Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 5, с. 545-559.

УДК 616.1., 9-055.5
©Рябинин

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНЫХ СИСТЕМ ПОДДЕРЖКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ

В.Е. Рябинин

Южно-Уральский государственный медицинский университет,
Челябинск, ул. Воровского, 64; тел.: 8-351-232-74-70; эл.почта: veryabinin@mail.ru

Рассмотрены особенности эфферентной терапии с использованием экстракорпоральных систем, аппаратов “искусственной печени” и “биоискусственной печени” при лечении печёночной недостаточности. Анализ литературных данных показывает необходимость дальнейшего развития этих биомедицинских исследований и поиска оптимальных решений для подбора источника гепатоцитов, разработки биореакторов и биоматериалов, составляющих основу аппаратов типа “Биоискусственная печень”. Учет определенных преимуществ и недостатков различных методов экстракорпоральной поддержки функционального состояния печени позволяет оценить предшествующий опыт при лечении заболеваний печени и подойти к разработке новых, более эффективных лечебных технологий.

Ключевые слова: биоискусственная печень, гепатоциты, биоматериалы, печёночная недостаточность

DOI: 10.18097/PBMC20156105545

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение функции печени возникает при различных патологических состояниях и сопровождается выраженными метаболическими расстройствами с развитием токсемического синдрома. Количество больных с печеночной недостаточностью (ПН) во всем мире достигает около двух миллионов человек в год. Использование стандартных терапевтических приёмов не позволяет достичь удовлетворительных результатов и смертность в среднем составляет 80%. “Золотым стандартом” лечения ПН является трансплантация печени. Ежегодно в США выполняется около 6000 операций по пересадке печени и приблизительно 600-700 в Великобритании. Однако возможности трансплантации печени также ограничены из-за операционного риска, наличия послеоперационных осложнений, необходимости иммуносупрессивной терапии и отсутствия адекватного количества доноров [1]. Значительная часть известных методов лечения эндо- и экзогенных интоксикаций у человека основана на таких способах экстракорпоральной детоксикации как гемодиализ, гемосорбция и плазмаферез [2], которые поддерживают лишь элиминирующую функцию печени, не затрагивая существенно обменные процессы. Эффективность такого лечения, как правило, не намного выше базовой терапии. Определённая ограниченность и недостаточная эффективность известных методов лечения требует их усовершенствования и разработки новых, патогенетически обоснованных способов детоксикации и нормализации обменных процессов. Особый интерес представляют исследования возможности использования экстракорпоральной “вспомогательной печени”, так как при этом наряду с детоксикацией может осуществляться и метаболическая функция. Перспективным представляется подход, основанный на использовании в экстракорпоральных аппаратах в качестве “биоискусственной печени” как отдельных клеток, так и субклеточных фракций печени [3, 4]. Известные трудности разработки аппаратов и систем типа “искусственная печень” связаны как с проблемами познания сложных биохимических процессов, протекающих в этом органе, так и с технологической сложностью процессов выделения, инкубации, культивирования и хранения клеток печени, высокой предполагаемой стоимостью такого рода операций.

Учёт определенных преимуществ и недостатков различных методов экстракорпоральной поддержки функционального состояния печени, представленных в настоящем обзоре, позволяет не только оценить

предшествующий опыт при лечении заболеваний печени, но и подойти к разработке новых, более эффективных лечебных технологий.

1. ЭФФЕРЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ И "ИСКУССТВЕННАЯ ПЕЧЕНЬ"

К важным патогенетическим факторам развития ПН относят гипераммониемию, увеличение концентрации ароматических аминокислот, билирубина, меркаптанов, фенолов, жирных кислот и некоторых других веществ [5, 6]. В связи с этим идеология разработки аппаратов "Искусственная печень" была исходно основана на элиминации этих соединений с помощью плазмафереза, гемофильтрации и гемосорбции.

1.1. Плазмаферез

Если вначале плазмаферез (ПФ) применялся в основном при заболеваниях, в патогенезе которых важную роль играют аутоантитела и циркулирующие иммунные комплексы, то впоследствии показания к его использованию значительно расширились. В обзоре Chang T. [7] дано описание первого успешного клинического применения ПФ на больных с печёночной комой. С тех пор количество работ существенно увеличилось. Результаты исследований свидетельствовали о положительном клиническом эффекте в 30-60% случаев при лечении острой печёночной недостаточности [8, 9]. Выживаемость пациентов при ПФ составляла 20%, а при молниеносной ПН – около 10%. Несмотря на широкое клиническое применение ПФ, механизм его лечебного эффекта во многом остаётся невыясненным [10]. Не удалось также обнаружить специфических лабораторных маркеров эффективности ПФ. Кроме того, было установлено, что при лечении острой ПН методом ПФ замещение изъятой плазмы альбумином или плазмой здоровых доноров может тормозить регенерацию собственной поражённой печени [11].

1.2. Диализно-фильтрационные и сорбционные методы

Успешное использование гемодиализа при лечении больных с хронической почечной недостаточностью дало надежду на эффективное применение этого метода у больных с заболеваниями печени. Однако первые результаты клинических наблюдений не обнадеживали [12], хотя задача уменьшения гипераммониемии была решена, и уже после одного четырёхчасового сеанса гемодиализа в диализат поступало около 2000 мкг аммиака. Это свидетельствовало о весьма относительном значении гипераммониемии в патогенезе печеночной комы и указывало на то, что не все вещества, определяющие развитие этого состояния, способны к диализу. По мнению исследователей, это было связано с низкой проницаемостью мембран для молекул средней массы.

С разработкой новых типов полиакрилнитрильных гемодиализных мембран с высокой проницаемостью для "средних молекул" началось интенсивное изучение их терапевтической активности. Opolon P. с соавт. [13], используя мембрану RP-6, показали эффективность гемодиализа у 17 больных из 39, находящихся в состоянии печёночной комы. Это выражалось во временном возвращении сознания и сопровождалось уменьшением концентрации в крови "средних молекул". Однако летальность составила 77% и практически не отличалась в сравнении с другой группой больных, не подвергавшихся гемодиализу. Ограничениями к применению этого метода являются также различные медицинские осложнения: развитие гипотензии и гиповолемии, нарушение сердечного ритма, вызванное ацидозом, анемией и резким изменением электролитного состава крови, изменения в свёртывающей системе крови, усугубляющиеся введением гепарина и механическим воздействием на форменные элементы крови [2, 14].

По мере увеличения молекулярной массы токсических веществ, степень их диффузии через полупроницаемую мембрану уменьшается. Молекулы средней массы не в полной мере преодолевают диализную мембрану по градиенту концентрации, поэтому их выведение возможно лишь при создании повышенного фильтрационного давления. В связи с этим был разработан метод гемофильтрации, при котором удаление веществ из организма происходит путём конвекции через мембраны с высокой гидравлической проницаемостью (так называемые "высокопоточные" мембраны high-flux). Этот метод был использован при лечении больных с печёночной недостаточностью, выживаемость при этом составила 60% [15].

Повысить эффективность стандартного гемодиализа за счёт увеличения объёма удаляемых веществ вследствие их фильтрационного и конвекционного переноса оказалось возможным с помощью сочетания стандартного гемодиализа и гемофильтрации. Этот метод называется гемодиафильтрацией и проводится с помощью специальных диализаторов с высокими значениями коэффициента ультрафильтрации. Несмотря на повышение клиренса "средних молекул" и улучшение некоторых клинических показателей после гемодиафильтрации, отмечается, что применение высокопроницаемых мембран увеличивает потери организмом необходимых для жизнедеятельности веществ (гормонов, витаминов, аминокислот и др.). Последствия таких потерь изучены ещё недостаточно [16].

Важным оказался опыт применения при лечении печёночной недостаточности диализа крови с помощью молекулярной адсорбции ("Молекулярная Адсорбирующая Рециркулирующая Система" (МАРС) фирмы "Teraklin", Германия), основанной на альбуминовом диализе. Данный метод лечения позволяет удалить связанные с альбумином и водорастворимые яды [17, 18]. Альбуминовый диализат регенерируется на активированном угле и ионообменной смоле и вновь используется,

что позволяет проводить процедуру одним объёмом альбумина, не снижая её эффективности. В зависимости от тяжести заболевания данный метод детоксикации может использоваться в течение 3-5 дней при длительности процедуры от двух до шести часов. Использование "MARC" приводило к улучшению физиологических и неврологических параметров пациентов с ПН, но лишь в незначительной степени улучшало показатели выживаемости [19]. При этом, как и в случае использования других фильтрационных методов, отмечена вероятность удаления целого ряда ключевых цитокинов (таких как IL-6 и TNF), вовлеченных в регенерацию печени [20]. Кроме того, необходимо отметить, что аппарат "MARC" не является автономным устройством и может работать только совместно с гемодиализными аппаратами, а его высокая стоимость, особенно, комплекта расходных материалов (несколько тысяч евро за один сеанс), не позволяют широко использовать это оборудование в медицинской практике. Тем не менее, в настоящее время альбуминовый диализ пока занимает лидирующее место в экстракорпоральных системах, разработанных для замещения некоторых функций печени.

С целью удешевления проведения альбуминового диализа был разработан метод с использованием отечественного альбумина и сорбентов [21]. Проведение клинических испытаний при лечении 15 пациентов с ПН различной этиологии с помощью аппарата "Биоискусственная печень" [22] показало высокую эффективность метода, проявляющуюся в достоверном снижении у всех больных биохимических маркеров цитолиза, холестаза и уровня эндогенной интоксикации. Какие-либо побочные явления, связанные с процедурой, отсутствовали, а летальность составляла 6,7%.

В экстракорпоральной системе "Prometheus" также используется адсорбционный метод при осуществлении высокопоточного (high flux) диализа плазмы на полупроницаемых мембранах с альбумином. Клинические исследования показали более высокую терапевтическую эффективность этого метода по сравнению с альбуминовым диализом на аппарате MARC, но не было отмечено существенных улучшений гемодинамики [23].

