

Кокорев О.В.<sup>1, 2</sup>, Гюнтер С.В.<sup>1</sup>, Ходоренко В.Н.<sup>1</sup>, Дамбаев Г.Ц.<sup>2</sup>

## СОЧЕТАННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕПАТОЦИТОВ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА НА КЛЕТОЧНЫХ НОСИТЕЛЯХ ИЗ ПОРИСТО-ПРОНИЦАЕМОГО НИКЕЛИДА ТИТАНА

<sup>1</sup> НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы, Сибирский физико-технический институт, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (634045, г. Томск, ул. 19-й Гвардейской дивизии, 17, Россия)

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (634055, г. Томск, Московский тракт, 2, Россия)

В работе показана разработка метода пролонгированной восстановительной регенерации повреждённой  $CCl_4$  печени. На крысах Вистар с экспериментальным хроническим гепатитом показана восстановительная способность печени после трансплантации клеточно-инженерных конструкций: клеток печени и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК) в соотношении 5:1 на клеточном носителе из никелида титана. Предварительно посредством совместного культивирования гепатоцитов и МСК в различных соотношениях и после трансплантации в составе тканеинженерной конструкции было выявлено оптимальное соотношение клеток печени и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга – 5:1. Восстановительную регенерацию оценивали, используя биохимические методы, на 10-е, 20-е и 30-е сутки. Показано, что в группах с тканеинженерной конструкцией статистически значимо ускоряются процессы восстановительной регенерации в повреждённой печени, по сравнению с контрольной группой с хроническим гепатитом. При этом нормализация биохимических показателей в группе с сочетанной трансплантацией на клеточном носителе («Геп + МСК + TiNi») наступала в более ранние сроки, чем в группе с трансплантацией одних гепатоцитов на клеточном носителе («Геп + TiNi»). Эти данные подтверждаются увеличением продолжительности жизни животных с сочетанной трансплантацией гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток на клеточном носителе из никелида титана. Более высокий уровень и пролонгированные сроки регенерации печени при трансплантации клеточных носителей из никелида титана обусловлены созданием в тканеинженерной конструкции биологически адекватных условий для жизнедеятельности клеток с определённым соотношением, иммобилизованных в их структуре.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия, печёночная недостаточность, трансплантация клеток, клеточный носитель, пористый никелид титана

**Для цитирования:** Кокорев О.В., Гюнтер С.В., Ходоренко В.Н., Дамбаев Г.Ц. Сочетанная трансплантация гепатоцитов с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга на клеточных носителях из пористо-проницаемого никелида титана. Acta biomedica scientifica, 3 (3), 195-203, DOI 10.29413/ABS.2018-3.3.30.

## COMBINED TRANSPLANTATION OF HEPATOCYTES WITH MESENCHYMAL STEM CELLS OF BONE MARROW ON POROUS-PERMEABLE TINI-BASED ALLOY SCAFFOLD

Kokorev O.V.<sup>1, 2</sup>, Gyunter S.V.<sup>1</sup>, Khodorenko V.N.<sup>1</sup>, Dambaev G.Ts.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Materials and Shape-Memory Implants, Siberian Physics and Technology Institute, Tomsk State University (ul. 19-y Gvardeiskoy divizii, 17, Tomsk 634045, Russian Federation)

<sup>2</sup> Siberian State Medical University (Moskovskiy trakt 2, Tomsk 634055, Russian Federation)

The paper reports the development of method for prolonged support of recovery processes in liver tissues with chronic hepatic damage.

The aim of the research was to study of the therapeutic efficacy of combined transplantation of liver cells and mesenchymal stem cells of bone marrow (MSC) on TiNi-based alloy scaffolds of rats with chronic hepatitis.

Materials and methods: Three groups of experiments were carried out on Wistar rats and intact rats (control) – I group; in the II group – chronic hepatitis; III group – cell-engineering designs with liver cells; in the IV group – cell-engineering designs with liver cells and BM MMSC. The activity of recovery processes was evaluated by using biochemical methods in dynamics on 10, 20, 30th days.

Results. The optimal ratio of liver cells to MSC (5:1) was previously found in TiNi-based alloy scaffolds after transplantation and through co-cultivation of hepatocytes and MSC at different ratios. It was shown that recovery processes in the group with scaffolds transplanted into damaged livers were much more active if compared with those in the control group with chronic hepatitis. At the same time, in the group with combined transplantation on TiNi-based alloy scaffolds contributed to a more rapid normalization of liver enzyme indices compared with the group with transplantation of some hepatocytes on scaffolds. These data are confirmed by an increase in the life span of animals with combined hepatocytes and MSC transplantation on TiNi-based alloy scaffolds.

Conclusions. A higher level and prolonged periods of liver regeneration during the transplantation of TiNi-based alloy scaffolds are due to the creation of biologically appropriate conditions for cells with certain ratio.

**Key words:** tissue engineering, liver failure, cell transplantation, cell-engineering design, scaffold, porous Ti-Ni-based alloy

**For citation:** Kokorev O.V., Gyunter S.V., Khodorenko V.N., Dambaev G.Ts. Combined transplantation of hepatocytes with mesenchymal stem cells of bone marrow on porous-permeable TiNi-based alloy scaffold. Acta biomedica scientifica, 3 (3), 195-203, DOI 10.29413/ABS.2018-3.3.30.

