспечивают эффективный массоперенос, но не предотвращают отсроченную гибель гепатоцитов в глубоких слоях и на поверхности микрофрагментов;
- необходимость использования больших количеств донорского материала, что повышает угрозу переноса опасных инфекций и служит фактором избыточной активации иммунной системы реципиента, сокращающей срок функционирования используемого материала;
- необходимость регулярного проведения сеансов подключения перфузионных систем «биоискусственная печень», что исключает непрерывность регуляторной поддержки печени у больных с ПН.

Недостатки и ограничения, возникающие при использовании экстракорпоральных перфузионных гибридных систем «биоискусственная печень» выдвигают на повестку дня необходимость разработки интракорпоральных биомодулей – устройств, создающих условия для долгосрочного выживания и функционирования в них клеток донорской печени, способных после трансплантации обеспечить непрерывную коррекцию ПН.

В экспериментах на животных описано применение интракорпоральных биомодулей «вспомогательная печень» [16, 17], которые представляют собой биодеградируемый полимерный матрикс с адгезированными на нем гепатоцитами. Однако выраженная местная воспалительная реакция после трансплантации предложенных биомодулей, гибель большого числа гепатоцитов и низкая плотность прикрепления клеток печени на них свидетельствовали об отсутствии у используемых матриксов оптимальной биосовместимости, и следовательно, о неспособности их обеспечивать адекватные условия для долгосрочного выживания клеток печени.

Если учесть, что используемые биомодули были изготовлены из импортных биополимеров, которые не лицензированы в нашей стране, то становится очевидным, что для изготовления биомодулей мы должны использовать отечественные лицензированные биополимеры, физико-химические, механические и технологические свойства которых позволяют прогнозировать их пригодность для изготовления биосовместимых каркасов и пролонгированного поддержания жизнедеятельности прикрепленных клеток.

Этим требованиям удовлетворяют 3D-матрицы из биополимеров [3, 4, 5], которые по своим свойствам способны не только обеспечить прикрепление клеток, но и формировать тканеподобные структуры за счет беспрепятственной диффузии к клеткам межтканевой жидкости с растворимыми субстратами, поддержания газообмена (O_2 и CO_2) и создания условий для прорастания через поры питающих сосудов.

Однако таких исследований по применению отечественных биополимеров для изготовления биомодулей типа «вспомогательная печень» и по использованию их для коррекции ПН мы в литературе не обнаружили.

Целью настоящего исследования явилось изучение пригодности биомодулей, созданных на основе биополимерных матриц «ЭластоПОБ®», для длительного выживания клеток печени и коррекции ПН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились с 9 до 19 часов при комнатной температуре (22–24 °C). 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 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.

В качестве доноров клеток печени использовали беспородных собак-самцов ($n = 5$) в возрасте 1–2 года весом 20–25 кг. Премедикацию этих животных (собаки) осуществляли путем внутримышечного введения: калипсола (5% – 10 мг/кг), дроперидола (1,5 мг/кг), атропина (0,1% – 0,02 мг/кг) и димедрола (1% – 0,5 мл). В операционной осуществляли вводный наркоз путем внутривенного введения пропофола (1% – 7 мг/кг). Операцию проводили под интубационным наркозом, анестезию поддерживали пропофолом (1% – 0,5 мг/кг/ч), калипсолом (5% – 2 мг/кг), дитилином (5% – 20 мг/кг/ч). Острую ПН моделировали путем резекции 65–70% ткани печени (правая центральная, квадратная, левая центральная, левая латеральная доли), которая создает сублетальный дефицит печеночной ткани и является признанной и адекватной моделью острой ПН [8, 9, 15]. Брюшную полость ушивали послойно наглухо. Для профилактики инфекционных осложнений интраоперационно животным внутривенно вводили офлоксацин – 40 мл и метронидазол – 30 мл.