Первые работы по применению гемосорбции при лечении больных с ПН показали уменьшение концентрации молекул средней массы, гидрофобных и других токсических компонентов [24], повышение выживаемости больных до 65% [25]. Проведение гемосорбции у больных с острой ПН при вирусном гепатите В показало отсутствие положительной клинической динамики, хотя в течение 1-2 суток наступало кратковременное снижение показателей общего и прямого билирубина [26]. По мнению этих авторов, низкая эффективность гемосорбции обусловлена сорбцией на поверхности используемых сорбентов пептидных факторов регенерации печени и некоторых жизненно важных метаболитов. Действительно, химический анализ веществ, содержащихся в активированном угле после гемосорбции, показал присутствие соединений, дающих положительную реакцию на нингидрин и определение белка по Лоури, а также альдоз, сорбоз, перекисей, органических кислот и средне-молекулярных пептидов, обладающих высокой биологической активностью [27]. Многолетние исследования эффективности гемосорбции у больных с хронической недостаточностью печени позволили установить коррелятивные связи положительного клинико-биохимического эффекта гемосорбции с исходными показателями белкового обмена, активностью индикаторных ферментов печени, степенью поражения ЦНС [28]. Выявлено положительное влияние гемоперфузии на течение заболевания и удлинение сроков ремиссии у больных с хроническими заболеваниями печени; при этом была отмечена более высокая эффективность при алкогольном поражении печени. В целом, анализ литературных данных показывает, что положительный эффект гемосорбции связан с удалением из крови некоторых аминокислот, фенолов, жирных и желчных кислот, билирубина. Селективное удаление этих веществ, безусловно, способствует благоприятному течению заболеваний, но не решает проблему лечения печеночной недостаточности.

Таким образом, использование диализно-фильтрационных методов, несмотря на улучшение некоторых клинических параметров, не позволяет существенно увеличить выживаемость пациентов [29]. Это в определенной степени может быть связано с побочными эффектами гемофильтрации, например, активацией комплемента при экстракорпоральной циркуляции крови, лейкопенией, ведущей к системному воспалению, нарушением свёртывающей способности крови и др. Существенным недостатком этих методов является удаление некоторых гормонов и факторов роста, вовлечённых в регенерацию печени [20]. Эстракорпоральные системы, поддерживающие лишь элиминирующую функцию печени, не способны в полной мере заместить другие утраченные функции печени. Возникающие при этом осложнения демонстрируют недостатки небиологических устройств поддержки печени. Сегодня существует ясное понимание того, что для создания систем "вспомогательной печени" необходимо использовать устройства с биологическим компонентом, способным к выполнению многих метаболических и детоксикационных функций печени [30]. Разумным подходом к решению этого вопроса является использование различных комбинаций эфферентных методов для лечения печеночной недостаточности [31].

2. РАЗРАБОТКИ И СОЗДАНИЕ "БИОИСКУСТВЕННОЙ ПЕЧЕНИ"

Более современные методы, появившиеся в конце 80-х годов и интенсивно разрабатываемые сегодня, основаны на включении в экстракорпоральные системы биологических принципов очистки крови и предусматривают временную инкубацию

в перфузионном контуре клеток или фрагментов тканей, способных осуществлять органоспецифические функции, утраченные поражённой печенью. В этих методах используются устройства, называемые часто как "искусственная печень" (artificial liver) и "биологическая искусственная печень" (bioartificial liver), принципом функционирования которых является перфузия крови или плазмы пациентов через биореактор с метаболически активным материалом, способным осуществлять различные функции печени: детоксикацию и биотрансформацию экзогенных и эндогенных веществ, синтез белков, мочевины, триглицеридов и др.

Относительно простым методом для коррекции метаболических расстройств при печёночной недостаточности является система для экстракорпоральной детоксикации с использованием цитозоля печени свиней, содержащего митохондриальную и микросомальную фракции [31]. Модельные эксперименты и исследования на животных продемонстрировали высокую эффективность метода, проявляющуюся в способности препарата печени усиливать детоксикационные процессы, снижать интенсивность патологических процессов и нормализовать содержание различных компонентов крови. Безопасность и эффективность способа доказана в доклинических исследованиях с помощью биохимических, гематологических и иммунологических методов. В настоящее время разработан регламент производства препарата из печени свиней для использования его в этом аппарате.

Важным этапом на пути создания "Биоискусственной печени" стала разработка Seglen [32] метода получения функционально полноценных изолированных клеток печени путём перфузии органа растворами, содержащими коллагеназу и гиалуронидазу для разрушения межклеточных связей, а также разработка Berry и Friend [33] комбинированного ферментно-механического способа выделения изолированных гепатоцитов. Совершенствование техники гипотермического хранения и криоконсервирования гепатоцитов к настоящему времени дало возможность для всесторонних клинических и экспериментальных исследований такого рода биологических экстракорпоральных методов временного замещения функций печени.

Наиболее значительными принципиальными отличиями известных на сегодняшний день биологических систем временной поддержки функций печени, являются источник (тип) используемых клеток, способ контакта крови или плазмы при проведении перфузии с воздействующей средой биореактора – гепатоцитами, и способ иммобилизации клеток в биореакторе. Некоторые разработчики оборудования такого рода считают необходимым включать в свои системы устройства, обеспечивающие детоксикацию перфузируемой крови или плазмы при использовании стандартных приёмов гемосорбции, диализа, ультрафильтрации и плазмафереза.

2.1. Источники гепатоцитов

На основе знаний, накопленных в области гепатологии, известно, что поддержание нормального функционирования печени после её резекции возможно при сохранении 20% от массы всей печени, что составляет примерно 200 г, то есть 2×10^{10} гепатоцитов. Клинические исследования, однако, показывают, что при использовании такой массы клеток в аппаратах типа "Экстракорпоральная биоискусственная печень" ("ЭБИП"), несмотря на улучшение биохимических параметров и клинических симптомов, не удаётся добиться повышения общей выживаемости. Кроме количества клеток на исход лечения влияют различные факторы, связанные с уровнем жизнеспособности и функциональной активности гепатоцитов.

2.1.1. Первичные гепатоциты человека (ПГЧ)

Теоретически, ПГЧ идеально подходят для аппаратов типа "ЭБИП", так как отвечают условиям безопасности и уровню биологической активности. Сравнение метаболизма ПГЧ, фетальных гепатоцитов человека (ФГЧ) и гепатоцитов свиней в аппарате "ЭБИП" показало, что способность ПГЧ к удалению аммиака и синтезу мочевины в 2 и 3 раза соответственно выше по сравнению с гепатоцитами свиней [34]. В то же время, метаболизм лидокаина у ФГЧ был в 3,5 раза выше, чем у гепатоцитов свиней. К недостаткам использования ПГЧ в аппаратах "ЭБИП" относят отсутствие пролиферации и непродолжительную жизнеспособность (1-2 недели). В большинстве случае ПГЧ получают после резекции печени при циррозах, фиброзах и холангитах, поэтому количество и функциональная активность ПГЧ оказываются недостаточными, а риск инфицирования бактериями и вирусами – значительными.

Несмотря на способность печени к регенерации, поддерживать и увеличивать объём культуры гепатоцитов оказалось чрезвычайно трудным делом [35]. Даже в оптимальной питательной среде ПГЧ могут дедифференцироваться в течение нескольких часов, теряя специфическую экспрессию генов и соответствующие функции. Тем не менее, кажется перспективным создание специальных банков ПГЧ, в которых должен проводиться надлежащий контроль за качеством клеточного материала и его накоплением для последующего использования в аппаратах "ЭБИП".

2.1.2. Линии клеток печени человека

В настоящее время единственной линией клеток печени человека, разрешённой к использованию в клинических условиях в аппаратах "ЭБИП" является линия C3A, полученная путём клонирования клеточной линии HepG2. Однако эта линия по сравнению с первичными гепатоцитами свиней (ПГС) имеет пониженную детоксикационную и метаболическую способность, что является критичным для больных с ПН [36, 37]. По-видимому, именно по этой причине использование данной линии клеток в аппаратах "ЭБИП" не было клинически оправданным.

Для получения высокофункциональных гепатоцитов используют различные методы иммортализации соответствующих клеточных линий. В обзоре Долгих [38] отмечается, что обычный подход к иммортализации гепатоцитов заключается в ретровирусной трансдукции ракового антигена SV-40 Tag, продукт которого связан с белками-регуляторами Rb и p53. Клеточные линии могут быть также получены при спонтанной иммортализации гепатоцитов в так называемых сэндвич-культурах на коллагеновом геле или в со-культурах, а также из раковых клеток печени. Однако, иммортализованные линии гепатоцитов могут быть функционально неполноценными и представлять онкогенную опасность. В настоящее время большое внимание уделяется методам, направленным на получение клеток печени из эмбриональных или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [30].

2.1.3. Первичные гепатоциты свиней (ПГС)

ПГС более широко используются при создании аппаратов "ЭБИП", так как получение и культивирование их достаточно хорошо отработано; они вполне доступны, в том числе и по стоимости. Однако и здесь имеются определенные проблемы, связанные прежде всего с потенциальной опасностью заражения эндогенным ретровирусом свиней (PERV). В ряде исследований показано, что PERV может инфицировать ПГЧ и другие культивируемые *in vitro* клеточные культуры [39, 40]. Наличие такого риска послужило основанием для запрета на использование ПГС в некоторых странах Европы и существенно ограничивает их применение в аппаратах "ЭБИП" [41].

В других исследованиях [42] с использованием системы поддержки печени Hepat Assist не было обнаружено инфицирования PERV. С помощью полимеразной цепной реакции было показано отсутствие инфицирования мононуклеарных клеток периферической крови, собранных через 5 лет после лечения 28 пациентов на этом аппарате. Результаты исследований *in vitro* также показали, что наличие мембраны уменьшает риск инфицирования PERV до 10^{-5} и совместное культивирование свиных гепатоцитов с клетками человека не сопровождается репродукцией вируса. Эти результаты противоречат представлениям о возможности инфицирования пациентов при лечении с помощью систем биоискусственной печени, использующих гепатоциты свиньи.

