

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA  
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Facultatea Medicină nr.1

Catedra Anatomie topografică și Chirurgie operatorie

# **Particularitățile de angiogeneză în ciroză hepatică**

TEZĂ DE DIPLOMĂ

Conducător științific:

Viorel Nacu,  
D.h.m., profesor universitar

Autor:

Colomîcenco Irina,  
studentă, anul VI, grupa 1642

Chișinău, 2014

## Содержание

Введение	5
ГЛАВА I. АКТУАЛЬНОСТЬ В ЛЕЧЕНИИ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ	9
1.1. Цирроз печени	9
1.2. Методы стимуляции ангиогенеза при циррозе печени	14
1.3. Трансплантация печени	16
1.4. Стволовые клетки	18
1.5. Генная терапия	21
1.6. Трансплантация генетически модифицированных фибробластов	23
1.6.1 Трансплантация генетически модифицированных гепатоцитов	23
1.6.2 Генетически модифицированные гемопоэтические стволовые клетки	24
1.7. Клеточная терапия	24
1.8. Тканевая инженерия	26
1.9. Биореакторы	33
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Влияние CD34 и ЭФРС на ангиогенез в печени	38
2.2. Стимуляция ангиогенеза ангиостатином	39
2.3. Внутripеченочная васкуляризация	39
2.4. Генная терапия фактором роста гепатоцитов	40
ГЛАВА III: РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	45
3.1. Влияние CD34 и ЭФРС на ангиогенез в печени	45
3.2. Стимуляция ангиогенеза ангиостатином	46
3.3. Генная терапия фактором роста гепатоцитов	49

Выводы	54
Библиография	55
Declarație	59

## **АББРЕВИАТУРЫ:**

**BrdU** - (англ. Bromodeoxyuridine), Бромдезоксисуридин

**CD 31** - гликопротеин, мембранный белок

**CD 34** - маркер эндотелиальных клеток

**HVC** - вирусный гепатит С

**HBV** - вирусный гепатит В

**HGF** - фактор роста гепатоцитов

**HIF** - 1 $\alpha$  - гипоксия-индуцируемого фактора 1-альфа

**MTT** - (3-(4, 5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl 2-H-tetraliumbromide; C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S<sub>2</sub>)

**PBS** - (англ. Phosphate buffered saline, PBS) Натрий-фосфатный буфер

**БИП** - биоинженерная печень

**ВКМ** - внеклеточный матрикс

**МСК** - мезенхимальные стволовые клетки

**ОПН** - острая печеночная недостаточность

**ОТП** - ортотопическая трансплантация печени

**СК** - стволовые клетки

**ЭСК** - эмбриональные стволовые клетки

**ЭФРС** - эндотелиальный фактор роста сосудов

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Жизнь организма невозможна без пополнения его тканей энергией, «строительным материалом» для роста и развития, восстановления тканей (как отмерших, так и поврежденных), а также витаминами, минеральными веществами и водой. Оно осуществляется за счет пищи. Процессы, обеспечивающие физическую и химическое изменение пищи с последующим всасыванием питательных веществ в кровь и лимфу называют пищеварением. Фактически пищеварение осуществляет высвобождение питательных веществ из продуктов питания и их утилизацию.

Печень – самая крупная железа организма. Она выполняет ряд жизненно важных функций, в том числе и как пищеварительная железа. Нарушение структуры печени вследствие действия различных факторов может привести к развитию таких распространенных на сегодняшний день опасных заболеваний как цирроз печени, гепатит и других, которые в конечном счёте могут привести к смерти. Поэтому актуальным является исследование структурно-функциональных особенностей данного органа с помощью современных методов с целью скорейшего выявления и предотвращения дальнейшего развития патологических изменений [31,32].

