

УДК 616–089.843:[616.36–018+616.419–018.4

КО-ТРАНСПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ ГЕПАТОЦИТОВ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК: ХАРАКТЕРИСТИКА, КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОДХОДА

А. А. СЫМАНОВИЧ¹⁾, Е. А. ПРИМАКОВА¹⁾, А. А. ГОМОН¹⁾, Н. И. ДЕДЮЛЯ¹⁾, Е. Г. ПЕТРОВСКАЯ¹⁾,
Е. С. БУЗУК¹⁾, В. В. СМОЛЬНИКОВА¹⁾, А. Е. ЩЕРБА¹⁾, С. И. КРИВЕНКО¹⁾

¹⁾Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей
на базе 9-й городской клинической больницы, ул. Семашко, 8, 210045, Минск, Беларусь

Представлены результаты исследования по изучению влияния совместного культивирования мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, и дифференцированных в гепатогенном направлении мезенхимальных стволовых клеток на жизнеспособность и функциональную активность гепатоцитов в совместной культуре. Установлено, что высокий уровень секреции протеинов печени дифференцированными мезенхимальными стволовыми клетками и обеспечение ими функциональных и метаболических свойств изолированных гепатоцитов наблюдается в первые дни культивирования (HGF (p=0,06) и ANGPTL4 (p<0,03)). Следовательно, при более длительном культивировании рекомендуется в качестве скаффолда использовать недифференцированные МСК. На развитие повреждения печени влияют переменные факторы окружающей среды и образ жизни (диета, физическая инертность и эмоциональный стресс). Для оценки эффективности применения ко-трансплантации гепатоцитов и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани было проведено пилотное клиническое исследование у десяти пациентов с осложнениями цирроза печени в виде печеночной недостаточности. Установлено, что интрапортальная совместная инфузия гепатоцитов и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани пациентам с печеночной недостаточностью на фоне цирроза и обширной резекции печени была безопасной в отношении нежелательных явлений и эффективной в отношении синтетической и метаболической функции печени.

Образец цитирования:

Сыманович А. А., Примакова Е. А., Гомон А. А., Дедюля Н. И., Петровская Е. Г., Бузук Е. С., Смольникова В. В., Щерба А. Е., Кривенко С. И. Ко-трансплантаты на основе гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток: характеристика, клиническое применение и первичная оценка эффективности подхода // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2018. № 2. С. 79–87.

For citation:

Symanovich A. A., Prymakova Y. A., Homan A. A., Dzyadzyulya N. I., Pyatrouskaya K. G., Buzuk E. S., Smolnikova V. V., Shcherba A. E., Krivenko S. I. Co-transplants based on hepatocytes and mesenchimal stem cells: characteristic, clinical application and primary assessment of the approach efficiency. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2018. No. 2. P. 79–87 (in Russ.).

Авторы:

Алла Александровна Сыманович – врач лабораторной диагностики.

Евгения Алексеевна Примакова – врач лабораторной диагностики.

Анастасия Алексеевна Гомон – младший научный сотрудник.

Наталья Ивановна Дедюля – заведующий лабораторией.

Екатерина Геннадьевна Петровская – научный сотрудник.

Евгения Сергеевна Бузук – врач лабораторной диагностики.

Виктория Владимировна Смольникова – старший научный сотрудник научного отдела.

Алексей Евгеньевич Щерба – кандидат медицинских наук, доцент; заведующий отделом.

Светлана Ивановна Кривенко – кандидат медицинских наук, доцент; заместитель главного врача.

Authors:

Ala A. Symanovich, doctor of laboratory diagnostics. aleftyna@tut.by

Yauheniya A. Prymakova, doctor of laboratory diagnostics. gane_sel@mail.ru

Anastasiya A. Homan, junior scientific researcher. gomonanastasiya@gmail.com

Natallya I. Dzyadzyulya, chief of the laboratory. nata_2010@tut.by

Katsiaryna G. Piatrouskaya, research scientist. Ekatherina999@mail.ru

Evgenia S. Buzuk, doctor of laboratory diagnostics. zhenik.r@gmail.com

Victoria V. Smol'nikova, senior researcher of the scientific department. vsmolnikova2603@mail.ru

Aliaksei E. Shcherba, PhD (medical), associate professor; departmen head. vsmolnikova2603@mail.ru

Svetlana I. Krivenko, PhD. (medical), associate professor; deputy chief doctor. svtl_kr@tut.by

Ключевые слова: гепатоциты; мезенхимальные стволовые клетки; гепатоцитоподобные клетки; совместное культивирование; скаффолды; уровень секреции растворимых протеинов печени; морфологические характеристики; клеточная ко-трансплантация.