Согласно требованиям Управления США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), при использовании гепатоцитов свиней должны использоваться определённые породы этих животных, содержащиеся в надлежащих условиях [43]. Это связано, прежде всего, с проблемой потенциального развития иммунного ответа у пациентов после перфузии их крови через ксеногепатоциты. Важным также является вопрос защиты гепатоцитов свиньи от действия потенциально активных факторов иммунной защиты пациентов в период перфузии. Эти проблемы во многом решаются при использовании мембран, способных задерживать вещества с молекулярной массой около 100 кДа, то есть способных пропускать такие белки как альбумин (60-80 кДа), но задерживать иммуноглобулины человека (2500 кДа).

2.1.4. Со-культивирование гепатоцитов с непаренхиматозными клетками

Межклеточные взаимодействия являются определяющими для функционирования многих органов и систем организма человека. Главным вопросом при этом является взаимодействие паренхиматозных и непаренхиматозных клеток, определяющее рост, миграцию и дифференциацию клеток. Это имеет не только фундаментальное значение для физиологии, клеточной биологии, биологии развития, но и позволяет разрабатывать новые подходы для лечения различных заболеваний.

Гетеротипические взаимодействия играют важную роль в функционировании печени, так как её формирование происходит из эндодермальной передней кишки и мезенхимных сосудистых структур. Как известно, печень является сложной многоклеточной структурой, состоящей из дифференцированных гепатоцитов, отделённых от эндотелия пространством Диссе; в структуре печени имеются липоциты (звёздчатые клетки или клетки Ито), клетки желчных протоков и клетки Купфера (гистиоциты). Таким образом, зрелая печень является своеобразной матрицей для многих сложных межклеточных взаимодействий, что позволяет ей эффективно осуществлять и координировать разнообразные функции.

При со-культивировании гепатоцитов с различными типами клеток *in vitro* их жизнеспособность и функциональная активность остаётся стабильной в течение нескольких недель. Образующиеся со-культуры были использованы в исследованиях различных физиологических и патофизиологических процессов, включая ответную реакцию на оксидативный стресс [44], токсическое действие ксенобиотиков [45] и др. В известной работе [46] было показано, что при со-культивировании фибробластов и гепатоцитов происходит появление определённого межклеточного контакта или гетеротипической поверхности раздела: возникает "островок" гепатоцитов, окруженный фибробластами. Функции гепатоцитов, включая секрецию альбумина, сохранялись в течение 65 дней [46]. Работы этих исследователей послужили началом для изучения возможности моделирования физиологической организации печеночной ткани в биореакторах "ЭБИП" при со-культивировании гепатоцитов с непаренхиматозными клетками [47, 48]. Со-культивирование гепатоцитов крысы с клеточными линиями фибробластов эмбрионов мышей (NIH3T3) в трёхмерной инкапсулированной структуре сопровождалось секрецией различных факторов роста, в частности трансформирующего фактора роста (TGF-b1), стимулирующего функции

гепатоцитов. В другом исследовании было обнаружено, что в клеточных слоях "гепатоциты-эндотелиальные клетки" происходит экспрессия генов, ответственных за метаболизм лекарств и поддержание на высоком уровне функциональной активности гепатоцитов [49]. Анализ корреляции функциональной активности гепатоцитов и экспрессии некоторых генов позволил обнаружить два варианта гена в со-культивируемой системе (декорин и N-кадерин), играющих важную роль в модуляции печёночных функций [50]. В последующих исследованиях этим авторам удалось установить, что повышенное выделение Т-кадерина способствует значительному увеличению функциональной активности гепатоцитов в со-культивируемой системе и сохранению соответствующего фенотипа путём экспрессии важных биологически активных молекул [51].

В дальнейшем было выполнено много работ, посвященных изучению вопросов оптимального соотношения паренхиматозных и непаренхиматозных клеточных культур, подбора питательных сред и пр., однако при этом до сих пор остается много нерешенных вопросов. Сложность анализа эффекта со-культивирования связана с тем, что размер колоний гепатоцитов, их агрегация и миграция могут варьировать в зависимости от плотности посева клеток. Не описаны также точные механизмы, регулирующие усиление печёночных функций в со-культурах гепатоцитов. Возможные медиаторы межклеточных взаимодействий включают как "свободно секретируемые сигналы" (цитокины), так и "связанные с клетками" сигналы (внеклеточный матрикс, связанные с мембранами белки и пр.). При попытке использовать со-культивирование гепатоцитов и фибробластов в биореакторах для аппаратов "ЭБИП" возникает большое количество вопросов.

2.1.5. Гепатоциты из стволовых клеток

Как известно, существует возможность дифференциации эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСКЧ) в гепатоциты [52, 53]. Это может быть достигнуто либо путём спонтанной дифференцировки через формирование эмбриоидных тел (ЭТ), либо путём прямой дифференцировки. Спонтанную дифференцировку ЭСКЧ получают в результате формировании ЭТ, состоящих из смешанной популяции клеток всех трёх зародышевых листков [54]. Показано, что ЭТ могут спонтанно дифференцироваться в гепатоциты, но с ограниченной эффективностью. Более быстрое и эффективное производство гепатоцитов может быть достигнуто путём прямой дифференцировки без образования ЭТ [55, 56]. В одной из работ гепатоцито-подобные клетки получали из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПК) путём многоступенчатой дифференциации из ЭТ и последующего культивирования в соответствующем мембранном модуле (размер пор 0,2 мкм) биореактора в течение 7 дней [57]. На конечных этапах дифференцировки ИПК изменяли свою морфологию в полигональную форму с двумя ядрышками и большим количеством цитоплазматических гранул. Анализ, проведённый с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, показал наличие в этих клетках гликогена, системы канальцев и микроворсинок на их поверхности. ПЦР-анализ выявил увеличение экспрессии мРНК альбумина и соответственно его синтеза, продукции мочевины в течение 7 дней. С помощью сканирующего электронного микроскопа было обнаружено прикрепление кластеров клеток к половолоконным мембранам биореактора. Вполне вероятно, что в будущем ЭСК смогут стать неиссякаемым источником гепатоцитов, однако их функции, так же, как и соматических клеток, зависят от тканевого микроокружения или "ниш".

2.2. 3D-конструкции гепатоцитов

Ключевые компоненты "ниш" включают различные факторы роста, межклеточные контакты и адгезивный клеточный матрикс, которые регулируют образование ткани, её функционирование и восстановление [58]. Изменения внеклеточного матрикса (ВКМ) сами по себе способны влиять на дифференциацию ЭСК и поддерживать фенотип гепатоцитов в культуре [49]. Клеточные ниши являются трёхмерными (3D) и их биохимические и топологические особенности существенно влияют на дифференцировку и процессы пролиферации. В отличие от 3D, создаваемые для аппаратов "ЭБИП" двумерные (2D) конструкции не соответствуют естественным условиям. Во вращающемся биореакторе 3D культура гепатоцитов линии HepG2 образует сфероиды с высокой активностью цитохрома P450 и продукцией альбумина [59]. Однако перенос сфероидов в культуральные планшеты (2D культивирование) приводил к потере функций и дезинтеграции. О преимуществе трёхмерной конфигурации культивируемых гепатоцитов свидетельствуют исследования, в которых было показано, что в монослойной культуре возникают существенные изменения ультраструктуры, проявляющиеся в эндоцитозе атриовентрикулярных комплексов с вторичным эффектом делокализации цитоскелета и потерей ориентации клеточных органелл [60]. В то же время на моделях культуры клеток высокой плотности и трёхмерного расположения агрегатов гепатоцитов [61] была показана возможность реконструкции атриовентрикулярных комплексов, релокализации цитоскелета и реориентации клеточных органелл.

Использование полиамидных и полиэфирных полых волокон [62] в биореакторах позволило осуществить гомогенную клеточную перфузию и создать 3D-конструкции с иммобилизованными гепатоцитами на поверхности капилляров и капиллярной сетью оксигенированных мембран. Как правило в таких системах среда, насыщенная 5% CO_2, прокачивается насосом через центры капилляров, а клетки добавляются во внешнюю камеру, окружающую полые мембранные волокна. Клетки прикрепляются и растут на внешней

стороне капилляров, достигая клеточной плотности аналогичной таковой в тканях. Считается, что клетки этого типа в культуре с высокой плотностью ведут себя как ткани *in vivo*. Показана возможность создания биореактора, способного поддерживать перфузируемую 3D культуру гепатоцитов и стимулировать развитие тканеподобной морфологической структуры с образованием желчных капилляров [63]. Использование систем 3D моделирования чрезвычайно перспективно для понимания клеточных функций и межклеточных взаимодействий, разработки масштабных производств клеточных систем для тестирования лекарственных средств и/или создания аппаратов типа "ЭБИП".

2.3. Биоматериалы для "Биоискусственной печени"

Объёмные матриксы для создания 3D клеточных моделей представляют собой сложные системы в виде губок, гелей и объемных конструкций. При конструировании матриксов в виде гелей необходимо контролировать ряд параметров с целью придания матриксу свойств, необходимых для успешного выращивания клеток. В ходе образования геля следует контролировать параметры процесса для обеспечения необходимой целостности и прочности геля, биосовместимости, требуемых адгезионных характеристик по отношению к клеткам, заданных скоростей биораспада, соответствующих диффузионных характеристик. Для того, чтобы внутри гидрогелевых каркасов из клеток формировались ткани, гидрогель должен способствовать миграции клеток в объём матрикса, их последующему прикреплению, делению и дифференцировке. Гидрогели, образованные из природных белков (например, коллагена), во многом соответствуют требуемым характеристикам.

Биодеградируемые материалы синтетического и природного происхождения, близкие по консистенции содержимому природных тканей, применяются для создания биоинженерии мягких тканей, включая печень. Такие материалы состоят из органических полимеров с разнообразными механическими и физико-химическими свойствами и способностями к биодеградации. Модифицированные структурные компоненты природного внеклеточного матрикса (ВКМ) широко используются в качестве биоматериалов в производстве каркасов для биоинженерной печени, поскольку обладают необходимыми структурными и химическими параметрами для создания биоактивных матриксов. Последние служат не только механической подложкой для размещения и экспансии клеток, но и оказывают стимулирующее влияние на клеточный рост и дифференцировку. При биоинженерии печени в качестве скаффолдов используются различные компоненты ВКМ, в частности коллаген. В ряде работ показано [64, 65], что в присутствии экзогенных факторов роста и гормонов культивирование ЭСК, размещённых в коллагеновом 3D скаффолде, сопровождалось образованием гепатоцитов с соответствующей экспрессией генов печени и синтезом альбумина.