## ВВЕДЕНИЕ

Длительное функционирование тканеинженерных конструкций, предназначенное для перепрограммирования процессов регенерации печени при лечении хронической печёночной недостаточности, может быть обеспечено путём формирования в ней областей регенерации. В этих сайтах регенерации, помимо тканеспецифических клеток печени, должны присутствовать стволовые клетки печени или костного мозга, которые способны инициировать регенеративные возможности клеток печени [6, 7, 8]. Необходимость присутствия таких клеток связана с тем, что основная клеточная структура печёночной ткани – гепатоциты (70 % от общего объёма клеток печени) – являются дифференцированно зрелыми клетками, и для их пролиферации, а также для длительного функционирования и обновления клеточного состава тканеинженерных конструкций необходимы малодифференцированные незрелые прогениторные клетки, продуцирующие в окружающей среде тканеспецифические регуляторные цитокины, которые инициируют процессы пролиферации и роста как донорских клеток в тканеинженерных конструкциях, так и клеток в собственной ткани печени реципиента. Данные клетки используются в экспериментах и клинических условиях для активации и перепрограммирования репаративных процессов в повреждённых органах, в частности, печени. Известно, что мезенхимальные клетки костного мозга являются обязательными участниками восстановительного морфогенеза повреждённой ткани печени [10, 11, 13, 14, 15]. При этом они оказывают своё корректирующее воздействие и на систему стволовых клеток печени, в частности, на клетки Ито и звездчатые клетки [5].

Ко всему прочему мезенхимальные клетки костного мозга использовались нами в тканеинженерных конструкциях по причине ингибиции отторжения аллогенных клеток донорской печени после трансплантации клеток в составе тканеинженерных конструкций. Их способность индуцировать иммунную толерогенность была продемонстрирована в различных исследованиях [4, 9, 12].

Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (МСК КМ), являясь стволовыми клетками, рассматривались нами в качестве возможного элемента регенеративного восстановления функций печени совместно с гепатоцитами посредством тканеинженерных конструкций из никелида титана. При изготовлении тканеинженерных конструкций важно также обеспечить высокую пролиферативную активность трансплантируемых клеток печени, которая может быть достигнута при их сокультивировании со стволовыми клетками, в качестве которых нами были использованы МСК КМ.

В качестве клеточного матрикса-носителя для обеспечения контактного взаимодействия и пролонгированного функционирования имплантируемых

тканеинженерных конструкций нами был использован отечественный материал – пористо-проницаемый никелид титана, который, несмотря на широкое клиническое применение [1, 2], не использовался для изготовления тканеинженерных конструкций, с иммобилизованными гепатоцитами и мезенхимальными клетками костного мозга. Оригинальность принципа создания трансплантируемых тканеинженерных конструкций на основе пористо-проницаемых сплавов из никелида титана, для пролонгированной коррекции функций внутренних органов подтверждена выдачей авторам патента на изобретение [3].

Полагаясь на эти доводы, **целью** наших исследований стала оценка терапевтической эффективности совместной трансплантации клеток печени и МСК КМ на клеточном носителе из никелида титана при экспериментальном хроническом гепатите.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.), Федеральному закону о защите животных от жестокого обращения от 01.01.1997 г., а также Директиве 86/609 ЕЭС, основанной на тексте соглашения «Current EU Legislation Controlling Animal Experiments» (Dr. Robert Hubrecht). Все манипуляции на животных проводили под общей анестезией.

### Пористые клеточные носители из никелида титана

Пористо-проницаемые клеточные носители были изготовлены из сверхэластичного пористого никелида титана марки ТН-1П, разработанного в НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы. Пористые сплавы из никелида титана были получены методом самораспространяющегося высокотемпературного синтеза (СВС) с пористой структурой в диапазоне – 70–75 %. Пористые заготовки из никелида титана резались на электроискровом станке на диски размером 5 × 15 мм со средним диаметром пор 150 мкм. Образцы обрабатывались растворами кислот для получения определённой поверхностной структуры. Стерилизация имплантатов осуществлялась сухожарочной обработкой при 180 °С в течение 60 мин.

### Определение пролиферативной активности клеток с помощью МТТ-теста (ГОСТ Р ИСО 10993.5-99)

Эксперименты проводили в 6-луночных планшетах. В каждую лунку вносили образец из никелида титана и среду инкубации DMEM, 15%-й эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина.

Среда инкубации содержала  $5 \times 10^4$  клеток. Клетки инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в 5%-м  $\text{CO}_2$ . Оценку пролиферативной активности проводили в различные сроки эксперимента. Для этого к клеткам добавляли 0,5%-й раствор 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) за 4 часа до конца инкубирования при температуре  $37^\circ\text{C}$ . При этом образовывались нерастворимые темно-синие кристаллы формазана. Образцы культивировали в течение 30 мин с 0,25%-м раствором трипсина-ЭДТА на шейкере. Затем образцы вынимали, клеточную суспензию переносили в пробирки и центрифугировали в течение 15 мин при 885 g. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в диметилсульфоксиде. Значение оптической плотности регистрировали спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Результаты испытаний представлены в процентах к контролю, в котором клетки содержались без образцов в культуральной среде (контрольный реактив).

#### **Метод выделения и культивирования мультипотентных мезенхимальных предшественников костного мозга**

Для приготовления культуры МСК КМ использовался костный мозг крыс Вистар. На операционном столе в стерильных условиях извлекали бедренные кости, костный мозг вымывали с помощью шприца с полной культуральной средой в стерильные флаконы. Концентрацию клеток костного мозга доводили до  $5 \times 10^6$  кл/мл полной среды и засеивали в 50 мл пластиковые флаконы фирмы «Corning». Для экспериментов использовали клетки 2-го пассажа. Общий срок культивирования клеточного материала составлял около 14 суток. Полученный материал представлял собой прикрепившиеся к пластику распластанные фибробластоподобные клетки, которые обладали высокой пролиферативной активностью.

