

## ОБЗОРЫ

УДК 616.1.9-055.5

©Долгих

### СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ИМПЛАНТИРУЕМОЙ БИОИСКУССТВЕННОЙ ПЕЧЕНИ.

*М.С. Долгих*

ФГУ Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов Федерального агентства высокотехнологичной медицинской помощи, Москва, Щукинская 1, тел.: 8-499-190-45-31 (42-67); эл. почта: Biolab@online.ru

Трансплантация печени остается наиболее эффективным методом лечения острых болезней печени. Перспективным средством терапии печеночной недостаточности может быть трансплантация гепатоцитов. Представленный обзор анализирует экспериментальные подходы и перспективы использования зрелых гепатоцитов для создания имплантируемого модуля биоискусственной печени с целью лечения печеночной недостаточности.

**Ключевые слова:** клеточная терапия, гепатоциты, трансплантация, печеночная недостаточность.

**ВВЕДЕНИЕ.** Совершенствование методов лечения острой и хронической печеночной недостаточности (ПН) является актуальной задачей современной медицины. По данным ВОЗ, смертность от хронической ПН занимает 5 место среди других патологий. Смертность от острой недостаточности печени достигает 70-80% [1, 2]. Ортотопическая и вспомогательная (когда сохраняется собственная печень) трансплантация печени остается наиболее эффективным методом помощи пациенту при необратимом повреждении этого органа [1, 2].

Возрастающая во всем мире нехватка донорского материала, а также значительные экономические затраты, связанные с пересадкой печени, необходимость иммуносупрессии и большой риск для реципиентов приводят к необходимости развивать клеточные технологии и методы тканевой инженерии.

Для лечения заболеваний печени разрабатываются клеточные технологии: экстракорпоральная искусственная печень, клеточная трансплантация и тканевая инженерия. Перспективным средством терапии печеночной недостаточности может быть трансплантация гепатоцитов, особенно в случае метаболических болезней печени, для коррекции которых требуется меньшее количество трансплантируемых клеток. Генная терапия печени позволит селективно лечить нарушения, связанные с дефицитом определенных белков (например, альфа-1-антитрипсина), тирозинемии и других. В этом случае предполагаемый подход будет заключаться в комбинации трансфера гена *ex vivo* и аутотрансплантации трансфицированных гепатоцитов. Во всех случаях необходимым требованием является адекватная поддержка выживания и пролиферации гепатоцитов и обеспечение стабильности их специфических функций.

#### **1. ПРОБЛЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ.**

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 некоторые функции гепатоцитов, такие как секреция альбумина, более стабильны, другие, как, например, синтез цитохрома P450, быстро уменьшаются в стандартных условиях культивирования. Эти 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 *ex vivo* [3, 4].

Большое количество работ [3, 5-8] посвящено культивированию гепатоцитов. В этих работах авторы анализируют “поведение” гепатоцитов в различных средах и на различных носителях (природных и синтетических, обладающих в свою очередь разными физико-химическими свойствами), а также подбору условий, обеспечивающих большие сроки выживаемости гепатоцитов при сохранении ими специфических функций (введение в среду дополнительных факторов, сокультивирование с другими типами клеток, получение агрегатов и сфероидов, культивирование на трехмерных подложках, имитирующих экстрацеллюлярный матрикс, обеспечение селективных преимуществ при трансплантации *in vivo*).

### 1.1. Подбор сред.

Основная задача при культивировании гепатоцитов заключается в обеспечении не только их выживания и пролиферативной способности, но и в сохранении ими фенотипа и функциональности. Задачу успешного культивирования гепатоцитов с целью их накопления решают с помощью специальных обогащённых сред, добавляя ростовые факторы, гормоны (инсулин, дексаметазон, глюкагон, EGF (epidermal growth factor) и т.д.) или генетическими манипуляциями [3, 5-8]. Представляют интерес бессывороточные среды, содержащие фактор роста эпидермиса. HGF (hepatic growth factor) и никотинамид, как было показано, поддерживают функцию гепатоцитов и даже индуцируют пролиферацию *in vitro* [3, 5-8].

Jasmund и соавт. (2007 г.) культивировали гепатоциты свиньи и человека на 7 различных средах – DMEM, ExCell-400, HepatoZYME-SMF, L-15 Leibovitz, SF-3, Waymouth и William’s E, а также изучали влияние сыворотки, фибронектина и биоматрикса (естественное окружение гепатоцитов в нативной печени, основным фактором которого является коллаген) при культивировании гепатоцитов в виде сандвич-культур (между слоями коллагена). Для определения функциональной активности гепатоцитов определяли альбумин, мочевины, холестерол, АСТ, АЛТ, ЛДГ и концентрации триглицеридов на протяжении 14 дней. Для обоих типов гепатоцитов (свиньи и человека) наилучшие результаты были получены со средой SF-3 [4].

Кислород является важным компонентом клеточного микроокружения, являющимся посредником в клеточном выживании, дифференцировке и функциональной активности. Снабжение кислородом является лимитирующим фактором при культивировании активно метаболизирующих клеток, таких как гепатоциты [9-11]. Nahmias и соавт. [10] культивировали гепатоциты крысы на коллагеновом геле с внедрённым в него носителем кислорода на фторуглеродной основе. Концентрация кислорода в культуре возросла в 6 раз, причём выживаемость и гепатоспецифичная функциональность клеток значительно увеличивалась. Активность цитохрома P450 IA1 (одного из изоэнзимов P450) при этом составила 140% в бессывороточной среде и 820% в среде, содержащей сыворотку. Значительно более высокий уровень гепатоцеллюлярных функций наблюдали во время долгосрочного культивирования (11 дней). Секреция альбумина увеличивалась на 350% в бессывороточной среде и на 166% в среде с добавлением сыворотки. Секреция мочевины увеличивалась на 79%

в бессывороточных культурах и на 76% в культурах с сывороткой. Культивирование гепатоцитов на матриксе, обогащенном кислородом, имитирует реальное микроокружение печени, богатое кислородом, и обеспечивает простой метод для получения более полноценной и долгосрочной функции гепатоцитов [10].

Kim S. с соавт. [12] году успешно культивировали гепатоциты крысы в проточных условиях на 3х-мерном матриксе из сополимера поли-молочной и поли-гликолевой кислот с внутренней сетью каналов. Авторы использовали среду William's с пируватом натрия для выделения гепатоцитов и среду Dulbecco с 10% сывороткой, дексаметазоном и инсулином для кокультивирования гепатоцитов и непаренхиматозных клеток печени. Метод проточного культивирования способствовал лучшему прикреплению и выживанию клеток до начала васкуляризации, а также способствовал метаболизму гепатоцитов и, в частности, синтезу альбумина по сравнению с методом статичного культивирования. Выработка альбумина увеличивалась в 3 раза по сравнению с обычным культивированием [12]. Последующее исследование культивирования гепатоцитов крысы в потоке показало, что на 7й день гепатоциты сохраняют свою метаболическую активность и синтезируют альбумин, причем непаренхиматозные клетки и синусоидальные эндотелиальные клетки при кокультивировании с ними гепатоцитов не играли существенной роли в выживании гепатоцитов и не увеличивали синтез альбумина в условиях проточного культивирования [13].

Большинство экспериментальных исследований выполнено на гепатоцитах крысы. Однако был показан ряд межвидовых метаболических отличий гепатоцитов крысы и человека. Поэтому в последнее время большое внимание уделяется разработке методов культивирования именно гепатоцитов человека и способов их выживания и сохранения функциональной активности *in vitro u in vivo*.

Auth M.K. с соавт. [14] культивировали гепатоциты человека в бифазной технике последовательно на 2-х средах - на обогащённой гормонами дифференцировочной среде (содержащей никотинамид, инсулин, трансферрин, селен и дексаметазон) и на активирующей среде (содержащей фактор роста гепатоцитов, фактор роста эпидермиса и гранулоцит-макрофаг-колоний-стимулирующий фактор). Гепатоциты подвергались повторным циклам активации и ре-дифференцировки. Авторы оценивали влияние бифазной техники на экспрессию, распределение и активацию рецепторов ростовых факторов (MET и EGFR) и характеристических цитокератинов (СК-19 и СК-18) и показали, что бифазная техника помогала преодолеть де-дифференцировку, которая происходит при длительном стимулировании посредством ростовых факторов [14].