Возможность использования коллагена для культивирования гепатоцитов была убедительно продемонстрирована во многих работах [66-68]. При этом было показано существование сложных механизмов, обеспечивающих взаимодействие между коллагеном и гепатоцитами. Введение гепатоцитов в коллагеновый гель сопровождалось сокращением коллагена и изменением диффузии различных низкомолекулярных веществ, а количество гепатоцитов и их жизнеспособность во многом определяли контрактильные свойства коллагена [69].

Гиалуроновая кислота – другой важнейший компонент ВКМ, участвующий в регуляции клеточной экспансии и размножения и играющий первую роль в опосредовании межклеточных сигналов и поведении (миграции) клеток. Гепатобласты плода человека и человеческие гепатоциты экспрессируют на своей поверхности молекулы CD44, являющиеся рецепторами гиалуроновой кислоты. Наличие рецепторов позволяет конструировать гидрогели из гиалуроновой кислоты и её химически модифицированных производных с хорошими адгезивными свойствами для гепатоцитов и гепатобластов, способными поддерживать функциональность и жизнеспособность встроенных клеточных агрегатов в течение 4 недель [70].

В настоящее время большое внимание уделяют таким природным гидрогелям как матригель и альгинат, которые интенсивно используются для создания 3D культуры гепатоцитов [71]. Матригель – композит, состоящий из растворимых мембранных белков, экстрагированных из хондросаркомы мышей, ламинина, коллагена IV и гепарина [72]. Гепатоциты, культивируемые на матригеле, способны образовывать кластеры в мультиклеточных сфероидах, но обладают меньшей полигональностью, чем гепатоциты *in vivo* [73]. Хотя матригель является исключительным биоматериалом, содержащим много естественных биологических молекул, его гетерогенная природа и не идентифицированные молекулярные компоненты уменьшают степень экспериментального контроля. Кроме того, он является ксеногенным источником из опухолевой ткани, что естественно ограничивает его клиническое применение для клеточной терапии или тканевой инженерии.

Альгинат – это природный полисахарид, состоящий из маннуроновой и гулуроновой кислот, получаемых из морских водорослей. Полимеры альгината образуют гель-ионные мостики в присутствии различных двухвалентных катионов (Ca, Mg) путём сшивания карбоксилатных групп на главной цепи полимера. Альгинатные гидрогели можно получать различными методами, включая физическую и химическую желатинизацию, с помощью которой можно создавать специальные микросферы для последующей инокуляции клеточного материала. Так, помещение гепатобластов плода человека в содержащие альгинат капсулы благоприятно сказывалось на их ростовых характеристиках и последующей дифференцировке

в зрелые клетки печени [74]. При этом сохранялись такие функции, как элиминация аммиака, синтез альбумина, экспрессия цитохрома P450, формирование желчных капилляров. Эмбриональные тельца человека, культивируемые в микрочастицах альгината в присутствии экзогенных факторов роста, дифференцировались в гепатоциты с экспрессией альфа-фетопротеина, альбумина, CYP7A1 и цитокератина 18 [75], а культивирование клеточной линии C3A гепатоцитов человека внутри альгинатных матриксов приводило к образованию многоклеточных сфероидов с гораздо более выраженной активностью цитохромов P450 по сравнению с монослойными культурами [76].

Разработано устройство типа "ЭБИП" с использованием инкапсулированных в альгинате и культивируемых в жидкостно-пластинчатом биореакторе гепатоцитов человека линии HepG2 [77], которые инкапсулировались с помощью аппарата JetCutter с образованием сферических частиц размером около 500 мкм, содержащих 1,75 млн клеток/мл в каждой. Клетки внутри частиц пролиферировали до образования компактных клеточных сфероидов с хорошими межклеточными контактами и клеточными функциями. Через 11-13 дней культивирования установлено 34-кратное увеличение клеточной плотности и сохранение жизнеспособности клеточных сфероидов. Оптимизация обеспечения клеток кислородом и питательными веществами позволила увеличить клеточную плотность до 45 млн клеток/мл в каждой альгинатной частице и получить до 5×10^{10} клеток в 1100 мл этих частиц. Этот процесс можно масштабировать до $0{,}7\text{-}1\times10^{11}$ клеток для использования в клинических условиях. Разработан протокол поддержания необходимой температуры, дающий возможность транспортировать клеточный материал к пациентам в течение 48 ч для использования в разработанном аппарате.

Существенным препятствием на пути использования природных биоматериалов в биореакторах и аппаратах типа "ЭБИП" является вариабельность их химического состава и физико-химических свойств, соответствующие проблемы этики и безопасности.

2.4. Синтетические полимеры для экстракорпоральной "Биоискусственной печени"

Синтетические биополимеры обладают определенными преимуществами перед природными материалами, так как обладают широким диапазоном свойств, могут быть биосовместимы, приспособлены к различным технологиям, а их состав может быть точно охарактеризован. Так, было показано, что 3D культивирование фетальных гепатоцитов свиней на матриксе полилактата (PLLA) в присутствии соответствующих биофакторов способствует повышению их функциональной активности [78]. Возможность образования сферических мультиклеточных агрегатов гепатоцитов крыс в порах полиуретановой пены была продемонстрирована в нескольких работах [79, 80]: при добавлении в культуру эмбриональных стволовых клеток мышей различных факторов роста происходила дифференцировка этих клеток и образование сфероидов, экспрессия печеночных маркеров, в том числе альфа-фетопротеина, альбумина и триптофан 2,3-диоксигеназы [81]. Однако деградация этих полимеров, поверхностная эрозия и гидрофобность являются серьезными факторами ограничения их использования [82]. Деградация полимеров вследствие их гидролиза может приводить к накоплению кислотных дериватов и вызывать воспалительную реакцию. Тем не менее, эти ограничения можно уменьшить путём изготовления модифицированных матриксов с использованием белков, фотохимических воздействий и создания биоактивных зон на поверхности скаффолдов для обеспечения процессов клеточной адгезии, миграции, тканевого роста и репарации [83].

3. ОСОБЕННОСТИ КОНСТРУКЦИЙ БИОРЕАКТОРОВ ДЛЯ "ЭБИП"

Особенности конструкции биореакторов для "ЭБИП" заключаются в том, что они должны обеспечить длительное и эффективное функционирование гепатоцитов и другого клеточного материала в виде суспензий, 2D и 3D биоинженерных конструкций. Для достижения этой цели разрабатываются самые разные варианты соответствующих устройств и систем. Идеальная система должна имитировать микроокружение *in vivo* при проведении длительной перфузии и оксигенации среды, облегчать отбор проб клеток и культуральной среды в процессе эксперимента. Наиболее подходящими для этой цели являются биореакторы на основе полых синтетических волокон.

3.1. Биореакторы на основе катриджей из полых волокон

Биореакторы подобного типа часто используются при создании аппаратов "ЭБИП", при этом клетки, как правило, закрепляют в пространстве между мембранами, в то время как кровь или плазма перемещаются внутри волокон. Принцип терапии основан на том, что при увеличении концентрации некоторых токсических веществ в крови происходит их перемещение через полупроницаемую мембрану и детоксикация в гепатоцитах. Различия в конструкции таких биореакторов заключаются в методах прикрепления гепатоцитов. Так, в аппарате ELAD (Extracorporeal liver assist device) гепатоциты человека C3A располагают в экстралюминальном пространстве волокон [36], в аппарате BLSS (Bioartificial liver support system) используют суспензию гепатоцитов свиней в коллагеновом геле [84], в устройстве для аппарата HepatAssist 2000 [85] для иммобилизации гепатоцитов свиней использовали декстрановые микрочастицы, а в апаратах фирмы Academic Medical Center – гидрофильный матрикс на основе полиэфиров [86]. В 2001 году была предложена

конструкция MELS (Modular extracorporeal liver support) с более сложным катриджем, состоящим из трёх компартментов полых волокон, выполняющих функции перемещения плазмы, обеспечения гепатоцитов кислородом и питательными веществами [87]. Гепатоциты культивировали в коллагеновом матриксе межкапиллярного пространства. Эта система позволяет также со-культивировать гепатоциты с различными непаренхиматозными клетками для формирования тканеподобной структуры и образования желчных капилляров.

В Китае разработаны варианты клинического использования аппаратов "ЭБИП" на основе полых волокон и различных эфферентных устройств, включающих угольные сорбенты и модули плазмафереза: в военном госпитале Пекина – HALSS (Hybrid artificial liver support system) [88]; в университете Nanjing – HEBAL (Hybrid bioartificial liver) [89]; в университете Zhejiang – NEBAL (Novel bioartificial liver) [90]; в Южном медицинском университете – BALSS (Bioartificial liver support system) [91]. Некоторые другие варианты биореакторов подобного типа находятся на стадиях доклинических и/или экспериментальных исследований. Это касается системы LIVER-X 2000 (университет штата Миннесота, США), в которой гепатоциты размещаются внутри полых волокон, а в экстралюминальном пространстве перфузируют кровь [92], метода экстракорпоральной детоксикации с использованием цитозоля печени свиней, контактирующего с кровью через синтетические полые полупроницаемые мембраны [93] и оксигенированного биореактора [94] на полых волокнах (OXY-HFB), в котором осуществляется прямой контакт между гепатоцитами и кровью (Университет Eberhard Karls, Тюбинген, Германия).

Разработка капиллярных мембран для аппаратов "ЭБИП" отличается уникальными требованиями к их характеристикам, обеспечивающим оптимальный ход процедуры. Ключевыми условиями для достижения этой цели являются обеспечение узкого диапазона распределения размеров пор, точного ограничения их максимального диаметра, высокой плотности и равномерности их распределения, минимизации толщины селективного слоя, оптимального соотношения диаметра волокна и толщины его стенки, гидрофобных характеристик поверхности. Все это обеспечивает необходимые гидравлические и диффузионные характеристики – условия для получения высоких показателей клиренса для одних веществ и степени задержки – для других.