#### **Выделение клеток печени для изготовления трансплантируемой клеточно-инженерной конструкции**

Гепатоциты выделяли по методу P.O. Seglen (1976) с модификациями S.C. Lehec (2009) и H.A. Hang (2009) бесперфузионным методом. Жизнеспособность клеток оценивали методом окрашивания трипановым синим. Выход клеток из резецированного участка печени составлял в пределах ( $3-4 \times 10^8$ ) клеток. Методами световой микроскопии было установлено, что клеточная суспензия, приготовленная из резецированного участка печени, содержала около 95–98 % гепатоцитов и в пределах 2–5 % непаренхиматозных клеток, при этом жизнеспособность клеток составляла  $86 \pm 3$  %. Разделение паренхиматозных и непаренхиматозных клеток не производили.

#### **Моделирование хронической печёночной недостаточности**

Для этого в опытах на крысах породы Вистар моделировали хроническое токсическое повреждение печени путём курсового введения  $\text{CCl}_4$  каждый день из расчёта 0,1 мл на 100 г массы животного в течение 10 дней внутрибрюшинно. Иммуносупрессивную терапию в этих опытах не проводили. Гибель животных к концу затравки составила 5 %.

#### **Приготовление клеточно-инженерной конструкции из сокультивированных клеток печени и МСК**

Сокультивирование выделенных клеток печени и МСК проводили до засеивания их на пористый инкубатор с целью предварительного образования комбинированных клеточных ассоциатов в течение 2 суток, при этом мезенхимальные стволовые клетки добавлялись к культуре клеток печени. Затем сокультивированная клеточная суспензия засеивалась на клеточный носитель из никелида титана (КННТ), культивировалась в течение суток и затем имплантировалась животным.

Операция проводилась в стерильных условиях на специальном столике в ламинарном боксе. Анестезию у экспериментальных животных осуществляли путём введения в брюшную полость препарата Zoletil 50 в дозировке 7,5 мг/кг веса. Имплантация КИК проводилась в брюшную полость под эфирным наркозом, и конструкция укладывалась непосредственно на поверхность печени подопытного животного. Далее производилось ушивание стерильными нитками. Применялся матрасный шов. Края разреза протирались тампоном, смоченным 70%-м спиртовым раствором, смазывались бриллиантовым зелёным, и затем наносился клей БФ-6. Каждое животное помещалось в отдельную клетку, а затем после выхода из наркоза перекладывалась в клетку с другими животными из данной группы.

Соответственно, экспериментальные животные были разделены на 4 группы.

1. Контроль ( $n = 10$ ) – интактные (здоровые) животные.
2.  $\text{CCl}_4$  ( $n = 10$ ) – животные с токсическим гепатитом, вызванным введением  $\text{CCl}_4$ .
3. Геп + TiNi ( $n = 10$ ) – животные с введением  $\text{CCl}_4$  и имплантированными КННТ насыщенном клетками печени (КП).
4. Геп + МСК + TiNi ( $n = 10$ ) – животные с введением  $\text{CCl}_4$  и имплантированными КННТ, насыщенным КП и МСК в соотношении 5:1.

#### **Оценка коррекции биохимических изменений в ткани печени**

Оценку биохимических параметров после моделирования печёночной недостаточности (ПН) проводили на 10-е, 20-е, 30-е сутки. На этих сроках в сыворотке крови у животных измеряли динамику изменения концентрации печёночных трансаминаз: АлАТ, АсАТ и щелочной фосфатазы, общего белка, лактата, – с помощью ветеринарного биохимического анализатора «PCE-90 WET» в соответствии с инструкцией производителя.

#### **Методы статистической обработки**

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами с помощью пакета статистических компьютерных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Поскольку в исследовании присутствовали выборки, закон распределения числовых показателей в которых отличался от нормального (по данным проверки при помощи критерия Колмогорова – Смирнова), статистическую

значимость различий изучаемых признаков проверяли при помощи непараметрического U-критерия Манна – Уитни (парные сравнения независимых совокупностей показателей). За статистически значимое принималось значение  $p < 0,05$ . В таблицах приведены значения средней арифметической и ошибки средней.

**Биоэтические аспекты исследования**

Все исследовательские процедуры и условия содержания грызунов отвечали этическим правилам работы с лабораторными животными, в том числе Европейской директиве FELASA-2010. Планы всех исследований проходили экспертизу и утверждение комиссией по биоэтике НИ ТГУ № 116 26.06.2017.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Для выявления наилучшей жизнеспособности и пролиферативной активности клеток при совместном культивировании был поставлен эксперимент по оценке пролиферативной активности сочетанного культивирования КП и МСК для определения эффективных сроков культивирования и оптимального соотношения культивируемых клеток с использованием теста с МТТ, результаты которого представлены в таблице 1. Было показано, что наиболее выраженная пролиферативная активность клеток может быть достигнута путём сокультивирования КП и МСК в соотношениях 1:1, 3:1 и 5:1, и оптимальным сроком совместного культивирования с имеющимися в нашем распоряжении реактивами является совместное культивирование в течение 2–3 суток, а затем наблюдается прогрессивное снижение пролиферативной активности.