Современная патология обладает мощным арсеналом диагностических средств и методов, которые позволяют выявить различные аспекты функции печени в условиях нормы и при заболеваниях гепатобилиарной системы. Широкое применение в клинической практике пункционной биопсии печени и использования современных морфологических методов диагностики (гистологических, морфометрических, электронно-микроскопических, иммуногистохимических, цитобиохимических) даёт возможность с высокой точностью определить характер и особенности патологических изменений всех компонентов органа – гепатоцитов, соединительнотканной стромы, системы

микроциркуляции. При этом возникает необходимость клинической интерпретации и обобщения значительного объема результатов высокоинформативных биохимических, иммуноферментных, инструментальных и морфологических методов с целью назначения эффективного лечения, которое бы учитывало все аспекты этиологии, патогенеза и клинико-лабораторных особенностей течения заболевания.

Глобализация и миграция привели к всемирному распространению вирусного гепатита и это заболевание стало проблемой всего мира [26]. Доклад Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) гласит: причиной 2,5% от общей смертности населения являются заболевания печени, а к 2030 г. они займут 14 место в списке самых распространенных причин смерти [14, 15]. В Великобритании печеночная патология стоит на 5 месте по причинам смертности и продолжает увеличиваться [26].

Для хронической печеночной патологии характерно воспаление и фиброз. В последствии ангиогенез, приводящий к образованию новых сосудов имеет важное прогностическое значение в прогрессировании заболеваний [4].

Ангиогенез играет важную роль в хроническом воспалении. Накопление воспалительного инфильтрата и развития фиброза повышает устойчивость тканей к кровяному потоку и доставке кислорода, в результате гипоксии. Согласно этим обстоятельствам происходит так, что ангиогенез приводит к регулированию проангиогенных факторов, ответственных за ремоделирование сосудов и сосудообразование [4, 24].

Для ангиогенеза печени характерны синусоидные капилляры. Такие заболевания печени, как хронический гепатит В (HBV) или С (HVC), неалкогольный стеатозный гепатит или аутоиммунный гепатит, способствуют прогрессированию цирроза. Позже они могут привести к развитию гепатоцеллюлярной карциномы. Понимание процесса ангиогенеза может способствовать эффективной терапевтической цели в обратном развитии

воспаления и предотвращении прогрессирования хронической печеночной патологии [4].

Процесс ангиогенеза в хронических заболеваниях печени начинается с развития фиброза, состоящего из внеклеточного матрикса, что приводит к гипоксии, которая действует как сигнал к новообразованию сосудов. Результаты исследований показали, что развитие кровеносных сосудов чаще встречается у пациентов с инфекцией HCV чем у пациентов с HBV, и контрольной группой. Информация касательно ангиогенеза при других хронических патологиях очень ограничена. Ангиогенез и точный молекулярный механизм хронического вирусного гепатита остается неизученным до конца. Было показано что при инфекции HBV и HVC, в ответ на развитие кровеносных сосудов, имеет место выработка оксида азота, вызывая вазодилатацию. Возможно активирование цитотоксических Т-клеток может урегулировать выработку молекул сосудистой адгезии, которые усиливают ангиогенез. Yoshiji H и др. изучая модель четырёххлористого углерода, стимулирующую фиброз печени, показали, что ЭФРС значительно стимулирует пролиферацию звёздчатых клеток печени и эндотелиальных клеток капиллярных синусоидов, которые являются предпосылкой к развитию фиброза печени [4].

### **Цель исследования**

Целью исследования служит поиск и анализ актуальной информации об особенностях ангиогенеза при циррозе печени для описания нового видения подходов к терапии цирроза печени.

## **Задачи исследования**

1. Анализ последних данных об ангиогенезе.
2. Анализ последних данных о методах лечения хронических заболеваний печени.
3. Описание особенностей ангиогенеза при циррозе печени.