Большое количество работ, посвященных культивированию гепатоцитов, означает, что задача их культивирования остается непростой. Это связано прежде всего с разными условиями выделения первичных клеток из печени (метод перфузии печени и метод деструкции). При выделении, особенно методом деструкции, большая часть зрелых гепатоцитов гибнет. Выжившие клетки представляют собой неоднородную популяцию, в которой присутствуют зрелые гепатоциты, прогениторные клетки и стволовые клетки, например, овальные клетки, различные фракции которых также несут разные наборы маркеров. Кроме того, могут присутствовать и другие клетки печени (гепатоциты составляют только 60% её состава), например овальные. При культивировании происходит отбор клеток и постепенное замещение печеночных клеток фибробластами и эпителиальными клетками. Поэтому условия культивирования должны способствовать дифференцировке выживших стволовых клеток и поддержанию гепатоспецифического фенотипа выживших пролиферирующих гепатоцитов. Это достигается не только с помощью сред, но и другими способами.

### **1.2. Влияние частичной гепатэктомии.**

Известно, что репликация гепатоцитов увеличивается *in vivo* после частичной гепатэктомии, а также при портокавальном шунтировании, так как эти процедуры обеспечивают массивный выброс гепатотрофных факторов. Fiegel H.C. с соавт.

[15] исследовали влияние частичной гепатэктомии (70%), выполненной за 48 часов до выделения гепатоцитов *in vitro*, на долговременное культивирование гепатоцитов. В качестве доноров служили самцы крыс Lewis. Выделенные гепатоциты культивировали на плашках, покрытых коллагеном, на среде с добавкой гормонов. Было показано, что частичная гепатэктомия существенно увеличивала количество гепатоцитов и секрецию альбумина на протяжении 5 дней по сравнению с культурами без предварительной гепатэктомии. Напротив, способность к биотрансформации моноэтил-глицин-ксилидида (MEGX) в культурах после частичной гепатэктомии уменьшалась. Эти результаты указывают на пролонгированный и сложный ответ гепатоцитов на частичную гепатэктомию. Таким образом, прайминг (стимуляция пролиферации) путём частичной гепатэктомии представляет собой перспективный подход к стабильному культивированию пролиферирующих гепатоцитов и может служить моделью для изучения механизмов регенерации печени *in vitro* [15].

Для успешного культивирования гепатоцитов были предложены различные среды, субстраты и гормоны, как в присутствии сыворотки, так и без неё. Недавно были предложены новые перспективные бессывороточные и химически определенные культуральные системы [16-20].

### 1.3. Ко-культивирование с непаренхиматозными клетками.

Ко-культивирование с клетками поджелудочной железы, желчными клетками, фибробластами и другими непаренхиматозными клетками существенно улучшает выживаемость и функциональность гепатоцитов.

Kaufmann P.M., Kneser U. с соавт. [20-23] показали, что котрансплантация гепатоцитов с островковыми клетками поджелудочной железы поддерживала приживание гепатоцитов на полимерном матриксе (PVA) так же хорошо, как и портокавальное шунтирование, причем не наблюдалось изменений в метаболизме глюкозы реципиентов. Поверхность, покрытая гепатоцитами, и степень их пролиферации увеличивались в зависимости от количества трансплантированных островков с пиком 40 островков на 1 миллион гепатоцитов. Гепатоциты экспрессировали мРНК альбумина на нормальном уровне транскрипции по сравнению со стандартной печенью, островковые клетки синтезировали инсулин и глюкагон в физиологическом соотношении. В таких культурах этот эффект уменьшался в присутствии антител к инсулину и глюкагону [20-23].

Используют Ко-культивирование с желчными клетками и другими непаренхиматозными клетками. Serandour A.L. с соавт. [24] исследовали механизмы, благодаря которым митогены и сигналы экстрацеллюлярного матрикса взаимодействуют для индукции пролиферации дифференцированных гепатоцитов. Авторы Ко-культивировали взрослые гепатоциты крысы с желчными клетками. Клетки были стабильно дифференцированы в течение нескольких недель, способны к ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса и неспособны делиться в ответ на воздействие только одного из исследуемых факторов. Гепатоциты могли подвергаться нескольким волнам пролиферации без потери дифференцировки при использовании альтернативных периодов стимуляции и лишения TNF- $\alpha$ /EGF. Через 3 дня после стимуляции обоими факторами поделились около 35% гепатоцитов [24].

Изучали долгосрочный эффект культивирования нормальных гепатоцитов человека с аллогенными эпителиальными билиарными клетками на коллагене или внутри трехмерных коллагеновых гелей. Для определения функциональности гепатоцитов при культивировании исследовали детоксикацию *in vitro* - превращение аммония в мочевины, конверсию лигнокаина в моноэтил-глицин-ксилидид (MEGX), а также экспрессию и секрецию белков (альбумина) и факторов свертывания крови (антитромбина III и фактора VII). Через 30 дней культивирования экспрессия и секреция альбумина и факторов свертывания крови гепатоцитами человека увеличивалась в 3D культуре, а также при Ко-культивировании с желчными клетками, причем более высокие концентрации желчных клеток способствовали

увеличению показателей функции печени. Почти полное отсутствие активности P450 только одних гепатоцитов после недельного культивирования возвращалось к норме и поддерживалось в течение 3 недель после со-культивирования с желчными клетками [25].

Если гепатоциты человека ко-культивировать с непаренхиматозными клетками (около 17% от общего числа клеток), синтез альбумина увеличивается примерно в 10 раз, а метаболизм лидокаина - в 3 раза по сравнению с монокультурой. Кроме того, в таких культурах наблюдали значительное уменьшение выделения лактатдегидрогеназы по сравнению с монокультурой, что свидетельствует о лучшем состоянии мембраны и лучшем функциональном состоянии гепатоцитов [26].

Свежеизолированные гепатоциты крысы или человека в ко-культуре с активированными стеллатными клетками крысы быстро агрегировали с образованием хорошо определившихся и видимых сфероидов, которые через 5 дней культивирования имели печеночную ультраструктуру, включающую канальцы, плотные связи, десмосомы и запас жира. Сфероидная со-культура имела существенно лучшие по сравнению с монокультурой показатели функций гепатоцитов [27]. Было также показано, что гепатоциты, культивируемые как многоклеточные агрегаты (сфероиды) улучшают и пролонгируют печеночные функции по сравнению с монокультурами. Для образования сфероидов авторы использовали полимер, содержащий лактон-лиганд рецептора асиалогликопротеина. Сфероиды, индуцированные полимером, обладали расширенной функцией, специфичной для печени (секрецией альбумина и синтезом мочевины). Авторы исследовали также индукцию гетеро-сфероидов, состоящих из различных конститутивных клеток печени. Эти сфероиды также показали лучшие результаты по сравнению с обычной монокультурой гепатоцитов [28].

Хорошие результаты по культивированию гепатоцитов крысы *in vitro* и их выживанию *in vivo* получены на подложках из гиалуроновой кислоты с фибробластами, включенными в матриксную структуру. Гепатоциты хорошо выживали, пролиферировали, секретировали альбумин и образовывали агрегаты до 35 дней наблюдения [29].

Используя поверхность, включающую галактозу, Lu H.F. с соавторами [30] предложили метод ко-культивирования первичных сфероидов крысиных гепатоцитов с мышинными фибробластами NIH/3T3. Сфероиды были приготовлены путем культивирования гепатоцитов в течение 3 дней на галактозилированной мембране из поливинилидендифторида [30]. Была также показана улучшенная функция гепатоцитов, кокультивированных с NIH/3T3 в сфероидах на подложке из альгинат галактозилированного хитозана [31]. Показана важная роль регуляции TGF- $\beta$ 1 в кокультуре гепатоцитов с NIH/3T3 с целью расширения функции гепатоцитов в 3D-окружении [32].

О преимуществах культивирования гепатоцитов в сфероидах сообщают и другие авторы. Ambrosino G. с соавт. [33] показали, что изолированные гепатоциты поддерживали функциональную активность в течение значительно меньшего периода времени по сравнению со сфероидами гепатоцитов. Авторы получили изолированные гепатоциты и гепатоциты в виде сфероидов (60% гепатоцитов, 40% непаренхиматозных клеток и экстрацеллюлярный матрикс) и подтвердили роль экстрацеллюлярного матрикса как критического компонента для обеспечения гомеостаза гепатоцитов и роль тесной связи между клеточной архитектурой и тканеспецифическими функциями [33].

