

Криоконсервированные клетки фетальной печени, заключенные в макропористые носители, способствуют восстановлению функций печени после поражения 2-ацетиламинофлуореном

UDC 618.393.018.2:615.014.41:616.36-08-092.9

D.V. GRITSAY, A.S. LEBEDINSKIY*, O.V. OCHENASHKO, YU.A. PETRENKO

Cryopreserved Fetal Liver Cells Immobilized in Macroporous Carriers Promote Liver Function Recovery After Injury With 2-Acetylaminofluorene

Исследовали влияние криоконсервированных клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых альгинатных носителях, на степень поражения печени крыс с моделью печеночной недостаточности, индуцируемой введением 2-ацетиламинофлуорена с последующим проведением частичной гепатэктомии. Показана способность иммобилизованных клеток печени ускорять восстановление гепатоспецифических параметров крови: содержания сывороточного альбумина, общего билирубина, активности аминотрансфераз. Полученные результаты свидетельствуют о положительном действии клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых носителях, на течение печеночной недостаточности и перспективности данного подхода для лечения заболеваний печени.

Ключевые слова: 2-ацетиламинофлуорен, частичная гепатэктомия, печеночная недостаточность, клеточная терапия, криоконсервированные клетки фетальной печени, макропористые носители, альгинаты.

Досліджували вплив криоконсервованих клітин фетальної печінки, іммобілізованих у макропористих альгінатних носіях, на ступінь ураження печінки щурів з моделлю печінкової недостатності, яка індукується введенням 2-ацетиламінофлуорену з наступним проведенням часткової гепатектомії. Показана здатність іммобілізованих клітин печінки прискорювати відновлення гепатоспецифічних параметрів крові: вмісту сироваткового альбуміну, загального білірубіну, активності аминотрансфераз. Отримані результати свідчать про позитивну дію клітин фетальної печінки, іммобілізованих у макропористих носіях, на перебіг печінкової недостатності і перспективність обраного підходу для лікування захворювань печінки.

Ключові слова: 2-ацетиламінофлуорен, часткова гепатектомія, печінкова недостатність, клітинна терапія, криоконсервовані клітини фетальної печінки, макропористі носії, альгинати.

The effect of cryopreserved fetal liver cells immobilized in macroporous alginate scaffolds on liver injury degree in rats with model of liver failure developed by administration of 2-acetylaminofluorene with subsequent partial hepatectomy. It was shown that immobilized fetal liver cells accelerated recovery of specific hepatic indices: serum albumin, total bilirubin content, aminotransferase activity. The results of this work indicate the positive effect of fetal liver cells seeded in macroporous scaffolds on course of liver failure and argue the availability of this approach for liver failure treatment.

Key words: 2-acetylaminofluorene, partial hepatectomy, liver failure, cell therapy, cryopreserved fetal liver cells, macroporous scaffold, alginate.

Поиск альтернативных методов коррекции тяжелых форм печеночной недостаточности остается актуальной проблемой современной медицины. Решение этой проблемы многие исследователи видят в использовании стволовых клеток. Одним из перспективных источников стволовых клеток гепатического ряда является плодовая печень. Трансплантация клеток фетальной печени – многообещающий метод поддержания её функции при многих заболеваниях [6, 8, 13]. Однако введение клеточных суспензий в кровотоки имеет ряд недостатков. Во-первых, при внутривенном введении лишь небольшая часть клеток попадает в орган-мишень. Так, для гепатоцитов при введении в портальную вену она колеблется в пределах 5–20%

The search for alternatives to correct severe forms of hepatic insufficiency has remained an actual problem of contemporary medicine. Many researchers suggest to solve this problem by using the stem cells. One of the perspective sources of hepatic stem cells is fetal liver. Transplantation of fetal liver cells is promising method to maintain liver function in many diseases [6, 8, 13]. However, the administration of cell suspensions into blood flow has some short-comings. The first one is that during intravenous injection just small amount of cells enters into target organ. So, for hepatocytes after portal vein injection it varies within 5–20% of total number of the injected donor cells [5, 9, 18] and for stem and progenitor cells which diameter is comparable with the one of capillaries it will be even less

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: alebedinsky@mail.ru

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 41 35, fax: +380 57 373 3084, e-mail: alebedinsky@mail.ru

от общего числа введенных донорских клеток [5, 9, 18], а для стволовых и прогениторных клеток, диаметр которых соизмерим с диаметром капилляров, она будет еще меньше [3, 4]. Во-вторых, поступив в кровоток, трансплантированные клетки могут вызывать тромбоз и эмболию в сосудах малого диаметра [10, 12].

Одним из подходов, позволяющих поддержать функцию печени и избежать перечисленных недостатков, может быть использование тканеинженерных конструкций, представляющих собой трехмерные носители (скаффолды), заселенные определенным типом клеток. При этом носитель должен быть нетоксичным, биосовместимым, обеспечивать трехмерную ориентацию клеток и выполнение ими специфических функций. Такими свойствами, в значительной степени, обладают трехмерные макропористые скаффолды из природных или искусственных материалов, которые позволяют иммобилизовать клетки в желаемой зоне, а также обеспечивать их иммуноизоляцию.

Среди материалов, используемых для разработки тканеинженерных конструкций, выделяется природный полимер альгинат, безопасность и эффективность которого были продемонстрированы при доставке клеток и белков в организм пациентов [19]. В экспериментах *in vitro* нами было показано, что макропористые скаффолды на основе альгината создают благоприятные условия для адгезии, роста и направленной мультилинейной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток [17]. Однако возможность использования макропористых носителей для разработки биоискусственных эквивалентов печени на основе фетальных клеток до настоящего времени не исследована.