KO-TRANSPLANTS BASED ON HEPATOCYTES AND MESENCHYMAL STEM CELLS: CHARACTERISTIC, CLINICAL APPLICATION AND PRIMARY ASSESSMENT OF THE APPROACH EFFICIENCY

A. A. SYMANOVICH^a, Y. A. PRYMAKOVA^a, A. A. HOMAN^a, N. I. DZYADZYULYA^a,
K. G. PYATROUSKAYA^a, E. S. BUZUK^a, V. V. SMOLNIKOVA^a, A. E. SHCHERBA^a, S. I. KRIVENKO^a

^aRepublican Scientific and Practical Center for organ and tissue transplantation, the 9th Minsk city clinical hospital, Semashko street, 8, 220116, Minsk, Belarus

Corresponding author: A. A. Symanovich (alefytina@tut.by)

The results of a study on the effect of co-cultivation of mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue and hepatogenic differentiation mesenchymal stem cells on the viability and functional activity of hepatocytes in a co-culture are presented. It was established that a high level of secretion of liver proteins by differentiated mesenchymal stem cells and providing them with functional and metabolic properties of isolated hepatocytes was observed in the first days of cultivation (HGF ($p = 0.06$) and ANGPTL4 ($p < 0.03$)). Therefore, with a longer culture, it is recommended to use undifferentiated MSCs as a scaffold. The development of liver damage is affected by variable environmental factors and lifestyle (diet, physical inertia and emotional stress). To assess the effectiveness of co-transplantation of hepatocytes and allogeneic mesenchymal stem cells of adipose tissue, a pilot clinical study was conducted in ten patients with complications of liver cirrhosis in the form of liver failure. It has been established that intraportal co-infusion of hepatocytes and allogeneic mesenchymal stem cells of adipose tissue in patients with hepatic insufficiency against cirrhosis and extensive liver resection was safe against undesirable phenomena and effective against the synthetic and metabolic function of the liver.

Key words: hepatocytes; mesenchymal stem cells; hepatocyte-like cells; co-culture; the level of liver secretory soluble proteins; morphological characteristics; cell co-transplantation.

Введение

Печень является важным органом в организме, где выполняются синтез белка и метаболизм экзогенных и эндогенных субстратов. Известная феноменальная способность печени после повреждения любой этиологии регулировать свой рост и массу, а также поддерживать постоянство структуры и функции связана с уникальными свойствами ее паренхиматозных клеток – гепатоцитов. Считается, что при отсутствии стимуляции роста гепатоциты в течение жизни делятся один или два раза. Однако после повреждения либо удаления фрагмента печени запускается последовательный механизм, основными компонентами которого являются пролиферация, дифференцировка и миграция клеток, а также реструктуризация стромы и ангиогенез. Факторы, продуцируемые как самой печенью, так и внепеченочными тканями, взаимодействуя между собой и со специфическими рецепторами клеточных мембран, регулируют этот компенсаторный механизм [1]. Другим перспективным источником для регенерации печени являются мультипотентные стромальные клетки [2]. Наряду с костным мозгом, мезенхимальные стволовые клетки присутствуют и во многих других тканях организма, например, в жировой ткани. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани (МСК ЖТ) способны дифференцироваться в нескольких клеточных направлениях. В исследованиях последних лет неоднократно сообщается, что МСК ЖТ могут дифференцироваться в гепатогенном направлении *in vitro* при определенных условиях культивирования. Следовательно, жировая ткань может быть доступным источником мезенхимальных стволовых клеток с терапевтическим потенциалом для клеточной терапии [3].

Известно, что независимо от этиологических факторов, степень повреждения печени может зависеть от генетических полиморфизмов, которые связаны с различными этническими и культурными особенностями. Следовательно, на метаболические гены влияют переменные факторы окружающей среды и образ жизни (диета, физическая инертность и эмоциональный стресс), которые связаны с региональными различиями среди населения [4]. Для лечения заболеваний печени разрабатываются клеточные технологии. Перспективным средством терапии печеночной недостаточности может быть трансплантация гепатоцитов, особенно в случае метаболических болезней печени, для коррекции которых требуется меньшее