3.2. Системы с "уплотнённым слоем" (Packed bed system)

Термин "Packed bed system" первоначально использовался в химии для описания систем, содержащих полые трубки или другие сосуды, заполненные упаковочным материалом (частицы катализаторов, адсорбенты и др.), с целью облегчения взаимодействия между двумя фазами в процессе реакций. В приложении к аппаратам "ЭБИП" это означает наличие определенных матриксов, заполненных гепатоцитами и перфузируемых питательной средой или кровью/плазмой. При наличии пористого носителя (подложки), гепатоциты могут функционировать внутри него, при этом они защищены от раневого стресса, что позволяет использовать более высокие скорости перемешивания и аэрации в процессе культивирования. В этом качестве были исследованы различные материалы, в том числе полиуретановая пена [95], поливиниловая смола [96], альгинатные частицы [97], пористый гидроксиапатит [98] и полиэфирные скаффолды [99].

При использовании биореакторов с фиксированной твёрдой фазой, раневой стресс и повреждение клеток пузырьками газа минимальны. В процессе культивирования через фиксированную подложку циркулирует насыщенная кислородом среда. Поэтому при аксиальном потоке длина подложки является критическим параметром, поскольку обеспечение культуры кислородом и питательными веществами может быть недостаточным. В реакторах большого объёма эту проблему можно решить с помощью радиально распространяющегося потока, когда среда, обогащенная продуктами метаболизма, удаляется непрерывно или периодически.

3.3. Биореакторы на основе инкапсулированных систем

В биореакторах, основанных на инкапсуляции гепатоцитов, клетки включаются в полимерный матрикс для формирования небольших капсул и размещаются в специальных перфузионных камерах или колонках. Для инкапсуляции гепатоцитов могут использоваться различные материалы, включая гидрогели [100], альгинат [101] и некоторые синтетические полимеры [102]. До настоящего времени нет сведений об использовании таких систем в клинических условиях.

3.4. Биореакторы на основе плоско-плиточных систем

Как правило, в биореакторах на основе плоско-плиточных систем (Flat-plate system) используют монослойную культуру гепатоцитов на субстратах из коллагена, ламинина, фибронектина, матригеля и др. Покрытие такого матрикса дополнительным слоем геля способствует созданию структуры типа "сэндвич" и поддержанию функциональной активности гепатоцитов в течение нескольких недель [103].

Устройства с полно-объемными плоскими (горизонтальными) мембранными биореакторами (FMB, full-scale flat membrane bioreactor) [104] содержат до 50 модулей, работающих в параллельном режиме, при поверхности каждого 1150 см^2. В каждом модуле размещалось до 2×10^8 клеток, а в целом биореакторе – до 1×10^{10} клеток. Дальнейшее развитие этого устройства [105] позволило создать органотипическую "sandwich" модель, в которой гепатоциты находились между двумя слоями коллагена. Это существенно превосходило

эффективность существующих биореакторов на основе чашек Петри и другой культуральной посуды, способной обеспечить только 2D культивирование при ограниченном доступе кислорода и питательных веществ. Устройства на основе "sandwich" культуры считаются одними из лучших для культивирования гепатоцитов *in vitro*, но для клинического использования необходимо предварительно решить целый ряд проблем, связанных с трудоёмкостью сборки модулей и возможностью размещения большего количества гепатоцитов.

3.5. Биореакторы на основе микрожидкостных чипов

Микрофлюидика – мультидисциплинарная область, где сочетаются интересы физики, химии и биотехнологии при создании систем с малыми объемами жидкости. Эта область исследований зародилась в 80-х годах прошлого столетия и использовалась при создании струйных принтеров, в ДНК-чипах, в микро-двигательной и микро-термической технологиях с целью более точного контроля и манипулирования малыми объёмами жидкостей (от 10^{-6} до 10^{-12} л). В настоящее время микрожидкостные (микрофлюидные) технологии используются для изучения подвижности клеток и контроля их взаимодействия [106].

Использование этих технологий (Microfluid chip based system) стало перспективным направлением при создании биореакторов для "ЭБИП", так как точное регулирование микросреды для гепатоцитов способствует поддержанию их функциональной активности и оптимизации массообмена. Так, например, были созданы синусоиды искусственной печени с микрожидкостным эндотелиально-подобным барьером, в пределах которого осуществляется культивирование гепатоцитов с поддержанием их метаболической активности и жизнеспособности в течение 7 дней [107]. Разработана конструкция биореактора из полидиметилсилоксановых микропластин с компартментами для культуры гепатоцитов и обеспечения их кислородом [108]. С помощью такого биореактора можно достичь высокой клеточной плотности (до 30-40 млн клеток/мл) и эффективного массопереноса, то есть. параметров, необходимых для масштабирования технологий "ЭБИП".

Биореакторы для клеточного материала имеют различные индивидуальные характеристики (контроллеры температуры, скорости работы насосов, подачи pO_2, pH, и др.) в зависимости от цели исследований и поставленных задач. Для измерения и управления применяются различные способы контроля, способствующие поддержанию параметров культивирования клеточного материала в необходимых пределах. При создании биореакторов, помимо реализации их основных функций, особое внимание должно быть обращено на обеспечение безопасности для пациентов, которая может достигаться целым комплексом биотехнологических решений в аппаратах "ЭБТП".

4. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АППАРАТОВ "ЭБИП"

Опыт клинического применения аппаратов типа "ЭБИП" позволил выявить не только преимущества, но и некоторые проблемы их использования, наметить пути устранения обнаруженных технологических недостатков.

В 1986 г. была создана экстракорпоральная перфузионная система для временной частичной замены функции поражённой печени (аппарат "вспомогательная печень"), обеспечивающая, по мнению авторов, непрерывную детоксикацию сепарированной плазмы крови в блоке с изолированными ксеногепатоцитами [109]. Применение этого метода у больных с острой и хронической ПН в состоянии комы приводило к восстановлению сознания, уменьшению активности трансаминаз, улучшению общего самочувствия. Однако из-за отсутствия достаточного количества наблюдений и прекращения дальнейших исследований трудно сделать вывод о степени эффективности этого метода по сравнению с базовой терапией. Дальнейшее развитие этих технологий привело к созданию различных аппаратов и экстракорпоральных систем для лечения печёночной недостаточности.

4.1. Аппарат HepatAssist

Наиболее полно представлены клинические исследования аппарата HepatAssist (сейчас переименован в "HepaMate"), в котором используются около $5\text{-}7\times10^9$ криоконсервированных первичных свиных гепатоцитов, закреплённых в экстракапиллярном пространстве половолоконных катриджей. Биореактор к этому аппарату был разработан ещё в 1995 году [110] и состоял из полых волокон с прикрепленными к ним на микроносителях гепатоцитами свиней. Микроносители и клетки были помещены в экстракапиллярное пространство реактора, через которое пефузировалась в течение нескольких часов плазма крови. С помощью двойного катетера кровь забирали из нижней полой вены пациентов, отделяли плазму и пропускали её через колонку, содержащую 5 млрд гепатоцитов в течение 6-7 ч. Из 9 пациентов с ПН, получавших один или несколько сеансов лечения, выздоровело 8 (88%), семь из которых в дальнейшем подверглись операции трансплантации печени. В целом все пациенты хорошо перенесли процедуру, у них отмечено снижение внутричерепного давления, улучшение внутримозгового кровообращения, снижение концентрации мочевины и аммиака в крови, ослабление неврологической симптоматики. В другом неконтролируемом клиническом исследовании из 39 пациентов 32 были успешно подготовлены к трансплантации печени, у 6 пациентов с острой печеночной недостаточностью (ОПН) отмечено улучшение состояния во время лечения, а месячная выживаемость составила 90% [111].

В контролируемом клиническом исследовании [112] 10 пациентам из 13 – с III или IV стадией печёночной энцефалопатии была успешно выполнена трансплантация печени через 9-110 ч после лечения на этом аппарате, у двоих наблюдали спонтанное выздоровление и одного пациента подготовили к трансплантации печени до применения аппарата. Несмотря на наличие ряда осложнений, связанных с нестабильностью гемодинамики и кровотечениями, отмечено значительное улучшение ряда функциональных и биохимических показателей, а общая годовая выживаемость составила 80%. Полученный положительный терапевтический эффект способствовал проведению дальнейшего рандомизированного, многоцентрового и контролируемого исследования у 171 пациента с молниеносной (фульминантной) ПН и осложнениями после трансплантации печени [113]. В ходе исследования 86 пациентов получали стандартное консервативное лечение и 85 пациентов лечили с помощью аппарата HepatAssist. Результаты исследований показали, что использование аппарата способствует уменьшению концентрации билирубина, однако уровень 30-дневной выживаемости существенно не отличался от контрольной группы. Авторы считают, что существенное влияние на результаты лечения могли оказывать такие факторы, как различная этиология и степень тяжести молниеносной ПН, небольшое количество пациентов и недостаточность знаний о механизмах терапевтического воздействия аппарата.

В настоящее время клинические исследования на более чем 200 пациентах в клиниках США (11 центров) и Европы (9 центров) проводит компания HepaLife Technologies (Boston, MA; Vancouver, BC, Canada) с использованием аппарата "HepaMate™" и клеточной линии свиных гепатоцитов PICM-19.

4.2. Annapam ELAD (Extracorporeal liver assist device)

В этом аппарате в качестве источника клеток сначала использовали около 200 г клеток линии гепатомы человека C3A, размещенных в диализном катридже [114]. Проведение клинических исследований, в том числе контролируемых [115], не позволило выявить существенных различий по сравнению с контрольной группой по целому ряду клинико-лабораторных показателей и выживаемостью пациентов с острой ПН. Для увеличения терапевтической эффективности была произведена модификация аппарата: увеличены размер пор полупроницаемой мембраны с 70 кДа до 120 кДа, скорость перфузии (от 150-200 мл/мин до 500 мл/мин) и клеточная масса до 400 г; установлены устройства для динамического (online) наблюдения за расходом кислорода и глюкозы в биореакторе; добавлены дополнительные фильтры в систему кровообращения для предотвращения попадания клеток [36]. Однако несмотря на эти усовершенствования не удалось добиться существенного улучшения эффективности лечения пациентов. В настоящее время этот аппарат находится на стадии клинических испытаний в Китае и США.