В дальнейшем совместное культивирование выделенных клеток печени и МСК КМ проводили во время их засеивания на клеточный носитель для предварительного образования клеточных ассоциатов

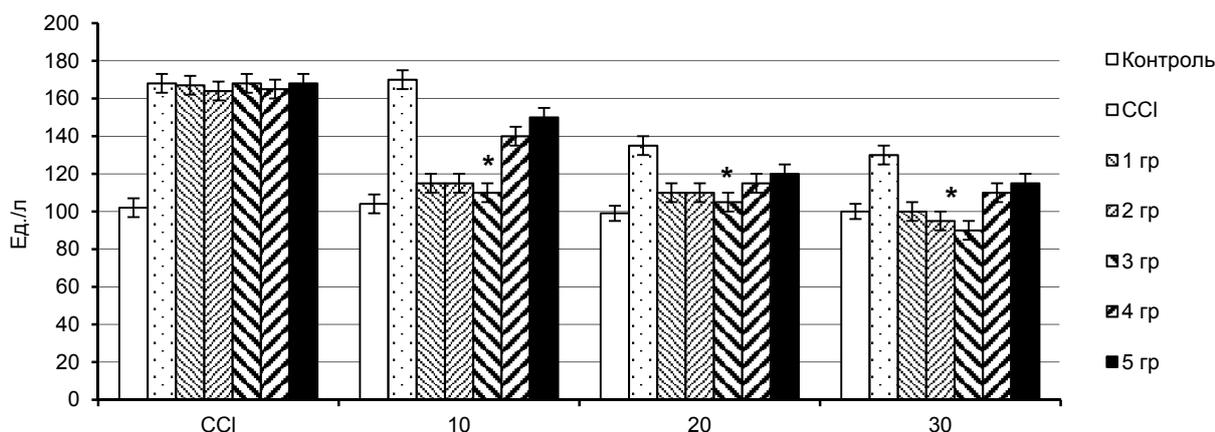
клеток печени и мезенхимальных клеток костного мозга, обеспечивающих контактное взаимодействие между этими клетками в течение 2 суток.

**Таблица 1**  
**Влияние количественного соотношения клеток печени и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ) на пролиферативную активность в культуре**

**Table 1**  
**The influence of the quantitative ratio of liver cells and mesenchymal stem cells of the bone marrow (MSC BM) on proliferative activity in culture**

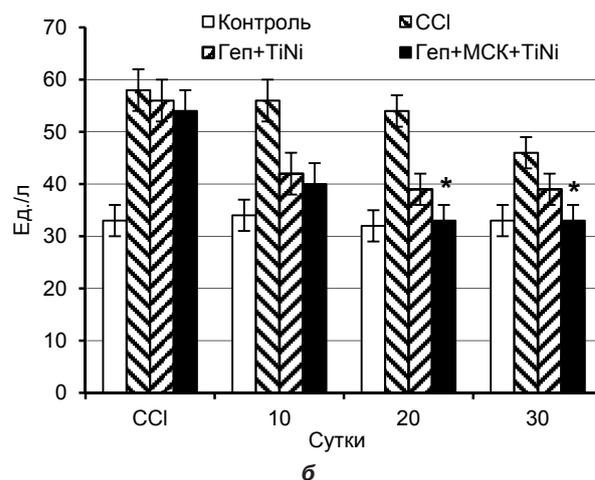
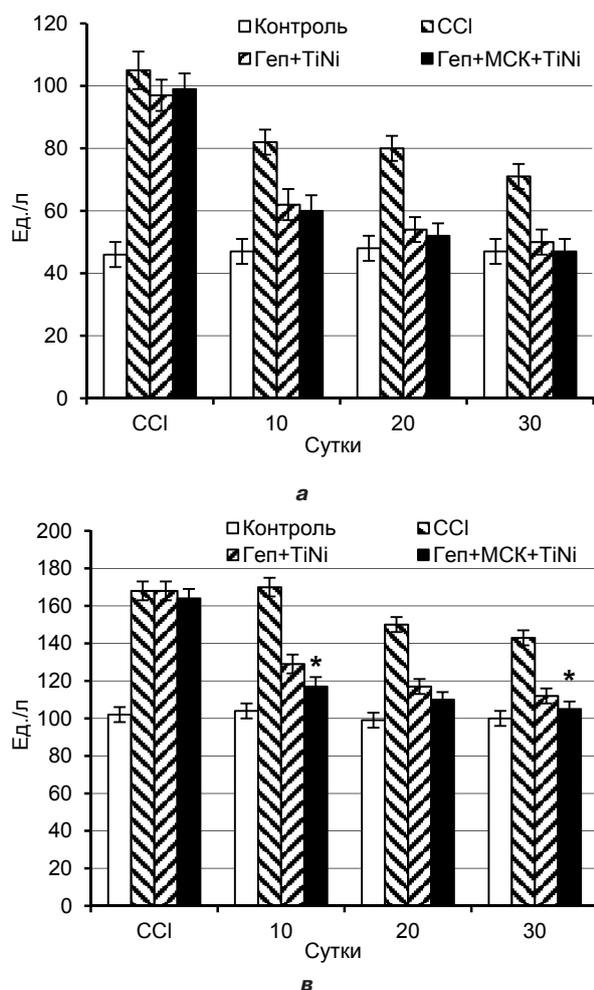
Время культивирования, сут.	Соотношение клеток печени и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга				
	1:1	3:1	5:1	7:1	10:1
1	98 ± 6	97 ± 5	97 ± 6	93 ± 6	93 ± 6
2	95 ± 6	95 ± 5	95 ± 6	89 ± 6	88 ± 6
3	90 ± 5	88 ± 5	88 ± 5	77 ± 4	75 ± 4
4	78 ± 5	78 ± 5	75 ± 5	65 ± 4	58 ± 4
5	75 ± 5	73 ± 5	70 ± 4	58 ± 4	51 ± 4

Для оптимизации клеточного состава клеточно-инженерных конструкций на основе клеточных носителей из никелида титана при лечении печёночной недостаточности нами было проведено сравнительное динамическое изучение нивелирования повышенного уровня фермента – щелочной фосфатазы(ЩФ). При этом использовались аллогенные КП и МСК в различных соотношениях (1:1; 3:1; 5:1; 7:1; 10:1) без применения иммуносупрессивных препаратов и две контрольные группы животных – интактный (здоровый) контроль и группа с печёночной недостаточностью без применения клеточной терапии. На представленных данных видно, что наиболее высокий темп снижения уровня фермента в сыворотке крови наблюдался при использовании комбинации КП и МСК в соотношении 5:1 (рис. 1).