Современные технологии криоконсервирования позволяют в значительной степени сохранить жизнеспособность клеточных суспензий, что позволяет разделить во времени этапы выделения и оценки клеток и их применения. Поэтому использование криоконсервирования и низкотемпературного хранения стало неотъемлемым этапом регенеративной медицины и клеточной трансплантации.

Печень крыс обладает высоким регенерационным потенциалом, который реализуется за счет деления зрелых гепатоцитов при нарушении целостности органа или удалении его части. Этот факт следует учитывать при выборе экспериментальной модели поражения печени. Формирование модели печеночной недостаточности у крыс обычно осуществляется путем введения гепатотоксинов (четырёххлористый углерод, D-галактозамин), которые вызывают обширное повреждение паренхимы печени, однако при этом способность гепатоцитов к делению сохраняется. Принципиально другой подход – применение веществ (ацетиламинофлуорен (ААФ), дипин, ретрорзин), которые мета-

[3, 4]. Secondly, when entered to blood flow the transplanted cells may cause thrombosis and embolism in the vessels of small diameter [10, 12].

One of the approaches allowing to maintain the liver function and avoid the mentioned short-comings may be the use of tissue-engineered constructs, representing the 3D carriers (scaffolds), seeded with certain cell type. Herewith the carrier should be non-toxic, biocompatible, provide 3D orientation of cells and performing by them of specific functions. These properties are inherent to 3D macroporous scaffolds either of natural or artificial materials, allowing the immobilization of the cells in a desired zone as well as providing their immune isolation.

Among the materials used for developing the tissue-engineered constructs the natural polymer, alginate is of interest, its efficiency was demonstrated when delivering the cells and proteins to patients' organism [19]. In the experiments *in vitro* we have shown that alginate-based macroporous scaffolds create favorable conditions for adhesion, growth and directed multilineal differentiation of mesenchymal stromal cells [17]. However, the possibility to use macroporous carriers for developing bioartificial equivalents of liver based in fetal cells has not been investigated till now.

Current cryopreservation technologies allow significant preservation of the viability of cell suspensions, that allow to spread in time the stages of isolation, assessment of cells and their application. Therefore the cryopreservation and low temperature storage has become an integral stage of regenerative medicine and cell transplantation.

Rat liver has a high regenerative potential, implementing due to division of mature hepatocytes after organ integrity impairment or removal of its part. This fact should be taken into account when selecting the experimental model for liver injury. Hepatic insufficiency model in rats is usually formed by administration of hepatotoxins (carbon tetrachloride, D-galactosamine), causing a vast injury of liver parenchyma, but thereat the ability of hepatocytes for division is kept. Principally another approach to the formation of the models of hepatic insufficiency is the application of the substances (acetylaminofluorene (AAF), dipine, retrorsine), metabolizing in liver with the formation of toxic agents, blocking proliferation of hepatocytes [20]. Combination of such an effect with partial (2/3) hepatectomy (PH) leads to the situation when rapid organ recovery due to the division of own hepatocytes is impossible and as a consequence a chronic hepatic insufficiency characterized with a disorder in main hepatic functions develops. When realizing these models in a recipient organism the favorable conditions to reveal the potential of the cells to be transplanted are created.

The research aim was to study the effect of fetal liver cells, immobilized in macroporous alginate carriers on the recovery of liver function of rats with AAF/PH.

болизируются в печени с образованием токсических агентов, блокирующих пролиферацию гепатоцитов [20]. Сочетание такого воздействия с удалением 2/3 части печени создает ситуацию, когда быстрое восстановление органа за счет деления собственных гепатоцитов невозможно, и, как следствие, развивается хроническая печеночная недостаточность, характеризующаяся нарушением основных функций печени. При воспроизведении таких моделей в организме реципиента создаются выгодные условия для раскрытия потенциала трансплантируемых клеток.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористые альгинатные носители, на восстановление функции печени крыс с моделью ААФ/ЧГЭ.

Материалы и методы

Исследования проводились на белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г. Эксперименты были проведены в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», одобренными IV Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2010 г.) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.).

Было сформировано 3 группы экспериментальных животных. Группу 1 составили животные, которые не подвергались никаким воздействиям – одновозрастная норма. У животных остальных двух групп была сформирована модель печеночной недостаточности. Для формирования модели ААФ вводился из расчета 30 мг/кг массы тела в течение 5 суток интрагастрально в виде масляного раствора. На 5-е сутки проводилась ЧГЭ по Хиггину, одновременно в большой сальник имплантировали альгинатные макропористые носители. Животным группы 2 (контроль) имплантировали носители без клеток, а животным группы 3 – носители с иммобилизованными в них клетками фетальной печени человека. Макропористые альгинатные скаффолды, полученные методом криотропного гелирования [17], перед использованием покрывали оболочкой из альгината и (для группы 3) заселяли клетками, как было описано ранее [2].

Клетки фетальной печени (КФП) выделяли неферментативным методом [16] из плодов человека первого триместра гестации, которые получали после письменного согласия пациента с соблюдением этических норм. Клеточную суспензию криоконсервировали с использованием программного замораживателя ЗП-10 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины) с использованием трехэтапной про-

Materials and methods

The studies were performed in white outbreed male rats of 250–300g in accordance with General ethical principles of the experiments in animals adopted by the 4th National Congress in Bioethics (Kiev, 2010) and coordinated with the statements of European Convention about the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

There were formed 3 groups of experimental animals. The group 1 comprised the animals not subjected to any effects, one-age norm. In the animals of other two groups the model of hepatic insufficiency was formed. To form the model the AAF was injected in respect of 30 mg/kg of body mass for 5 days intragastrically as oily solution. To the 5th day there was performed PH according to Higgins, alginate macroporous carriers were simultaneously implanted into greater omentum. The animals of group 2 (control) were implanted with the carriers without cells and the animals of group 3 obtained the carriers with immobilized cells of human fetal liver. Macroporous alginate scaffolds obtained by means of cryotropic gel formation [17] prior to the use were covered with alginate and seeded with the cells (for group 3) as reported earlier [2].