4.3. Annapam AMC-bioartificial liver (AMC-BAL)

В аппарате AMC-BAL, разработанном в академическом медицинском центре Амстердама (Нидерланды), используется биореактор на основе гидрофильного полиэфирного матрикса толщиной 4 мм и общей поверхностью 5610 $см^2$ с первичными гепатоцитами свиней (общее количество клеток – 1×10^{10}), непосредственно контактирующих с плазмой пациентов в мембранном модуле с полыми волокнами [116]. Проведение I фазы клинических испытаний [117] на 7 пациентах с острой ПН позволили получить данные о положительном терапевтическом эффекте и восстановлении функций печени после двукратного применения процедуры. В другом исследовании на 12 пациентах, ожидающих трансплантации печени, были получены данные об улучшении неврологического статуса и гемодинамики больных [86]. При этом 11 пациентов были успешно подготовлены к трансплантации печени и одному она уже не понадобилась в связи с улучшением состояния после лечения. Общая продолжительность лечения с использованием аппарата варьировала от 4 до 35 ч. Общая выживаемость составила 66% (8 пациентов) в течение 30 месяцев. Однако в связи с установлением в некоторых европейских странах ограничений для ксенотрансплантации эти исследования были закончены, а исследователи в настоящее время работают над оптимизацией ряда технологических параметров: оксигенация биореактора, скорость перфузии жидкостей, отработка методов получения и культивирования гепатоцитов человека [118].

4.4. Annapam BLSS (Bioartificial liver support system)

В аппарате BLSS, разработанном в Университете Питтсбурга (США), используется биореактор с полыми мембранными волокнами (100 кДа) и гепатоцитами свиней в количестве от 70 до 100 г, смешанных с коллагеновым гелем [119]. Ограниченные клинические исследования на 5 пациентах с острой ПН продемонстрировали достаточную эффективность лечения с улучшением ряда биохимических и клинических симптомов без серьёзных осложнений [120]. Ни у кого из пролеченных пациентов в течение года не был обнаружен свиной ретровирус PERV.

4.5. Annapam MELS (Modular extracorporeal liver support)

Система MELS, разработанная в клинике Charite Virchow (Берлин, Германия) состоит из биореактора (CellModule) с гепатоцитами свиней или человека, детоксикационного блока (DetoxModule) на основе альбуминового диализа и диализного модуля (DialysisModule) для осуществления длительной вено-венозной гемодиафильтрации [87, 121, 122]. Гепатоциты (500-600 г) фиксируются в 3D матриксе, состоящем из двух групп гидрофильного материала для транспорта плазмы и группы гидрофобных волокон для поставки кислорода и удаления углекислого газа. В первой фазе

клинических испытаний участвовали 8 пациентов с острой ПН различной этиологии, которые успешно и без осложнений перенесли лечение с помощью первичных гепатоцитов свиней, были подготовлены к трансплантации печени со 100% выживаемостью в течение 3 лет. Инфицирования пациентов PERV не было обнаружено. В другом клиническом исследовании в биореакторе использовались первичные гепатоциты человека и детоксикационный модуль альбуминового диализа [123]. После лечения в течение 7-144 ч наблюдались улучшения клинико-лабораторных показателей у всех восьми участвующих в исследовании пациентов.

4.6. Аппарат RFB (Radial-flow bioreactor)

Конструкция этого аппарата содержит биореактор, в котором афферентная жидкость перфузируется от центра к периферии, проходя через гепатоциты свиней (200-230 г), расположенные на полиэфирной матрице в специальном отсеке между двух слоев полиэфирных пластин [124]. Результаты I фазы клинических испытаний на семи пациентах с острой ПН показали улучшение неврологической симптоматики, снижение уровня аммиака и билирубина, отсутствие осложнений.

4.7. Аппарат "Биоискусственная печень" ("БИП")

Сотрудничество специалистов Южно-Уральского государственного университета (Челябинск) и Миасского завода медицинского оборудования (Миасс, Челябинская область) позволило создать аппарат "БИП" и провести клинические исследования, продемонстрировавшие высокую терапевтическую эффективность цитозольного и альбуминового диализа [31]. В настоящее время разработана структурная схема терапевтического комплекса для проведения процедур экстракорпоральной детоксикации, определены принципы построения программного обеспечения оборудования терапевтического комплекса, включающие модульность, открытость, совместимость и информационную безопасность. Разработаны элементы (модули) программного обеспечения терапевтического комплекса для аппарата "БИП", включающие вид и состав пользовательского интерфейса (человек-машина) панельного компьютера, шесть дополнительных лечебных терапий экстракорпоральной очистки крови в пользовательском меню (таблица).

Проведённый недавно мета-анализ терапевтической эффективности аппаратов типа "ЭБИП" при острой ПН и острой ПН, развившейся на фоне хронической ПН (ОХПН), с использованием 19 рандомизированных контролируемых исследований (566 пациентов с острой ПН и 371 пациент с ОХПН) показал достоверное уменьшение смертности и срока подготовки к трансплантации печени при ОХПН и наличие только определённых корреляций этих же параметров при лечении пациентов с острой ПН при помощи аппаратов "ЭБИП" [125].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Более чем 20-летние исследования терапевтической эффективности аппаратов "ЭБИП" показали значительное увеличение выживаемости животных с острой ПН, однако для внедрения их в клиническую практику необходимо решить ряд важных проблем, одни из которых связаны с организацией контролируемых клинических исследований, другие – с усовершенствованием конструкции аппаратов и биотехнологических процессов. Главные клинические требования к аппаратам типа "ЭБИП" связаны с отбором оптимального источника и массы гепатоцитов, созданием высокоэффективного массообмена между кровью/плазмой и гепатоцитами, изучением *in vivo* условий для оптимального функционирования и жизнеспособности гепатоцитов, совершенствованием технологии

Таблица. Сравнительные характеристики экстракорпоральных систем очистки крови.

Аппараты для экстракорпорального очищения крови	Стадия	SCUF	CVVH	CVVHD	CVVHDF	HP	TRE	AD	CD	Cell-D
БИП	НИиОКР	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prismaflex	На рынке	+	+	+	+	+	+			
multiFiltrat	На рынке	+	+	+	+	+	+			
Prometheus	На рынке			+		+	+			
MARS	На рынке			+				+		
HepaPheresis™System	Клинические испытания									+
HepaMate™	Клинические испытания									+
ELAD (Vital Therapies, Inc)	Клинические испытания									+

Примечание: SCUF - низкопоточная продлённая (непрерывная) ультрафильтрация; CVVH - продлённая вено-венозная гемофильтрация; CVVHD - продлённый вено-венозный гемодиализ; CVVHDF - продлённая вено-венозная гемодиафильтрация; HP - гемоперфузия; TRE - терапевтический плазмаферез; AD - альбуминовый диализ; CD - цитозольный диализ; Cell-D - клеточный диализ.