## **Теоретическое и научное значение полученных результатов**

Полученные результаты имеют теоретическое и практическое значение в использовании их для получения широкой картины актуальных методов лечения цирроза печени в развитых странах. Учитывая новейшие данные включённые в актуальный труд, полученные результаты можно использовать в качестве ориентира для выбора терапевтической или хирургической тактики в лечении цирроза печени. Ориентируясь на полученные результаты можно получить вектор для выбора дальнейших научных разработок и определение будущих нерешённых задач в лечении цирроза печени.

## ГЛАВА I. АКТУАЛЬНОСТЬ В ЛЕЧЕНИИ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

### 1.1. Определение цирроза печени

Термин «цирроз печени» объединяет группу хронических заболеваний, при которых наблюдается сочетание прогрессирующего поражения паренхимы и интерстиция (стромы) печени с дистрофией печёночных клеток, очаговой регенерацией и преобладанием диффузного разрастания соединительной ткани, обуславливающим перестройку паренхимы печени, ее сосудистой системы с недостаточностью функций печени.

От цирроза следует отграничивать фиброз печени, при котором наблюдается только разрастание соединительной ткани в результате преимущественно локальных процессов (очагов некроза, абсцессов, инфильтратов, гранулем, гумм и др.). Этиология цирроза печени разнообразна и во многом аналогична этиологии хронического гепатита [4, 32].

Большое значение в развитии цирроза печени имеет вирусный гепатит, причем исход его в цирроз печени совершается не только через стадию хронического гепатита. Иногда наблюдается непосредственное развитие цирроза на фоне затяжных и рецидивирующих форм вирусного гепатита.

К развитию цирроза могут привести и другие факторы: воздействие токсических веществ, в частности четыреххлористого углерода, тринитротолуола, ряда нерационально принимаемых лекарственных средств (сульфаниламидных препаратов, солей золота и др.); хронические воспалительные заболевания желчных протоков, особенно внутripеченочных (через стадию хронического холангиогепатита), заболевания, приводящие к застою желчи (желчнокаменная болезнь, реже дискинезия); алиментарная недостаточность (частичное белковое голодание, дефицит в пище витаминов, особенно цианокобаламина, пиридоксина, токоферола), а также эндогенная

витаминовая и белковая недостаточность, наблюдаемая при энтерите и энтероколите.

Особое значение в развитии цирроза имеет алкоголь (алкогольный цирроз). Употребление алкоголя, и особенно его суррогатов, создает условия для развития белковой и витаминной недостаточности; одновременно алкоголь усугубляет действие гепатотропных токсических веществ, создает относительную и абсолютную недостаточность липотропных веществ, подготавливая условия, усиливающие воздействие на печень вируса. Наконец, сам алкоголь обладает гепатотоксическим действием.

Патогенез цирроза печени тесно связан с его этиологией, что накладывает особый отпечаток и на характер морфологических изменений в печени.

Механизм развития заболевания во многом аналогичен таковому при хроническом гепатите. В настоящее время большое значение придают аутоиммунным факторам. В результате действия патогенного фактора возникают очаги некроза, в которых наряду с процессами регенерации частично происходит разрастание соединительной ткани. Так как при этом неизбежно поражаются сосуды и нарушается структура сосудистого русла печени, развивается тканевая гипоксия, способствующая дальнейшему разрастанию соединительной ткани. Отдельные очаги некроза, ведущие к образованию вначале локализованного процесса (фиброза), в дальнейшем, в силу нарушения кровоснабжения печени, приводят к диффузному поражению и к циррозу [4, 32].

Разрастание соединительной ткани происходит в основном в трёх направлениях: вокруг разветвлений воротной вены внутри печени, что характерно для портального цирроза; в очагах некроза в дольках печени, что свойственно преимущественно постнекротическому циррозу, и, наконец, при длительном существовании воспалительного процесса во внутриспечёчных желчных протоках (холангит, холангиолит) процесс через стадию

перихолангиолита распространяется и на печень, что преимущественно свойственно одному из основных видов биллиарного цирроза – холестатическому (перихолангиолитическому).

При нарушении обменных процессов сопутствующие им дистрофические изменения также могут явиться исходным фоном для медленного развития цирроза печени.