Fetal liver cells (FLCs) were isolated with non-enzyme method [16] from fetal fetuses of the first gestation trimester, derived after the written consent of the patient with keeping all ethical norms. Cell suspension was cryopreserved using programmable freezer ZP-10 (Special Construction and Technical Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) according to three-step freezing program [15] with initial rate of 1 deg/min down to -40°C and seeding at -7°C and with the rate of 10 deg/min from -40 down to -80°C with following plunging into liquid nitrogen. Cryopreservation medium comprised 250 mM sucrose, 5 mM KCL, 1.6 mM Na_2HPO_4 , 0.4 mM KH_2PO_4 , 0.8 mM MgCl_2 , 1.2 mM CaCl_2 (pH 7.4) and 10% DMSO. The cells were stored at -196°C under conditions of Low temperature bank of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine for 2–3 months. Prior to the application they were thawed, the viability was assessed by trypan blue staining and then they were seeded into macroporous carriers.

Observation period for animals after the model formation and implantation of macroporous sponges made 4 weeks. The blood was procured in animals for biochemical studies to the 7, 14, 21 and 28th days. In the resulted blood serum the content of albumin, total bilirubin, as well as activity of marker enzymes of liver lesion: alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AsT) were spectrophotometrically examined. For biochemical studies there were used

граммы замораживания [15] с начальной скоростью охлаждения 1 град/мин до -40°C и сидингом при -7°C , со скоростью 10 град/мин от -40°C до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. Среда криоконсервирования содержала 250 мМ сахарозы, 5 мМ KCl, 1,6 мМ Na_2HPO_4 , 0,4 мМ KH_2PO_4 , 0,8 мМ MgCl_2 , 1,2 мМ CaCl_2 (pH 7,4) и 10% ДМСО. Клетки хранили при -196°C в условиях низкотемпературного банка ИПКиК НАН Украины в течение 2–3 месяцев. Перед использованием клетки отогревали, определяли их жизнеспособность по прокрашиванию трипановым синим и заселяли в макропористые носители.

Период наблюдения за животными после формирования модели и имплантации макропористых губок составил 4 недели. На 7, 14, 21 и 28-е сутки проводился забор крови у животных для биохимических исследований. В полученной сыворотке крови спектрофотометрически определяли содержание альбумина, общего билирубина, а также активность маркерных ферментов повреждения печени: аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспартатаминотрансферазы (АсТ). Для биохимических исследований использовали стандартные биохимические наборы «Lachema BioLaTest» (Чехия).

Полученные результаты обрабатывали статистически при помощи компьютерного пакета программ «Origin 7.5». Данные оценивали, используя непараметрический метод Манна-Уитни. Данные представлены как $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

Жизнеспособность свежеизолированных КФП составляла $90,6 \pm 5,9\%$. Криоконсервирование суспензии клеток под защитой 10% ДМСО по трехэтапной программе замораживания достоверно ($p \leq 0,05$) снижало жизнеспособность до $73,0 \pm 3,6\%$.

Формирование модели ААФ/ЧГЭ сопровождалось значительной смертностью животных, пик которой приходился на 2–3-ю недели после частичной гепатэктомии. В группе 2, которой на фоне сформированной модели были введены макропористые носители без клеток, смертность к концу периода наблюдения составила 40%. В группе 3, которой имплантировали скаффолды с иммобилизованными клетками фетальной печени, смертность была значительно ниже и составила 20%.

Уровень альбумина (рис. 1) резко снижался после проведения ЧГЭ в обеих группах с минимумом на 7-е сутки. При этом в группе 2 показатель оставался достоверно ниже значений нормы (группа 1) в течение всего периода наблюдения. Введение КФП, иммобилизованных в макропористых носителях (группа 3), позволило избежать такого значительного снижения концентрации альбумина: показатель достоверно снижался только на 7-е и

standard biochemical kits Lachema BioLaTest (Czech Republic).

The obtained results were statistically processed with Origin 7.5 software. To assess the data there were used non-parametric Mann-Whitney test. The data are presented as $M \pm m$.

Results and discussion

Viability of freshly isolated FLCs made $90.6 \pm 5.9\%$. Cryopreservation of cell suspension under protection of 10% DMSO according to three-stage freezing program statistically and significantly ($p \leq 0.05$) reduced viability down to $73.0 \pm 3.6\%$.

Formation of AAF/PH model was accompanied by significant mortality of animals, the peak of which felt within the 2nd–3rd weeks after partial hepatectomy. In group 2, where the animals on the background of the formed model underwent the transplantation of cell free macroporous carriers, the death rate to the end of observation period made 40%. In the group 3, where the scaffolds with immobilized fetal liver cells were implanted, the mortality was significantly lower (20%).

