

КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ МИНГОРИСПОЛКОМА
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«МИНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ,
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ГЕМАТОЛОГИИ»

УДК 616.36-018:616.419- 018.4]-089.843

СЫМАНОВИЧ
Алла Александровна

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОМЕДИЦИНСКИХ
КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ГЕПАТОЦИТОВ И
ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ В ГЕПАТОГЕННОМ НАПРАВЛЕНИИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

Минск, 2019

Научная работа выполнена в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

Научный руководитель: **Кривенко Светлана Ивановна**, доктор медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной работе государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

Официальные оппоненты: **Зиматкин Сергей Михайлович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Пасюков Вадим Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией клеточной лекарственной резистентности государственного учреждения «Республиканский практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

Оппонирующая организация: Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Защита состоится 19.06.2019 в 14.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.03.01 при государственном учреждении «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» по адресу: 220045, г. Минск, ул. Семашко, 8, телефон: (8-017) 277-20-18, e-mail: iskrov@m9gkb.by.

С диссертацией можно ознакомиться в Республиканской научной медицинской библиотеке.

Автореферат разослан «17» мая 2019 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент



Искров И.А.

ВВЕДЕНИЕ

Применение трансплантации гепатоцитов в качестве альтернативного метода коррекции печеночной недостаточности впервые было предложено в 90-х годах прошлого столетия (S. C. Strom et al., 1997). На сегодняшний день проведенные различными авторами научные исследования свидетельствуют о возможности и целесообразности использования гепатоцитов в терапии заболеваний печени, однако полученные в клинических исследованиях результаты неоднозначны. Эффективность данного метода лечения в большинстве исследований оказалась неудовлетворительной, что было связано с технической невозможностью получения гепатоцитов в количествах, достаточных для обеспечения потребности пациента (A. Dhawan et al., 2010). Причина этого заключается в отсутствии оптимальных методов, позволяющих сохранить клеточный материал в культуре, не прибегая к его криоконсервированию, а также в морфологической гетерогенности изолированных клеток (R. Gramignoli et al., 2015).

Одним из перспективных направлений регенеративной медицины является разработка различных вариантов биологических и синтетических подложек для улучшения результатов культивирования клеток. С этой точки зрения достаточно перспективным представляется использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для структурной и трофической поддержки изолированных клеток печени в культуре *in vitro* (D. D. Houlihan et al., 2008, E. Fitzpatrick et al., 2015, V. Gouliarmou et al., 2015). МСК являются естественным компонентом стромы печени, а также обладают способностью к дифференцировке в гепатогенном направлении *in vitro* и *in vivo* (J. Yuan et al., 2015). Кроме того, МСК характеризуются низкой иммуногенностью и локальным иммуносупрессивным действием (P. Bianco, 2014, R.E.B. Fitzsimmons et al., 2018, Y.B. Yц, 2018), что позволяет применять их для совместной пересадки с гепатоцитами.

Таким образом, для получения качественного пересадочного материала гепатоцитов, пригодного для клинического применения, необходима разработка новых методических подходов к культивированию данного типа клеток, направленных на увеличение количества и однородности выделяемой клеточной популяции, обеспечивающих более длительное сохранение их жизнеспособности и функциональной активности *in vitro*, в том числе за счет применения эффективных подложек (F. Nevens et al., 2012, D.C. Bartlett et al., 2015).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научных исследований и научно-технической деятельности (пп. 3.2 и 4.2 «Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики на 2011–2015 годы», п. 4 «Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики на

2016-2020 годы», утвержденных постановлениями Совета Министров Республики Беларусь от 19 апреля 2010 г. № 585, от 12 марта 2015 года № 190, соответственно; пп. 25, 33 «Перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2011-2015 годы», п. 4 «Перечня приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 годы», утвержденных Указами Президента Республики Беларусь от 22 июля 2010 года № 378, от 22 апреля 2015 года № 166, соответственно).

Работа выполнялась в рамках следующих заданий государственных научно-технических программ и инновационных проектов:

– Разработать технологию получения стандартизированного аллогенного трансплантата мезенхимальных стволовых клеток от доноров при проведении мультиорганного забора для создания банка клеточной терапии в Республике Беларусь (№ госрегистрации 20113498 от 22.09.2011, срок выполнения 4 кв. 2011–4 кв. 2015 гг.);

– Разработать и внедрить метод комплексной иммуносупрессивной терапии пациентов после органной трансплантации с применением мезенхимальных стволовых клеток (№ госрегистрации 20150028 от 15.01.2015, срок выполнения 4 кв. 2014–3 кв. 2016 гг.);

– Разработать и внедрить технологию перфузионного кондиционирования трансплантатов органов (№ госрегистрации 20151810 от 04.12.2015, срок выполнения 3 кв. 2015–2 кв. 2018 гг.).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: разработать научно-обоснованный алгоритм получения терапевтически эффективных и безопасных биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для лечения пациентов с терминальной стадией хронической печеночной недостаточности (ХПН).

Задачи исследования:

1. Определить влияние предварительной перфузии печени консервирующими растворами «Кустодиол» (НТК) и University of Wisconsin (UW) на морфологические и иммунофенотипические характеристики, метаболическую активность и уровень генной экспрессии гепатоцитов *in vitro*.

2. Изучить влияние продолжительности культивирования МСК при их направленной дифференцировке в гепатогенном направлении на жизнеспособность и функциональную активность гепатоцитоподобных клеток.

3. Провести сравнительный анализ эффективности использования различных подложек (МСК, дифференцированных в гепатогенном направлении МСК) для культивирования гепатоцитов.

4. Оценить влияние клеточной терапии гепатоцитами и МСК на клинико-лабораторные показатели пациентов с терминальной стадией ХПН.

Научная новизна

Впервые показано, что предварительная перфузия донорской печени консервирующими растворами «Кустодиол» (НТК) и University of Wisconsin (UW) снижает морфологическую гетерогенность выделяемой популяции гепатоцитов, что улучшает качество клеточного продукта на их основе.

Установлено, что модификация общепринятого лабораторного протокола дифференцировки МСК в гепатогенном направлении, заключающаяся в сокращении продолжительности шага 2 с 14 до 7 суток, позволяет получить БМКП, имеющий морфологические и иммунофенотипические характеристики гепатоцитоподобных клеток.

Научно обоснована эффективность применения МСК, дифференцированных в гепатогенном направлении, в качестве подложки в процессе культивирования изолированных гепатоцитов для поддержания их жизнеспособности и функциональных свойств.

Впервые показано, что совместная пересадка аллогенных гепатоцитов и МСК клеткам пациентам с терминальной стадией ХПН способствует улучшению метаболической и синтетической функции печени.

Положения, выносимые на защиту

1. Перфузия донорской печени консервирующим раствором на этапе, предшествующем получению гепатоцитов, снижает морфологическую гетерогенность выделяемой клеточной популяции за счет уменьшения количества содержащихся в ней форменных элементов крови (ФЭК).

2. Сокращение продолжительности шага 2 общепринятого протокола дифференцировки МСК в гепатогенном направлении с 14 до 7 суток не оказывает влияния на количественные и качественные характеристики получаемых гепатоцитоподобных клеток по сравнению с общепринятым протоколом.

3. Использование в качестве подложки МСК и дифференцированных в гепатогенном направлении МСК способствует поддержанию жизнеспособности и функциональных свойств изолированных гепатоцитов в процессе культивирования.

4. Совместная пересадка гепатоцитов и МСК при ХПН обеспечивает улучшение синтетической и метаболической функций печени.

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором совместно с научным руководителем определены цель и задачи, а также объем и методы исследования. Автором самостоятельно проанализирована литература по теме диссертации, проведен патентный поиск, сформированы группы сравнения, созданы электронные базы данных, проведена статистическая обработка данных, написаны все разделы диссертации. Соискателем лично получены основные научные результаты диссертации, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации (личный вклад – 100 %).