Таким образом, межклеточное взаимодействие, как гомотипическое (гепатоцит-гепатоцит), так и гетеротипическое (гепатоцит-непаренхиматозная клетка) резко улучшают выживаемость и функцию гепатоцитов. Восстановление взаимодействия гепатоцитов в виде сфероидных агрегатов способствует образованию желчных протоков, щелевых контактов, плотных контактов, образованию E-кадгеринов и стабилизирует гепатоспецифическую функцию. Гетеротипное взаимодействие в кокультурах гепатоцитов и непаренхиматозных

клеток, по-видимому, представляет собой консервативный механизм, который усиливает функции, специфичные для печени [3].

#### 1.4. Типы подложек и моделирование экстрацеллюлярного матрикса.

Успех терапии путем трансплантации гепатоцитов зависит от стабильности фенотипа гепатоцитов и ее регуляции путем реплик микроокружения. Первичные гепатоциты адгезивно-зависимы и поэтому их трудно поддерживать *in vitro*. Как уже указывалось выше, свежеизолированные клетки быстро теряют морфологию взрослых печеночных клеток и дифференцированные специфичные функции, если их культивировать в монослое или суспензии. В процессе выживания клеток большое значение имеет сохранение ими цитоскелета и объёмной конфигурации. Поэтому исследователи разрабатывают культуральные модели, основанные на чертах архитектуры печени, чтобы воссоздать сложное микроокружение гепатоцитов. Моделирование экстрацеллюлярного матрикса может включать вариации как в составе, так и в топологии.

Синтетические полимеры обеспечивают больший контроль над механическими свойствами и биodeградируемостью. Кроме того, при имплантации *in vivo* они могут не только поддерживать клетки, но и выделять лекарства и различные факторы.

Для культивирования гепатоцитов используют в первую очередь коллаген [34], фибрин [35, 36], а также различные синтетические полимеры, которые также покрывают этими природными белками. Коллаген является основным веществом микроокружения гепатоцитов *in vivo*.

Сандвич-культивирование подражает окружению гепатоцитов в структуре печени *in vivo*, так как имеется возможность внедрения клеток между слоями коллагенового геля. Коллагеновые сандвич-культуры получили признание, так как было показано, что они пролонгируют выживание гепатоцитов и сохранение их функции в долгосрочных культурах. Обычно один слой коллагена создают на дне культуральной плашки, а второй слой - поверх монослоя гепатоцитов. В таких условиях гепатоциты сохраняют свою функцию в течение 4-6 недель [37-40].

Weiss T.S. с соавт. [37] сравнивали культуры первичных гепатоцитов человека на монослое коллагена и в сандвич-культуре. Выживаемость гепатоцитов была одинаково хорошей в обоих типах культур, но секреция альбумина уменьшалась в однослойной культуре через 14 дней. Общий внутриклеточный уровень полиаминов в гепатоцитах, определяемый методом жидкостной хроматографии (HPLC), заметно уменьшался в течение первых дней в обоих типах культур, но затем оставался на постоянном уровне до 21 дня с соотношением 1:4 в пользу сандвич-культуры [37]. Одним из ранних генов, экспрессирующихся при регенерации печени, является *odc*, который кодирует орнитиндекарбоксилазу - ключевой фермент метаболизма полиаминов. Более того, полиамины увеличивают выживаемость крыс при ортотопической трансплантации печени и играют важную роль в синтезе ДНК, индуцированном ростовыми факторами при культивировании гепатоцитов крысы. Поэтому полиамины - спермин, спермидин и путресцин - использовали в качестве маркеров функциональной активности гепатоцитов, причем было показано, что эти полиамины могут служить маркерами дифференцировки *in vitro* при культивировании гепатоцитов человека. Уровень спермина уменьшался, а уровень путресцина увеличивался как в однослойной, так и в двухслойной культуре в течение 14 дней, но уровень спермидина увеличивался только в двухслойной (сандвич) культуре, что указывает на лучшие условия сохранения функциональности гепатоцитов [37].

Tuschl G. с соавт. [40] показали, что культивирование первичных гепатоцитов крысы в сандвич-культуре между слоями коллагена в бессывороточной среде по-видимому является наиболее подходящим методом для длительного (более 72 часов) культивирования и скрининга гепатотоксичности *in vitro*. Авторы оценивали культуру по экспрессии специфичных генов количественным методом микрочипов с помощью флуоресцентной метки системы TaqMan (LDA-TaqManLow Density Arrays) [40].

Существующие в настоящее время модели культивирования гепатоцитов страдают от ограниченной или неэффективной реполяризации гепатоцитов, что в результате приводит к плохому удалению ксенобиотиков и других вредных продуктов из клеток. Ng S. с соавт. [41] считают, что пространственная и временная презентация осей полярности может быть достигнута сэндвич-конфигурацией. Авторы улучшили временную презентацию осей полярности введением верхнего слоя коллагена немедленно-синхронно с установлением межклеточных контактов вместо общепринятых 24 часов. Немедленное представление коллагенового матрикса поверх слоя клеток увеличивает образование апикобазолатеральных доменов, плотных контактов, и восстанавливает функциональную активность двух каналкулярных транспортеров - белка Mrp2 (устойчивого к многим лекарствам) и Р-гликопротеина (P-gp) в 48-часовой культуре, и увеличивает секрецию альбумина, продукцию мочевины и активности 7-этоксирезорурфин-О-диэтилирования цитохрома P450 гепатоцитов в течение 14 дней культивирования по сравнению с контролем [41]. Ng S. с соавт. [42] оптимизировали 3D культуру гепатоцитов путем контроля физических и химических свойств экстрацеллюлярного матрикса. Авторы нашли специфическую комбинацию нано-волокон метилированного и галактозилированного коллагена, оптимальную для поддержания функций гепатоцитов *in vitro* [42].

Большой интерес вызывают подложки для конструирования ткани печени на основе коллагена/хитозана. Смесь коллагена с хитозаном в соотношении 1:1 в виде пленок и пористых губок показала прекрасные механические качества и малое время биодеградации ( $65 \pm 1,7$  дней). Через 25 дней после посева гепатоциты сохраняли функции АСТ и секреции глюкозы [43]. Недавно был предложен новый перспективный матрикс для имплантабельной биоискусственной печени, полученный при желировании коллаген\хитозана с гепарином. Гепатоциты, культивируемые на этом матриксе, обладали повышенной секрецией мочевины и триглицеридов в течение 25 дней [44].

Было показано, что неклеточный печеночный матрикс (homologous acellular matrix, HAM) способствует лучшему выживанию и сохранению функций гепатоцитов крысы по сравнению с коллагеном [45].

Higuchi A. с соавт. [46] изучали продукцию альбумина и мочевины гепатоцитами мыши, культивированными в течение 7 дней на мембранах из модифицированного поливинилового спирта (poly-vinylalcohol-co-ethylamine) с конъюгированными на них белками экстрацеллюлярного матрикса - коллагеном, витронектином и ламинином (PVA-EA-ECM). Имобилизованные белки обеспечивали долговременное выживание гепатоцитов и стабильную продукцию альбумина и мочевины [46].

Хорошие результаты при культивировании *in vitro* и при трансплантации получены при культивировании гепатоцитов крысы на подложке из гиалуроновой кислоты (HYAFF), обогащенной путем культивирования фибробластов внутри этой подложки. Гепатоциты секретировали альбумин до 14 дней культивирования. Результаты *in vivo* показали биосовместимость подложки, имплантированной мышам (nude), в которых гепатоциты образовывали малые хорошо организованные агрегаты до 35 дней [29].

Yamada K. с соавт. [28] культивировали гепатоциты как мультিকлеточные агрегат (сфероиды), причем эти клетки обладали расширенной функцией печени и сохраняли её в течение длительного времени по сравнению с монослойной культурой. Индукция образования гепатоцитами сфероидов поддерживалась в клеточной суспензии синтетическим полимером Eudragit (сополимером метакриловой кислоты и метилметакрилата) в качестве искусственного матрикса. В этом методе агрегации гепатоцитов способствовало электростатическое и гидрофобное взаимодействие между клетками и полимером. Для усиления клеточной агрегации и клеточной специфичности полимера в него был введён лактон - лиганд асиалогликопротеинового рецептора. Этим методом была

## СОЗДАНИЕ ИМПЛАНТИРУЕМОЙ БИОИСКУССТВЕННОЙ ПЕЧЕНИ

также исследована индукция гетеросфероидов, состоящих из различных клеток печени. Гетеросфероиды, индуцированные полимером, показали улучшенную функциональность, свойственную печени [28].