The albumin level (Fig. 1) sharply reduced after PH in the groups 2 and 3 with the minimum to the 7th day. Thereat, in group 2 the index remained statistically lower than the norm (group 1) during the whole obser-

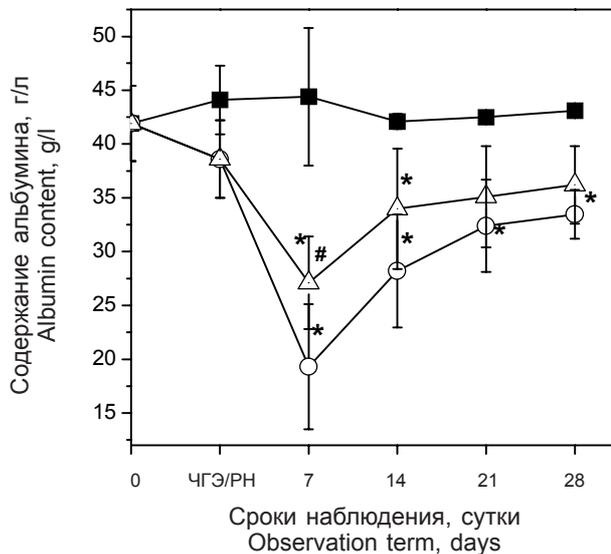


Рис. 1. Содержание альбумина в сыворотке крови крыс с моделью ААФ/ЧГЭ после имплантации в сальник криоконсервированных клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых альгинатных носителях: ■ – группа 1; △ – группа 2; ○ – группа 3; * – $p \leq 0,05$ относительно группы 1; # – $p \leq 0,05$ относительно группы 2.

Fig. 1. Albumin content in rat blood serum with AAF/PH model after implantation into omentum of cryopreserved fetal liver cells immobilized in alginate macroporous carriers; ■ – group 1; △ – group 2; ○ – group 3; * – $p \leq 0.05$ as for the group 1; # – $p \leq 0.05$ as for the group 2.

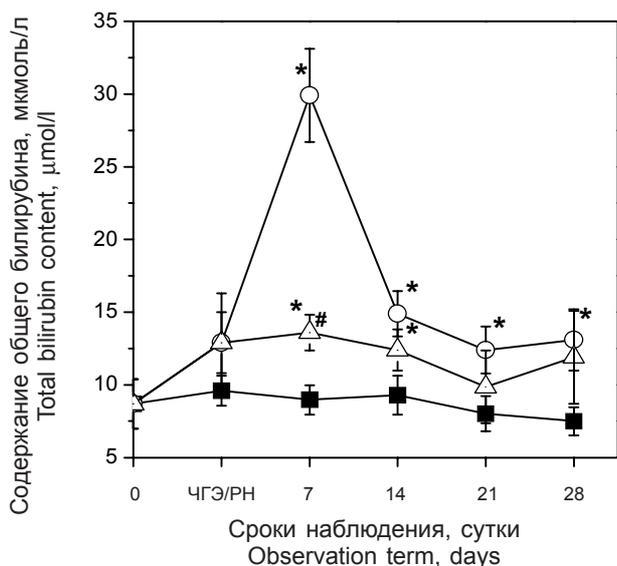


Рис. 2. Содержание общего билирубина в сыворотке крови крыс с моделью ААФ/ЧГЭ после имплантации в сальник криоконсервированных клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых альгинатных носителях: ■ – группа 1; △ – группа 2; ○ – группа 3; * – $p \leq 0,05$ относительно группы 1; # – $p \leq 0,05$ относительно группы 2.

Fig. 2. Total bilirubin content in rat blood serum with AAF/PH model after implantation into omentum of cryopreserved fetal liver cells immobilized in alginate macroporous carriers; ■ – group 1; △ – group 2; ○ – group 3; * – $p \leq 0.05$ as for the group 1; # – $p \leq 0.05$ as for the group 2.

14-е сутки. Следует отметить, что пик падения показателя на 7-е сутки, который наблюдался в группе 2 (контрольной) сглаживался в ответ на введение иммобилизованных КФП в группе 3 ($p \leq 0,05$).

Схожая динамика наблюдалась в содержании общего билирубина (рис. 2). На 7-е сутки в группе 2 (контрольной) показатель резко повышался (в 3,3 раза выше значений группы 1, интактной). В течение остального периода наблюдения отмечалось умеренное повышение показателя (в 1,3–1,6 раза выше нормы). Имплантация макропористых альгинатных носителей с иммобилизованными КФП (группа 3) предотвращала пикообразное повышение показателя на 7-е сутки после гепатэктомии ($p \leq 0,05$ по сравнению с группой 2, контрольной). Более того, введение КФП в группе 3 позволило нормализовать показатель уже к 21-м суткам, чего не наблюдалось в контроле (группа 2).

Активность АсТ (рис. 3) в группе 2 была выше нормальных значений примерно в 1,5 раза на 7–21-е сутки после ЧГЭ, а к 28-м суткам нормализовалась. После имплантации носителей с иммобилизованными КФП повышение данного показателя было выражено значительно меньше и нормализовалось уже к 21-м суткам наблюдения.

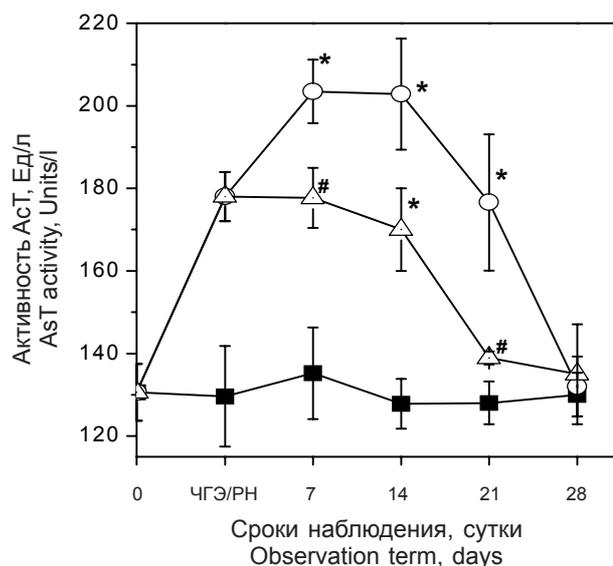


Рис. 3. Активность АсТ в сыворотке крови крыс с моделью ААФ/ЧГЭ после имплантации в сальник криоконсервированных клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых альгинатных носителях: ■ – группа 1; △ – группа 2; ○ – группа 3; * – $p \leq 0,05$ относительно группы 1; # – $p \leq 0,05$ относительно группы 2.