Соискатель, являясь сотрудником лаборатории клеточных биотехнологий УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска (далее – УЗ «9-я ГКБ»), принимал непосредственное участие в выделении гепатоцитов из донорской печени, получении МСК жировой ткани (МСК ЖТ), а также в исследовании функциональной активности клеток (личный вклад – 95%) [1–3, 6]. Отбор пациентов, получение информированного согласия на проведение клеточной терапии осуществлялось лечащими врачами отделений трансплантации и портальной гипертензии УЗ «9-я ГКБ». Контроль динамики клинико-лабораторных показателей пациентов проводился соискателем лично [4, 5, 7]. Иммунофенотипические и молекулярно-генетические исследования выполнены на базе клинико-диагностической лаборатории службы трансплантации костного мозга УЗ «9-я ГКБ». Проведение мультиплексного анализа осуществлялось в лаборатории HLA-типирования УЗ «9-я ГКБ». Вклад автора в публикации по данной тематике – 90 % [2–4, 6].

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследований и основные положения диссертации доложены и обсуждены на: I Евразийском конгрессе «Трансплантация стволовых клеток» (Минск, 2013), Международной научно-практической конференции, посвященной 25-летию Независимости Республики Казахстан «Актуальные вопросы клинической хирургии. От аппендэктомии до трансплантации», (Шимкент, 2016), III Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2017), VIII Съезде гематологов и трансфузиологов Республики Беларусь (Минск, 2017).

Получено 3 акта о внедрении в лечебный процесс ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии» и 2 акта о внедрении в образовательный процесс кафедры иммунологии и экологической эпидемиологии ГУО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белгосуниверситета».

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе: 3 статьи в рецензируемых научных журналах, соответствующих п.18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (1,0 авторских листа), 1 статья в иных рецензируемых научных журналах, 3 тезисов докладов в сборниках научных работ, материалов конференций, съездов, конгрессов, из них 3 – в зарубежной печати (0,80 авторских листа).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 106 страницах машинописного текста, содержит 22 рисунка и 6 таблиц. Включает введение, общую характеристику работы, аналитический обзор литературы, описание материалов и методов, 3 главы результатов собственных исследований, заключение, 195 использованных библиографических источников (из них 19 – русскоязычных, 176 – англоязычных),

список публикаций соискателя, 6 приложений.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В **аналитическом обзоре литературы** обобщены литературные данные о применении гепатоцитов для восстановления функции печени, рассмотрены основные проблемы их выделения и культивирования, а также альтернативные способы поддержания их жизнеспособности, включая использование различных подложек. Обозначены нерешенные задачи. Обоснована необходимость разработки новых подходов к культивированию данного типа клеток, обеспечивающих длительное сохранение их жизнеспособности и функциональной активности, в том числе за счет применения эффективных подложек.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на гепатоцитах человека из фрагмента печени, полученного от трупных доноров (n=26), при родственной трансплантации (n=22) или резекции печени (n=4); 2) МСК ЖТ человека, полученной от трупных доноров (n=25). Изоляцию гепатоцитов проводили по стандартной методике (R. R. Mitry, 2009). Выделение МСК ЖТ проводили по разработанному ранее протоколу с некоторыми модификациями (С. И. Кривенко и др., 2014). Морфологические характеристики клеток исследовали методом фазово-контрастного микроскопирования. Подсчет количества гепатоцитов выполняли общепринятым методом с уксусной кислотой, жизнеспособность оценивали по исключению трипанового синего, апоптотическую активность – методом ИФА по концентрации расщепленной (M30) и нерасщепленной (M65) форм цитокератина 18. Функциональную активность клеток оценивали по продукции мочевины общепринятым количественным колориметрическим методом с использованием набора «QuantiChrom™ Urea Assay Kit» (BioAssay Systems, США).

Экспрессию поверхностных маркеров CD90, CD105, CD44, CD13, CD34, CD45, CD49e, HLA-DR, CD68 и внутриклеточного маркера Cytokeratin выделенными из печени клетками исследовали в первые 18–24 ч после их изоляции. Популяцию гепатоцитов идентифицировали как Cytokeratin⁺ CD 68⁻. Для контроля дифференцировки МСК в гепатогенном направлении использовали следующую панель моноклональных антител: CD45 PC7, CD34 APC, CD105 PE, CD90 FITC, CD13 PE, HLA-DR, CD68 FITC. Полученные в процессе дифференцировки гепатоцитоподобные клетки оценивали как CD105^{low}CD68⁻.

Уровни экспрессии генов альбумина (ALB) и α -фетопротейна (AFP) гепатоцитоподобными клетками исследовали методом относительного количественного анализа с использованием ПЦР в режиме реального времени в комбинации с методом обратной транскрипции. Выделение суммарной клеточной РНК осуществляли с использованием коммерческого набора реагентов для выделения тотальной РНК из цельной крови, клеточных культур и образцов тканей

«РНК-экстран» (Синтол, Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК определяли с использованием набора реагентов Qubit RNA BR Assay Kit (Life Technologies, США). Синтез к-ДНК проводили с применением набора реагентов Maxima First Strand cDNA Syntesis Kit (Thermo Scientific, США). Для определения уровня представленности транскриптов генов ALB и AFP использовали ген-специфичные праймеры TaqMan Gene Expression Assays (Hs00609411_m1, Hs01040598_m1, Thermo Scientific, США). Нормализацию уровня экспрессии изучаемых генов осуществляли относительно экспрессии гена «домашнего хозяйства» GAPDH с использованием праймеров Hs03929097_g1. Амплификацию проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Детекцию флюоресценции и первичную обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения CFX96 Maestro 1.1 в автоматическом режиме (Y. Yu et al., 2018).

Концентрацию секретируемых гепатоцитами белков AFP, ANGPTL4, FABP1, FGF-21 и HGF определяли методом мультиплексного анализа на приборе Luminex 200 (Luminex, США) с использованием коммерческих тест-систем Milliplex («Millipore», США) по инструкции производителя.

Для оценки эффективности терапии с использованием гепатоцитов и МСК анализировали показатели синтетической и экскреторной функции печени пациентов с ХПН до и через 7 дней после клеточной терапии.

Статистическую обработку результатов исследований выполняли с помощью пакета прикладных программ для медико-биологических исследований STATISTICA (Version 12, StatSoft Inc.) и Microsoft Excel. Для оценки характера распределения данных использовали функцию описательной статистики. При отличном от нормального распределении количественных переменных данные представляли: для биологических характеристик клеток в виде медианы с 5% и 95% квартилями, для клинико-лабораторных данных пациентов – с 25% и 75% квартилями. Для сравнения зависимых групп по 1 показателю использовали Wilcoxon Matched Pairs Test. Для сравнения независимых групп по 1 показателю использовали U-тест Mann-Whitney, при сравнении 3 и более переменных – Friedman ANOVA & Kendall's concordance (непараметрический ANOVA) (О. Ю. Реброва, 2002). Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$. При оценке взаимосвязи 2 переменных выполняли ранговую корреляцию по Спирмену (ρ) и Gamma корреляцию. Поиск литературных источников выполнен в электронной базе данных Pubmed (NLM).

Биологические характеристики изолированных из фрагмента печени гепатоцитов

Для определения оптимальной исходной массы фрагмента печени, обеспечивающей максимальный выход гепатоцитов, были проанализированы данные, полученные при выделении клеток из 26 образцов печени, распределенных

на 3 группы в зависимости от их массы: от 2 г до 49 г (n=15) – группа 1; от 50 г до 499 г (n=7) – группа 2; более 500 г (n=4) – группа 3.