**Рис. 1.** Динамика изменения уровня щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс при экспериментальном гепатите после имплантации клеточного носителя из никелида титана с различным соотношением КП и МСК. Опытные группы: 1-я группа – КП:МСК = 1:1; 2-я группа – КП:МСК = 3:1; 3-я группа – КП:МСК = 5:1; 4-я группа – КП:МСК = 7:1; 5-я группа – КП:МСК = 10:1. \* – различия статистически значимы при  $p < 0,05$  между 3-й и 4-й, 5-й группами.

**Fig. 1.** Dynamics of changes of alkaline phosphatase in blood serum of rats with chronic hepatitis after implantation of TiNi-based alloy scaffolds with different ratios of liver cells (LC) and MSC BM. Experimental groups: I group – LC:MSC = 1:1; II group – LC:MSC = 3:1; III group – LC:MSC = 5:1; IV group – LC:MSC = 7:1; V group – LC:MSC = 10:1. \* – the differences are statistically significant at  $p < 0.05$  between the III, IV, and V groups.



**Fig. 2.** Dynamics of enzyme reduction (AST (a), ALT (б) and ALP (в)) of Wistar rats with chronic hepatitis after implantation of TiNi-based alloy scaffolds with liver cells and MSC BM in ratio 5:1. \* – the differences are statistically significant at  $p < 0.05$ , compared to the “CCl” and “Hep + TiNi” groups.

Показано, что для коррекции биохимических показателей, характеризующих хроническую печеночную недостаточность, имеет значение не только количественный состав клеток, но и соотношение клеток, используемых в тканеинженерных конструкциях из никелида титана. Присутствие в составе тканеинженерной конструкции из никелида титана определённого соотношения клеток печени и МСК является наиболее важным фактором эффективной терапии хронической печеночной недостаточности. Данные, полученные в этих экспериментах, подтверждают, что использование в составе тканеинженерной конструкции аллогенных клеток КП и МСК в соотношении 5:1 (совпадает с данными М.Ю. Шагидулина [3]) позволяет достичь наилучшего результата для нормализации щелочной фосфатазы при лечении хлориндуцированной печеночной недостаточности.

При исследовании терапевтической эффективности комбинированной трансплантации клеток печени и мезенхимальных стволовых клеток на КННТ были выявлены следующие особенности. Так, при регистрации показателей АсАТ, АлАТ и щелочной фосфатазы было установлено резкое повышение этих показателей в течение первых 2 недель после введения ССТ: активность АсАТ повышалась более чем в 2,3 раза, АлАТ – более чем в 1,8 раза, а ЩФ – почти в 1,7 раз (рис. 2). К 30-м суткам эксперимента

исследуемые показатели снижались, но оставались на статистически значимо более высоком уровне, по сравнению с интактными животными. Данный факт говорит о существенном повреждении ферментативного аппарата печени и деструкции клеток (цитоллиз), вызванном токсическим влиянием на печень хлоруглерода.

В группе, где гепатоциты имплантировались без МСК, происходило неуклонное снижение концентрации данного фермента в течение всего периода исследований в течение 30 суток. В те же сроки в группе с сочетанным введением гепатоцитов и МСК активность ферментов цитолиза статистически значимо снижалась более быстрыми темпами в течение всего 30-суточного промежутка. В группе животных, где клетки печени вводились совместно с мезенхимальными клетками на пористо-проницаемом носителе из никелида титана, биохимические показатели крови (АЛТ, АСТ, ЩФ) приблизились и даже сравнялись с первоначальными значениями интактных здоровых животных, что свидетельствовало о купировании процессов цитолиза в печени и полноценном восстановлении её функциональной активности (рис. 2).

Введение гепатоцитов на клеточном носителе из никелида титана привело к статистически значимому увеличению общего белка сыворотки до 60 г/л и снижению ацидоза в сыворотке крови, что отмечено

снижением концентрации лактата до 1,8 ммоль/л (рис. 3). Эти данные коррелируют с уровнями ферментов, описанными ранее. Показанное увеличение количества общего белка мы связываем с регенеративным влиянием трансплантированных клеток печени, иммобилизованных на КННТ, на печень животного-реципиента, повреждённую действием хлоруглерода.