количество трансплантируемых клеток. Для эффективной трансплантации необходимо выделить гепатоциты из печени и накопить их путем культивирования в достаточном количестве для пересадки. При выделении гепатоцитов большое количество клеток гибнет, а у выживших – изменяются адгезивные свойства клеточной поверхности, так что их прикрепление на культуральном пластике с целью дальнейшего культивирования и накопления происходит с большими потерями. При длительном культивировании гепатоциты теряют ряд своих функциональных свойств. Хотя такие функции гепатоцитов, как секреция альбумина, синтез цитохрома P450 быстро уменьшаются в стандартных условиях культивирования. Данные фенотипические изменения связаны с изменениями в экспрессии генов, сопровождающимися снижением уровня транскрипции соответствующих генов. Эти процессы могут быть определены как начало дедифференцировки гепатоцитов и происходят вследствие ишемического/реперфузионного стресса во время их выделения, разрушения нормальной архитектуры ткани, а также адаптации клеток к новым условиям *in vitro* [5]. Основная задача при культивировании гепатоцитов заключается в обеспечении не только их выживания и пролиферативной способности, но и в сохранении ими фенотипа и функциональности. Для культивирования гепатоцитов используют в первую очередь коллаген, фибрин, а также различные синтетические полимеры, которые также покрывают этими природными белками [5]. Совместное культивирование мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, и изолированных клеток печени способствует сохранению клеточного трансплантата в течение определенного периода времени в сравнении с монокультурой гепатоцитов. Предположительно, что стимулированные гепатоцитами мезенхимальные стволовые клетки вырабатывают паракриновые факторы. Эти данные свидетельствуют об уменьшении гибели клеток (и в частности, апоптоза гепатоцитов) и улучшении их выживаемости. Дальнейшие клинические исследования необходимы для того, чтобы определить несколько важных факторов о трансплантации печеночных клеток пациентам с печеночной недостаточностью: оптимальное количество гепатоцитов, которые необходимы для поддержания функции печени, учитывая временные рамки для трансплантации гепатоцитов, причину и тяжесть. Отметим, что у пациентов с циррозом применение методов воздействия на процессы регенерации печени целесообразно как для лечения самого заболевания и его осложнений, так и для подготовки к ортотопической трансплантации печени.

В этой связи *основной целью* данного исследования является разработка оптимального алгоритма получения терапевтически эффективных ко-трансплантатов на основе гепатоцитов и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток для лечения пациентов с острой и терминальной стадией хронической печеночной недостаточности.

Материалы и методы исследования

Изоляция гепатоцитов из донорской печени осуществлялась путем 3-ступенчатой перфузии органа и обработки ферментативным раствором с последующей механической экстракцией. Все растворы нагревались до 37 °С, что позволяло создать условия, близкие к условиям работы ферментов в организме человека. Во фрагмент печени, по предварительно заканюлированным сосудам, вводился раствор для перфузии 1, состоящий из раствора Хэнкса и EDTA. Далее осуществлялось введение раствора Хэнкса (раствор для перфузии 2) и обработка перфузионным раствором 3, содержащим коллагеназу II или IV типа. Фрагмент печени выдерживался 30 мин в растворе для перфузии 3 при постоянном перемешивании на механическом шейкере при 37 °С, после чего фермент нейтрализовался методом разбавления раствором питательной среды, содержащим 10 % человеческого альбумина. При данной температуре происходило ингибирование ферментативной активности. Обработанная коллагеназой ткань измельчалась на мелкие фрагменты путем механической гомогенизации скальпелем или стерильными ножницами, после чего подвергалась двойной фильтрации. Полученная клеточная суспензия центрифугировалась в течение 4 мин при 587 об./мин. Процедура повторялась дважды (t=4 мин при 587 об./мин при 4°С). Осадок ресуспендировали в 5–10 мл среды для культивирования гепатоцитов. Подсчет клеток и определение жизнеспособности проводился по стандартной методике по исключению трипанового синего и с уксусной кислотой.

Выделение МСК из жировой ткани проводилось по ранее разработанному протоколу с некоторыми модификациями [3]. Липоаспират смешивался с равным объемом стерильного фосфатного буфера и центрифугировался в течение 10 мин при 1500 об./мин при комнатной температуре. Образовавшийся поверх фосфатного буфера слой адипоцитов собирался в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 50 мл. Полученная суспензия смешивалась с равным объемом раствора коллагеназы I типа в фосфатном буфере и инкубировалась в течение 60 мин при температуре 37 °С и легком помешивании. После этого фермент нейтрализовался добавлением к смеси равного объема питательной среды, содержащей 10 % сыворотки АВ(IV) или 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Полу-

ченная смесь центрифугировалась в течение 10 мин при 4000 об./мин при комнатной температуре. Осадок собирался и ресуспендировался в 50 мл среды. Процедура центрифугирования повторялась ($t=10$ мин при 1500 об./мин при комнатной температуре). Далее осадок ресуспендировался в 10–15 мл среды для культивирования МСК. Подсчет клеток производился по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим. Оценка жизнеспособности клеток проводилась по общепринятой методике по исключению трипанового синего. Клеточная суспензия доводилась средой для культивирования МСК до посевной концентрации и высевалась в культуральные флаконы. Через 24–48 часов инкубации (37°C , 5 % CO_2 , 90 % влажность) не адгезировавшие к поверхности флакона клетки смывались стерильным PBS и заполнялись флаконы специализированной средой для культивирования МСК.