Количество выделенных гепатоцитов в пересчете на 1 г массы фрагментов печени в группах 1 и 2 было сопоставимо и составило $4,2 [0,77; 15] \times 10^6$ клеток и $5,24 [0,55; 10,67] \times 10^6$ клеток, соответственно. Из образцов массой более 500 г выделялось значительно меньше клеток в пересчете на 1 г ($1,16 [0,65; 1,87] \times 10^6$ клеток), что, по-видимому, обусловлено сложностью эффективной обработки фрагментов ткани большого объема. Непараметрический ранговый корреляционный анализ по Спирмену выявил отсутствие статистически значимой корреляционной взаимосвязи между массой полученного фрагмента печени и количеством выделенных клеток во всех группах: в группе 1 ($r=-0,05$, $p=0,85$), в группе 2 ($r=-0,50$, $p=0,25$) и в группе 3 ($r=-0,40$, $p=0,60$). Поэтому при составлении лабораторного протокола выделения гепатоцитов рекомендовано использовать фрагменты печени с исходной массой 50 до 500 г.

При анализе морфологических характеристик клеток через 18–24 ч после их изоляции из фрагмента печени без дополнительной обработки получаемая клеточная популяция отличалась неоднородностью и гетерогенностью. В культуре выявляли существенную примесь ФЭК, которые покрывали все поле зрения, что существенно затрудняло визуализацию и контроль количества гепатоцитов (рисунок 1).

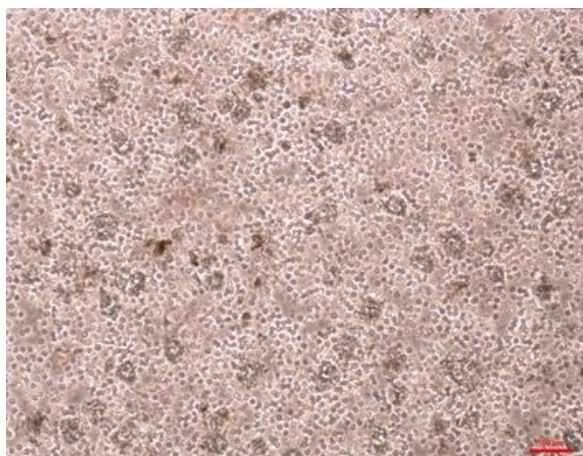


Рисунок 1. – Изолированные клетки печени, $\times 100$, ФК

Изучение влияния предварительной перфузии печени консервирующими растворами НТК и UW на биологические характеристики выделяемой популяции клеток проведено на образцах печени с перфузией (основная группа, n=10) и без перфузии (группа сравнения, n=10). В основной группе через 18–24 ч после выделения гепатоцитов микроскопически определяли множество одноядерных (реже многоядерных) клеток с невыраженной зернистостью цитоплазмы, которые имели полигональную форму и диаметр, равный приблизительно 30 мкм. Через 72 ч количество клеток данной популяции снижалось, увеличивалась зернистость цитоплазмы и лизис ядер гепатоцитов, а к 7 суткам культивирования регистрировали полную утрату морфологических свойств, характерных для клеток

печени (рисунок 2).

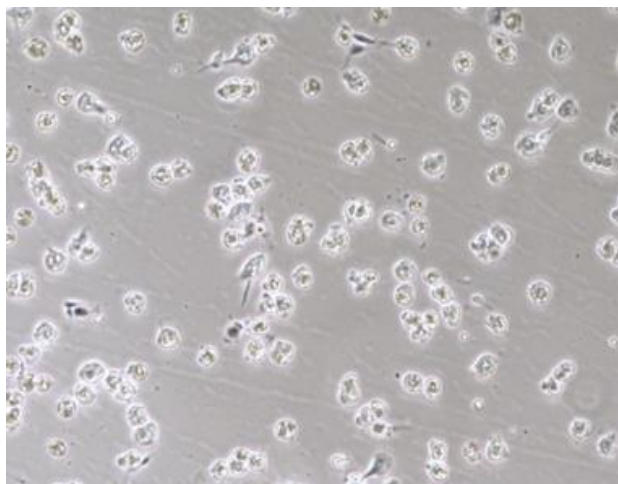


Рисунок 2. – Изолированные клетки печени после проведения перфузии через 18-24 ч, $\times 100$, ФК

Жизнеспособность клеток в образцах основной группы спустя 18 ч культивирования составляла 98 [96; 100]%. Через 72 ч в культуре регистрировали уменьшение количества гепатоцитов и их жизнеспособности (56 [42; 64]%). К 7 суткам культивирования жизнеспособность клеток снижалась до 15 [10; 28]% ($p=0,001$, Wilcoxon Matched Pairs Test). Анализ жизнеспособности клеток в образцах группы сравнения не проводили из-за невозможности учета окрашенных клеток на фоне плотного слоя ФЭК.

В основной группе при анализе показателей, характеризующих процессы апоптоза и некроза в гепатоцитах, также выявили статистически значимую корреляционную взаимосвязь между концентрацией M30 субъединицы цитокератина 18 (апоптоз) и сроком культивирования гепатоцитов ($p=0,04$, Gamma Correlations). Аналогичные результаты были получены и для M65 субъединицы, принимающей участие в регуляции некроза клеток ($p=0,04$, Gamma Correlations).

При определении экспрессии поверхностных маркеров клетками в первые 18–24 ч после их изоляции из печени установлено, что количество CD 45+ клеток в основной группе составило 0,1 [0; 1,9] %, в то время как для группы сравнения аналогичный показатель составил 63,9 [8,4; 67,6]% ($p=0,01$; Mann-Whitney U-test). Также выявлены статистически значимые различия в экспрессии HLA-DR (0,1 [0; 2,2]% и 40,7 [3,3; 78,5]% в основной группе и группе контроля соответственно, ($p=0,01$; Mann-Whitney U-test)) и CD 90 (79,5 [30,4; 94,8]% и 0,1 [0,1; 8,6]% в основной группе и группе контроля соответственно ($p=0,01$; Mann-Whitney U-test)). Увеличение количества CD 90+ клеток в основной группе, по-видимому, связано с повышением гомогенности выделяемой популяции, удалением в ходе перфузии примеси ФЭК и других неадгезивных клеток (таблица 1).

Таблица 1 – Экспрессия поверхностных маркеров клетками, выделенными из печени с предварительной перфузией (n=10) и без перфузии (n=10)

Маркер клеточной поверхности	Количество позитивных клеток, %		P
	Образцы с перфузией	Образцы без перфузии	
CD 90	79,5 [30,4; 94,8]	0,1 [0,1; 8,6]	0,01
CD 105	13,6 [1,0; 79,6]	0,2 [0,1;96,0]	0,14
CD 44	99,4 [97,0;99,9]	26,0 [13,1;58,3]	0,01
CD 13	100,0 [95,1;100,0]	35,3 [0,2;95,7]	0,02
CD 49e	19,2 [4,4;98,8]	13,1 [1,9;95,5]	0,40
CD 34	0,1 [0; 1,5]	1,9 [1,3;60,0]	0,09
CD 45	0,1 [0; 1,9]	63,9 [8,4;67,6]	0,01
HLA-DR	0,1 [0; 2,2]	40,7 [3,3;78,5]	0,01

Примечание – Данные в таблице представлены в виде: медиана (min;max).

При дальнейшем анализе популяции адгезивных клеток было установлено, что применение предварительной перфузии в основной группе обеспечивало выделение клеток с более высоким уровнем экспрессии внутриклеточного маркера Cytokeratin (97,3 [92,4; 98,8]%) по сравнению с группой без предварительной перфузии – 70,2 [67,2; 73,9]% ($p=0,001$; Mann-Whitney U-test), что свидетельствовало об увеличении доли гепатоцитов в получаемой популяции клеток из печени. Кроме того, уменьшение содержания CD 68⁺ клеток в образцах основной группы (0,35 [0,10; 0,60] %) по сравнению с группой сравнения (5,55 [3,8; 6,2] %) позволяло сделать заключение о значительном повышении гомогенности клеточной популяции за счет снижения примеси непаренхиматозных клеток ($p=0,001$; Mann-Whitney U-test) (рисунок 4).