Fig. 3. Activity of AsT in rat blood serum with AAF/PH model after implantation into omentum of cryopreserved fetal liver cells immobilized in alginate macroporous carriers; ■ – group 1; △ – group 2; ○ – group 3; * – $p \leq 0.05$ as for the group 1; # – $p \leq 0.05$ as for the group 2.

Administration of FLCs immobilized in macroporous carriers (group 3) allowed the avoiding of such a considerable decrease of albumin concentration: the index statistically and significantly reduced only to the 7th and 14th days. It should be noted that the maximum fall of the index to the 7th day which was observed in group 2 (control), was smoothed in response to the treatment with immobilized FLCs in the group 3 ($p \leq 0.05$).

The similar dynamics was noted in the content of total bilirubin (Fig. 2). To the 7th day in the group 2 (control) the index sharply increased (in 3.3 times above the values of group 1). During the remained period of observation the index was still moderately increased (in 1.3–1.6 times above the norm). Implantation of macroporous alginate carriers with immobilized FLCs (group 3) prevented a peak-like rise in the index to the 7th day after hepatectomy ($p \leq 0.05$ vs. group 2 (control)). Moreover, the FLCs introduction in group 3 enabled the normalization of the index already to the 21st day which was not observed in the control (group 2).

Activity of AsT (Fig. 3) in group 2 was higher than normal values approximately in 1.5 times to the 7–21st days after PH and to the 28th day it normalized. After implantation of the carriers with immobilized FLC the

Изменения активности АлТ носили сходный характер (рис. 4). В группе 2 данный показатель повышался вплоть до 21-х суток после гепатэктомии, а затем резко снижался до уровня контроля. Имплантация макропористых альгинатных носителей с иммобилизованными КФП нивелировала это повышение.

Ранее в нашей лаборатории на модели ЧГЭ была выявлена способность КФП стимулировать синтез ДНК и таким образом ускорять процессы регенерации печени [1]. При проведении ЧГЭ интактным животным происходит быстрое, в пределах 7–10 суток, восстановление клеточной массы печени за счет пролиферации паренхиматозных клеток печени, в связи с чем органоспецифические функции также быстро восстанавливаются.

Использованная в данном исследовании модель исключает возможность быстрой регенерации печени за счет пролиферации гепатоцитов, так как она ингибируется введением ААФ [7, 14], который метаболизируется в гепатоцитах с образованием токсичного продукта, связывающегося с ДНК, что приводит к подавлению способности гепатоцитов к пролиферации [11]. ЧГЭ в данном случае, с одной стороны, является мощным стимулом к пролиферации, а с другой – увеличивает метаболическую нагрузку на оставшиеся клетки печеночной паренхимы, что ускоряет их гибель. Клетки, трансплантированные реципиентам с такой моделью, попадают в условия, в которых имеется достаточное количество биологически активных веществ, стимулирующих их пролиферацию и/или дифференцировку [21]. Таким образом, введение ААФ перед проведением ЧГЭ, с одной стороны, формирует модель поражения печени, сопровождающуюся серьезными структурными и функциональными нарушениями в органе [14], позволяющими более четко наблюдать эффекты от клеточной трансплантации, с другой – создает стимул для развития введенных клеток. Результаты проведенных нами исследований на модели ААФ/ЧГЭ свидетельствуют о глубоких нарушениях биохимических показателей печени. Резкое пикообразное повышение содержания общего билирубина и снижение концентрации сывороточного альбумина на 7-е сутки после ЧГЭ у животных группы 2, которым имплантировали скаффолды без клеток, очевидно, отражает острую фазу патологического процесса, когда функция печени страдает больше всего. Данные показатели связаны, поскольку именно альбумином осуществляется транспорт билирубина. Тем не менее падение уровня альбумина, вероятно, свидетельствует о нарушении синтетической функции печени, а повышение уровня билирубина указывает на нарушение детоксикационной функции. В то же время повышение сывороточной

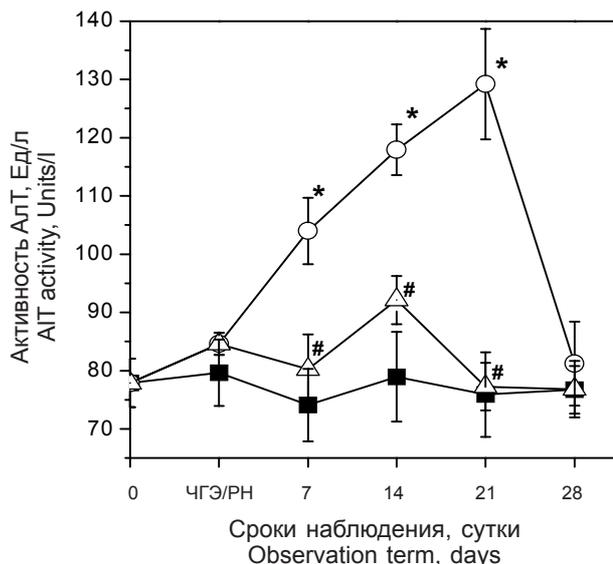


Рис. 4. Активность АлТ в сыворотке крови крыс с моделью ААФ/ЧГЭ после имплантации в сальник криоконсервированных клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых альгинатных носителях: ■ – группа 1; △ – группа 2; ○ – группа 3; * – $p \leq 0,05$ относительно группы 1; # – $p \leq 0,05$ относительно группы 2.