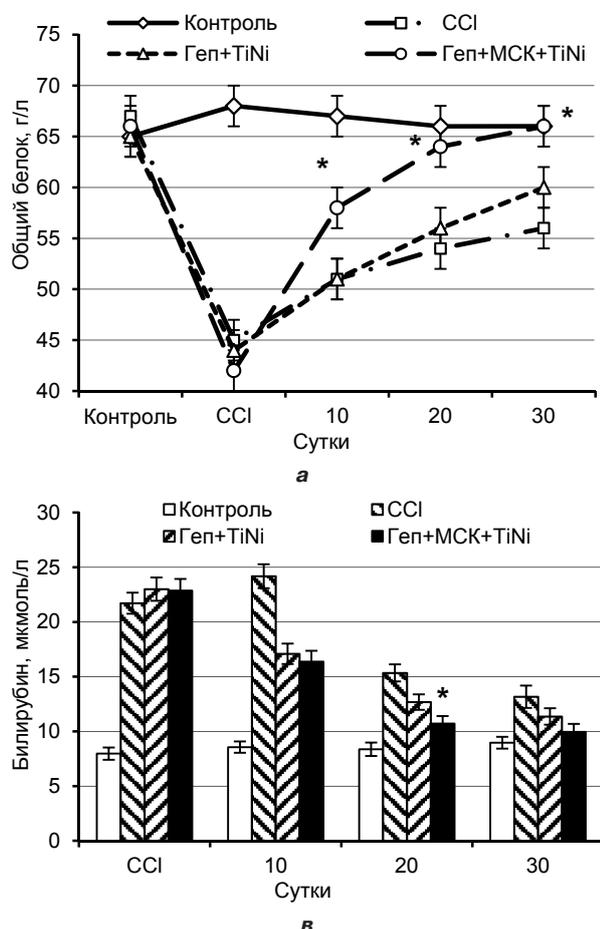
Имплантация клеточного носителя, насыщенного КП и МСК, оказало более весомое влияние на нормализацию показателей сыворотки крови при хроническом гепатите. Это воздействие наглядно демонстрирует статистически значимо более высокое увеличение концентрации общего белка сыворотки крови в разные сроки исследования (10-е, 20-е, 30-е сутки), достигая 66 г/л в терминальные сроки исследования и сравниваясь с показателями контрольной группы (рис. 3а). Концентрация лактата в опытной группе также быстро и стабильно снижается до 1,6 ммоль/л, достигая показателей группы здоровых интактных животных на 30-е сутки исследования, тем самым приводя к нормализации параметры кислотно-щелочного состава крови у опытных животных (рис. 3б), что не так заметно для группы, где вводились клетки печени без МСК.

Подобная динамика наблюдалась и в содержании общего билирубина. Имплантация клеточных носителей из никелида титана, заселённых гепатоцитами и МСК, позволила сгладить резкое повышение данного показателя после курсового введения хлоруглерода.

При этом на 20-е сутки данные в опытной группе статистически значимо отличались от группы с моно-клеточной тканеинженерной конструкцией (рис. 3в).

Сроки жизни животных, оставленных на дожитие, также подтвердили значимость применения сочетанного введения КП и МСК для коррекции печёночной недостаточности в эксперименте. Отмечено, что продолжительность жизни в группе с введением хлоруглерода составила  $106 \pm 19$  суток. В группе, где гепатоциты вводились на никелиде титана, продолжительность жизни увеличилась в 2 раза и составила  $214 \pm 13$  суток. Однако наиболее эффективно показала себя тканеинженерная конструкция на основе пористо-проницаемого никелида титана с сочетанным введением КП и МСК. При сходных условиях эксперимента в группе, где были имплантированы такие инкубаторы, продолжительность жизни оказалась максимальной –  $256 \pm 25$  суток, что в 2,4 раза превысило показатель в группе контроля с хлоруглеродом и в 1,2 раза – показатели группы с однородным введением гепатоцитов на КННТ (табл. 2).

Контактирующая с печенюю часть клеточных носителей плотно срасталась с поверхностью печени, что предотвращало смещение клеточного носителя и повреждение внутренних органов. Данная безоперативная имплантация клеточного носителя в печень снижает операционные осложнения, присущие оперативной имплантации и приводит к более быстрому восстановлению повреждённой хлоруглеродом печёночной ткани реципиента (рис. 4).



**Рис. 3.** Динамика содержания общего белка (а), молочной кислоты (лактат) (б) и общего билирубина (в) в сыворотке крови крыс Вистар после сочетанной трансплантации клеток печени и МСК на КННТ в соотношении 5:1 при хроническом гепатите: \* – различия статистически значимы при  $p < 0,05$ , по сравнению с группами «CCI» и «Геп + TiNi».

**Fig. 3.** Dynamics of the total protein (а), lactate (б) and total bilirubin (в) content in the serum of Wistar rats with chronic hepatitis after implantation of TiNi-based alloy scaffolds with liver cells and MSC BM in ratio 5:1: \* – the differences are statistically significant at  $p < 0.05$ , compared to the “CCI” and “Геп + TiNi” groups.

**Таблица 2**  
**Сроки жизни животных с печёночной недостаточностью после проведения трансплантации КП совместно с МСК на КННТ в соотношении 5:1**

**Table 2**  
**Life expectancy of Wistar rats with chronic hepatitis after implantation of TiNi-based alloy scaffolds with liver cells and MSC BM in ratio 5:1.**

Группа животных	Кол-во животных на дожитие	Срок жизни, сут.	
		Длительность	Средний срок
CCI	5	83, 94, 106, 119, 129	106 ± 19
Геп + TiNi	5	198, 205, 217, 219, 224	213 ± 11
Геп + МСК + TiNi	5	225, 241, 256, 272, 287	256 ± 25