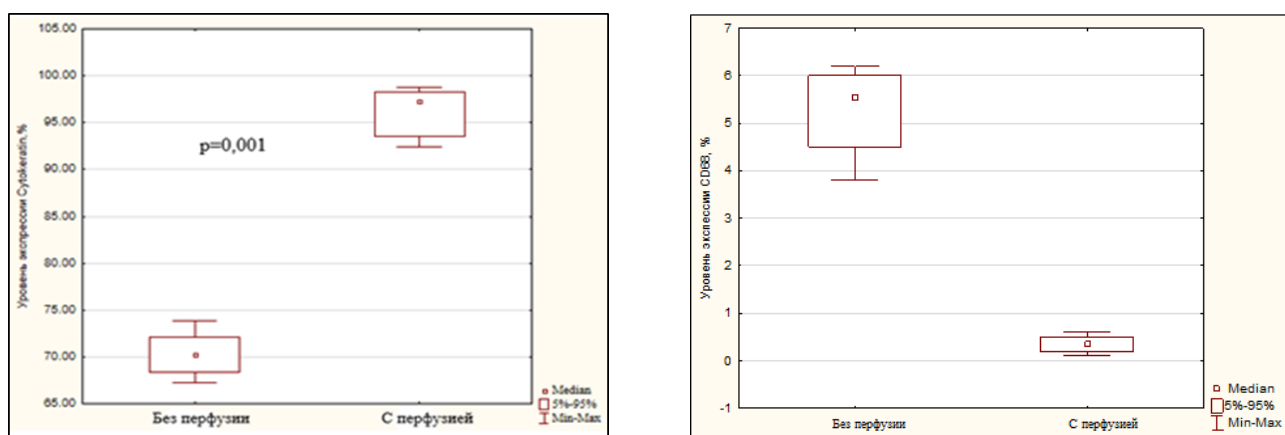


Рисунок 3. – Сравнительный анализ уровня экспрессии внутриклеточного маркера Cytokeratin и поверхностного маркера CD 68 в основной группе (n=10) и группе сравнения (n=10)

При оценке метаболической активности изолированных гепатоцитов по продукции ими мочевины на 1, 3, 7 и 10 сутки нахождения в культуре

регистрировали изменение данного показателя в культуральной среде с 9,0 [6,16; 11,22] мг/дл на 1 сутки до 11,46 [9,48; 11,60] мг/дл на 7 сутки ($p=0,002$, $r=0,77$ ANOVA по Фридмену). К 10 суткам наблюдали значительный подъем концентрации мочевины в клеточном супернатанте до 20,71 [19,39; 22,03] мг/дл ($p=0,028$; Wilcoxon Matched Pairs Test), который, по-видимому, является следствием гибели клеток и выделения продуктов их распада. Таким образом, применение на этапе операции мультиорганного забора процедуры предварительной перфузии печени позволяет получить морфологически и иммунофенотипически более однородную популяцию клеток, но не улучшает показатели жизнеспособности и функциональной активности гепатоцитов при их последующем содержании в культуре *in vitro*.

Технологии получения биомедицинских клеточных продуктов гепатоцитов

Были изучены альтернативные подходы к получению БМКП гепатоцитов, такие как направленная дифференцировка МСК в гепатогенном направлении, а также возможности улучшения результатов культивирования гепатоцитов, изолированных из печени, за счет использования подложек.

Для оценки влияния длительности культивирования МСК, находящихся в процессе направленной дифференцировки в гепатоцитоподобные клетки, на морфологические и иммунофенотипические характеристики получаемой клеточной популяции провели исследование на 25 образцах МСК ЖТ 2-го пассажа, каждый из которых был разделен на 3 группы: 1) МСК, дифференцированные в гепатогенном направлении по общепринятому протоколу, длительность шага 2 дифференцировочного протокола (ДП) 14 суток ($n=25$) – опытная группа I; 2) МСК, дифференцированные в гепатогенном направлении по общепринятому протоколу с сокращением сроков культивирования на шаге 2 до 7 суток ($n=25$) – опытная группа II; 3) недифференцированные МСК ($n=25$) – контрольная группа. Исходно МСК имели характерный для данного вида клеток иммунофенотип: $CD44^+$, $CD73^+$, $CD29^+$, $CD105^+$, $CD13^+$, $CD90^+$, $CD34^-$, $CD45^-$, $HLA-DR^-$. Факт гепатогенной дифференцировки подтверждали морфологически, методом проточной цитометрии, мультиплексного анализа секретируемых протеинов печени, полимеразной цепной реакцией в реальном времени. Морфологический контроль проводили на 3, 7, 14 и 21 сутки ДП.

В результате морфологического анализа клеточных культур на первом этапе ДП (шаг 1) значительных морфологических изменений в опытных группах I и II по сравнению с контролем выявлено не было. Регистрировали лишь небольшое количество клеток четырехугольной формы. На 14 сутки ДП (7 сутки культивирования на шаге 2) установлены морфологические изменения в образцах обеих опытных групп по сравнению с контролем, заключавшиеся в изменении фибробластоидную формы клеток на распластанную полигональную

форму с центральным расположением ядра и незначительной зернистостью цитоплазмы, которая характерна для зрелых гепатоцитов. При дальнейшем следовании условиям общепринятого ДП (опытная группа I, 8-14 сутки шага 2) в некоторых образцах отмечалась потеря клетками адгезивных свойств и постепенная деградация культуры.

При сравнении между собой после завершения дифференцировки образцов клеток, входящих в опытную группу I (14 сутки второго шага дифференцировки) и группу II (7 сутки второго шага дифференцировки), морфологических отличий популяции гепатоцитоподобных клеток исследуемых групп выявлено не было (рисунок 5).

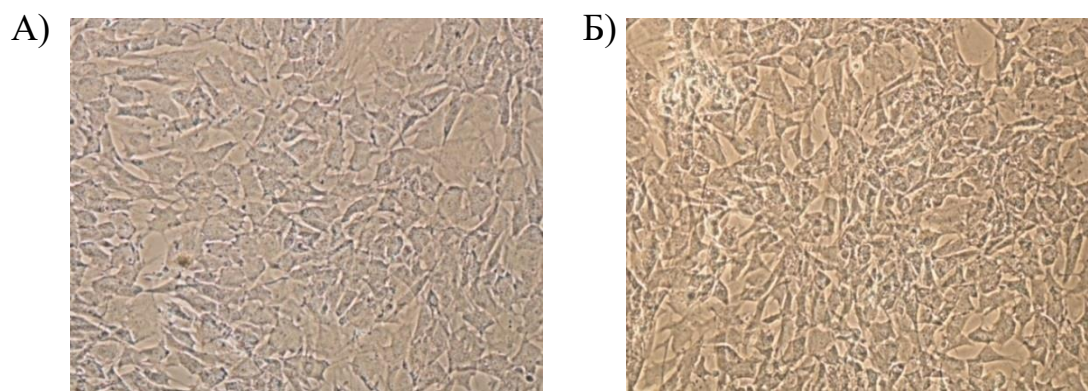


Рисунок 4. – Морфологический анализ культур клеток на 7 (А) и 14 (Б) сутки шага 2 протокола направленной дифференцировки МСК в гепатогенном направлении, $\times 100$, ФК

В процессе дифференцировки наблюдали постепенное снижение экспрессии CD105 с 99 [97; 100]% до дифференцировки до 73,4 [4,8; 93,2]% на шаге 2 ДП, показатели других маркеров адгезии сохранялись на исходном уровне. Полученные в процессе дифференцировки гепатоцитоподобные клетки оценивали как CD 68⁺.