выделения, культивирования/сокультивирования и криоконсервирования гепатоцитов с применением современных материалов и методов. Важным представляется также проведение адекватного мониторинга физиологического, гемодинамического и биохимического статуса пациентов, а также решение проблем доставки клеточного материала к месту операций.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Seaman D.S.* (2001) J. Clinic. Gastroenter., **33**, 97-106.
2. *Кутепов Д.Е., Семенов В.Н., Денисов А.Ю., Пасечник И.Н.* (2004) Вестник интенсивной терапии, **2**, 65-68.
3. *Онищенко Н.А., Базиева Ф.Х.* (1999) Вестн. трансплантол. и искусств. органов, **I**(1), 54-59.
4. *Рябинин В.Е., Ткачев С.И., Гробовой С.И.* (2002) Вестн. трансплантол. и искусств.органов, **IV**(3), 92-93.
5. *Шерлок Ш., Дули Дж.* (1999) Заболевания печени и желчевыводящих путей: практ. руководство (пер. с англ.), "ГЭОТАР" Медицина, Москва.
6. *Jalan R., Bernuau J.* (2007) J. Hepatology, **47**, 168-171.
7. *Chang T.M.* (1972) Artificial Cells, Springfield: Thomas Publisher.
8. *Kondrup J., Almdal T., Vilstrup H., Tygsrup N.* (1992) Int. J. Artif. Organs., **15**, 669-676.
9. *Larsen F.S., Hansen B.A., Ejlersen E., Secher N.H., Clemmesen J.O., Tygstrup N.* (1996) Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., **8**, 261-265.
10. *Левитан Б.Н., Сальникова Г.Г., Миах С.Н.* (2003) Эфферентная терапия, **9**(1), 97-98.
11. *Malschesky P.S., Omokawa S., Nose I.* (1988) Artif. Organs., **12**, 300-304.
12. *Keynes W.M.* (1968) Lancet., **2**(7580), 1236-1238.
13. *Opolon P., Rapin J.R., Huguet C., Granger A., Delome M.L., Boschat M.* (1976) Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, **22**, 701-710.
14. *Лопаткин Н.А., Лопухин Ю.М.* (1989) Эфферентные методы в медицине, "Медицина", Москва.
15. *Rakela J., Kurtz S.B., McCarthy J.T., Krom R.A., Baldus W.P., McGill D.B., Perrault J., Milliner D.S.* (1988) Mayo Clin. Proc., **63**, 113-118.
16. *Чупрасов В.Б.* (2001) Программный гемодиализ, ООО "Фолиант", СПб.
17. *Кутепов Д.Е., Попов А.В., Денисов А.Ю., Моляренко Е.В., Бозиева Н.М., Рыжова О.И., Рыбакова О.Б., Гептнер Р.А.* (2003) Эфферентная терапия, **9**(1), 95-96.
18. *Mitzner S.R., Stange J., Klammt S., Peszynski P., Schmidt R., Noldge-Schomburg G.* (2001) J. Am. Soc. Nephrol., **12**, 75-82.
19. *Jalan R., Sen S., Steiner C., Kapoor D., Alisa A., Williams R.* (2003) J. Hepatology, **38**, 24-31.
20. *Court F.G., Wemyss-Holden S.A., Dennison A.R., Maddern G.J.* (2003) ANZ. J. Surgery, **73**(9), 739-748.
21. *Рябинин В.Е., Полевщикова Е.Е.* (2005) Патент на полезную модель №56191 "Аппарат для диализа", Москва.
22. *Ryabinin V.E., Polevchikova E.E.* (2004) Biotechnology and Medicine, Nova Science Publ., Inc., New York, 124-127.
23. *Laleman W., Wilmer A., Evenepoel P., Elst I.V., Zeegers M., Zaman Z., Verslype C., Fevery J., Nevens F.* (2006) Critical Care, **10**(4), 108-113.
24. *Лопухин Ю.М., Молоденков М.Н.* (1985) Гемосорбция, "Медицина", Москва.
25. *Gazzard B.G., Weston M.E., Murray-Lyon I.M., Flax H., Record C.O., Portmann B., Langley P.G., Dunlop E.H., Mellon P.J., Ward M.B., Williams R.* (1974) Lancet, **1**(7870), 1301-1307.
26. *Нахаев В.И., Базиева Ф.Х., Онищенко Н.А.* (1997) Трансплантол. искусств. орг., **3**, 79-84.
27. *Рябинин В.Е., Лазовская А.Я., Лифшиц Р.И.* (1985) Вопр. мед. химии, **31**, 94-97.
28. *Шабров А.В., Радченко В.Г., Ермолов С.Ю.* (1997) Эфферентная терапия, **3**, 47-50.
29. *Liu J.P., Gluud L.L., Als-Nielsen B., Gluud C.* (2004) Cochrane Database of Systematic Reviews, **1**, Article ID CD003628.
30. *Kobayashi N.* (2009) J. Hepato-Biliary-Pancreatic Surg., **16**(2), 113-117.
31. *Рябинин В.Е., Супрун В.И., Ткачев С.И.* (2007) Использование искусственных систем жизнеобеспечения и клеточных технологий при лечении заболеваний печени, Издательство "ОАО Челябинский Дом печати", Челябинск.
32. *Seglen P.O.* (1976) Methods in Cell Biology, **13**, 29-83.
33. *Berry M., Friend D.* (1969) J. Cell. Biol., **43**, 506-520.
34. *Poyck P.P., Hoekstra R., van Wijk A.C., Attanasio C., Calise F., Chamuleau R.A., van Gulik T.M.* (2007) Liver Transpl., **13**, 589-598.
35. *Miranda J.P., Leite S.B., Muller-Vieira U., Rodrigues A., Carrondo M.J.T., Alves P.M.* (2009) Tissue Engineering, Part C, **15**, 157-167.
36. *Ellis A.J., Hughes R.D., Wendon J., Dunne J., Langley P.G., Kelly J.H., Gislason G.T., Sussman N.L., Williams R.* (1996) Hepatology, **24**, 1446-1451.
37. *Mavri-Damelin D., Damelin L.H., Eaton S., Rees M., Selden C., Hodgson H.J.* (2008) Biotechnol. Bioeng., **99**, 644-651.
38. *Долгих М.С.* (2010) Биомед. химия, **56**, 425-442.
39. *Harrison S., Boquest A., Grupen C., Faast R., Guildolin A., Giannakis C., Crocker L., McIlfatrick S., Ashman R., Wengle J., Lyons I., Tolstoshev P., Cowan P., Robins A., O'Connell P., D'Apice A.J., Nottle M.* (2004) Cloning Stem Cells, **6**(4), 327-321.
40. *Fruhauf J.H., Mertsching H., Giri S., Fruhauf N.R., Bader A.* (2009) Liver International, **29**(10), 1553-1561.
41. *Chamuleau R.A.F.M., Poyck P.P.C., van de Kerkhove M.P.* (2006) Therapeutic Apheresis and Dialysis, **10**, 168-174.
42. *Pitkin Z., Mullon C.* (1999) Artif. Organs., **3**, 829-833.
43. Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research: Draft PHS guideline on infectious disease issues in xenotransplantation. Food and Drug Administration. (2000), http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm.55.
44. *Mertens K., Rogiers V., Vercruysse A.* (1993) Arch. Toxicol., **67**, 680-685.
45. *Guillouzo A., Morel F., Fardel O., Meunier B.* (1993) Toxicology, **82**, 209-219.
46. *Bhatia S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M.* (1999) FASEB J., **13**, 1883-1900.
47. *Zinchenko Y.S., Schrum L.W., Clemens M., Coger R.N.* (2006) Tissue Eng., **12**, 751-761.
48. *Nishikawa M., Kojima N., Komori K., Yamamoto T., Fujii T., Sakai Y.J.* (2008) J. Biotechnol., **133**(2), 253-260.
49. *Ohno M., Motojima K., Okano T., Taniguchi A.* (2009) J. Biochem., **145**, 591-597.

50. *Khetani R., Szulgit G., Del Rio J.A., Barlow C., Bhatia S.N.* (2004) Hepatology, **40**, 545-554.
51. *Khetani R., Chen A.A., Ranscht B., Bhatia S.N.* (2008) FASEB J., **22**, 3768-3775.
52. *Lavon N., Benvenisty N.* (2005) J. Cell. Biochem., **96**, 1193-1202.
53. *Baharvand H., Hashemi S.M., Ashtiani S.K., Farrokhi A.* (2006) Intern. J. Developm. Biol., **50**(7), 645-652.
54. *Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N.* (2000) Mol. Med., **6**(2), 88-95.
55. *Hay D.C., Zhao D., Fletcher J., Hewitt Z.A., McLean D., Urruticoechea-Uriguen A., Black J.R., Elcombe C., Ross J.A., Wolf R., Cui W.* (2008) Stem Cells, **26**(4), 894-902.
56. *Agarwal S., Holton K.L., Lanza R.* (2008) Stem Cells, **26**(5), 1117-1127.
57. *Iwamuro M., Shiraha H., Nakaji S., Furutani M., Kobayashi N., Takaki A. Yamamoto K.* (2012) BioMedical Engineering OnLine, **11**, 93.
58. *Discher D.E., Mooney D.J., Zandstra P.W.* (2009) Science, **324**(5935), 1673-1677.
59. *Chang T.T., Hughes-Fulford M.* (2009) Tissue Engineering, Part A, **15**, 559-567.
60. *Berry M.N., Edwards A.M., Barrit G.J.* (1991) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular biology (Burdon R.H., van Knippenberg P.H., eds.), Amsterdam: Elsevier, 110-112.
61. *Yuasa C., Tomita Y., Shono M., Ishimura K., Ichihara A.* (1993) J. Cell. Physiol., **156**, 522-530.
62. *Gerlach J., Stoll P., Schnoy N., Bucherl E.S.* (1990) Int. J. Artif. Organs., **13**(7), 788-793.
63. *Powers M.J., Janigian D.M., Wack K.E., Baker C.S., Beer Stolz D., Griffith L.G.* (2002) Tissue Eng., **8**, 499-513.
64. *Imamura T., Cui L., Teng R., Johkura K., Okouchi Y., Asanuma K., Ogiwara N., Sasaki K.*. (2004) Tissue Engineering, **10**, 1716-1724.
65. *Baharvand H.* (2006) In: Embryonic Stem Cell Research (Grier E.V., ed.), 1-63.
66. *Strom S.C., Michatopoulos G.* (1982) Methods Enzymol., **82**, 544-555.
67. *Nyberg S.L, Remmel R.P., Mann H.J., Peshwa M.V., Hu W.S., Cerra F.B.* (1994) Annals Surg., **220**, 59-67.
68. *Wu D.-Q., Zhang G.-L., Shen C., Zhao Q., Li H., Meng Q.* (2005) World J. Gastroenterol., **11**, 1599-1604.
69. *Dai J., Zhang G., Meng Q.* (2009) Cytotechnology, **60**, 133-141.
70. *Turner W.S., Schmelzer E., McClelland R., Wauthier E., Chen W., Reid L.M.* (2007) J. Biomed. Mat. Res., Part B, **82**, 156-168.
71. *Sharma R., Greenhough S., Medine C.N., Hay D.C.* (2010) J. Biomed. Biotechnol, **2010**, 1-12.
72. *Dawson E., Mapili G., Erickson K., Taqvi S., Roy K.* (2008) Advanced Drug Delivery Reviews, **60**(2), 215-228.
73. *Schug M., Heise T., Bauer A., Schug M., Heise T., Bauer A., Storm D., Blaszkewicz M., Bedawy E., Brulport M., Geppert B., Hermes M., Föllmann W., Rapp K., Maccoux L., Schormann W., Appel K.E., Oberemm A., Gundert-Remy U., Hengstler J.G.* (2008) Arch. Toxicol., **82**(12), 923-931.
74. *Cheng N., Wauthier E., Reid L.M.* (2008) Tissue Eng. Part A., **14**, 1-7.
75. *Fang S., Qiu Y.D., Mao L., Shi X.L., Yu D.C., Ding Y.T.* (2007) Acta Pharmacologica Sinica, **28**(12), 1924-1930.
76. *Elkayam T., Amitay-Shaprut S., Dvir-Ginzberg M., Harel T., Cohen S.* (2006) Tissue Eng., **12**, 1357-1368.
77. *Erro E., Bundy J., Massie I., Chalmers S.A., Gautier A., Gerontas S., Hoare M., Sharratt P., Choudhury S., Lubowiecki M., Llewellyn I., Legallais C., Fuller B., Hodgson H., Selden C.* (2013) Biores. Open. Access., **2**, 1-11.
78. *Huang H., Hanada S., Kojima N., Sakai Y.* (2006) Cell Transplantation, **15**(8-9), 799-809.
79. *Ijima H., Matsushita T., Nakazawa K., Fujii Y., Funatsu K.* (1998) Tissue Engineering, **4**, 213-226.
80. *Fukuda J., Sakiyama R., Nakazawa K., Ijima H., Yamashita Y., Shimada M., Shirabe K., Tsujita E., Sugimachi K., Funatsu K.* (2001) Int. J. Artif. Organs, **24**, 799-806.
81. *Matsumoto K., Mizumoto H., Nakazawa K., Ijima H., Funatsu K., Kajiwara T.* (2008) J. Biosci. Bioeng., **105**, 350-354.
82. *Sokolsky-Papkov M., Agashi K., Olaye A., Shakesheff K., Domb A.J.* (2007) Advance Drug Deliv. Rev., **59**, 187-206.
83. *Desai J.P., Pillarisetti A., Brooks A.D.* (2007) Ann. Rev. Biomed. Eng., **9**, 35-53.
84. *Mazariegos G.V., Kramer D.J., Lopez R.C., Shakil A.O., Rosenbloom A.J., DeVera M., Giraldo M., Grogan T.A., Zhu Y., Fulmer M.L., Amiot B.P., Patzer J.F.* (2001) ASAIO J., **47**, 471-475.
85. *Detry O., Arkadopoulos N., Ting P., Kahaku E., Watanabe F.D., Rozga J., Demetriou A.A.* (1999) Am. Surg., **65**, 934-938.
86. *van de Kerkhove M.P., Di Florio E., Scuderi V., Mancini A., Belli A., Bracco A., Dauri M., Tisone G., Di Nicuolo G., Amoroso P, Spadari A., Lombardi G, Hoekstra R., Calise F, Chamuleau R.A.* (2002) Int. J. Artif. Organs, **25**, 950-959.
87. *Sauer M., Obermeyer N., Kardassis D., Theruvath T., Gerlach J.C.* (2001) Ann. N.Y. Acad. Sci., **944**, 308-319.
88. *Xue Y.L., Zhao S.F., Luo Y., Li X.J., Duan Z.P., Chen X.P., Li W.G, Huang X.Q., Li Y.L, Cui X., Zhong D.G, Zhang Z.Y, Huang Z.Q.* (2001) World J. Gastroenterol., **7**, 826-829.
89. *Ding Y.T., Qiu Y.D., Chen Z., Xu Q.X., Zhang H.Y., Tang Q., Yu D.C.* (2003) World J. Gastroenterol., **9**, 829-832.
90. *Liu J., Song T., Jiang W., Zhang Y., Lv G., Zhao L., Zhang G., Li L.* (2009) Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc., 3095-3098.
91. *Gao Y., Mu N., Xu X.P., Wang Y.* (2005) World J. Gastroenterol., **11**, 5468-5474.
92. *Nyberg S.L., Shatford R.A., Payne W.D., Hu W.S., Cerra F.B.* (1992) Cytotechnology, **10**, 205-215.
93. *Ryabinin V.E., Grobovoi S.I.* (2000) J. Artif. Organs, **23**, 566.
94. *Jasmund I., Langsch A., Simmoteit R., Bader A.* (2002) Biotechnol. Prog., **18**, 839-846.
95. *Gion T., Shimada M., Shirabe K., Nakazawa K., Ijima H., Matsushita T., Funatsu K., Sugimachi K.* (1999) J. Surg. Res., **82**, 31-36.
96. *Yanagi K., Miyoshi H., Ohshima N.* (1998) ASAIO J., **44**, 436-440.
97. *Kinasiewicz A., Gautier A., Lewinska D., Bukowski J., Legallais C., Werynski A.* (2007) Transplant. Proc., **39**, 2911-2913.
98. *Kanai H., Marushima H., Kimura N., Iwaki T., Saito M., Maehashi H., Shimizu K., Muto M., Masaki T., Ohkawa K., Yokoyama K., Nakayama M., Harada T., Hano H., Hataba Y., Fukuda T., Nakamura M., Totsuka N., Ishikawa S., Unemura Y., Ishii Y., Yanaga K., Matsuura T.* (2007) Artif. Organs., **31**, 148-151.
99. *Naruse K., Sakai Y., Nagashima I., Jiang G.X., Suzuki M., Muto T.* (1996) Int. J. Artif. Organs, **19**, 605-609.