Выделение аутологичных клеток печени осуществляли из резецированного участка печени (4 × 4 × 2 см) бесперфузионным методом [8] путем 3-кратной отмывки изъятых кусочков печени от крови и измельчения его на холоде ($t = 4$ °C) в чашке Петри, с 3-кратной отмывкой образовавшейся взвеси клеток и мелких кусочков буферным раствором без кальция (1000 мл дистиллированной воды; 8,3 г NaCl; 0,5 г KCl; 2,38 г HEPES; pH 7,4; 37 °C) в течение 7–10 минут. После этого мелкие кусочки печени инкубировали трехкратно в растворе коллагеназы Тип IV-S (>125 CDU/mg); 1000 мл среды DMEM/F-12 + 1% FCS + 20 mM HEPES, pH 7,2–7,3; 37 °C в течение 6–8 минут каждый раз с последующей заменой ферментного раствора и центрифугированием 500 об./мин в течение 1 минуты при $t = 37$ °C. Полученный материал переносили на сито с ячейками 200 мкм и фильтровали промыванием питательной средой DMEM/F-12 с 10% фетальной бычьей сывороткой; затем суспензию из отдельных клеток и небольших агрегатов переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 500 об./мин при 4 °C в течение 1 минуты. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в свежей среде того же состава и опять центрифугировали. Процедуру повторяли 3–5 раз. Жизнеспособность клеток оценивали методом окрашивания трипановым синим. Выход клеток из резецированного участка печени (12–15 г ткани печени) колебался в пределах (3–4 × 10⁸) клеток. Клеточная суспензия содержала: гепатоциты и непаренхиматозные клетки, которые определяли при световой микроскопии. Разделение паренхиматозных и непаренхиматозных клеток не выполняли. Полученную взвесь клеток печени концентрировали в 1–2 мл физиологического раствора и ресуспендировали в ростовой среде (William's E с заменой аргинина на орнитин и добавлением фетальной бычьей сыворотки, фактора роста гепатоцитов, эпидермального фактора роста, дексамезатона, этаноламина, селенита натрия, глюкогона, инсулина, инсулино-подобного фактора роста-I, аскорбиновой кислоты, линолевой и линоленовой жирных кислот) в концентрации 2,0–4,0 × 10⁶ клеток печени/мл. Посадку (иммобилизацию) свежесыведенных клеток печени в концентрации 2–3 × 10⁶ клеток на 1 см³ осуществляли на предварительно пропитанный этой средой трехмерный биосовместимый биодеградируемый пористый матрикс по традиционной методике [10].

В качестве матрикса использовали биополимер ЭластоПОБ® (ЗАО «Биомирсервис», Россия), созданный на основе сополимера полиоксибутирата-валерата, синтезируемого различными видами прокариотических клеток, поддерживающего жизнеспособность культивируемых клеток в неоптимальных условиях среды [5, 14, 19].

ЭластоПОБ[®] в настоящее время разрешен к медицинскому применению. Основным компонентом *ЭластоПОБ*[®] является биodeградируемый бактериальный сополимер β-оксибутирата и β-оксивалерата (ПОБ-со-ПОВ), содержащий оксивалерата 15–30 мол% ($M_w = 295–360$ КДа, кристалличность 50–60%). В состав *ЭластоПОБ*[®] входит также высокомолекулярный гидрофильный пластификатор (ВГП), повышающий гидрофильность и эластичность материала.

Матрицы *ЭластоПОБ*[®] представляли собой губки со следующими размерами и параметрами: 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.

Культивирование аутологичных клеток печени на матрице осуществляли в течение 3 суток по общепринятой методике [16]. Для этого матрикс с посаженными клетками помещали в стерильную камеру и инкубировали *in vitro* в ростовой среде, состав которой указан выше. Созданный биомодуль, который содержал аутологичные клетки печени в концентрации $2–3 \times 10^6$ клеток/см³, иммобилизованные на матрице *ЭластоПОБ*[®], трансплантировали в брыжейку тонкой кишки экспериментальному животному (собака) на 3-и сутки после резекции печени для коррекции развивающейся ПН.

Сразу после трансплантации назначали: гепарин 2500 МЕ каждые 12 часов в течение 7–10 дней под контролем свертывающей системы крови и трентал из расчета 45 мг/м² поверхности тела также через каждые 12 часов в течение 30 дней.

Динамику коррекции ПН контролировали по биохимическим показателям, измеряемым с помощью автоматического биохимического анализатора Hitachi-912 и биохимических наборов фирмы Roche. Показатели свертывающей системы исследовали на

коагулологическом анализаторе Sysmex 560 и агрегометре Chrono-log с использованием реактивов фирмы «Дейд Беринг». Исследование РКФМ (растворимых комплексов фибринмономеров) проводилось с использованием орто-фенантролина производства «Технология-стандарт». Для исследования показателей кислотно-щелочного и электролитного баланса использовали газово-электролитный анализатор ABL-700 (Radiometer). Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Micros-60. Жизнеспособность клеток перед иммобилизацией на матрикс оценивали окрашиванием трипановым синим. Морфологию клеток, культивируемых на матрице после трансплантации биомодулей в брыжейку тонкой кишки, исследовали методами световой микроскопии через 90 дней.

Для иммуногистохимического выявления активно функционирующих клеток печени, иммобилизованных на трансплантированном матриксе, был применен иммунопероксидазный метод с антителами на цитокератин 18 фирмы DAKO (Дания) и антитомохондриальными антителами фирмы BIOGENIEX (USA).