При сравнении уровней секретируемых белков в опытных группах I-II (культивирование МСК в присутствии дифференцировочных факторов) и контрольной группе (культивирование МСК в среде без дифференцировочных факторов) были установлены статистически достоверные различия по концентрации HGF ($p=0,002$; Mann-Whitney U-test) между образцами МСК ЖТ P₂ (0,43 [0,15; 1,08] нг/мл) и дифференцированными в гепатогенном направлении МСК (0,94 [0,23; 8,51] нг/мл). Также были выявлены значимые различия для ANGPTL4, концентрация которого в образцах опытных групп I-II (72,53 [5,87; 524,58] нг/мл) была выше по сравнению с образцами контрольной группы (15,52 [4,90; 70,86] нг/мл) ($p=0,003$; Mann-Whitney U-test). В анализируемых группах не было установлено статистически достоверных различий в уровне маркера AFP. Данный показатель составил 0,25 [0,08; 0,64] нг/мл и 0,26 [0,07; 2,50] нг/мл для МСК и гепатоцитоподобных клеток соответственно ($p=0,60$; Mann-Whitney U-test). По концентрациям FGF-21 и FABP1 в клеточных супернатантах также не было установлено статистически значимых различий между МСК (FGF-21 – 0,036 [0,001; 0,495] нг/мл и FABP1 – 0,247 [0,032; 3,427] нг/мл) и

дифференцированными в гепатогенном направлении клетками (FGF-21 – 0,018 [0,001; 0,559] нг/мл и FABP1 – 0,175 [0,071; 0,480] нг/мл) ($p=0,317$ и $p=0,279$, соответственно; Mann-Whitney U-test).

На 2-й неделе культивирования на шаге 2 ДП (опытная группа I) регистрировали в большинстве культур снижение адгезивной способности клеток (экспрессия CD105 – 73,4 [4,8; 93,2]%) и их жизнеспособности (63,5 [0; 99,0]%). Данный факт и послужил основой для формирования в исследовании опытной группы II, в которой подвергающиеся дифференцировке клетки находились на шаге 2 протокола только 7 суток.

При проведении анализа не было установлено статистически значимых различий в концентрациях ни одного из секретируемых белков печени в клеточных супернатантах (HGF – $p=0,71$; ANGPTL4 – $p=0,47$; AFP – $p=0,75$; FGF-21 – $p=0,77$; FABP1 – $p=1,00$, критерий Вилкоксона) между образцами клеток, находившимися на шаге 2 ДП 7 суток и 14 суток.

Для определения экспрессии генов ALB и AFP в дифференцируемых в гепатогенном направлении МСК на 7 (шаг 1 ДП), 14 (7 сутки шага 2 ДП) и 21 (14 сутки шага 2 ДП) дни культивирования исследовали уровень мРНК методом ПЦР в реальном времени. Установлено статистически достоверное увеличение генной экспрессии альбумина в гепатоцитоподобных клетках (1,31 [0,62; 1,92]) на 7 сутки шага 2 ДП по сравнению с недифференцированными МСК (0,03 [0,00; 0,48]) ($p=0,03$; Mann-Whitney U-Test). Аналогичные изменения в сравниваемых группах выявлены и при определении уровня экспрессии мРНК AFP: 69,7 [22,8; 109,1] и 6,9 [0,0; 15,8] соответственно ($p=0,03$; Mann-Whitney U-Test). Культивирование клеток на шаге 2 ДП более 7 дней не приводило к увеличению количества мРНК ALB и AFP.

Таким образом, сокращение продолжительности пребывания дифференцируемых в гепатогенном направлении МСК на шаге 2 ДП с 14 до 7 суток не влечет за собой изменения морфологических характеристик, не влияет на уровень генной экспрессии ALB и AFP, секрецию HGF и ANGPTL4, и обеспечивает получение функционально активной популяции клеток. Кроме того, данная модификация обеспечивает сокращение времени получения БМКП на основе гепатоцитоподобных клеток и удешевление процедуры дифференцировки за счет снижения расхода дорогостоящих ростовых факторов на 30-40 %.

Для улучшения результатов культивирования гепатоцитов, изолированных из печени, было предложено использование в качестве подложек дифференцированных в гепатогенном направлении МСК (опытная группа I) и недифференцированных МСК (опытная группа II). При сравнении результатов в исследуемых группах жизнеспособность гепатоцитов в опытной группе I (95,5 [93; 97]%) статистически значимо не отличалась от аналогичных показателей в опытной группе II (96 [95; 97]%) ($p > 0,05$) на протяжении всего периода культивирования (10 суток) (рисунок 6).

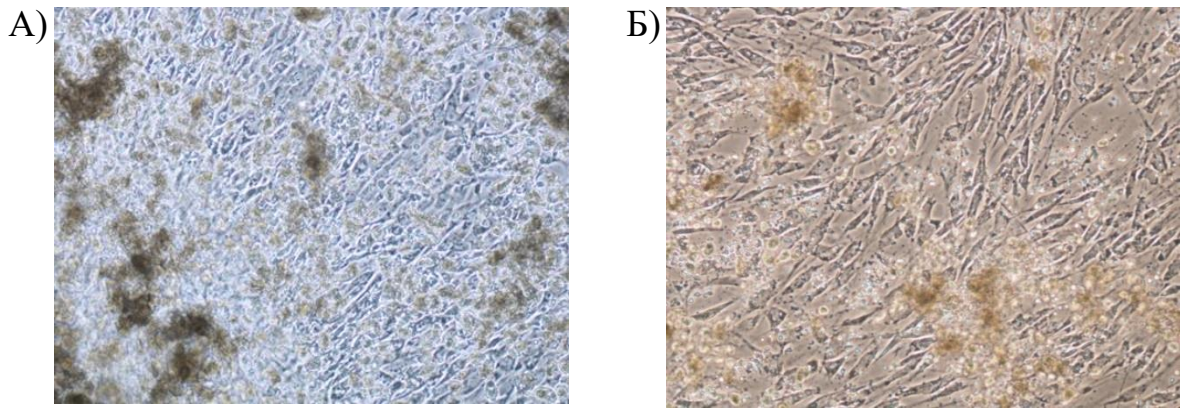


Рисунок 5. – Гепатоциты на 7 сутки культивирования на подложке из МСК (А) и дифференцированных в гепатогенном направлении МСК (Б), $\times 100$, ФК

При сравнении уровней продукции ANGPTL4 и HGF в контрольной (монокультура гепатоцитов без использования подложки) и опытной группах II (подложка из МСК) в образцах опытной группы II регистрировались более высокие уровни HGF (0,36 [0,23;0,94] нг/мл) и ANGPTL4 (14,28 [7,71;71,33] нг/мл) по сравнению с контрольной группой – HGF (0,23 [0,14;0,34] нг/мл) и ANGPTL4 (3,86 [2,00;24,40] нг/мл) ($p=0,0048$; $p=0,003$; Mann–Whitney U-test), что свидетельствует о способности МСК в качестве подложки обеспечивать поддержание не только жизнеспособности, но функциональной активности гепатоцитов при культивировании. При сравнении аналогичных показателей в опытных группах I и II были установлены значимые отличия лишь в концентрации ANGPTL4 (3072 [2160;3568] нг/мл и 1456,75 [805;1833] нг/мл, $p=0,003$, соответственно). Статистически значимых изменений (Mann–Whitney U-test) в концентрации HGF ($p=0,060$), AFP ($p=0,083$), FGF-21 ($p=0,76$) и FABP1 ($p=1,000$) в обеих опытных группах не регистрировали.