Для гепатогенной дифференцировки мезенхимальные стволовые клетки, находящиеся на втором пассаже, высевались в культуральные флаконы и культивировались до достижения 70–80 % конfluence. После этого в додифференцировочный период в культуральную среду, не содержащую сыворотки, добавляли EGF (эпидермальный фактор роста), bFGF (основной фактор роста фибробластов, «Sigma-Aldrich», Германия) и 1% антибиотика для остановки процесса пролиферации. Далее следовал 2-этапный протокол дифференцировки. На первом этапе гепатогенная дифференцировка стимулировалась дифференцировочной средой без сыворотки, дополненной HGF (фактор роста гепатоцитов), bFGF, никотинамидом и 1 % антибиотика. В таких условиях клетки культивировались в течение 7 дней. На втором этапе бессывороточная дифференцировочная среда содержала OMS (онкостатин М), дексаметазон, ITS-premix (100 $\mu\text{mol/L}$ инсулина, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ трансферина, 3,6 $\mu\text{mol/L}$ селеновой кислоты, 1,25 mg/mL BSA и 190 $\mu\text{mol/L}$ ленолевой кислоты) и 1% антибиотика. Культивирование продолжалась 14 дней с заменой среды каждые 2–3 дня [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Морфологический анализ клеточных культур гепатоцитов проводился через 18 ч после выделения, определялось наличие множества крупных клеток полигональной формы, по морфологии которых можно судить о принадлежности их к популяции гепатоцитов. Через 72 ч количество клеток данной популяции снижалось, а к 7-м суткам наблюдалось полная утрата свойств клеток печени, что подтверждено данными иммунофенотипического анализа.

Метаболическая активность выделенных гепатоцитов оценивалась методом количественного колориметрического анализа уровня продукции мочевины в клеточном супернатанте на 1, 3, 7 и десятые сутки после процедуры изоляции клеток печени. Наличие мочевины в культуральной среде свидетельствует, наряду с морфологическими характеристиками, о принадлежности выделенных клеток к гепатоцитам. Постепенное уменьшение концентрации данного продукта жизнедеятельности клеток в образце позволяет судить о снижении метаболической активности гепатоцитов, что соответствует результатам иммунофенотипического и морфологического анализа и согласуется с многочисленными литературными источниками. Большинство образцов имели схожий уровень продукции мочевины с тенденцией к увеличению на десятый день культивирования, что может говорить о постепенной гибели клеток и выделении продуктов их распада.

Фракция мононуклеарных клеток выделялась по ранее разработанному модифицированному протоколу с использованием экстракорпоральной механической обработки жировой ткани. Для всех образцов МСК, выделенных из жировой ткани, в процессе культивирования была проанализирована экспрессия маркеров клеточной поверхности методом проточной цитофлуориметрии для подтверждения принадлежности клеток к мезенхимальным стволовым. Для иммунофенотипирования МСК ЖТ был выбран спектр маркеров, наиболее часто экспрессируемых на стромальных стволовых клетках: CD 90, CD 105, CD 13, CD 44, CD 45, CD 73, CD 34, CD 54, CD 29, CD 9. МСК ЖТ образцов, рассмотренных ниже, характеризовались постоянно высокими уровнями стромально-ассоциированных маркеров (CD 90, CD 105, CD 13, CD 44, CD 73, CD 29, CD 9) и низким уровнем CD 34. Исследуемые клетки были негативны по маркерам CD 45 и HLA-DR.

При микроскопировании клеточных культур, дифференцированных в гепатогенном направлении (опыт и контроль), наиболее значительные морфологические изменения были установлены на 14-й день культивирования (седьмой день культивирования на втором этапе), которые заключались в том, что клетки утратили фибробластидную морфологию и приобрели распластанную полигональную форму. Кроме того, на данном этапе отмечалось увеличение генной экспрессии фетального маркера α -фетопротейна, а также максимума достигали отличия в уровне экспрессии генного маркера ALB в опытной группе в сравнении с контролем (экспрессия альбумина усиливалась у дифференцированных МСК).

Иммунофенотипические характеристики клеток незначительно изменялись: наблюдалось снижение экспрессии CD 105, однако уровень других маркеров адгезии сохранялся на прежнем уровне. Полученные в процессе дифференцировки гепатоцитоподобные клетки оценивались как CD 68⁺.