Результаты биохимических исследований были подвергнуты статистической обработке по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методами световой микроскопии было установлено, что клеточная суспензия, приготовленная из резецированного участка печени, содержала ~95–98% гепатоцитов и ~5–2% непаренхиматозных клеток, причем жизнеспособность этих клеток составляла $76 \pm 4\%$ (рис. 1).

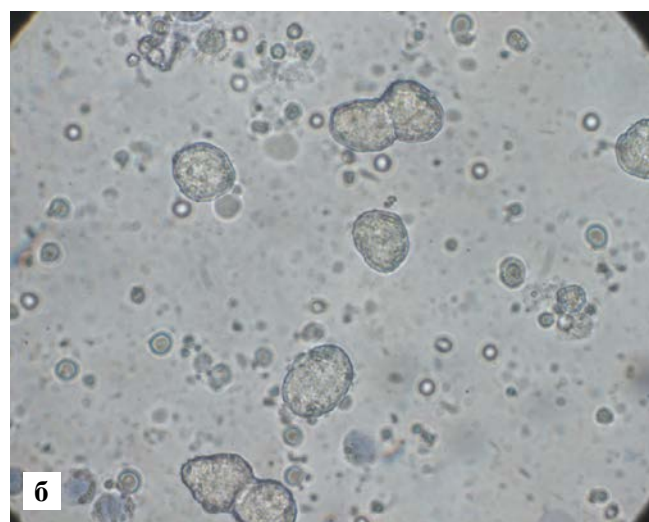
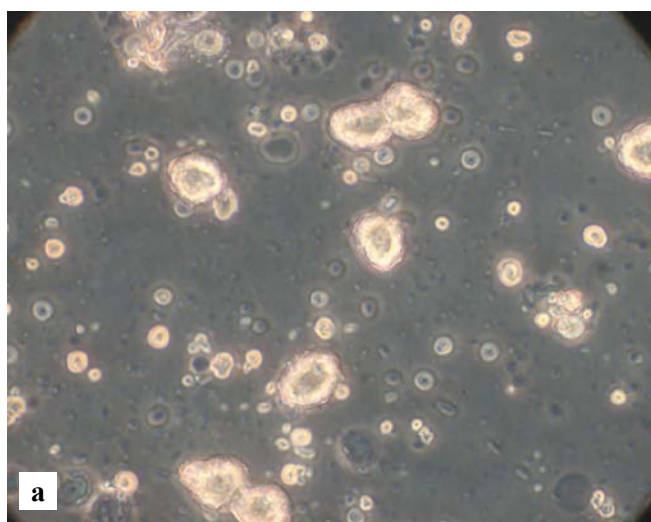


Рис. 1. Суспензия клеток печени сразу после выделения. Наряду с гепатоцитами и непаренхиматозными клетками в суспензии присутствует дебрис (осколки клеток). Фазово-контрастная (а) и прямая просвечивающая микроскопия (б). $\times 630$

Культивирование выделенных клеток печени на культуральном пластике, покрытом коллагеном (имитация условий культивирования на 3D-матриксах), позволяет повысить процент жизнеспособных клеток до 92–95% и создает условия для формирования тканеподобных структур (рис. 2). Полученные нами результаты послужили основанием для использования предварительного культивирования *in vitro* выделенных клеток печени на 3D-матриксах *ЭластоПОБ*[®] в течение 3 суток для иммобилизации жизнеспособных клеток и приготовления функционально активных биомодулей. Изучение динамики развития ПН позволило уста-

новить, что к концу 1-х суток после моделирования ПН общий белок сыворотки крови резко снизился (с 70,6 до 48,7 г/л) (рис. 3, а). Стал нарастать ацидоз (дефицит оснований увеличился в 2 раза); повысился лактат (рис. 3, б) и резко увеличился уровень цитолитических ферментов (рис. 4, а). Уровень АЛТ по сравнению с исходом увеличился в 6 раз, АСТ – в 15 раз, ALP (щелочная фосфатаза) – в 5 раз. При анализе показателей плазменного звена гемостаза было отмечено, что в исходе до моделирования ПН у собак имел место сдвиг в сторону гиперкоагуляции. Этот сдвиг характеризовался низкими цифрами АЧТВ (14”), повышенным уровнем про-