Таким образом, использование подложек из МСК и дифференцированных в гепатогенном направлении МСК обеспечивает сохранение жизнеспособности и функциональной активности гепатоцитов в культуре до 10 суток. Выявленные минимальные отличия между опытными группами существенным образом не влияют на качество получаемого клеточного продукта, что позволяет рекомендовать использование обоих типов подложек при получении БМКП гепатоцитов.

Влияние клеточной терапии гепатоцитами и МСК на клинико-лабораторные показатели пациентов с терминальной стадией ХПН

Все пациенты с терминальной стадией ХПН, включенные в исследование, получали стандартную медикаментозную терапию, которая у пациентов основной группы ($n=5$) была дополнена клеточной терапией, включавшей введение аллогенных гепатоцитов и МСК. Медиана количества гепатоцитов и МСК, введенных пациентам, составила 114,3 [51,0; 200,0] $\times 10^6$ и 141,8 [32,9;172,7] $\times 10^6$ клеток, соответственно. Изменение базовых биохимических показателей и показателей коагуляционного звена системы гемостаза, характеризующих

синтетическую и метаболическую функцию печени, оценивали у пациентов до начала терапии (0 сутки) и на 7 сутки терапии.

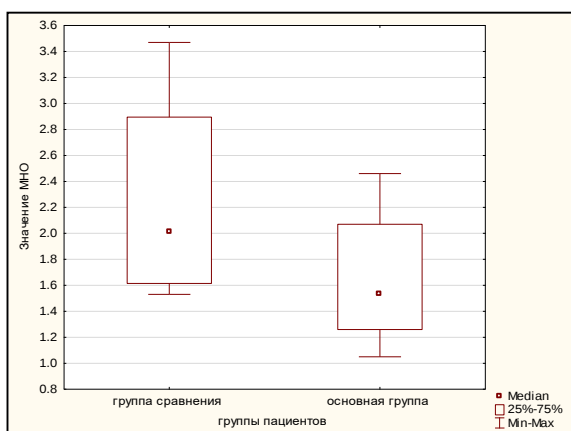
У пациентов основной группы на 7 сутки терапии было выявлено статистически значимое снижение показателя концентрации билирубина по сравнению с аналогичным показателем до начала терапии ($p=0,040$), что свидетельствовало об улучшении метаболической функции печени после проведения клеточной терапии. В группе сравнения анализируемые показатели на 7 сутки терапии по своим значениям не отличились аналогичных показателей до начала лечения (таблица 2).

Таблица 2. – Лабораторные показатели пациентов с ХПН до начала терапии и на 7 день терапии

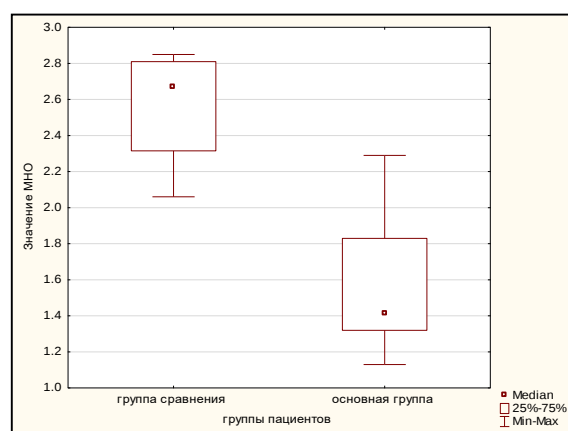
Показатель	Основная группа (n=5)		p (критерий Вилкоксона)
	до начала терапии	7 день терапии	
Билирубин, мкмоль/л	130,5 [29,2; 521,0]	99,3 [24,9; 464,3]	0,040*
Альбумин, г/л	24,9 [17,5; 36,0]	29,1 [24,7; 34,0]	0,465
МНО	1,53 [1,05; 2,46]	1,41 [1,13; 2,29]	0,225
Показатель	Группа сравнения (n=4)		p (критерий Вилкоксона)
	до начала терапии	7 день терапии	
Билирубин, мкмоль/л	275,3 [44,7; 582,2]	296,4 [29,0; 532,3]	0,715
Альбумин, г/л	25,3 [22,5; 28,3]	24,4 [16,8; 31,2]	1,000
МНО	2,01 [1,53; 3,47]	2,67 [2,06; 2,85]	0,617

Примечание – *статистически значимые различия лабораторных показателей ($p < 0,05$)

При сравнении исследуемых групп между собой на 7 день терапии в группе пациентов, которым проводилась клеточная терапия, регистрировались более низкие значения показателя МНО по сравнению с аналогичным показателем у пациентов группы сравнения (1,41 [1,13; 2,29] и 2,67 [2,06; 2,85], соответственно) ($p=0,037$, Mann-Whitney U-Test) (рисунок 7).



Значение МНО у пациентов до терапии



Значение МНО у пациентов после терапии

Рисунок 6. – Изменение показателя коагуляционного гемостаза МНО у пациентов с ХПН в ходе терапии

Снижение уровня МНО у пациентов основной группы отражает улучшения синтеза витамин К-зависимого комплекса факторов свертывания, что свидетельствует об улучшении синтетической функции печени в целом на фоне клеточной терапии. Статистически значимых отличий по концентрации альбумина в плазме крови у пациентов основной группы и группы сравнения исходно и на 7 сутки терапии выявлено не было ($p=1,000$ и $p=0,312$, соответственно; Mann-Whitney U-Test), что, по-видимому, связано с получаемой стандартной терапией, включающей трансфузию раствора альбумина у этой категории пациентов.

При анализе эффективности использования клеточной терапии в комплексной терапии пациентов с терминальной стадией ХПН в основной группе на 28 сутки терапии отмечалось статистически значимое снижение балла MELD, включающего оценку синтетической и метаболической функций печени, ($p=0,02$; Mann-Whitney U-test).

Таким образом, использование клеточной терапии гепатоцитами и МСК в комплексном лечении пациентов с терминальной ХПН способствует улучшению синтетической и метаболической функции печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Использование предварительной перфузии органа на этапе, предшествующем изоляции гепатоцитов, позволяет получить морфологически и иммунофенотипически более однородную популяцию клеток. После проведения перфузии в основной группе по сравнению с группой контроля соответственно увеличивалось количество CD90⁺клеток (79,5 [30,4; 94,8]% и 0,1 [0,1; 8,6]%, $p=0,01$), а также клеток, экспрессирующих внутриклеточный маркер Cytokeratin (97,3 [92,4;98,8]% и 70,2 [67,2;73,9]%, $p=0,0002$). Также уменьшалась содержание HLA-DR⁺клеток (0,1 [0;2,2]% и 40,7 [3,3;78,5]%, $p=0,01$), CD45⁺клеток (63,9 [8,4; 67,6]% и 0,1 [0; 1,9]%, $p=0,01$) и CD 68⁺ (0,35 [0,10;0,60]% и 5,55 [3,8;6,2]%, $p=0,001$) (Mann-Whitney U-test), что связано с удалением в ходе перфузии примеси ФЭК и других неадгезивных клеток [3, 4].

2. Сокращение сроков пребывания МСК на шаге 2 ДП с 14 на 7 суток не оказывает влияния на морфологические, иммунофенотипические и функциональные характеристики получаемых гепатоцитоподобных клеток. Не было установлено статистически значимых различий в концентрациях ни одного из исследованных секретируемых белков печени (HGF – $p=0,71$; ANGPTL4 – $p=0,47$; AFP – $p=0,75$; FGF-21 – $p=0,77$; FABP1 – $p=1,00$, критерий Вилкоксона) в супернатантах образцов клеток, находившихся на шаге 2 ДП 7 суток, по сравнению с образцами клеток, находившимися на шаге 2 ДП 14 суток. Культивирование клеток на шаге 2 ДП более 7 дней также не приводило к увеличению количества мРНК ALB и AFP [2–4, 6].