Использование МСК в качестве скаффолда для культивирования является одним из новейших подходов в получении клеточного трансплантата клеток печени. Проведено исследование по влиянию мезенхимальных стволовых клеток на полученный трансплантат гепатоцитов использования МСК в качестве биodeградируемого скаффолда. Отрабатывалось два способа культивирования сложных совместных культур:

- 1) использование дифференцированных в гепатогенном направлении мезенхимальных клеток;
- 2) использование культуры мезенхимальных стволовых клеток, достигшей монослоя.

При морфологическом анализе культур гепатоцитов в 1–3 сутки не регистрировалось значимых отличий в зависимости от используемого скаффолда. Оба типа скаффолдов обеспечивали поддержание морфологии культуры гепатоцитов. При дальнейшем культивировании наблюдалось снижение адгезивных свойств дифференцированных в гепатогенном направлении клеток в сравнении с недифференцированными МСК.

Кроме изучения морфологических характеристик по мере накопления образцов клеток, выделенных из печени, был исследован уровень секреторной активности изолированных гепатоцитов ($n=15$), совместных культур МСК+гепатоциты ($n=15$) и дифференцированных МСК+гепатоциты ($n=15$) для выявления статистически значимых различий. Проводилось определение уровня секреции протеинов выделенными клетками печени на приборе для мультиплексного анализа Luminex 200TM. Измерялась концентрация следующих белков: AFP, ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL6, FABP, FGF-19, FGF-21, FGF-23 и HGF.

Для анализа полученных данных был применен непараметрический метод Манна–Уитни (STATISTICA 6.0). Были установлены статистически значимые различия по секреторной активности ANGPTL4 ($p=0,03$) и тенденция к увеличению уровня HGF ($p=0,06$) (рис. 1, 2).

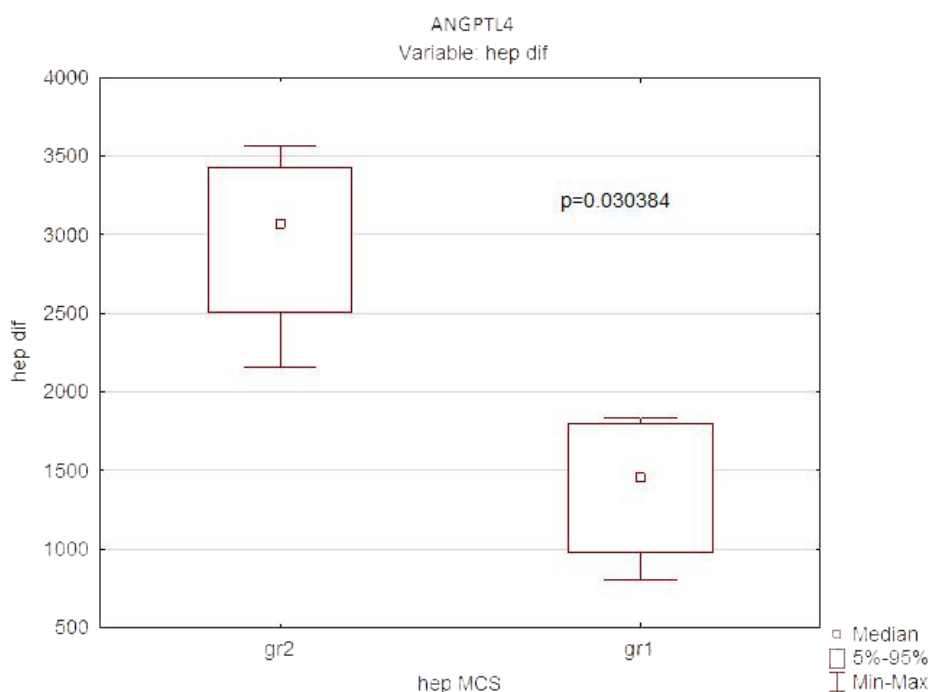


Рис. 1. Уровень секреторной активности ANGPTL4 дифференцированных в гепатогенном направлении МСК+гепатоциты ($n=15$), МСК + гепатоциты ($n=15$) ($p<0,03$)

Fig. 1. The level of the secretory activity of ANGPTL4 of co-cultures hepatocyte-like cells + hepatocytes ($n = 15$) co-cultures of MSCs + hepatocytes ($n = 15$) ($p < 0.03$)