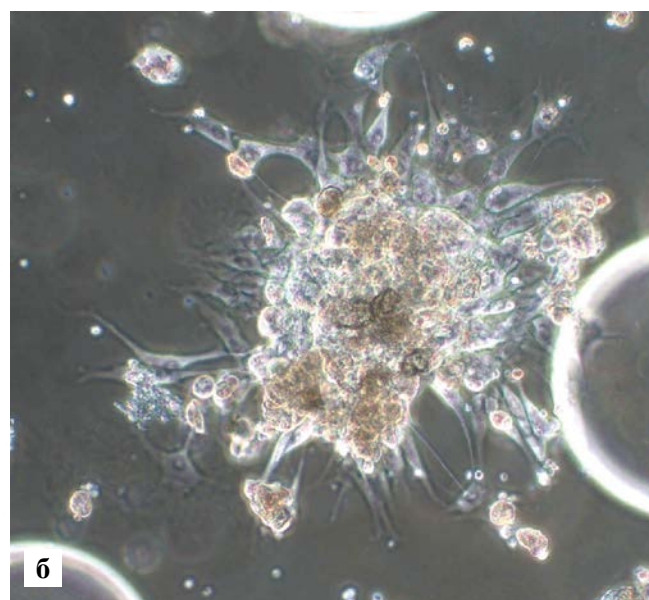
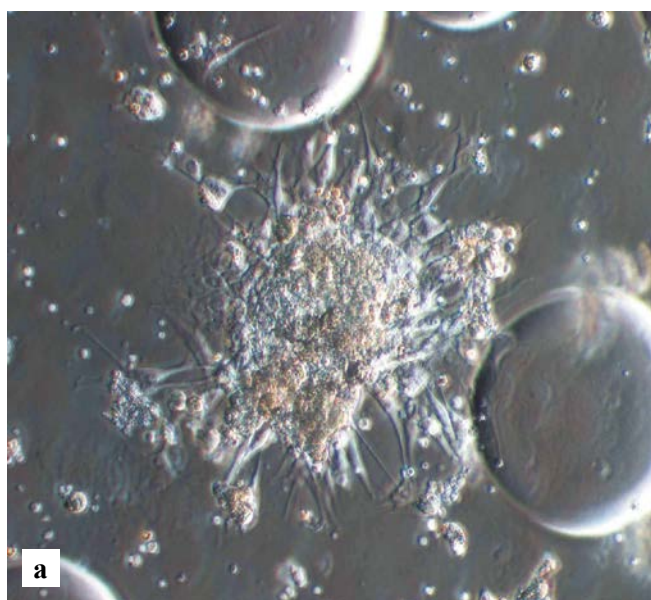
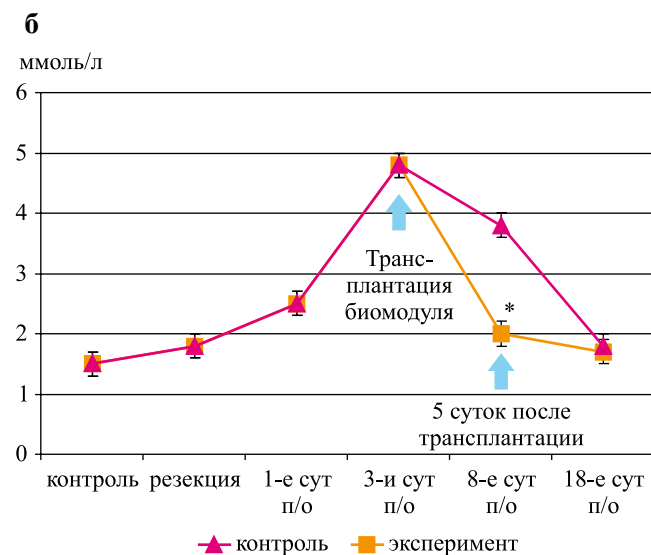
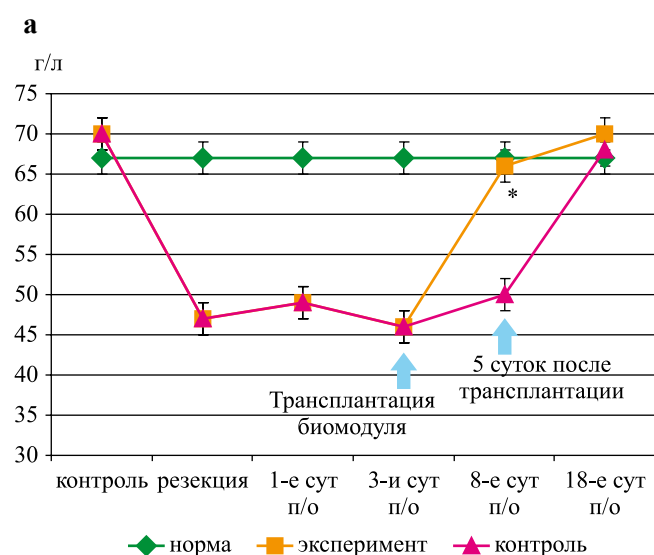