Вследствие того, что трансплантированные в составе тканеинженерной конструкции клетки печени и МСК были аллогенными, становится ясным, что более высокая их выживаемость и функциональная активность клеток печени при трансплантации их в составе тканеинженерной конструкции обусловлена не только их защитой носителем, но и иммуно-толерогенными свойствами мезенхимальных клеток, которые имеют возможность перепрограммировать иммунный ответ, создавая благоприятные условия для приживания и функционирования аллогенных гепатоцитов. Вероятно, за счёт этого получается более длительная и эффективная поддержка восстановительных регенерационных процессов в повреждённой печени, что и стимулирует стабильную регенерацию печени хозяина. Следовательно, касательно опытной группы животных, видимо, введение мезенхимальных стволовых клеток приводит к прямому межклеточному контакту (эпигенетический механизм), а возможность передачи метаболических

сигналов стимулирует индукцию регенерационной программы (секрецию факторов дифференцировки, роста и т. д.) печени и пролиферацию зрелых гепатоцитов собственной печени реципиента. В исследованиях была продемонстрирована достаточно высокая эффективность клеточной терапии на пористых носителях из никелида титана, и найденные эффекты нуждаются в дальнейших клинических исследованиях и научно-теоретическом обосновании.

*Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентноспособности ТГУ Фонда имени Д.И. Менделеева ТГУ, № 8.2.10.2017 (2017 г.).*

**Конфликт интересов**

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

*Выражаем признательность директору НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы ТГУ В.Э. Гюнтеру за консультативную помощь в проектировании дизайна исследования.*

**ЛИТЕРАТУРА  
REFERENCES**

1. Гюнтер В.Э., Ходоренко В.Н., Ясенчук Ю.Ф. Никелид титана. Медицинский материал нового поколения. – Томск: Изд-во «МИЦ», 2006. – 296 с.

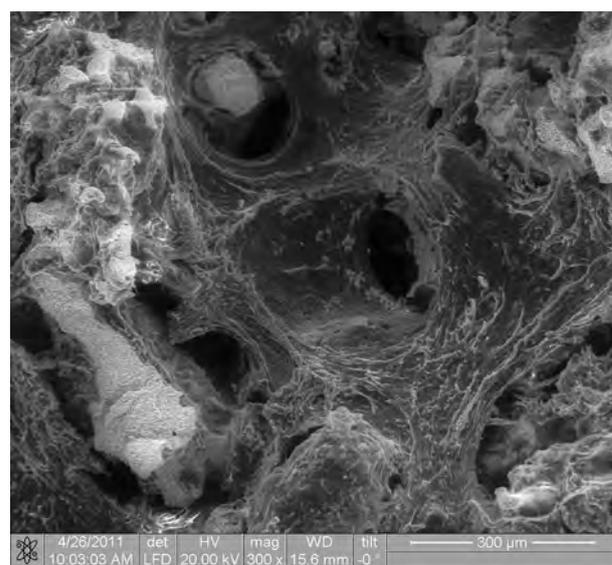
Gyunter VE, Khodorenko VN, Yasenchuk YuF. (2006). Titanium nickelide. Medical material of a new generation [Nikelid titana. Meditsinskiy material novogo pokoleniya]. Tomsk, 296 p.

2. Гюнтер В.Э., Ходоренко В.Н., Чекалкин Т.Л., Олесова В.Н, Дамбаев Г.Ц., Сысолятин П.Г., Фомичев Н.Г. Медицинские материалы с памятью формы // Медицинские материалы и имплантаты с памятью формы. – Томск, 2011. – Т. 1. – 534 с.

Gyunter WE, Khodorenko VN, Chekalkin TL, Olesova VN, Dambaev GT, Sysolyatin PG, Fomichev NG. (2011). Medical materials with shape memory [Meditsinskie



**а**



**б**

**Рис. 4.** Вращение печени в клеточный носитель из никелида титана (**а**), зарастание внутренней пористой структуры клеточного носителя тканью (**б**) (30-е сутки).

**Fig. 4.** Growth of the liver in the cellular carrier from titanium nickelide (**a**), overgrowth of the internal porous structure of the cellular carrier with tissue (**b**) (30th day).

materialy s ramyat'yu formy]. *Meditzinskie materialy i implantaty s ramyat'yu formy*. Tomsk, 1, 534 p.

3. Имплантат для хирургического лечения заболеваний внутренних органов: Пат. 2143867 Рос. Федерация; МПК А61F 2/02 (2000.01) / Дамбаев Г.Ц., Гюнтер В.Э., Загребин Л.В., Ходоренко В.Н., Смольянинов Е.С., Чердынцева Н.В., Ясенчук Ю.Ф., Кокорев О.В.; заявители и патентообладатели Дамбаев Г.Ц., Гюнтер В.Э., Загребин Л.В., Ходоренко В.Н., Смольянинов Е.С., Чердынцева Н.В., Ясенчук Ю.Ф., Кокорев О.В. – № 97119471/14; заявл. 12.11.1997; опубл. 10.01.2000. – Бюл. № 23.

Dambaev GTs, Gyunter VE, Zagrebin LV, Khodorenko VN, Smolyaninov ES, Cherdyntseva NV, Yasenchuk YuF, Kokorev OV. (2000). Implant for surgical treatment of internal organs diseases: Patent 2143867 of the Russian Federation [*Implantat dlya khirurgicheskogo lecheniya zabolevaniy vnutrennikh organov: Pat. 2143867 Ros. Federatsiya*].

4. Климович В.Б. Стволовые клетки как иммуномодуляторы при использовании клеточных технологий // Клеточные технологии для регенеративной медицины. – СПб.: Изд. политехн. ун-та, 2011. – С. 62–86.

Klimovich VB. (2011). Stem cells as immunomodulators in using cell technologies [*Stvolovye kletki kak immunomodulyatory pri ispol'zovanii kletochnykh tekhnologiy*]. *Kletochnye tekhnologii dlya regenerativnoy meditsiny*. Sankt-Peterburg, 62-86.