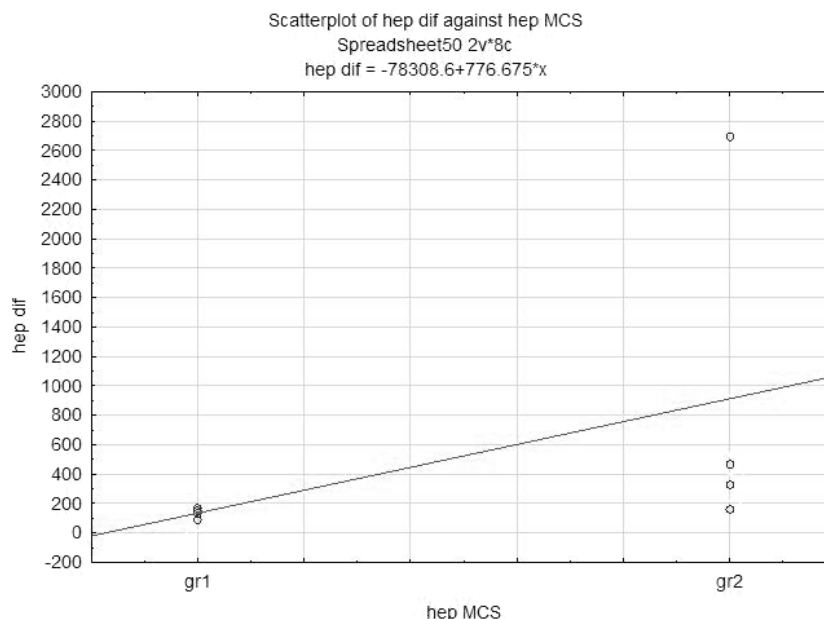


Рис. 2. Уровень секреторной активности HGF дифференцированных в гепатогенном направлении МСК+гепатоциты (n=15), МСК + гепатоциты (n=15) ($p < 0,06$)

Fig. 2. The level of the secretory activity of HGF of co-cultures hepatocyte-like cells + hepatocytes ($n = 15$) co-cultures of MSCs + hepatocytes ($n = 15$) ($p < 0,06$)

По уровню секреции альфа-фетопротейна не было установлено статистически достоверных различий между группами ($p > 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии дифференцированных мезенхимальных стволовых клеток на уровень секреции протеинов печени и поддержания функциональных и метаболических свойств изолированных гепатоцитов в первые дни культивирования. Однако при более длительном культивировании рекомендуется в качестве скаффолда использовать недифференцированные МСК.

Совместное культивирование мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, и изолированных клеток печени способствует сохранению клеточного трансплантата в течение определенного периода времени в сравнении с монокультурой гепатоцитов. Предположительно, что стимулированные гепатоцитами мезенхимальные стволовые клетки вырабатывают паракриновые факторы. Эти данные свидетельствуют об уменьшении гибели клеток (и в частности, апоптоза гепатоцитов) и улучшении их выживаемости.

Предыдущие исследования показали, что выделенные из костного мозга стволовые клетки оказывают защитное действие на гепатоциты грызунов *in vitro* и *in vivo*. Группой исследователей под руководством Исода (2004) было выявлено, что стволовые клетки, выделенные из костного мозга, поддерживают функцию гепатоцитов путем секреции IL-6, отвечающего за усиление продукции мочевины при сохранении альбумина на прежнем уровне [7]. Другая научная группа во главе с Махаджерани выполняла трансплантацию мышам человеческих гепатоцитов, культивированных совместно со стволовыми клетками костного мозга, и обнаружила степень улучшения приживления, по сравнению с монокультурой клеток печени [8]. МСК, как известно, являются структурной опорой для клеток организма и обладают антиапоптотическим, иммуномодулирующим действием. Кроме того, был исследован эффект культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга совместно с гепатоцитами крысы и лимфоцитами человека, а также и найдена зависимость влияния совместного культивирования с лимфоцитами на функциональную активность гепатоцитов и развитие противовоспалительного ответа [9–12]. Данный эффект опосредован комбинацией развития ответа через межклеточные контакты и через растворимые факторы (факторы роста, цитокины внеклеточного матрикса) [13].

Эта вспомогательная роль мезенхимальных стволовых клеток особенно перспективна в контексте клеточной трансплантации при острой печеночной недостаточности. Трансплантация гепатоцитов может послужить в качестве моста для регенерации собственной печени либо поддерживающей терапии у пациентов в предтрансплантационном периоде, обеспечивая достаточное время для поиска подходящего органа. Определено, что МСК могут служить потенциальной альтернативой трансплантации гепатоцитов при острой

печеночной недостаточности. Однако, хотя мезенхимальные стволовые клетки могут ускорить процесс восстановления печени, МСК не всегда способны обеспечить недостающие функции печени. Совместная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток и гепатоцитов при острой печеночной недостаточности может обеспечить оптимальное сочетание поддержки печени с противовоспалительным действием.

Ко-трансплантация гепатоцитов и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани была технически успешно выполнена пяти пациентам. У четверых пациентов причиной печеночной недостаточности послужил цирроз печени и у одного – обширная резекция печени. Во всех случаях процедура прошла без осложнений, мониторинг давления в воротной вене не показал его роста.