3. Культивирование изолированных гепатоцитов из печени на подложках из

МСК и дифференцированных в гепатогенном направлении МСК обеспечивает сохранение их жизнеспособности и функциональной активности в течение 10 суток. При использовании подложки из МСК регистрировались более высокие уровни продукции гепатоцитами ANGPTL4 (14,28 [7,71;71,33] нг/мл) и 3,86 [2,00;24,40] нг/мл), соответственно, $p=0,003$) и HGF (0,36 [0,23;0,94] нг/мл) и 0,23 [0,14;0,34] нг/мл), соответственно, $p=0,0048$) по сравнению с аналогичными показателями в монокультуре гепатоцитов. При использовании для культивирования гепатоцитов в качестве подложки дифференцированных в гепатогенном направлении МСК по сравнению с вариантом подложки из МСК установлены значимые отличия лишь в концентрации ANGPTL4 (3072 [2160;3568] нг/мл и 1456,75 [805;1833] нг/мл, $p=0,003$, соответственно). Статистически значимых изменений в концентрации HGF ($p=0,060$), AFP ($p=0,083$), FGF-21 ($p=0,76$) и FABP1 ($p=1,000$) в указанных группах не выявлено [2, 3, 6].

4. Использование клеточной терапии гепатоцитами и МСК в комплексном лечении пациентов с терминальной ХПН способствует улучшению базовых биохимических показателей и показателей коагуляционного звена системы гемостаза, характеризующих синтетическую и метаболическую функцию печени. На 7 сутки после проведения клеточной терапии у пациентов данной группы по сравнению с аналогичным показателем до начала терапии наблюдали снижение концентрации билирубина в плазме крови (99,3 [24,9; 464,3] и 130,5 [29,2; 521,0], соответственно, $p=0,040$). Также в этой группе пациентов регистрировались более низкие значения показателя МНО по сравнению с аналогичным показателем у пациентов группы стандартной терапии (1,41 [1,13; 2,29] и 2,67 [2,06; 2,85], соответственно) ($p=0,037$). На 28 сутки после клеточной терапии у пациентов данной группы по сравнению с группой пациентов, получавших стандартную терапию, отмечалось статистически значимое снижение балла MELD, включающего оценку синтетической и метаболической функций печени ($p=0,02$; Mann-Whitney U-test) [1, 4, 5, 7].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Для получения наибольшего количества гепатоцитов в пересчете на 1 г обработанной ткани целесообразно использовать фрагменты печени весом от 50 до 500 г (лабораторный протокол получения клеточных трансплантатов на основе гепатоцитов ГУ «МНПЦ ХТиГ» от 03.08.2018г.). При подготовке донорской печени к изоляции клеток следует осуществлять перфузию органа консервирующими растворами НТК и UW, что обеспечивает получение более однородной и менее иммуногенной популяции гепатоцитов (акт о внедрении метода выделения гепатоцитов из печени человека в лаборатории клеточных биотехнологий ГУ «МНПЦ ХТиГ» от 03.08.2018г.).

2. При дифференцировке МСК в гепатогенном направлении рекомендуется сокращение продолжительности шага 2 общепринятого протокола с 14 дней до 7 дней, что обеспечивает уменьшение времени получения клеточного продукта на их

основе и удешевление процедуры дифференцировки за счет снижения расхода дорогостоящих ростовых факторов на 30–40% (акт о внедрении метода направленной дифференцировки МСК в гепатогенном направлении в лаборатории клеточных биотехнологий ГУ «МНПЦ ХТиГ» от 03.09.2018г.; акт о внедрении в образовательный процесс кафедры иммунологии и экологической эпидемиологии ГУО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белгосуниверситета» метода направленной дифференцировки МСК в гепатогенном направлении от 03.09.2018г).

3. Для повышения жизнеспособности и сохранения функциональной активности при культивировании *in vitro* изолированных из печени гепатоцитов целесообразно использовать в качестве подложки МСК и гепатоцитоподобные клетки (акт о внедрении в образовательный процесс кафедры иммунологии и экологической эпидемиологии ГУО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белгосуниверситета» метода получения ко-трансплантата на основе гепатоцитов и МСК от 07.09.2018г).

4. Для улучшения результатов лечения пациентов с некоррегируемой стандартными методами терминальной стадии ХПН целесообразно включение в комплексную терапию клеточной терапии аллогенными гепатоцитами. Для снижения иммуногенности аллогенных гепатоцитов при проведении клеточной терапии рекомендуется использовать совместное введение гепатоцитов и МСК (акт о внедрении метода получения ко-трансплантата на основе гепатоцитов и МСК в лаборатории клеточных биотехнологий ГУ «МНПЦ ХТиГ» от 31.08.2018г.).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах

1. Причины бактериального инфицирования у доноров печени и почек / Л. В. Кирковский, К. М. Романчук, А. Е. Щерба, О. О. Руммо, А. А. Коритко (Сыманович), С. В. Спиридонов // Военная медицина. – 2016. – № 2. – С. 44–48.

2. Роль гепатоцитарного фактора роста в регенерации и патогенезе осложнений после трансплантации печени / А. А. Коритко (Сыманович), Д. Ю. Ефимов, С. В. Коротков, С. И. Кривенко, А. Е. Щерба, О. О. Руммо // Наука и инновации. – 2016. – № 8. – С. 40–42.

3. Роль мезенхимальных стволовых клеток в поддержании жизнеспособности и функциональной активности культуры гепатоцитов *in vitro* / А. А. Коритко (Сыманович), С. И. Кривенко, А. Е. Щерба, Е. А. Примакова, А. А. Гомон, Е. Г. Петровская, Н. И. Дедюля, Е. С. Бузук // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2017. – № 1. – С. 7–14.

4. Ко-трансплантаты на основе гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток: характеристика, клиническое применение и первичная оценка эффективности подхода / А. А. Сыманович, Е. А. Примакова, А. А. Гомон, Н. И. Дедюля, Е. Г.

Петровская, Е. С. Бузук, В. В. Смольникова, А. Е. Щерба, С. И. Кривенко // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. – 2018. – № 2. – С. 79–87.

Материалы конференций, съездов, конгрессов, тезисы докладов

1. Ко-трансплантация гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток для поддержания функции печени у пациентов с острой и терминальной стадией хронической печеночной недостаточности / А.А. Коритко (Сыманович), А.Е. Щерба, Д.Ю. Ефимов, С.В. Коротков, С.И. Кривенко // Актуальные вопросы клинической хирургии. От аппендэктомии до трансплантации: материалы междунар. научн.-практ. конф., Шимкент, Туркестан, 7–9 дек. 2016 г. – [Опубл. в журн.] Вестн. МКТУ им. Х. А. Ясави. – 2016 г. – №4. – С. 192–194.

2. Гепатоцитарный фактор роста и осложнения после трансплантации печени / А.А. Коритко (Сыманович), Кривенко С.И., Ефимов Д.Ю., Коротков С.В., Щерба А.Е., Руммо О.О. // Актуальные вопросы клинической хирургии. От аппендэктомии до трансплантации: материалы междунар. научн.-практ. конф., Шимкент, Туркестан, 7–9 дек. 2016 г. – [Опубл. в журн.] Вестн. МКТУ им. Х. А. Ясави. – 2016 г. – №4. – С. 195–197.

3. Коритко (Сыманович), А. А. Влияние инфузии аллогенных гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток на функцию печени у пациентов с печеночной недостаточностью / А. А. Коритко (Сыманович), А. Е. Щерба, С. И. Кривенко // Третий Российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация и донорство органов» : материалы конгр. : тез. докл., Москва, 2–4 окт. 2017 г. / Нац. мед. исслед. центр трансплантологии и искусств. органов им. акад. В. И. Шумакова ; под ред. С. В. Готье. – М., 2017. – [Опубл. в журн.] Вестн. трансплантологии и искусств. органов. – Прил. – С. 208.