Рис. 2. Клетки печени. 3-и сутки культивирования на культуральном пластике, покрытом коллагеном. Образование ассоциата печеночных клеток, прикрепившихся к коллагеновому матриксу, из-под которого разрастаются клетки эпителиоподобного фенотипа. Микроскопия по Номарскому (а) и фазовый контраст (б). ×200



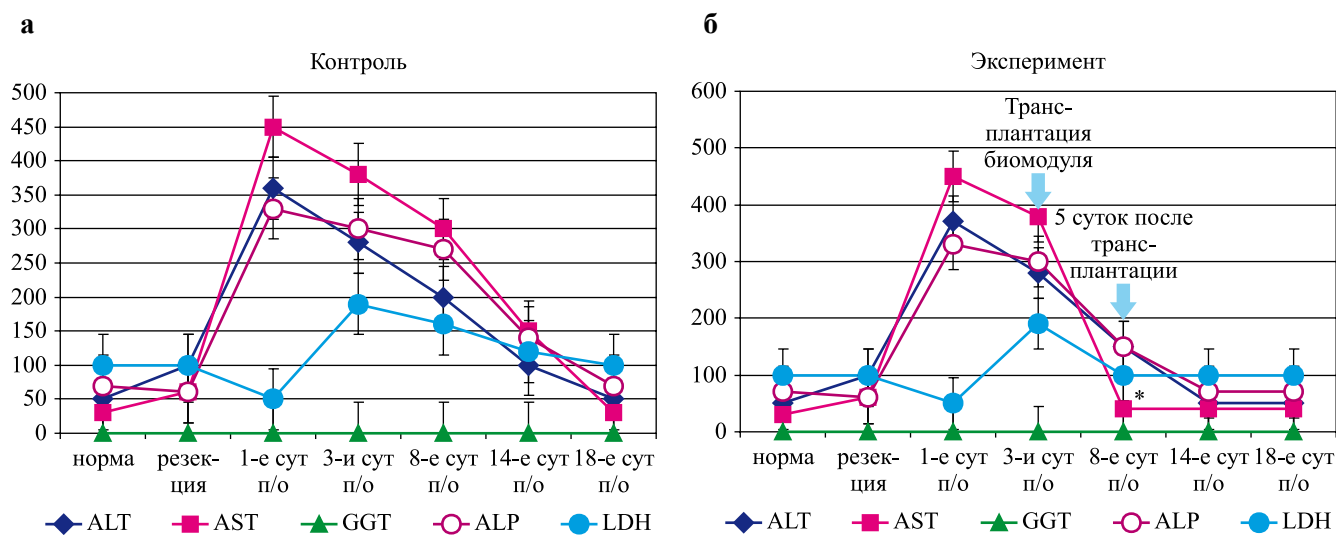
* – различие достоверно по сравнению с контролем.

Рис. 3. Динамика содержания общего белка (а) и молочной кислоты (лактат) (б) в сыворотке крови собак при моделировании печеночной недостаточности в опытах без (контроль) и с трансплантацией биомодуля (матрикс с иммобилизованными клетками печени)

тромбинового индекса (133%) (рис. 5, а), высоким содержанием фибриногена (6000 мг/л) (рис. 5, б), умеренно выраженной тромбинемией (РКФМ 15 мг%) без существенного снижения уровня АТ-III и снижением агрегационной активности тромбоцитов (9%). После резекции печени изменения АЧТВ не происходило, уровень протромбинового индекса к 1-м суткам составил 143% (рис. 5, а), значительно увеличился уровень тромбинемии (РКФМ 28 мг%). К 1-м суткам после резекции отмечалось снижение содержания фибриногена (1800 мг/л) (рис. 5, б) и АТ-III (64%), что указывало на снижение синтетической функции печени. Агрегационная активность тромбоцитов по сравнению с исходом также снизилась.