100. *Yanagi K., Ookawa K., Mizuno S., Ohshima N.* (1989) ASAIO Trans., **35**, 570-572.
101. *Dore E., Legallais C.* (1999) Ther. Apher., **3**, 264-267.
102. *Wells G.D., Fisher M.M., Sefton M.V.* (1993) Biomaterials, **14**, 615-620.
103. *Uchino J., Tsuburaya T., Kumagai F., Hase T., Hamada T., Komai T., Funatsu A., Hashimura E., Nakamura K., Kon T.* (1988) ASAIO Trans., **34**(4), 972-977.
104. *Taguchi K., Matsushita M., Takahashi M., Uchino J.* (1996) Artif. Organs, **20**(2), 178-185.
105. *De Bartolo L., Jarosch-Von Schweder G., Haverich H., BaderA.* (2000) Biotechnol. Prog., **16**, 102-108.
106. *Giri S., Weingartz U., Nieber K., Acikgöz A., Bader A.* (2010) Biotechnol. Lett., **32**, 765-771.
107. *Chokkalingam V., Tel J., Wimmers F., Liu X., Semenov S., Thiele J., Carl Figdor G., Wilhelm Huck T.S.* (2013) Lab on a Chip, **13**, 4740-4744.
108. *Lee P.J., Hung P.J., Lee L.P.* (2007) Biotechnol. Bioeng., **97**(5), 1340-1346.
109. *Leclerc E., Sakai Y., Fujii T.* (2004) Biotechnol. Prog., **20**(3), 590-595.
110. *Корухов Н.Ю., Полоцкий М.А., Писаревский А.А.* (1986) Трансплантация и искусственные органы, Москва, с. 193-197.
111. *Demetriou A.A., Rozga J., Podesta L., Lepage E., Morsiani E., Moscioni A.D., Hoffman A., McGrath M., Kong L., Rosen H. et al.* (1995) Scand. J. Gastroenterol. Suppl., **208**, 111-117.
112. *Mullon C., Pitkin Z.* (1999) Expert Opin. Investig. Drugs, **8**, 229-235.
113. *Samuel D., Ichai P., Feray C., Saliba F., Azoulay D., Arulnaden J.L., Debat P., Gigou M., Adam R., Bismuth A., Castaing D., Bismuth H.* (2002) Transplantation., **73**, 257-264.
114. *Demetriou A.A., Brown R.S. Jr., Busuttil R.W., Fair J., McGuire B.M., Rosenthal P., Lerut J., Nyberg S.L., Salizzoni M., Fagan E.A. et al.* (2004) Ann. Surg., **239**, 660-667.
115. *Sussman N.L., Kelly J.H.* (1993) Artif. Organs, **17**, 27-30.
116. *Millis J.M., Cronin D.C., Johnson R., Conjeevaram H., Conlin C., Trevino S., Maguire P.* (2002) Transplantation., **74**, 1735-1746.
117. *Flendrig L.M., la Soe J.W., Jorning G.G., Steenbeek A., Karlsen O.T., Bovee W.M., Ladiges N.C., te Velde A.A., Chamuleau R.A.* (1997) J. Hepatol., **26**, 1379.
118. *van de Kerkhove M.P., Poyck P.P.C., Deurholt T., Hoekstra R., Chamuleau R.A.F.M., van Gulik T.M.* (2005) Digestive Surgery, **22**, 254-264.
119. *Poyck P.P., van Wijk A.C., van der Hoeven T.V., de Waart D.R., Chamuleau R.A., van Gulik T.M., Oude Elferink R.P., Hoekstra R.* (2008) J. Hepatol., **48**, 266-275.
120. *Patzer J.F., Mazariegos G.V., Lopez R., Molmenti E., Gerber D., Riddervold F., Khanna A., Yin W.Y., Chen Y., Scott V.L., Aggarwal S., Kramer D.J., Wagner R.A., Zhu Y., Fulmer M.L., Block G.D., Amiot B.P.* (1999) Ann. N.Y. Acad. Sci., **875**, 340-352.
121. *Mazariegos G.V., Patzer J.F. 2nd, Lopez R.C., Giraldo M., Devera M.E., Grogan T.A., Zhu Y, Fulmer M.L., Amiot B.P., Kramer D.J.* (2002) Am. J. Transplant., **2**, 260-266.
122. *Sauer I.M., Gerlach J.C.* (2002) Artif. Organs, **26**, 703-706.
123. *Pless G, Sauer I.M.* (2005) Transplant. Proc., **37**, 3893-3895.
124. *Sauer I.M., Zeilinger K., Obermayer N., Pless G., Grünwald A., Pascher A., Mieder T., Roth S., Goetz M., Kardassis D., Mas A., Neuhaus P., Gerlach J.C.* (2002) Int. J. Artif. Organs., **25**, 1001-1005.
125. *Zheng Z., Li X., Li Z., Ma X.* (2013) Exp. Ther. Med., **6**, 929-936.

Поступила: 08. 02. 2014.

PROBLEMS AND PROSPECTS OF CREATION OF EXTRACORPORAL SYSTEMS FOR SUPPORT OF FUNCTIONAL LIVERS STATUS

V.E. Ryabinin

South-Ural State Medical University,
64 Vorovskogo str., Chelyabinsk, Russia; tel.: 8-351-232-74-70; e-mail: veryabinin@mail.ru

The review considers features of efferent therapy employing extracorporeal systems, the devices known as “artificial liver” and “bioartificial liver” in the treatment of liver insufficiency. Analysis of literature data shows the need for further development of these biomedical studies and the search for optimal solutions in the selection of the source of hepatocytes, the development of bioreactors and biomaterials forming the basis of devices like “bioartificial liver”. Taking into consideration certain advantages and disadvantages typical for various methods of extracorporeal support of the functional state of the liver one can evaluate prior experience in the treatment of liver diseases and approaches to the development of new, more effective medical technologies.

Key words: bioartificial liver, hepatocytes, biomaterials, liver failure