Применение клеточного трансплантата на основе гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток способствовало значимому улучшению синтетической и экскреторной функции печени. Уровень альбумина был достоверно выше (33(28;35) г/л против 29(25;32) г/л), а МНО (1,6(1,4;1,9) против 2,15(1,8;2,3)) и билирубина (51(35;67) мкмоль/л против 87(60;90) мкмоль/л) – ниже в основной группе. В группе сравнения имело место прогрессирование печеночной энцефалопатии у 2-х из пяти пациентов, а в основной группе подобное прогрессирование было у одного пациента.

Таблица

Сравнительная характеристика лабораторных показателей в основной группе и группе сравнения через 7 дней после инфузии клеток

Table

Comparative characteristics of laboratory parameters in the main group and the comparison group 7 days after the infusion of cells

Лабораторный показатель	Основная группа, n=5	Группа сравнения, n=5	Достоверность различий между группами*	Изменение показателя
Альбумин, г/л	33(28±35)	29(25±32)	p= 0,045	
МНО	1,6(1,4±1,9)	2,15(1,8±2,3)	p=0,04	↓
Билирубин, мкмоль/л	51(35±67)	87(60±90)	p=0,04	↓

Примечание. *Mann –Whitney U-Test

Степень выраженности печеночной недостаточности была оценена с помощью формулы расчета балла MELD: $0,95 \times \text{Log } e(\text{креатинин мг/дл}) + 0,378 \times \text{Log } e(\text{билирубин мг/дл}) + 1,120 \times \text{Log } e(\text{МНО}) + 0,643$ (www.mayoclinic.org/gi-rst/mayomodel5.html).

Наблюдалось статистически достоверное снижение балла MELD через 28 дней после ко-трансплантации гепатоцитов и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (Mann–Whitney U-test; p=0,02) (рис. 3).

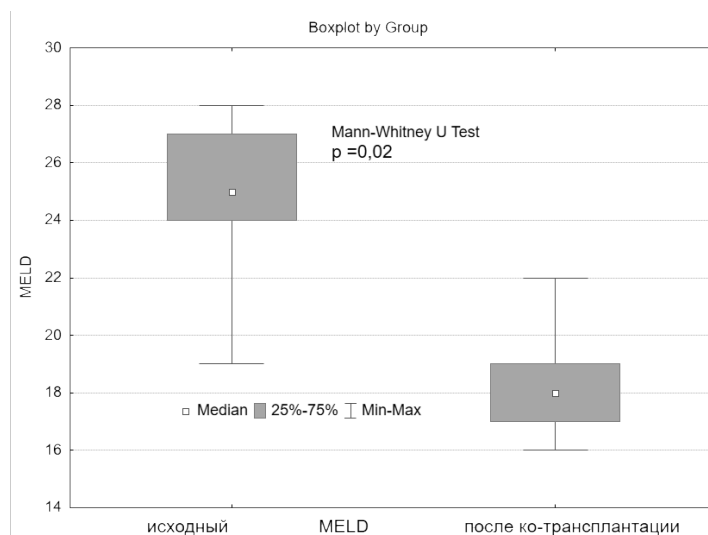


Рис. 3. Влияние совместной трансплантации гепатоцитов и МСК на балл MELD

Fig. 3. Effect of co-transplantation of hepatocytes and MSCs on the MELD score

Таким образом, интрапортальная совместная инфузия гепатоцитов и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани пациентам с печеночной недостаточностью на фоне цирроза и обширной резекции печени была безопасной в отношении нежелательных явлений и эффективной в отношении синтетической и метаболической функции печени.

Заключение

Полученные результаты позволяют констатировать следующее:

1. Культивирование выделенных из печени гепатоцитов без использования скаффолдов не обеспечивает увеличения количества клеток и приводит к снижению их жизнеспособности с 98 % (96–100 %) до 15 % (10–28 %) в день 1 и в день 7 соответственно. Синтез секреторных белков печени HGF ($p=0,06$) и ANGPTL4 ($p<0,03$) свидетельствует о возможности использования дифференцированных мезенхимальных стволовых клеток в качестве скаффолда для поддержания функциональных свойств изолированных гепатоцитов в процессе культивирования.

2. Высокий уровень секреции протеинов печени дифференцированными мезенхимальными стволовыми клетками и обеспечение ими функциональных и метаболических свойств изолированных гепатоцитов наблюдается в первые дни культивирования. Однако при более длительном культивировании рекомендуется в качестве скаффолда использовать недифференцированные МСК.

3. Совместная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток и гепатоцитов в качестве клеточной терапии при острой печеночной недостаточности обеспечивает оптимальное сочетание поддержки печени с противовоспалительным действием.