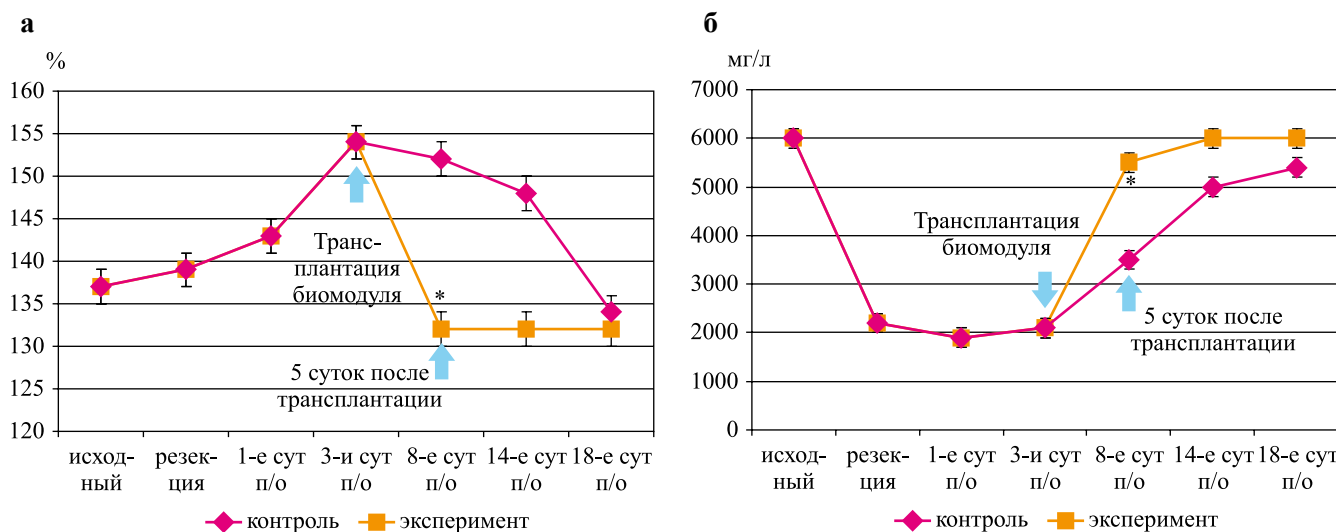
При динамическом исследовании перечисленных показателей у собак с ПН было отмечено постепенное их возвращение к норме. Содержание лактата в крови, показатели цитолиза и протромбинового индекса начинали снижаться с 3-х суток (рис. 3, б; 4, а; 5, а). Показатели общего белка и фибриногена начинали повышаться с 9-х суток после моделирования ПН (рис. 3, а; 5, б). Окончательное восстановление большинства исследуемых показателей в контроле наступало только на 18-е сутки после резекции печени.

В опытах с коррекцией ПН (трансплантация биомодулей на 3-и сутки после резекции печени) при динамическом исследовании биохимических показателей и показателей свертывающей системы кро-



* – различие достоверно по сравнению с контролем.

Рис. 4. Динамика ALT, AST, ALP, LDH (U/L) при моделировании печеночной недостаточности в опытах без (а – контроль) и при трансплантации (б) биомодуля (матрикс с иммобилизованными клетками печени)



* – различие достоверно по сравнению с контролем.

Рис. 5. Динамика изменения протромбинового индекса (а) и содержания фибриногена (б) в плазме крови собак при моделировании печеночной недостаточности в опытах без (контроль) и с трансплантацией биомодуля (матрикс с иммобилизованными клетками печени)

ви был отмечен более высокий темп их нормализации по сравнению с контролем. На 5-е сутки после трансплантации биомодулей отмечалось выраженное снижение показателей ПН: снижение лактата (рис. 3, б), ферментов цитолиза (рис. 4, б), а также достоверное снижение протромбинового индекса (рис. 5, а), достоверное повышение фибриногена (рис. 5, б) и общего белка (рис. 3, а). К 5-м суткам после трансплантации происходило также значительное увеличение по сравнению с исходом содержания тромбоцитов, но без активации их функциональной активности (с 531×10^9 до 1646×10^9).

Все исследуемые биохимические показатели после трансплантации биомодулей нормализовались и достигали исходного уровня на 9–14-е сутки после резекции печени, тогда как в контроле их нормализация наступала не ранее чем на 18-е сутки. На 14-е сутки после трансплантации биомодулей исходных значений достигали не только биохимические, но и основные коагулологические показатели: АЧТВ, АТ-III, содержание фибриногена, протромбиновый индекс, значительно снизился уровень тромбинеми (РКФМ 8 мг%), которые, однако, в контрольной группе не нормализовались даже к 18-м суткам после резекции печени. Более высокий темп коррекции ПН, восстановления дезинтоксикационной и синтетической функций поврежденной печени при трансплантации биомодулей мы связали с реализацией гепатоспецифических и регуляторных функций тех жизнеспособных гепатоцитов, которые были трансплантированы на матриксах. Для подтверждения возможности длительного сохранения жизнеспособности и пролиферативной активности гепатоцитов на 3D-матриксах *ЭластоПОБ*[®], а также для изучения возможности использования таких биомодулей для коррекции ПН нами было проведено изучение состояния гепатоцитов в биомодулях через 90 суток после их трансплантации. В приготовленных срезах зон (брыжейка тонкой кишки) трансплантации биомодулей (матрикс с гепатоцитами) через 90 дней были выявлены жизнеспособные пролиферирующие гепатоциты (рис. 6, а). В структуре биодегра-