Биоинкапсулирование гепатоцитов позволяет изолировать клетки от иммунологического процесса. Этот способ основан на принципе искусственных клеток или полупроницаемых микрокапсул. Инкапсулированные гепатоциты могут быть криоконсервированы и храниться в течение 4 месяцев [47, 48]. Однако часто микрокапсулы *in vivo* быстро покрываются фибрином и фибробластами, что ведет к адгезии и смерти гепатоцитов. Поэтому ведутся интенсивные разработки новых биосовместимых мембран микрокапсул, чтобы они могли свободно плавать в кровотоке после имплантации.

Сообщается об успешном использовании для инкапсулирования полиэлектролитного комплекса альгината натрия, сульфата целлюлозы и поли(метилен-когуанидин) гидрохлорида [47, 48]. Гепатоциты, микроинкапсулированные в смеси альгината и акрилового терполимера с желатином и PVA в качестве экстрацеллюлярного матрикса, имели хорошую морфологию и метаболизм [49]. Kang et al. [50] изучали морфологию и метаболизм гепатоцитов, инкапсулированных с Ва-альгинатом с галактозилированным полиаллиламином (GA) и поливиниловым спиртом (PVA) в качестве экстрацеллюлярного матрикса. Гепатоциты, культивируемые с GA и PVA внутри микрокапсулы, быстро агрегировали в течение дня и сохраняли таким образом метаболические функции, такие как синтез альбумина и удаление аммония [50].

Получил распространение гель Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Было показано, что обеспечение компонентами экстрацеллюлярного матрикса (экстрагированными из клеток EHS) гетеротопно трансплантированных гепатоцитов позволяет значительно увеличить их выживание (по меньшей мере до 120-140 дней). Ламинин и коллаген IV типа являются основными компонентами EHS-экстрацеллюлярного матрикса. Он содержит также небольшие количества факторов EGF и IGF-1 [51, 52].

Экстрацеллюлярный матрикс, несущий галактозу, происходящий из синтетического и природного полимеров, связывает гепатоциты через рецептор-опосредованный механизм, что дает в результате расширенную функцию гепатоцитов. Физико-химические свойства такого матрикса, включая геометрию ECM, а также тип, плотность и ориентацию галактозы, влияли на прикрепление и функции гепатоцитов [53].

Seo S.G. с соавт. [54] предложили новый синтетический экстрацеллюлярный матрикс, полученный путем электростатического взаимодействия и состоящий из альгината, галактозилированного хитозана и гепарина. Результаты показали, что гепатоциты в виде стабильных сфероидов с фибробластами мыши NIH/3T3 увеличивают свою функциональность и что предложенный матрикс может служить для создания биоискусственной печени [54].

Изучали возможность применения ксилогликанов (XG) природного происхождения, имеющих галактозные остатки в боковой цепи для создания синтетического экстрацеллюлярного матрикса при конструировании ткани. Адгезия гепатоцитов на полистироловой подложке, покрытой ксилогликаном, составляла 73% через 30 мин. инкубации, а без покрытия - 59,1%. Было показано специфическое взаимодействие между галактозными остатками ксилогликана и асиалопротеиновыми рецепторами гепатоцитов [55, 56].

Lu H.F. с соавт. [30] ко-культивировали гепатоциты крысы в виде сфероидов с фибробластами мыши NIH/3T3 в трехмерной культуре на подложке из галактозилированной поли(винилиден-дифторид) мембраны. Секреция альбумина поддерживалась в течение 2 недель и была на 11-й день максимальной в ко-культуре, что в 1,8 и в 2,9 раз выше, чем пик экспрессии в сфероидных монокультурах (в бессывороточной среде - на 3-й день и в среде, содержащей сыворотку - на 4-й день). На 13-й день секреция альбумина в кокультуре была

в 5,1 (в бессывороточной среде) и в 17,8 (в сывороточной среде) раз выше по сравнению с монокультурой. Аналогично этому, энзиматическая активность цитохрома P450, индуцированная 3-метил-холантеном, была в 5,5 и в 3,1 раз выше в ко-культуре по сравнению с монокультурой [30].

Полимеры, соединяющие преимущества синтетических и природных материалов, могут быть созданы привязкой пептидов, происходящих из экстрацеллюлярного матрикса (ЕСМ), к  $\epsilon$ -аминогруппам лизина (сополимер полимолочной кислоты и лизина) [57].

Недавно было показано, что интегрин играет существенную роль в выживании гепатоцитов мыши, хотя гепатоциты способны выживать и на матриксах, не узнающих интегрин, таких как поли-L-лизин (PLL) и поли-(N-*n*-винилбензил-4-О-бета-D-галактопиранозил-D-глюконамид) (PVLA-) в течение нескольких дней без сыворотки [58]. В другой работе эти авторы показали, что ламинин играет важную роль в поддержании функций гепатоцитов. Гепатоциты сохраняли функциональность на поверхности, покрытой PVLA- и ламинином [59]. Таким образом, манипулирование взаимодействием интегрина с компонентами экстрацеллюлярного матрикса может существенно увеличивать приживление клеток в печени.

Используют самособирающиеся пептидные подложки, которые состоят из гибких нановолокон, поддерживающих дифференцировку прогениторных клеток печени крысы в функциональные гепатоцитоподобные сфероиды [60].

Zeisberg M. с соавт. [61] выполнили весьма интересное исследование, показав, что дедифференцировка первичных гепатоцитов человека зависит от состава специализированной базальной мембраны печени. Авторы показали, что препараты базальной мембраны (BM), полученные из мышей, больных раком (Matrigel), которые обычно используют как модель базальной мембраны, значительно отличаются по составу от BM нормальных мышей *in vivo*. Авторы предложили новый подход к созданию BM, состоящий в отдельном выделении компонентов матрикса - коллагена IV типа, ламинина, нидогена, и гепаран-сульфат-протеогликанов с последующим воссозданием матрикса-подобного геля (liver-derived basement membrane matrix-LBLM). Адгезия первичных гепатоцитов человека была существенно увеличена, а дедифференцировка уменьшена при культивировании на LBLM по сравнению с Матригелем или коллагеном I типа. Первичные гепатоциты человека поддерживали свой дифференцированный эпителиальный фенотип на матриксе, полученном из нормальной печени человека, на протяжении более 21 дня. В то же время они быстро дедифференцировались на матриксе, полученном из циррозной печени. Нормальная LBLM человека содержит уникальный состав изоформ коллагена IV типа, а именно цепи альфа 1(IV), альфа 2(IV), альфа 4(IV) и альфа 6 (IV), в то время как LBLM цирротически изменённой печени содержит только альфа 1 (IV) и альфа 2(IV) изоформы, хотя и представленные в увеличенных количествах. Эти исследования демонстрируют, что состав базальной мембраны печени важен для поддержания выживания гепатоцитов и является ключом к анти-дедифференцировке [61]. Матригель, полученный от больных раком мышей и подобный базальной мембране клетки, является примером подложки, содержащей вещества ЭЦМ различного состава и использующийся для стабилизации фенотипа гепатоцитов. Однако гепатоциты подвергаются агрегации на Матригеле, что затрудняет их использование в клинике [3].

Bruns H. с соавт. [35] на модели крысы предложили новую технику для прямого интрапеченочного введения гепатоцитов, иммобилизованных на фибриновом геле, полученном из морских водорослей. Дифференцировка гепатоцитов оценивалась иммуногистохимически и методом RT-PCR путём определения цитокератина-18 и альбумина. Иммобилизация гепатоцитов на фибриновом геле является перспективным инструментом для развития систем поддержки печени [35].

Поддержание нормальной клеточной физиологии и межклеточных контактов *in vitro* имеет особое значение для оптимальной экспрессии фенотипических генов и для ответа на введение лекарств и других ксенобиотиков. На примере матриц различного состава и геометрии была показана важная роль матрикса. Химическая природа, адгезивность, электрический заряд и пористость играют важную роль в успешном культивировании гепатоцитов *in vitro* и в их выживании *in vivo*. Различная экспрессия белков, отвечающих за отдельные свойства печени, имела место у первичных гепатоцитов в зависимости от условий культивирования [62].

Ise H. с соавт. [63] показали, что гепатоциты мыши в 3D культурах на 0,3% агарозном геле в отличие от 2D культур обладали долговременной (больше 3 недель) выживаемостью, значительной самосборкой с образованием тканеподобных агрегатов, низкой активностью ЛДГ и высоким уровнем синтеза альбумина [63].