Библиографические ссылки

1. Enosawa S. Isolation of GMP Grade Human Hepatocytes from Remnant Liver Tissue of Living Donor Liver Transplantation // *Methods Mol Biol.* 2017. № 29. P. 231–245.
2. Alegre, F., Pelegrin, P., Feldstein, A. E. Inflammasomes in Liver Fibrosis // *Semin Liver Dis.* 2017. № 37. P. 119–127.
3. Krivenko S. I. Sposob polutheniia mezenhimal'nyh stvolovyh kletok iz zhirovoi tkani theloveka [The way to produce mesenchymal stem cells from human adipose tissue]. Patent RB. 2013. № 18051.
4. Ramos-Lopez O., Martinez-Lopez E., Roman S., et al. Genetic, metabolic and environmental factors involved in the development of liver cirrhosis in Mexico // *World J. Gastroenterol.* 2015. № 41. P. 11552–11566.
5. Dhawan A., Puppi J., Hughes R. D., et al. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010. № 7. P. 288–298.
6. Taléns-Visconti R., Bonora A., Jover R., et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells // *World J. Gastroenterol.* 2006. № 36. P. 5834–5845.
7. Isoda K., Kojima M., Takeda M., et al. Maintenance of hepatocyte functions by coculture with bone marrow stromal cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2004. № 97. P. 343–346.
8. Mohajerani S. A., Nourbakhsh M., Cadili A., et al. Transplant of primary human hepatocytes cocultured with bone marrow stromal cells to SCID Alb-uPA Mice // *Cell Medicine, part B of Cell Transplantation.* 2010. № 1. P. 81–92.
9. Fitzpatrick E., Wu Y., Dhadda P. Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes // *Cell Transplantation.* 2015. № 1. P. 73–83.
10. Gomez-Aristizabal A., Ng C., Ng J., et al. Effects of two mesenchymal cell populations on hepatocytes and lymphocytes // *Liver Transpl.* 2012. № 18. P. 1384–1394.
11. Aurich I., Mueller L. P., Aurich H., et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers // *Gut.* 2007. № 56. P. 405–415.
12. Banas A., Teratani T., Yamamoto Y., et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury // *Stem Cells.* 2008. № 26. P. 833–848.
13. Houllhan D. D., Newsome P. N. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease // *Gastroenterology.* 2008. № 135. P. 438–450.

References

1. Enosawa S. Isolation of GMP Grade Human Hepatocytes from Remnant Liver Tissue of Living Donor Liver Transplantation. *Methods Mol Biol.* 2017. No. 29. P. 231–245.
2. Alegre, F., Pelegrin, P., Feldstein, A. E. Inflammasomes in Liver Fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2017. No. 37. P. 119–127.
3. Krivenko S. I. Sposob polutheniia mezenhimal'nyh stvolovyh kletok iz zhirovoi tkani theloveka [The way to produce mesenchymal stem cells from human adipose tissue]. *Patent RB.* 2013. No. 18051.
4. Ramos-Lopez O., Martinez-Lopez E., Roman S., et al. Genetic, metabolic and environmental factors involved in the development of liver cirrhosis in Mexico. *World J. Gastroenterol.* 2015. No. 41. P. 11552–11566.
5. Dhawan A., Puppi J., Hughes R. D., et al. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010. No. 7. P. 288–298.
6. Taléns-Visconti R., Bonora A., Jover R., et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J. Gastroenterol.* 2006. No. 36. P. 5834–5845.

7. Isoda K., Kojima M., Takeda M., et al. Maintenance of hepatocyte functions by coculture with bone marrow stromal cells. *J. Biosci. Bioeng.* 2004. No. 97. P. 343–346.
8. Mohajerani S. A., Nourbakhsh M., Cadili A., et al. Transplant of primary human hepatocytes cocultured with bone marrow stromal cells to SCID Alb-uPA Mice. *Cell Medicine, part B of Cell Transplantation.* 2010. No. 1. P. 81–92.
9. Fitzpatrick E., Wu Y., Dhadda P. Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes. *Cell Transplantation.* 2015. No. 1. P. 73–83.
10. Gomez-Aristizabal A., Ng C., Ng J., et al. Effects of two mesenchymal cell populations on hepatocytes and lymphocytes. *Liver Transpl.* 2012. No. 18. P. 1384–1394.
11. Aurich I., Mueller L. P., Aurich H., et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut.* 2007. No. 56. P. 405–415.
12. Banas A., Teratani T., Yamamoto Y., et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells.* 2008. No. 26. P. 833–848.
13. Houllhan D. D., Newsome P. N. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology.* 2008. No. 135. P. 438–450.

Статья поступила в редколлегию 07.05.2018
Received by editorial board 07.05.2018