Fig. 4. Activity of AIT in rat blood serum with AAF/PH model after implantation into omentum of cryopreserved fetal liver cells immobilized in alginate macroporous carriers; ■ – group 1; △ – group 2; ○ – group 3; * – $p \leq 0.05$ as for the group 1; # – $p \leq 0.05$ as for the group 2.

rise of this index was manifested in less extent and normalized already to the 21st observation day.

The changes in activity of AIT were of the same character (Fig. 4). In group 2 this index increased up to the 21st day after hepatectomy and then sharply reduced to the control level. Implantation of macroporous alginate carriers with immobilized FLCs eliminated this rise.

Previously at our laboratory it was found in PH model the ability of FLCs to stimulate DNA synthesis and thereby to accelerate the liver regeneration processes [1]. After performing PH in intact animals a rapid recovery within 7–10 days of liver cell amount due to proliferation of parenchyma cells took place, as well as quick restoration of organ specific functions.

The used in this research model excludes the possibility of rapid liver regeneration due to proliferation of hepatocytes, which is inhibited by AAF administration [7, 14]. AAF is metabolized in hepatocytes with the formation of DNA binding toxic product, that leads to suppression of the ability of hepatocytes to proliferate [11]. In this case PH on the one hand is a powerful stimulus to proliferation and on the other hand it increases metabolic loading to the remaining cells of hepatic parenchyma, accelerating their death. The cells transplanted to recipients with such a model enter the

активности маркерных ферментов повреждения печени – аминотрансфераз – было наиболее выражено в этой группе в более отдаленные сроки – с 7 по 21-е сутки после ЧГЭ. Увеличение активностей АлТ и АсТ, вероятно, отражает постепенный процесс гибели паренхиматозных клеток печени, не справляющихся с метаболической нагрузкой. Введение иммобилизованных в макропористые скаффолды КФП (группа 3) предотвращало пикообразное повышение содержания общего билирубина и снижение концентрации альбумина, более того, в отличие от группы 2, эти показатели нормализовались к 28-м суткам наблюдения. Аналогично в группе 3 было менее выражено повышение активности аминотрансфераз, что, очевидно, свидетельствует о меньшей интенсивности некротических процессов в печеночной паренхиме животных.

Приведенные результаты могут свидетельствовать, что клетки, иммобилизованные в макропористых носителях, оказывают эффект на течение патологического процесса. Это влияние может быть обусловлено активацией пролиферации и дифференцировки овальных клеток реципиента. В таком случае позитивный эффект, вероятно, обусловлен действием синтезированных в клетках биологически активных веществ. При этом проведенные исследования не позволяют выявить, реализуется ли действие этих биологически активных веществ на уровне овальных клеток или направлено на поддержание жизнеспособности и функциональной активности зрелых гепатоцитов. Для выяснения механизмов позитивного действия КФП, заключенных в макропористые носители, на течение патологического процесса требуются дополнительные исследования структурных изменений печени.

Другим направлением развития настоящей работы является гистологическое исследование клеток в составе макропористых носителей после введения реципиенту. Ранее в нашей лаборатории было показано, что клетки выживают и размножаются при объемном культивировании в составе макропористых губок [17], однако нельзя утверждать, что они поведут себя аналогичным образом в данных экспериментальных условиях. Во-первых, в культуре клетки находятся в стационарных условиях снабжения питательными веществами и кислородом, чего нельзя обеспечить в системе *in vivo*. Во-вторых, в настоящей работе макропористые альгинатные скаффолды были заселены клетками другого типа, более чувствительными к парциальному давлению кислорода. В-третьих, в работе использовали криоконсервированные клетки. Тот факт, что после деконсервирования суспензия содержала более 70% сохранных клеток, не означает, что клетки оставались жизнеспособными в тече-

conditions where an essential amount of biologically active substances is present, stimulating their proliferation and/or differentiation [21]. Thus the introduction of AAF prior to PH on the one hand forms the model of liver injury, accompanied by severe structural and functional disorders in organ [14], allowing more clear observation of the effects resulted from cell transplantation and on the other hand creates the stimulus for development of the introduced cells. The results of performed by us studies in the model of AAF/PH testify to a deep impairments of liver biochemical indices. An abrupt peak-like rise in the content of total bilirubin and reduction of serum albumin concentration to the 7th day after PH in the animals of group 2, implanted with cell free scaffolds apparently reflects an acute phase of pathological process when liver function suffers most. The fall of albumin level testifies likely to a disorder of liver synthetic function and the rise in bilirubin level points to a damaged detoxication function. At the same time the rise in serum activity of marker enzymes of liver injury, the aminotransferases, was the most manifested in this group in more distant terms, from 7 to 21st days after PH. The increased activities of ALT and AsT obviously reflect the gradual process of death of parenchymatous cells, not endured the metabolic loading. Implantation of FLCs immobilized in macroporous scaffolds (group 3) prevented a peak-like rise in the content of total bilirubin and reduction of albumin concentration, moreover in contrast to group 2 these indices normalized to the 28th observation day. Similar to group 3 the rise in activity of aminotransferases was less manifested, likely testifying to a lower intensity of necrotic processes in hepatic parenchyma of animals.