Успешное культивирование гепатоцитов крысы было показано на 3D-матрике поли-молочной кислоты. Число клеток на матрике медленно уменьшалось в течение 2 недель до 71% от первоначального количества клеток, причём экспрессия гепато-специфических генов не уменьшалась.

В то же время клетки, культивируемые на стандартных культуральных плашках в монослое, начинали погибать уже на 3 день, и к 7 дню живых клеток уже не оставалось [64]. В других работах группы этих авторов было показано преимущество выживания и пролонгированного культивирования гепатоцитов крысы на 2D (коллаген) и 3D (поливиниловый спирт) матриксах вместе с клетками поджелудочной железы. При таком ко-культивировании на 3D-матриксах клетки сохраняли свою функциональную активность вплоть до 6 месяцев *in vivo* [20-23]. Гепатоциты успешно культивировали на поли-молочной кислоте (PLA) [64], поли-гликолевой кислоте (PGA) [66] и их сополимерах [12, 65, 67].

Zavan V. с соавт. [69] сообщили о возможностях нетканых губчатых материалов на основе гиалурановых природных соединений (бензиловый эфир гиалурановой кислоты – HYAFF-11 FAB-Italy) для культивирования гепатоцитов и бета-клеток крысы *in vitro*. Сравнивали результаты, полученные в присутствии экстрацеллюлярного матрикса, создаваемого фибробластами, предварительно культивированными в подложку, и на полной среде без фибробластов. Гепатоциты в обоих случаях пролиферировали 14 дней, а бета-клетки - 21 день, после чего клетки начинали подвергаться апоптозу. Присутствие фибробластов в трехмерной подложке существенно улучшало условия культивирования [69].

### 2. СОЗДАНИЕ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ ЛИНИЙ.

Развитие высоко функциональных клеточных линий для использования в клеточной терапии является перспективной стратегией для преодоления ограничений роста первичных гепатоцитов. Получены положительные результаты лечения острой печеночной недостаточности у крыс с помощью обратимо иммортализованных гепатоцитов человека [72]. Обычный подход к иммортализации гепатоцитов заключается в ретровирусной трансдукции ракового антигена SV-40 (SV-40 Tag), продукт которого связан с белками-регуляторами Rb и p53. Клеточные линии получают также при спонтанной иммортализации гепатоцитов в сэндвич-культурах на коллагеновом геле или в кокультурах. Третий тип клеточных линий образуется из раковых клеток печени, например Hep-G2. Все эти клеточные линии должны быть оценены в отношении гепато-специфических функций и безопасности. Иммортализованные гепатоциты обычно не полностью выполняют функции первичных клеток и могут не соответствовать важным физиологическим задачам. Главная опасность заключается во внесении онкогенных факторов в организм хозяина. Для улучшения контроля и безопасности иммортализованных клеточных линий предложено использовать температуро-чувствительный ген SV40 Tag, Cre/lox P-опосредованное удаление онкогена и интеграцию генов суицида, таких как HSV-tk вируса простого герпеса [3].

Sai J. с соавт. [73] получили 35 клонов иммортализованных гепатоцитов крысы путем трансдукции гена SV40 Tag. Последовательность SV40 Tag и ген суицида HSV-tk были фланкированы последовательностью lox P, так что они могли быть удалены путем Cre\lox рекомбинации. Будучи трансплантированы в селезенку крысам, подвергшимся портокавальному шунтированию, 3 из 35 клонов предотвращали развитие гепато-энцефалопатии, индуцированной гипераммониемией. Защита была обратима при лечении ганцикловиром, который убивает клетки, экспрессирующие HSV-tk. Трансплантация 50 млн иммортализованных гепатоцитов, инкапсулированных в альгинате, в селезенку мышей с циррозом печени привела к значительному улучшению протромбинового индекса, уровней сывороточного альбумина и билирубина, а также к облегчению гепато-энцефалопатии и пролонгированию выживания. Метаболическая поддержка, обеспечиваемая иммортализованными клетками, была эквивалентна той, которую наблюдают при трансплантации первичных гепатоцитов крысы [73].

Циклин D1 был использован для иммортализации гепатоцитов человека с целью пролонгированного культивирования этих клеток [74]. В качестве альтернативы для создания клеточных линий гепатоцитов человека и свиньи авторы применили T-антиген SV40 вируса обезьян [75].

Таким образом, в настоящее время существуют генетические технологии обеспечения длительной пролиферации клеток. Однако при использовании генетических технологий иммортализации клеток непосредственно перед клиническим применением онкоген необходимо удалять, чтобы введение иммортализованных клеток не привело к образованию опухоли. Необходимы дальнейшие исследования для оценки безопасности используемых линий и для понимания механизмов потери массы или функций трансплантированных гепатоцитов со временем и механизмов того, как относительно небольшое количество прижившихся гепатоцитов могут улучшать декомпенсацию печени при печёночной недостаточности.

### 3. РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА.

Понимание механизмов клеточного цикла гепатоцитов и его регуляции весьма существенно для развития новой стратегии иммортализации, необходимой для преодоления потери пролиферативной способности гепатоцитов *in vitro*.

Переход гепатоцитов из фазы G0 в фазу G1 и далее через раннюю фазу G1 у частично гепатэктомированных мышей происходит, по-видимому, под регуляторным влиянием экстрацеллюлярного матрикса, также как и под влиянием цитокинов, включая TNF- $\alpha$  и интерлейкин 6 [76-78]. Дальнейшее прохождение гепатоцитов *in vivo* через позднюю фазу G1 требует ростовых факторов и активации комплексов циклин-зависимой киназы cdk3. Регуляторные медиаторы точки рестрикции поздней фазы G1 включают фактор транскрипции E2F и белок ретинобластомы (Rb), который активируется путём фосфорилирования с помощью циклин/cdk3 [76,79,80]. После частичной гепатэктомии в первую очередь увеличивается синтез циклина D1 (при посредстве ростовых факторов в фазе G1). Циклин D1 образует комплексы с циклин-зависимыми киназами cdk4 и cdk6 и после активации cdk cdk-активирующей циклазой (H/cdk7) этот комплекс фосфорилирует Rb [80]. Таким образом, повышение содержания циклина D1 играет ключевую роль в контроле точки рестрикции G1.

### 4. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ПЕЧЕНИ.

В последнее время активно развивается генная терапия болезней печени. Для генной терапии используют трансплантацию генетически модифицированных гепатоцитов, а также гепатоцитов с нормальным геномом. Генная терапия метаболических болезней печени может быть селективным методом лечения врождённого дефицита ферментов печени (дефицит  $\alpha$ -1 антитрипсина, тирозинемия I типа, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз 3 типа - болезнь Вильсона, липидозы, эритропоэтическая протопорфирия). Вторая группа болезней, которые можно лечить методами генной терапии, не связана непосредственно с болезнью печени, но связана с метаболической

недостаточностью и изменением функции гепатоцитов. Это гипербилирубинемия (синдром Криглер-Найяра 1 типа), семейная гиперхолестеролемиа 2а типа, гипераммониемия, дефицит орнитинтранскарбамилазы, дефекты метаболизма углеводов, дефекты коагуляции крови, такие как гемофилии А и В и афиброгенемия, врождённая ангиоэдема - болезнь Квинке. Генная терапия может быть полезна при лечении вирусных гепатитов, если будут трансплантированы гепатоциты, устойчивые к репликации вирусов гепатитов В и С, а также при лечении рака печени, если трансгены будут вызывать суицид пораженных клеток [82-85].

Печень обладает уникальными чертами, которые делают её подходящей для переноса генов *in vivo* и *ex vivo*. Подход *in vivo* сопровождается доставкой векторов в кровяное русло и поэтому гораздо менее инвазивен, чем подход *ex vivo*, когда клетки выделяют из резецированной доли печени, генетически модифицируют *in vitro* и затем трансплантируют обратно донору.

Иммунный ответ хозяина, направленный против трансгенного продукта и/или частиц вектора, препятствует эффективности переноса генов и долговременной экспрессии трансгена после доставки гена *in vivo*. Подход *ex vivo* позволяет осуществлять эффективный таргетинг гепатоцитов без экспрессии трансгена (сопровождающейся презентацией антигена), но связан с низкой пролиферативной способностью гепатоцитов *in vitro* и с неэффективным заселением печени трансплантированными клетками [85]. В тех случаях, когда иммунная система находится под контролем или трансплантированные клетки имеют явное селективное преимущество в росте перед гепатоцитами хозяина, перенос гена обеспечивает долговременную и полную коррекцию генетического дефекта [85, 86].