При структурных изменениях в паренхиме печени (постнекротический цирроз) нарушаются многообразные функции этого органа, что другим формам цирроза свойственно меньше. При биллиарном, холангиолитическом циррозе существенно нарушается пигментный (желчный) обмен, а при портальном – относительно рано развиваются синдром портальной гипертензии и асцит. В последнем случае происходит развитие окольного (коллатерального) кровообращения, и часть крови, минуя печень, попадает в общий круг кровообращения, вследствие чего ряд поступивших из кишок токсических веществ не обезвреживается. Поэтому в некоторых случаях портального цирроза отмечается интоксикация без резко выраженной недостаточности печени. Разрастание соединительной ткани, в частности врастание соединительнотканых перегородок в паренхиму печени, сопровождается образованием анастомозов между разветвлениями воротной вены и печеночной артерии, иногда между веточками воротной и печеночных вен. Подобные сосудистые шунты также способствуют переходу крови из системы воротной вены в общий кровоток, минуя печень, что приводит к нарушению ее питания и интоксикации.

В результате нарушения многочисленных функций печени при циррозе отмечаются изменения белковых показателей (гипопротеинемия, гипоальбуминемия, гипергаммаглобулинемия), в крови резко снижается уровень протромбина, изменяются уровень холестерина и характер

гликемической кривой после нагрузки глюкозой, существенно нарушается антитоксическая (синтетическая) функция и др.

В патогенезе заболевания ведущее значение имеют две группы явлений: недостаточность печени и связанная с этим гепатаргия, а также синдром портальной гипертензии.

Выделяют три последовательные стадии цирроза: начальную, стадию сформировавшегося цирроза и конечную – дистрофическую.

Постнекротический цирроз характеризуется неравномерным разрастанием соединительной ткани в очагах некроза, вследствие чего печень в начале заболевания несколько увеличенная, имеет бугристую поверхность. Развитие постнекротического цирроза происходит циклически, соответственно рецидивирующему ценообразованию при хроническом процессе после перенесенного вирусного гепатита. Возможно и подострое развитие постнекротического цирроза на фоне тяжелого течения вирусного гепатита (узелковая гиперплазия Маршана).

Микроскопически в печени видны узлы (регенераты) и сохранившаяся между ними неизменная ткань печени, очаги некроза, дистрофически измененные клетки и между узлами различной величины – спавшиеся очаги подвергающейся коллагенизации стромы. На месте некротических участков наблюдается интенсивное разрастание соединительной ткани. Всегда выявляется и воспалительная реакция.

При портальном циррозе печень уменьшена (вначале может быть увеличена), поверхность ее мелкозернистая. В далеко зашедшей стадии печень резко сморщивается и масса ее может уменьшиться до 900 г.

Для этого вида цирроза характерно разрастание соединительной ткани преимущественно вокруг внутripеченочных разветвлений воротной вены. При этом резко деформируются долики печени, образуются псевдодольки; в

межузловой строме увеличивается количество ложных желчных канальцев. Одной из особенностей развития соединительной ткани является образование перегородок, фрагментирующих дольки печени и соединяющих центры их с желчными протоками.

В сформированной и конечной стадиях развивается портальная гипертензия вследствие внутрипеченочного портального блока, при котором препятствие для оттока крови из системы воротной вены локализуется в ее внутрипеченочных разветвлениях. В результате развиваются коллатерали с варикозным расширением вен пищевода, желудка, прямокишечных вен, асцит и др.