The presented results may testify to the fact that the cells immobilized in macroporous carriers affect the course of pathological process. This effect may be stipulated by activated proliferation and differentiation of recipient oval cells. In that case a positive effect may be conditioned by the effect of biologically active substances synthesized in cells. Herewith the performed studies do not allow the revealing whether the effect of these biologically active substances is implemented at the level of oval cells or is directed to the maintenance of viability and functional activity of mature hepatocytes. To elucidate the mechanisms of positive effect of FLCs enclosed into macroporous carriers on the course of pathological process additional investigations of liver structural changes are needed.

Other direction of this research development is histological study of cells as components of macroporous carriers after administration to a recipient. The previous studies performed at our laboratory showed that cells survive and propagate during 3D culturing in macroporous sponges [17], but it is impossible to state that their behavior would be the same under these experi-

ние долгосрочного пребывания в организме, тем более, что они находились в агрессивной среде, обусловленной течением патологического процесса. Определение морфофункционального состояния клеток в составе макропористых носителей после имплантации в организм реципиента и возможностей его коррекции является важным этапом на пути развития тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Выводы

Проведенные исследования показали, что ксенотрансплантация криоконсервированных клеток фетальной печени человека, полученных из плодов первого триместра гестации и заключенных в макропористые скаффолды из альгината, в значительной степени способствует восстановлению функции печени, нарушенной сочетанным действием ААФ и ЧГЭ, что проявляется в улучшении гепатоспецифических показателей крови.

В целом результаты настоящей работы свидетельствуют о положительном действии клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых носителях, на течение печеночной недостаточности и перспективности данного подхода для лечения заболеваний печени.

Литература

1. Оченашко О.В., Божков А.И., Петренко А.Ю. Влияние эмбриональных клеток печени человека на синтез ДНК и яРНК в регенерирующей печени крыс // Укр. біохім. журнал. – 2002. – Т. 74, №3. – С. 20–25.
2. Петренко Ю.А., Иванов Р.В., Лозинский В.И., Петренко А.Ю. Сравнительное исследование методов заселения макропористых носителей на основе альгинатного криогеля мезенхимальными стромальными клетками костного мозга человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – №4. – С. 225–228.
3. Cheng K., Benten D., Bhargava K. et al. Hepatic targeting and biodistribution of human fetal liver stem/progenitor cells and adult hepatocytes in mice // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 50, №4. – P. 1194–1203.
4. Darinskas A., Gasparaviciute R., Malisauskas M. et al. Engrafting fetal liver cells into multiple tissues of healthy adult mice without the use of immunosuppressants // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2007. – Vol. 12. – P. 422–434.
5. De Roos W.K., von Geusau B.A., Bouwman E. et al. Monitoring engraftment of transplanted hepatocytes in recipient liver with 5-bromo-2'-deoxyuridine // *Transplantation*. – 1997. – Vol. 63, №4. – P. 513–518.
6. Duncan A. W., Dorrell C., Grompe M. Stem cells and liver regeneration // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 137, №2. – P. 466–481.
7. Dusabineza A.C., Van Hul N.K., Abarca-Quinones J. et al. Participation of liver progenitor cells in liver regeneration: lack of evidence in the AAF/PH rat model // *Lab. Invest.* – 2011. – Vol. 92. – P. 72–81.
8. Kakinuma S., Nakauchi H., Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease // *J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 44, №3. – P. 167–172.

mental conditions. Firstly, in the culture the cells are in conditions of constant supplying of nutrients and oxygen, which can not be provided *in vivo*. Secondly, in this study the macroporous alginate scaffolds were seeded with the cells of other type being more sensitive to partial pressure of oxygen. Thirdly, the research was conducted with cryopreserved cells. The fact that after freeze-thawing the suspension contained more than 70% of survived cells does not mean that the cells would remain viable during long-term staying in an organism, moreover they would be in aggressive medium, resulted from pathological process course. The examining of morphofunctional state of cells inside the macroporous carriers and possibilities of its correction is an important stage in the progress of tissue engineering and regenerative medicine.

Conclusions

The performed studies have shown that xenogeneic transplantation of cryopreserved human fetal liver cells derived from fetuses of the first trimester and immobilized in macroporous alginate scaffolds in a great extent contribute to a recovery of liver function disordered by a combined effect of AAF and PH, manifesting in improvement of hepatospecific blood indices.

Generally the results of present work testify to a positive effect of fetal liver cells immobilized in macroporous carriers on the course of hepatic insufficiency and prospects of this research for treating hepatic diseases.

References

1. Ochenashko O.V., Bozhkov A.I., Petrenko A.Yu. Effect of human embryonic liver cells on DNA and nRNA synthesis in rats' regenerating liver // *Ukr. Biokhim. Zhurnal*. – 2002. – Vol. 74, N3. – P. 20–25.
2. Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Petrenko A.Yu. Comparative study of seeding methods of widely porous carriers based on alginate cryogel with mesenchymal stromal cells of human bone marrow // *Kletochnye Tekhnologii v Biologii i Meditsine*. – 2010. – N4. – P. 225–228.
3. Cheng K., Benten D., Bhargava K. et al. Hepatic targeting and biodistribution of human fetal liver stem/progenitor cells and adult hepatocytes in mice // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 50, N4. – P. 1194–1203.
4. Darinskas A., Gasparaviciute R., Malisauskas M. et al. Engrafting fetal liver cells into multiple tissues of healthy adult mice without the use of immunosuppressants // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2007. – Vol. 12. – P. 422–434.
5. De Roos W.K., von Geusau B.A., Bouwman E. et al. Monitoring engraftment of transplanted hepatocytes in recipient liver with 5-bromo-2'-deoxyuridine // *Transplantation*. – 1997. – Vol. 63, N4. – P. 513–518.
6. Duncan A. W., Dorrell C., Grompe M. Stem cells and liver regeneration // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 137, N2. – P. 466–481.
7. Dusabineza A.C., Van Hul N.K., Abarca-Quinones J. et al. Participation of liver progenitor cells in liver regeneration: lack of evidence in the AAF/PH rat model // *Lab. Invest.* – 2011. – Vol. 92. – P. 72–81.