дируемого матрикса располагаются клетки печени с четкими контурами, жизнеспособность и эндодермальное происхождение которых подтверждены иммуногистохимическим методом с антителами к митохондриальным антигенам (рис. 6, б). Важно подчеркнуть, что спустя 90 суток в структуре деградируемого матрикса наряду с жизнеспособными гепатоцитами нами были выявлены новообразованные сосуды (артерии мышечного типа) (рис. 6, в). Очевидно, пористость и полная биосовместимость используемых матриксов *ЭластоПОБ*[®] способствовали прорастанию в них сосудов, а также длительному поддержанию жизнеспособности культивируемых гепатоцитов, и эти факты, по нашему мнению, могут служить гарантом пригодности трансплантируемых биомодулей для коррекции ПН.

Таким образом, проведенное нами исследование жизнеспособности клеток печени в структуре длительно имплантируемых биомодулей показало пригодность 3D-матрикса *ЭластоПОБ*[®] для создания функционирующей ниши жизнеспособных ассоциатов клеток печени. Жизнеспособность клеточных ассоциатов в матриксе обеспечивается не только размещением и активной диффузионной доставкой кислорода и питательных веществ к иммобилизованным клеткам, но и прорастанием к ним сосудов, создающих благоприятные условия для формирования устойчивых тканеподобных ассоциатов иммобилизованных клеток печени и их длительного автономного функционирования. Мы полагаем, что изготовление интракорпоральных биомодулей «вспомогательная печень» на основе отечественного 3D-матрикса *ЭластоПОБ*[®] может найти широкое применение для лечения ПН, так как предполагаемая конструкция биомодуля:

- исключает необходимость применения сложных перфузионных систем и проведения сложных полостных операций;
- создает с помощью трансплантируемого 3-мерного матрикса культуральные условия для выживания и пролиферации клеток печени, а также формирования «тканеподобной» структуры;

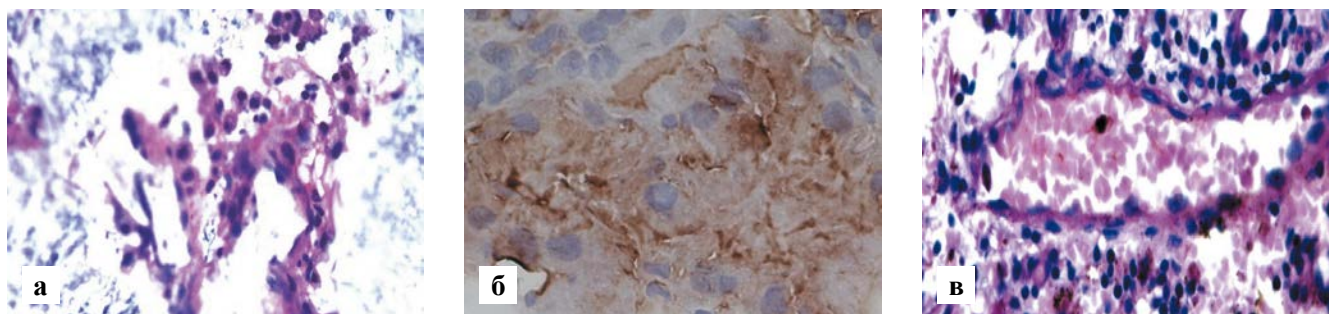


Рис. 6. Гистологические срезы в месте трансплантации биомодуля (матрикс *ЭластоПОБ*[®] с иммобилизованными клетками печени на 90-е сутки эксперимента): а – группы гепатоцитов, окраска гематоксилин-эозином; б – иммуногистохимическое окрашивание на специфические митохондриальные антигены эндотелиальных клеток (гепатоциты); в – вновь образованный сосуд (полнокровная артерия мышечного типа), PAS окраска. $\times 400$

- создает с помощью 3D-каркаса адекватные условия для диффузии оксигенированной межтканевой жидкости и прорастания сосудов через матрикс, что пролонгирует и оптимизирует условия жизнеобеспечения иммобилизованных клеток печени;
- предполагает использование как аутологических клеток, которые снижают степень активации иммунной системы, так и аллогенных клеток печени, что позволит трансплантируемому биомодулю при использовании иммуносупрессоров оказывать длительное биорегуляторное органоспецифическое воздействие на печень и организм.