Для трансфекции гепатоцитов используют адено-ассоциированный вирус (AAV), лентивирус, вирус мышинной лейкемии (MuLV) [84, 87, 88]. Адено-ассоциированный вирус лишен вирусных генов, вызывающих реакцию иммунной системы хозяина. Ретровирусные векторы (MuLV и лентивирусный) являются прекрасным инструментом вследствие их способности встраиваться в геном клетки хозяина и таким образом обеспечивать долговременную экспрессию трансгена. Лентивирусные векторы, происшедшие от HIV-1, обладают способностью инфицировать и трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, и обладают высоким уровнем трансдукции как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме вирусной трансфекции используют липофекцию – перенос инкапсулированных в липосомы олигонуклеотидов в клетки путём рецептор-опосредованного эндоцитоза [89]. Однако, прежде чем генная терапия получит клиническое применение, необходимы дальнейшие исследования для обеспечения безопасности генной терапии, её терапевтической эффективности, отсутствия иммунного ответа против трансгена и обеспечение долговременной экспрессии трансгена.

Открытие интерференции РНК - одного из наиболее важных механизмов регуляции экспрессии генов - дает в руки исследователей удобный инструмент для подавления экспрессии нежелательных генов. Было показано, что предотвратить печеночную недостаточность возможно при помощи siРНК против каспазы-8, необходимой не только для Fas-зависимого апоптоза, но и для апоптоза, вызванного другими факторами, например, фактором некроза опухолей  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [90].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Проблема накопления хорошо функционирующих гепатоцитов остаётся актуальной задачей. Основные подходы заключаются в подборе обогащённых сред, в понимании важности окислительно-восстановительного потенциала среды. Многократно показано лучшее выживание и сохранение гепато-специфических функций при кокультивировании гепатоцитов с другими, непаренхиматозными клетками (клетками поджелудочной железы, желчными клетками, фибробластами и др.). Предварительная частичная гепатэктомия перед выделением гепатоцитов способствует последующему стабильному культивированию пролиферирующих гепатоцитов. Получение агрегированных культур и сфероидов благоприятно сказывается на сохранении фенотипа гепатоцитов. Разработаны и испытаны *in vitro* и *in vivo* различные матриксы, улучшающие выживание гепатоцитов и сохранение ими функциональной активности (таблица).

Таблица. Типы подложек для гепатоцитов.

|    | <b>Подложка</b>  | <b>Ссылка</b> |
|----|--|---------------|
| 1  | Коллаген   | [34-41]       |
| 2  | Коллаген\хитозан   | [43]          |
| 3  | Коллаген\хитозан с гепарином   | [44]          |
| 4  | Коллаген-Gal\коллаген-Meth   | [42]          |
| 5  | Фибрин   | [35]          |
| 6  | Полилактид (PLA)   | [64]          |
| 7  | Полилактид\ПВА (PLA/PVA)   | [67]          |
| 8  | Полигликолид (PGA)   | [66]          |
| 9  | Полилактид\ полигликолид (PLA/PGA)   | [65,12]       |
| 10 | Поли-виниловый спирт (PVA)   | [68]          |
| 11 | Поли(молочная кислота-ко-лизин) (PLA/PLL)  | [57]          |
| 12 | Поли-этиленгликоль (PEG)   | [71]          |
| 13 | ПВА-ко-этиламин-ЭЦМ (коллаген, витронектин, ламинин)-<br>(PVA-BA-BSM)                    | [46]          |
| 14 | Гиалуроновая кислота (HYAFF)\фибробласты   | [29]          |
| 15 | HYAFF-11-FAB(бензиловый эфир гиалуроновой кислоты)                                       | [69]          |
| 16 | Альгинат   | [70]          |
| 17 | Поли-лизин-поли-альгинат   | [3,70]        |
| 18 | Альгинат натрия\ сульфат целлюлозы\ поли-(метилен-ко-гуанидин) гидрохлорид               | [47,48]       |
| 19 | Альгинат\акриловый терполимер\ желатин\ПВА   | [49]          |
| 20 | Ва-альгинат\ Gal-поли-аллиламин (GA)\PVA   | [50]          |
| 21 | Альгинат\ хитозан- Gal/гепарин   | [53,54]       |
| 22 | Ксилоглюкан\Са-альгинат  | [56]          |
| 23 | Ксилоглюкан\Gal\полистирол   | [55]          |
| 24 | Budragit (метакрил \метилметакрилата)  | [29]          |
| 25 | Meth-коллаген\терполимер гидроксипропанметакрилат-метилметакрилат-метилакриловой кислоты | [42]          |
| 26 | Гель Engelbreth-Holm-Swarm (EHS-матрикс базальной мембраны)                              | [51,52]       |
| 27 | Gal- поли-винилиден дифторид   | [30]          |
| 28 | Поли-L-лизин (PLL)   | [58]          |
| 29 | Поли-(N-л-винилбензил 4-О-бета-D-галактопиранозил-D-глюкозамид) (PVLA)                   | [58]          |
| 30 | PVLA\ламнинин  | [59]          |
| 31 | Самособирающиеся пептидные подложки  | [60]          |
| 32 | Агароза  | [63]          |
| 33 | Matrigel   | [61]          |
| 34 | LBIM (коллаген IV типа, ламинин, нидоген, гепаран-сульфат-протеогликаны)                 | [61]          |

## СОЗДАНИЕ ИМПЛАНТИРУЕМОЙ БИОИСКУССТВЕННОЙ ПЕЧЕНИ

Острая потребность в создании имплантируемого модуля биоискусственной печени побуждает исследователей активно искать новые реалистичные подходы к решению этой важной задачи. Продолжают совершенствоваться методы культивирования гепатоцитов, обеспечивающие сохранение морфологии и поляризации гепатоцитов, предпринимаются работы, ведущие к пониманию механизмов их дифференцировки и пролиферации. Рассматривается возможность использования иммортализованных линий. Особенно большое внимание уделяют разработке микроокружения гепатоцитов, имитирующего архитектуру печени и молекулярные взаимосвязи гепатоцитов в естественных условиях *in vivo*. Для этого ведутся поиски оптимальных матриц, обеспечивающих не только сохранность адгезивности и цитоскелета клеток, но и их гепатоспецифичных свойств. Сохранение фенотипа гепатоцитов при культивировании и после трансплантации реципиенту представляет собой важнейшую задачу. Идеальной модели для культивирования гепатоцитов, характеризующейся долговременным поддержанием гепато-специфических функций, сравнимой по эффективности с уровнем этих функций *in vivo*, в настоящее время не существует. По-видимому, альтернативные стратегии должны быть сфокусированы на процедуре выделения гепатоцитов, во время которой уже начинается гибель и дедифференцировка клеток. Кроме того, хорошие перспективы открывает определение условий, необходимых для полного созревания гепато-прогениторных клеток *in vitro* в стабильные функциональные гепатоциты [81].

В этом обзоре мы не рассматривали экспериментальные и клинические результаты трансплантации гепатоцитов *in vivo* и проблемы, связанные с их выживанием и пролиферацией. Однако подходы к решению проблемы выживания трансплантированных гепатоцитов имеют общие черты с решением этих проблем *in vitro*. Предварительная гепатэктомия и портокавальное шунтирование, а также ко-культивирование с непаренхиматозными клетками (прежде всего с бета-клетками поджелудочной железы) помогают обеспечить трансплантированные клетки питанием и гепатотрофными факторами. Растворимые факторы и структура экстрацеллюлярного матрикса, использование подходящих пористых трехмерных подложек, пригодных для эффективной васкуляризации, способны обеспечить приживание и функционирование трансплантированных гепатоцитов.