5. Люндуп А.В., Онищенко Н.А., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М.Е. Стволовые/прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – № 2 (XII). – С. 100–107.

Lyundup AV, Onischenko NA, Shagidulin M.Yu., Krasheninnikov ME. (2010). Stem/progenitor cells of liver and bone marrow as regulators of regenerative regeneration of damaged liver [*Stvolovye/progenitornye kletki pecheni i kostnogo mozga kak regulatory vosstanovitel'noy regeneratsii povrezhdennoy pecheni*]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*, 2 (XII), 100-107.

6. Онищенко Н.А., Гулай Ю.С., Шагидулин М.Ю., Никольская А.О., Башкина Л.В. Разработка имплантируемых клеточно- и тканеинженерных конструкций вспомогательной печени для лечения печеночной недостаточности // Гены & клетки. – 2015. – Т. X, № 1. – С. 6–17.

Onischenko NA, Gulai YuS, Shagidulin MYu, Nikolskaya AO, Bashkina LV. (2015). Development of implantable cell and tissue engineering auxiliary liver structures for the treatment of liver failure [*Razrabotka implantiruemykh kletochno- i tkaneinzhenernykh konstruktsiy vspomogatel'noy pecheni dlya lecheniya pechenochnoy nedostatochnosti*]. *Geny & kletki*, X (10), 6-17.

7. Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. Выживание клеток печени, иммобилизованных на 3D-матриксах при моделировании печеночной недостаточности // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т. XIII, № 3. – С. 59–66.

Shagidulin MYu, Onishchenko NA, Krasheninnikov ME. (2011). Survival of liver cells. immobilized on 3D matrices in the modeling of hepatic insufficiency [*Vyzhivanie kletok pecheni, immobilizovannykh na 3D-matriksakh pri modelirovanii pechenochnoy nedostatochnosti*]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*, XIII (3), 59-66.

8. Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А. Трансплантация стволовых клеток костного мозга как новый способ лечения печеночной недостаточности. Современное состояние проблемы // Фарматека. – 2013. – № 18. – С. 130–135.

Shagidulin MYu, Onishchenko NA. (2013). Transplantation of bone marrow stem cells as a new way of treating hepatic insufficiency. Current state of the problem [*Transplantatsiya stvolovykh kletok kostnogo mozga kak novyy sposob lecheniya pechenochnoy nedostatochnosti. Sovremennoe sostoyanie problemy*]. *Farmateka*, (18), 130-135.

9. Charles R, Lu L, Qian S, Fung JJ. (2011). Stromal cell-based immunotherapy in transplantation. *Immunotherapy*, (3), 1471-1485.

10. Dai LJ, Li HY, Guan LX, Ritchie G, Zhou JX. (2009). The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res*, 2 (1), 16-25.

11. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K., Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, Baharvand H, Ghavamzadeh A, Malekzadeh R. (2007). Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med*, 10 (4), 459-466.

12. Ren G, Zhang L, Zhao X, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2 (2), 141-150.

13. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. (2004). Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 40 (6), 1304-1311.

14. Schwartz RE, Reyes M, Koodie J, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 109, 1291-1302.

15. Yagi K, Kojima M, Oyagi S, Ikeda E, Hirose M, Iso-da K, Kawase M, Kondoh M, Ohgushi H. (2008). Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine. *Yakugaku Zasshi*, 128 (1), 3-9.

**Сведения об авторах**  
**Information about the authors**

**Кокорев Олег Викторович** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы, Сибирский физико-технический институт, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; ассистент кафедры госпитальной хирургии с курсом сердечно-сосудистой хирур-

гии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (634055, г. Томск, Московский тракт, 2; e-mail: kokorevov@handed.ru)

**Kokorev Oleg Viktorovich** – Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer, Research Institute of Medical Materials and Shape-Memory Implants, Siberian Physics and Technology Institute, Tomsk State University; Teaching Assistant at the Department of Advanced Level Surgery with a Course of Cardiovascular Surgery, Siberian State Medical University (634055, Tomsk, Moskovskiy trakt, 2; e-mail: kokorevov@yandex.ru)

**Гюнтер Сергей Викторович** – кандидат технических наук, старший научный сотрудник, НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы, Сибирский физико-технический институт, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (634045, г. Томск, ул. 19-й Гвардейской дивизии, 17; тел./факс: (3822) 41-38-15; e-mail: guntersv@inbox.ru)

**Gyunter Sergey Viktorovich** – Candidate of Technical Sciences, Senior Research Officer, Research Institute of Medical Materials and Shape-Memory Implants, Siberian Physics and Technology Institute, Tomsk State University (634045, Tomsk, ul. 19-y Gvardeyskoy divizii, 17; tel./fax: (3822) 41-38-15; e-mail: guntersv@inbox.ru)

**Ходоренко Валентина Николаевна** – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, НИИ медицинских материалов и имплантатов с памятью формы, Сибирский физико-технический институт, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

**Khodorenko Valentina Nikolaevna** – Candidate of Physico-Mathematical Sciences, Senior Research Officer, Research Institute of Medical Materials and Shape-Memory Implants, Siberian Physics and Technology Institute, Tomsk State University

**Дамбаев Георгий Цыренович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой госпитальной хирургии с курсом сердечно-сосудистой хирургии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: dambaev@vtomske.ru)

**Dambaev Georgiy Tsyrenovich** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Advanced Level Surgery with a Course of Cardiovascular Surgery, Siberian State Medical University (e-mail: dambaev@vtomske.ru)