РЭЗІЮМЭ

СЫМАНОВІЧ Ала Аляксандраўна

Атрыманне і характарыстыка біямедыцынскіх клеткавых прадуктаў на аснове гепатацытаў і дыферэнцыраваных у гепатагенным кірунку мезенхімальных ствалавых клетак

Ключавыя словы: гепатацыты, мезенхімальныя ствалавыя клеткі, гепатацытападобныя клеткі, перфузія, падложкі, , клеткавая тэрапія.

Мэта даследавання: распрацаваць навукова-абгрунтаваны алгарытм атрымання тэрапеўтычна эфектыўных і бяспечных біямедыцынскіх клеткавых прадуктаў (БМКП) для лячэння пацыентаў з тэрмінальнай стадыяй хранічнай пячоначнай недастатковасці (ХПН).

Метады даследавання і выкарыстаная апаратура: культуральны, мікраскапічны, імунаферментны, статыстычны, ПЦР ў рэальным часе; інвертаваны мікраскоп (Nikon, Японія), мікраскоп Axio Imager (Carl Zeiss, Германія), аналізатар Luminex 200 (Luminex, ЗША), праточны цытафлюарыметр FACSCanto (Becton Dickinson, ЗША), ампліфікатар CFX96 (Bio-Rad, ЗША).

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Паказана, што папярэдняя перфузія донарскай печані кансервавальнымі растворамі «Кустадзіёл» (НТК) і University of Wisconsin (UW) зніжае марфалагічную гетэрагеннасць вылучаемай папуляцыі гепатацытаў. Устаноўлена, што скарачэнне працягласці кроку 2 агульнапрынятага пратаколу дыферэнцыявання МСК у гепатагенным кірунку з 14 да 7 сутак дазваляе атрымаць БМКП з морфа-функцыянальнымі ўласцівасцямі гепатацытападобных клетак. Даказана эфектыўнасць прымянення МСК і гепатацытападобных клетак у якасці падложкі пры культываванні ізаляваных гепатацытаў для падтрымання іх жыццяздольнасці і функцыянальных уласцівасцяў. Ўпершыню паказана, што сумесная перасадка гепатацытаў і МСК пацыентам з тэрмінальнай стадыяй ХПН спрыяе паляпшэнню метабалічнай і сінтэтычнай функцыі печані.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: для вылучэння больш гамагеннай папуляцыі гепатацытаў ажыццяўляць перфузію печані кансервавальнымі растворамі НТК і UW. Пры дыферэнцыяванні МСК у гепатагенным кірунку рэкамендуецца скарачэнне працягласці кроку 2 агульнапрынятага пратаколу з 14 да 7 дзён. Пры культываванні *in vitro* гепатацытаў варта выкарыстоўваць у якасці падложкі МСК і гепатацытападобныя клеткі. Для паляпшэння метабалічнай і сінтэтычнай функцыі печані ў пацыентаў з ХПН мэтазгодна ўключэнне ў комплексную тэрапію клеткавай тэрапіі гепатацытамі і МСК.

Вобласць ужывання: клеткавыя тэхналогіі, рэгенератыўная медыцына.

РЕЗЮМЕ**СЫМАНОВИЧ Алла Александровна****Получение и характеристика биомедицинских клеточных продуктов на основе гепатоцитов и дифференцированных в гепатогенном направлении мезенхимальных стволовых клеток**

Ключевые слова: гепатоциты, мезенхимальные стволовые клетки, гепатоцитоподобные клетки, перфузия, подложка, клеточная терапия.

Цель исследования: разработать научно-обоснованный алгоритм получения терапевтически эффективных и безопасных биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для лечения пациентов с терминальной стадией хронической печеночной недостаточности (ХПН).

Методы исследования и использованная аппаратура: культуральный, микроскопический, иммуноферментный, статистический, ПЦР в реальном времени; инвертированный микроскоп (Nikon, Япония), микроскоп Axio Imager (Carl Zeiss, Германия), анализатор Luminex 200 (Luminex, США), проточный цитофлюориметр FACSCanto (Becton Dickinson, США), амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США).

Полученные результаты и их новизна: Показано, что предварительная перфузия донорской печени консервирующими растворами «Кустодиол» (НТК) и University of Wisconsin (UW) снижает морфологическую гетерогенность выделяемой популяции гепатоцитов. Установлено, что сокращение продолжительности шага 2 общепринятого протокола дифференцировки МСК в гепатогенном направлении с 14 до 7 суток позволяет получить БМКП с морфо-функциональными свойствами гепатоцитоподобных клеток. Доказана эффективность применения МСК и гепатоцитоподобных клеток в качестве подложки при культивировании изолированных гепатоцитов для поддержания их жизнеспособности и функциональных свойств. Впервые показано, что совместная пересадка гепатоцитов и МСК пациентам с терминальной стадией ХПН способствует улучшению метаболической и синтетической функции печени.

Рекомендации по использованию: для выделения более гомогенной популяции гепатоцитов осуществлять перфузию печени консервирующими растворами НТК и UW. При дифференцировке МСК в гепатогенном направлении рекомендуется сокращение продолжительности шага 2 общепринятого протокола с 14 до 7 дней. При культивировании *in vitro* гепатоцитов следует использовать в качестве подложки МСК и гепатоцитоподобные клетки. Для улучшения метаболической и синтетической функции печени у пациентов с ХПН целесообразно включение в комплексную терапию клеточной терапии гепатоцитами и МСК.

Область применения: клеточные технологии, регенеративная медицина.

SUMMARY

SYMANOVICH Alla Aleksandrovna

Receiving and characterizing biomedical cell products based on hepatocytes and differentiated in the hepatogenic direction mesenchymal stem cells

Key words: hepatocytes, mesenchymal stem cells, hepatocyte-like cells, perfusion, scaffolds, cell therapy.

Objective of the study: to develop a scientifically-based algorithm for obtaining therapeutically effective and safe biomedical cell products (BMCP) for treating patients with end-stage chronic liver failure (HLF).

Methods of the study and equipment used: cultural, microscopic, enzyme immunoassay, statistical, real-time PCR; inverted microscope (Nikon, Japan), Axio Imager microscope (Carl Zeiss, Germany), multiplex analyzer Luminex 200 (Luminex, USA), flow cytometer FACSCanto (Becton Dickinson, USA), amplicator CFX96 (Bio-Rad, USA).

Obtained results and their novelty: pre-perfusion of donor liver with preservative solutions Custodiol (HTK) and the University of Wisconsin (UW) has been shown to reduce the morphological heterogeneity of the isolated hepatocyte population. It has been established that reducing the duration of step 2 of the generally accepted protocol for differentiation of MSCs in the hepatogenic direction from 14 to 7 days allows obtaining BMCP with the morphological and functional properties of hepatocyte-like cells. The efficiency of using MSCs and hepatocyte-like cells as a scaffold has been proven when cultivating isolated hepatocytes to maintain their viability and functional properties. For the first time, it has been shown that co-transplantation of hepatocytes and MSCs in patients with end-stage HLF to improve of the metabolic and synthetic functions of the liver.

Recommendations for the use: use liver perfusion with HTK and UW preservative solutions to isolate a more homogeneous hepatocyte population. When differentiating MSCs in the hepatogenic direction, it is recommended to reduce the duration of step 2 of the generally accepted protocol from 14 to 7 days. When cultivating of hepatocytes *in vitro*, MSCs and hepatocyte-like cells should be used as a scaffold. It is advisable to include in the complex treatment of cell therapy hepatocytes and MSCs to improve the metabolic and synthetic functions of the liver in patients with HLF.

Field of implementation: cellular technologies, regenerative medicine.