Вопрос о преимуществах использования гепатоцитов или стволовых клеток при тех или иных патологиях нельзя считать решенным вследствие недостаточного количества экспериментальных и клинических работ. По-видимому, при острой печеночной недостаточности необходимо массивное (10-30% от объема печени) введение зрелых гепатоцитов. При метаболических нарушениях достаточно 2-5% и даже менее клеток [3]. Большим преимуществом трансплантации клеток по сравнению с трансплантацией целого органа является возможность проводить повторные трансплантации. Однако дифференцированные гепатоциты затруднительно накапливать методом культивирования, а для переселения печени трансплантированным гепатоцитам необходимо создать существенное селективное преимущество, что в клинике пока реализовать сложно. Стволовые клетки культивировать легче. Кроме того, они требуют меньшего селекционного давления для пролиферации после трансплантации, способны пролиферировать долгое время *in vivo* и регенерировать полные доли печени. С другой стороны, нельзя не отметить, что существует опасность возникновения у пациентов онкологических заболеваний как после трансплантации стволовых клеток, так и иммортализованных гепатоцитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. (ред.) (1994) Лечение печёночной недостаточности методами трансплантации и экстракорпорального подключения печени и других тканей (биологические и клинические аспекты). Москва.

2. *Шумаков В.И. (ред.)* (1998) Очерки по физиологическим проблемам трансплантологии и применения искусственных органов, Тула. 338-367.
3. *Allen J.W., Bhatia S.N.* (2002) *Tissue Engineering*, **8**(5), 725-737.
4. *Jasmund I., Schwintek S., Acikgoz A., Langsch A., Machens H.G., Bader A.* (2007) *Biomol. Eng.*, **24**(1), 59-69.
5. *Block G.D., Locker J., Bowen W., Petersen B.E., Katyal S., Strom S.C., Riley T., Howard T.A., Michalopolous G.K.* (1996) *J. Cell Biol.*, **132**, 1133-1149.
6. *Dich J., Vind C., Grunnet N.* (1988) *Hepatology*, **8**, 39-45.
7. *Isom H.C., Secott T., Georgoff I., Woodworth C., Mummaw J.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3252-3256.
8. *Jungermann K., Kietzmann T.* (2000) *Hepatology*, **31**, 255-260.
9. *Chen H., Yan X., Zhu P., Lin J.* (2006) *Nutr. J.*, **5**, 31.
10. *Nahmias Y., Kramvis Y., Barbe L., Casali M., Berthiaume F., Yarmush L.* (2006) *FASEB J.*, **20**(14), 2531-2533.
11. *Lee S.H., Cogler R.N., Clemens M.G.* (2006) *Tissue Eng.*, **12**(10), 2825-2834.
12. *Kim S.S., Utsunomiya H., Koski J.A., B.M.Wu, Cima M.J., Sohn J., Mukai K., Griffith L.G., Vacanti J.P.* (1998) *Ann. Surg.*, **228**(1), 8-13.
13. *Kaihara S., Vacanti J.P.* (1999) *Arch.Surg.*, **134**, 1184-1188.
14. *Auth M.K., Boost K.A., Leckel K., Beecken W.D., Engl T., Jonas D., Oppermann E., Hilgard P., Markus B.H., Bechstein W.O., Blaheta R.A.* (2005) *World J. Gastroenterol.*, **11**(14), 2080-2087.
15. *Fiegel H.C., Kaufmann P.M., Kneser U., Kluth D., Rogiers X.* (2000) *Tissue Engineer.*, **6**(6), 619-626.
16. *Runge D., Michalopolous G.K., Strom S.C., Runge D.M.* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **274**, 1-3.
17. *Kane R.E., Li A.E., Kaminski D.R.* (1995) *Drug.Metab. Dispos.*, **23**(3), 307.
18. *Kono Y., Yang S., Roberts E.A.* (1997) *In vitro Cell Dev. Biol.*, **33**(6), 467-472.
19. *Donato M.T., Gomez-Lechon M.J., Jover R., Nakamura T., Castell J.V.* (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**(2), 760-767.
20. *Kaufmann P.M., Fiegel H.C., Kneser U., Pollok J.M., Kluth D., Rogiers X.* (1999) *Tissue Engineering*, **5**(6), 583-596.
21. *Kneser U., Kaufmann P.M., Fiegel H.C., Pollok J.M., Rogiers X., Kluth D., Herbst H.* (1999) *Virchovs Arch.*, **435**, 125-132.
22. *Kaufmann P.M., Kneser U., Fiegel H.C., Pollok J.M., Kluth D., Izbicki J.R., Herbst H., Rogiers X.* (1999) *Transplantation*, **68**(2), 1-8.
23. *Kneser U., Kaufman P.M., Fiegel H.C., Pollok J.M., Kluth D., Herbst H., Rogiers X.* (1999) *Pediatr. Int.*, **15**, 168-174.
24. *Serandour A.L., Loyer P., Garnier D., Courselaud B., Theret N., Glaise D., Guguen-Guillouzo C., Corlu A.* (2005) *Hepatology*, **41**(3), 478-486.
25. *Auth M.K., Woitaschek D., Beste M., Schreiter T., Kim H.S., Oppermann E., Joplin R.E., Baumann U., Hilgard P., Nadalin S., Markus B.H., Blaheta R.A.* (2005) *Liver Transplant.*, **11**(4), 410-419.
26. *Burt C.V., Wallace L., Kelly D.A. et al.* (2000) *FASEB J.*, **14**: A 285.
27. *Thomas R.J., Bhandari R., Barrett D.A., Bennett A.J., Fry J.R., Powe D., Thomson B.J., Shakesheff K.M.* (2005) *Cells Tissues Organs*, **181**(2), 67-79.
28. *Yamada K., Kahimira M., Iijima S.* (1999) *J. Biosci. Bioeng.*, **88**(5), 557-562.
29. *Zavan B., Brun P., Vindigni V., Amadori A., Habeler W., Pontisso P., Montemurro D., Abatangelo G., Cortivo R.* (2005) *Biomaterials*, **26** (34), 7038-7045.
30. *Lu H.F., Chua K.N., Zhang P.C., Lim W.S., Ramakrishna S., Leong K.W., Mao H.Q.* (2005) *Acta Biomater.*, **1**(4), 339-410.
31. *Seo S.J., Kim I.Y., Choi Y.J., Akaike T., Cho C.S.* (2006) *Biomaterials*, **27**(8), 1487-1495.
32. *Chia S.M., Lin P.C., Yu H.* (2005) *Biotechnol.Bioeng.*, **89**(5), 565-573.
33. *Ambrosino G., Basso S.M., Varotto S., Zardi E., Picardi A., D'Amico D.F.* (2005) *Cell Transplant.*, **14**(6), 397-401.