Эффективность применения вживляемых биомодулей «вспомогательная печень» и сравнительно низкая себестоимость их использования также должны способствовать внедрению нового метода лечения ПН в клиническую практику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что биомодули, представляющие собой изолированные клетки печени (гепатоциты и непаренхиматозные клетки), иммобилизованные на 3-мерном биосовместимом и биодеградируемом отечественном матриксе *ЭластоПОБ*[®] при аутотрансплантации в брыжейку тонкой кишки способны длительно выживать и сохранять фенотип печеночных клеток.

При трансплантации биомодулей «вспомогательная печень» животным с острой ПН коррекция нарушений функций печени происходит быстрее, чем у животных без трансплантации биомодулей.

Длительное сохранение жизнеспособности и фенотипа клеток печени в трансплантируемых биомодулях позволяет предполагать эффективность их применения для коррекции хронической ПН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н. Практическая гепатология // Рига: Звайгзне, 1984. 405 с.
2. Дифференциальная диагностика и лечение внутренних болезней: Руководство для врачей. Т. 2. Болезни органов пищеварения / Под ред. А.И. Хазанова. М., 2003. С. 281–306.
3. Севастьянов В.И., Егорова В.А., Немец Е.А., Перова Н.В., Онищенко Н.А. Биодеградируемый биополимерный материал *ЭластоПОБ*[®] для клеточной трансплантации // Перспективные материалы. 2004. № 3. С. 35–41.
4. Севастьянов В.И., Немец Е.А., Волкова Т.Г., Марковцова М.Г. Трехмерные пористые матриксы для трансплантации клеток на основе биодеградируемого бактериального сополимера «Биопластотан» // Перспективные материалы. 2007. № 6. С. 5–10.
5. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Довжик И.А. и др. Медико-биологические свойства полиоксиканоатов – биодеградируемых бактериальных полимеров // Перспективные материалы. 2001. № 5. С. 46–55.
6. Шумаков В.И. Достижения и перспективы развития трансплантологии и искусственных органов в России // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2005. № 3. С. 6–9.
7. Fiegel H.C., Kaufmann P.M., Kneser U., Kluth D., Rogiers X. Priming of hepatocytes for cell culture by partial hepatectomy prior to cell isolation // Tissue Eng. 2000. Vol. 6 (6). P. 619–626.
8. Kahn D., Hickman R., Terblanche J., von Sommoggy S. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs – the response to different resection sizes // Nippon Geka Gakkaikai Zasshi. 1986. Vol. 87 (5). P. 536–546.
9. Kobayashi J., Takeyoshi I., Ohwada S., Morishita Y. et al. The effects of FR167653 in extended liver resection with ischemia in dogs // Hepatology. 1998. Vol. 28, № 2. P. 459–465.
10. Mooney D.J., Sano K., Kaufmann P.M., Vacanti J.P., Langer R. Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges // J. Biomed. Mater. Res. 1997. Vol. 5. P. 413–420.
11. Ohashi K., Park F., Kay M.A. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application // J. Mol. Med. 2001. Vol. 79. P. 617–630.
12. Pereira S.P., Williams R. et al. Limits to liver transplantation in the UK // Gut. 2008. Vol. 42. P. 883–885.
13. Pietrosi G., Vizzini G.B., Gruttadauria S., Gridelli B. Clinical applications of hepatocyte transplantation // World J. Gastroenterol. 2009. Vol. 7. P. 2074.
14. Sevastianov V.I., Perova N.V., Shishatskaya E.I., Kalacheva G.S., Volova T.G. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood // J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 2003. Vol. 14 (10). P. 1029–1042.
15. Siman J., Payer J., Stojkovic J., Cerný J. Hemodynamics of the liver. II. Hemodynamics of the dog liver after resection of 70% of the liver and ligation of the left branch of the portal vein // Z. Exp. Chir. 1979. Vol. 12 (2). P. 113–118.
16. Uyama S., Kaufmann P.M., Takeda T., Vacanti J.P. Delivery of whole liver equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation // Transplantation. 1993. Vol. 55. P. 932–935.
17. Uyama S., Kaufman P., Kneser U., Vacanti J., Rodrigues X. Hepatocyte transplantation using biodegradable matrices in ascorbic acid-deficient rats: comparison with heterotopically transplanted liver grafts // Transplantation. 2001. Vol. 7. P. 1–7.
18. Van de Kerckhove M.P., Hoekstra R., Chamuleau R.A., van Gulik T.M. Clinical application of bioartificial liver support systems // Ann. Surg. 2004. Vol. 240. P. 216–230.
19. Volova T., Shishatskaya E., Sevastianov V., Efremov S., Mogilnaya O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers // Biochem. Eng. J. 2003. № 3736. P. 1–9.
20. www.eurotransplant.nl/files/statistics.