9. Kocken J.M., Bouwman E., Borel Rinkes I.H. et al. Observations on initial cell loss after intraportal hepatocyte transplantation of 5'-bromo-deoxy-uridine-labeled hepatocytes // *Eur. Surg. Res.* – 1997. – Vol. 29, №6. – P. 411–420.
10. Kocken J.M., Bouwman E., Scheringa M. et al. Acute death after intraportal hepatocyte transplantation in an allogeneic rat strain combination: a possible role for complement activation // *Transplant. Proc.* – 1997. – Vol. 29. – P. 2067–2068.
11. Meerman J.H.N., Van de Poll M.L.M. Metabolic activation routes of arylamines and their genotoxic effects // *Environmental Health Perspectives.* – 1994. – Vol. 102, №6. – P. 153–159.
12. Muraca M., Neri D., Parenti A. et al. Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study // *Transplantation.* – 2002. – Vol. 27, №73(6). – P. 890–896.
13. Oertel M., Shafritz D.A. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1782. – P. 61–74.
14. Park D.Y., Suh K.S. Transforming growth factor- β 1 protein, proliferation and apoptosis of oval cells in acetylaminofluorene-induced rat liver regeneration // *J. Korean Med. Sci.* – 1999. – Vol. 14. – P. 531–538.
15. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.* – 1991. – Vol. 194, №2. – P. 326–332.
16. Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Grischuk V.P. et al. Separation of intact and damaged hepatocytes in sucrose following non-enzymatic liver perfusion // *Cytotechnology.* – 1995. – Vol. 17. – P. 127–131.
17. Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Yu., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells // *J. Mater. Sci: Mater. Med.* – 2011. – Vol. 22, №6. – P. 1529–1540.
18. Saeter G., Schwarze P.E., Nesland J.M., Seglen P.O. Transplantation of preneoplastic rat hepatocytes by intraportal injection // *Toxicol. Pathol.* – 1987. – Vol. 15, №1. – P. 78–81.
19. Senni K., Pereira J., Gueniche F. et al. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering // *Mar. Drugs.* – 2011. – №9. – P. 1664–1681.
20. Shafritz D.A., Dabeva M.D. Liver stem cells and model systems for liver repopulation // *J. Hepatol.* – 2002. – Vol. 36, №4. – P. 552–564.
21. Zimmerman A. Liver regeneration: the emergence of new pathways // *Med. Sci. Monit.* – 2002. – Vol. 8, №3. – P. 53–63.
8. Kakinuma S., Nakauchi H., Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease // *J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 44, N3. – P. 167–172.
9. Kocken J.M., Bouwman E., Borel Rinkes I.H. et al. Observations on initial cell loss after intraportal hepatocyte transplantation of 5'-bromo-deoxy-uridine-labeled hepatocytes // *Eur. Surg. Res.* – 1997. – Vol. 29, №6. – P. 411–420.
10. Kocken J.M., Bouwman E., Scheringa M. et al. Acute death after intraportal hepatocyte transplantation in an allogeneic rat strain combination: a possible role for complement activation // *Transplant. Proc.* – 1997. – Vol. 29. – P. 2067–2068.
11. Meerman J.H.N., Van de Poll M.L.M. Metabolic activation routes of arylamines and their genotoxic effects // *Environmental Health Perspectives.* – 1994. – Vol. 102, №6. – P. 153–159.
12. Muraca M., Neri D., Parenti A. et al. Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study // *Transplantation.* – 2002. – Vol. 27, №73(6). – P. 890–896.
13. Oertel M., Shafritz D.A. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1782. – P. 61–74.
14. Park D.Y., Suh K.S. Transforming growth factor- β 1 protein, proliferation and apoptosis of oval cells in acetylaminofluorene-induced rat liver regeneration // *J. Korean Med. Sci.* – 1999. – Vol. 14. – P. 531–538.
15. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.* – 1991. – Vol. 194, №2. – P. 326–332.
16. Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Grischuk V.P. et al. Separation of intact and damaged hepatocytes in sucrose following non-enzymatic liver perfusion // *Cytotechnology.* – 1995. – Vol. 17. – P. 127–131.
17. Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Yu., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells // *J. Mater. Sci: Mater. Med.* – 2011. – Vol. 22, №6. – P. 1529–1540.
18. Saeter G., Schwarze P.E., Nesland J.M., Seglen P.O. Transplantation of preneoplastic rat hepatocytes by intraportal injection // *Toxicol. Pathol.* – 1987. – Vol. 15, №1. – P. 78–81.
19. Senni K., Pereira J., Gueniche F. et al. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering // *Mar. Drugs.* – 2011. – №9. – P. 1664–1681.
20. Shafritz D.A., Dabeva M.D. Liver stem cells and model systems for liver repopulation. // *J. Hepatol.* – 2002. – Vol. 36, №4. – P. 552–564.
21. Zimmerman A. Liver regeneration: the emergence of new pathways // *Med. Sci. Monit.* – 2002. – Vol. 8, №3. – P. 53–63.

Поступила 24.01.2012

Accepted 24.01.2012