## СОЗДАНИЕ ИМПЛАНТИРУЕМОЙ БИОИСКУССТВЕННОЙ ПЕЧЕНИ

34. *Boost K.A., Kim H.J., Engl T., Oppermann E., Jonas D., Oertl A., Blaheta R.A.* (2006) *Int. J. Mol. Med.*, **17**(3), 475-482.
35. *Bruns H., Kneser U., Holzhtuter S., Roth B., Kluth J., Kaufmann P.M., Kluth D., Fiegel H.* (2005) *Tissue Eng.*, **11**(11-12), 1718-1726.
36. *Griffith C.K., Miller C., Sainson R.C., Calvert J.W., Jeon N.L., Hughes C.C., George S.C.* (2005) *Tissue Eng.*, **11**(1-2), 257-266.
37. *Weiss T.S., Jahn B., Cetto M., Jauch K.-W., Thasler W.E.* (2002) *Cell Prolif.*, **35**, 257-267.
38. *Ryan C.M., Carter E.A., Jenkins R.L., Sterling L.M., Yarmush M.L., Malt R.A.* (1993) *Surgery*, **113**, 48-54.
39. *Knop E., Bader A., Boker K., Pichlmayr R., Sewing K.F.* (1995) *Anat.Rec.*, **242**, 337-349.
40. *Tuschl G., Mueller S.O.* (2006) *Toxicology*, **218**(2-3), 205-215.
41. *Ng S., Han R., Chang S., Ni J., Hunziker W., Goryachev A.B., Ong S.H., Yu H.* (2006) *Tissue Eng.*, **12**(8), 2181-2191.
42. *Ng S., Wu Y.N., Zhou Y., Toh Y.E., Ho Z.Z., Chia S.M., Zhu J.H., Mao H.O., Yu H.* (2005) *Biomaterials*, **26**(16), 3153-3163.
43. *Wang X., Yan Y., Xiong Z., Lin F., Wu R., Zhang R., Lu Q.* (2005) *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **75**(1), 91-98.
44. *Wang X., Yan Y., Lin F., Xiong Z., Wu R., Zhang R., Lu Q.* (2005) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **16**(9), 1063-1080.
45. *Burra P., Tomat S., Conconi M.T., Macchi C., Russo F.P., Parnigotto P.P., Naccarato R., Nussdorfer G.G.* (2004) *Int. J. Mol. Med.*, **14**(4), 511-515.
46. *Higuchi A., Kurihara M., Kobayashi K., Cho C.S., Akaike T., Hara M.* (2005) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **16**(7), 847-860.
47. *Canaple L., Nurdin N., Angelova N., Saugy D., Hunkeler D., Desvergne B.* (2001) *J. Hepatol.*, **34**(1), 11-18.
48. *Chang T.M.S.* (2000) *J. Hepatol.*, **34**, 148-149.
49. *Moon J.S., Jeon H.M., Meng W., Akaike T., Kang I.K.* (2005) *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **16**(10), 1245-1259.
50. *Kang I.K., Moon J.S., Jeon H.M., Meng W., Kim Y.I., Hwang Y.J., Kim S.* (2005) *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **16**(6), 533-599.
51. *Ohashi K., Waugh J.M., Dake M.D., Yokoyama T., Kuge H., Nakajima Y., Yamanouchi M., Naka H., Yoshioka A., Kay M.A.* (2005) *Hepatology*, **41**(1), 132-140.
52. *Kimata T., Nagaki M., Ogiso T., Naiki T., Kato T., Moriwaki H.* (2006) *Hepatology*, **44**(1), 140-151.
53. *Cho C.S., Seo S.J., Park I.K., Kim S.H., Kim T.H., Hoshiba T., Harada I., Akaike T.* (2006) *Biomaterials*, **27**(4), 576-585.
54. *Seo S.J., Choi Y.J., Akaike T., Higuchi A., Cho C.S.* (2006) *Tissue Eng.*, **12**(1), 33-44.
55. *Seo S.J., Park I.K., Yoo M.K., Shirakawa M., Akaike T., Cho C.S.* (2004) *J. Biomater. Sci. Poly. Ed.*, **15**(11), 1375-1387.
56. *Seo S.J., Akaike T., Choi Y.J., Choi Y.J., Shirakawa M., Kang I.K., Cho C.S.* (2005) *Biomaterials*, **26**(17), 3607-3615.
57. *Barrera D.A., Zylstra E., Lansbury P.T., Langer R.* (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11010-11011.
58. *Hoshiba T., Nagahara H., Cho C.S., Tagawa Y., Akaike T.* (2007) *Biomaterials*, **28**(6), 1093-1104.
59. *Hoshiba T., Cho C.S., Murakawa A., Okahata Y., Akaike T.* (2006) *Biomaterials*, **27**(26), 4519-4528.
60. *Semino C.E., Merok J.R., Crane G.G., Panagiotakos G., Zhang S.* (2003) *Differentiation*, **71**(4-5), 262-270.
61. *Zeisberg M., Kramer K., Sindhi N., Sarkar P., Upton M., Kalluri R.* (2006) *Mol. Cell. Biochem.*, **2283**(1-2), 181-189.
62. *Le Cluyse E.L., Alexandre E., Hamilton G.A., Viollon-Abadie C., Coon D.J., Jolley S., Richert L.* (2005) *Methods Mol. Biol.*, **290**, 207-229.

63. Ise H., Takashima S., Nagaoka M., Ferdous A., Akaike T. (1999) *Biotechnology Letters*, **21**, 209-213.
64. Kaufmann P.M., Heimrath S., Kim B.S., Mooney D.J. (1997) *Cell Transplantation*, **6**(5), 463-468.
65. Mooney D.J., Sano K., Kaufmann P.M., Majahod., K., Schloo B., Vacanti J.P., Langer R. (1997) *J. Biomed. Mater. Res.*, **37**(3), 413-420.
66. Uyama S., Kaufmann P.M., Kneser U., Fiegel H.C., Pollok J.M., Kluth D., Vacanti J.P., Rogiers X. (2001) *Transplantation*, **71** (10), 1-7.
67. Mooney D.J., Park S., Kaufman P.M., Sano K., McNamara K., Vacanti J.P., Langer R. (1995) *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 959-965.
68. Kaufmann P.M., Kneser U., Fiegel H.C., Kluth D., Herbst H., Rogiers X. (1999) *Transplant. Proc.*, **31**, 1928-1929.
69. Zavan B., Cortivo R., Tonello C., Abatangelo G. (2003) *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **14**(8), 727-729.
70. Glicklis R., Shapiro L., Agbaria R., Merchuk J.C., Cohen S. (2000) *Biotechnol. Bioeng.*, **67**(3), 344-353.
71. Carlisle E.S., Mariappan M.R., Nelson K.D., Thomes B.E., Timmons R.B., Constantinescu A., Eberhart R.C., Bankey P.E. (2000) *Tissue Eng.*, **6**(1), 45-52.
72. Kobayashi N., Fujiwara T., Westerman K.A., Inoue Y., Sakaguchi M., Noguchi H., Miyazaki M., Cai J., Tanaka N., Fox I.J., Leboulch P. (2000) *Science*, **287**, 1258-1262.
73. Cai J., Ito M., Westerman K.A., Kobayashi N., Leboulch P., Fox I. (2000) *J. Hepatol.*, **33**, 701-708.
74. Werner A., Duvar S., Muthing J., Buntmeyer H., Kahmann U., Lunsdorf H., Lehmann J. (1999) *Ann. N-Y Acad. Sci.*, **875**, 364-368.
75. Liu J., Pan J., Naik S. (1999) *Cell. Transplant.*, **8**, 219-232.
76. Jauregui H.O. (2001) *Artificial Organs.*, **25**(7), 509-512.
77. Fausto N. (2000) *J. Hepatol.*, **32**, 19-31.
78. Pardee A. (1989) *Science*, **246**, 603-608.
79. Helin K. (1998) *Curr. Opin. Genetic. Dev.*, **8**, 28-35.
80. Sidle A., Palaty C., Dirks P., Wiggan O., Kiess M., Gill R., Wong A., Hamel P. (1996) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **31**, 237-271.
81. Elaut G., Henkens T., Papeleu P., Snykers S., Vinken M., Vanhaecke T., Rogiers V. (2006) *Curr. Drug. Metab.*, **7**(6), 629-660.
82. Ledley F.D. (1993) *Hepatology*, **18**(5), 1263-1273.
83. Grossman M., Rader D.J., Muller D.W., Kolansky D.M., Kozarsky K., Clark B.J. 3rd, Stein E.A., Lupien P.J., Brewer H.B. Jr., Raper S.E., Wilson J.M. (1995) *Nature Med.*, **1**(11), 1148-1154.
84. Malhi H., Gupta S. (2001) *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **8**, 40-50.
85. Nguyen T.H., Ferry N. (2004) *Gene Ther.*, **11**, Suppl. 1 :S76-S84.
86. Puppi J., Guillonneau C., Pichard V., Bellodi-Privato M., Cuturi M.C., Anegon I., Ferry N. (2004) *J. Hepatol.*, **41**(2), 222-228.
87. Ferry N., Heard M. (1998) *Hum. Gene Ther.*, **9**(14), 1975-1981.
88. Park F., Ohashi K., Chiu W., Naldini L., Kay M.A. (2000) *Nature Genet.*, **24**(1), 49-52.
89. Bandyopadhyay P., Ma X., Linehan-Stieers C., Kren B.T., Steer C.J. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**(15), 10163-10172.
90. Zender L., Hutker S., Liedtke C., Tillmann H.L., Zender S., Mundt B., Waltemathe M., Gosling T., Flemming P., Malek N.P., Trautwein C., Manns M.P., Kuhnel F., Kubicka S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**(13), 7797-7802.
91. Lowes K.N., Croager E.J., Olynyk J.K., Abraham L.J., Yeon G.C.T. (2003) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **18**, 4-12.

Поступила: 16. 10. 2008.

THE MODERN CREATION TECHNOLOGIES OF IMPLANTED BIOARTIFICIAL LIVER

*M.S. Dolgikh*

Institute of Transplantology and Artificial Organs, Rosmedtechnology, Shchukinskaya, 1, Moscow, Russia; tel.: (499)190-45-31; e-mail: biolab@online.ru

The liver transplantation is the most effective method for treating severe liver disease. The hepatocytes transplantation may serve as the perspective means for treating liver failure. This review analyzes the experimental approaches and perspectives on the adult hepatocytes use for the creation of implanting bioartificial liver module for hepatic failure treatment.

**Key words:** cell therapy, hepatocytes, transplantation, liver failure.