Билиарный (холестатический) цирроз развивается на почве длительно существующего холангита, а также при длительном застое желчи. В результате холестаза печень увеличена, часто зеленого цвета, поверхность ее длительно остается гладкой и сморщивается только в конечной стадии. Соединительная ткань разрастается в виде обширных тяжей вдоль междольковых проточков и внутридольковых желчных канальцев при относительно небольшой узелковой регенерации. В морфологической картине отчетливы признаки нарушения выделения желчи: расширенные и переполненные желчью капилляры и протоки, нередко местами разрывающиеся и образующие «желчные озера». Воспалительный процесс локализуется по ходу околодольковых и внутридольковых желчных протоков, и лимфатических сосудов. В дальнейшем разрастается соединительная ткань с «рассеканием» печеночной дольки на отдельные островки, появляются узлы регенерации. Наконец, встречается и смешанный цирроз, включающий морфологические особенности двух, реже – трех типов [32].

## 1.2. Методы стимуляции ангиогенеза при циррозе печени

Исходя из полученной информации из научных источников следует, что ангиогенез как биологический процесс стимулируется различными факторами *in vivo*, и методами как *in vivo*, так и *in vitro*.

В настоящее время трансплантация печени является наиболее эффективным методом лечения терминальной стадии печеночных заболеваний. Поэтому тканевая инженерия печени, основанная на клеточной трансплантации, которая объединяет материи, имитирующие печеночную ткань, находится в процессе исследования, с целью восстановления нормальных функций печени [29, 31].

Особенностью сосудистой сети печени, нехарактерной для других тканей, является наличие синусоидных капилляров, которые выстланы эндотелиальными клетками, обладающими особыми сообщениями (фенестрации), а также отростчатыми и звездчатыми клетками. Синусоидные капилляры обладают способностью синтезировать специфические печеночные факторы, такие как ангиопоэтин-подобный белок-3. Ангиогенез при печеночной патологии зависит от тех же основных принципов активации, пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, как и при других патологиях с расширением кровеносных сосудов [4, 18].

Гипоксия и воспаления, два основных фактора стимуляции ангиогенеза. Гипоксия активирует ангиогенез, как следствие сигнала опосредованного гипоксии – индуцируемых факторов транскрипции. Воспаление увеличивает проницаемость сосудов и способствует хемокин-опосредованной организации моноцитов, тромбоцитов, макрофагов, тучных клеток и факторов роста. Благодаря гипоксии ухудшается гидроксилирование гипоксия-индуцируемого фактора 1-альфа (HIF-1alpha) и следовательно снижается его последующая деградация протеасомами. В результате HIF-1alpha накапливается в цитозоле, облегчая тем самым его взаимодействие с бета субъединицами и транслокацию

в ядро, с последующей модуляцией экспрессии многих ангиогенез-стимулирующих генов, которые содержат гипоксия-ответственные элементы (ГОЭ) [4, 18, 24].

Организация эндотелиальных клеток способствует расширению сосудов, которое ослабляет межэндотелиальные контакты и утечку компонентов плазмы из уже существующих сосудов. Это явление делает возможным экстарвазацию белков плазмы, которые вместе с компонентами внеклеточного матрикса способствуют закладке временной основы для миграции эндотелиальных клеток. Оксид азота, свойства которого были хорошо изучены, является основным фактором, ответственным за расширение сосудов [4]. ЭФРС увеличивает проницаемость сосудов. Базальная мембрана (в основном коллаген IV типа и ламинин) и внеклеточный матрикс (коллаген I типа и эластин) уменьшаются для последующей миграции и пролиферации эндотелиальных клеток. Этот процесс происходит за счет специфичных протеиназ, включая активатор плазминогена. Протеолиз внеклеточного матрикса приводит к высвобождению встроенных факторов внеклеточного матрикса, которые способствуют миграции и пролиферации эндотелиальных клеток.

Пролиферация эндотелиальных клеток происходит в ответ на факторы роста которые секретируются сами по себе или окружающими клетками (звездчатыми клетками печени, лейкоцитами, гепатоцитами и клетками Купффера). Наиболее известным является ЭФРС, представляющий собой многофункциональный белок, который связывается с двумя рецепторами тирокиназы, рецептор I и рецептор II ЭФРС. ЭФРС, включающие индуцируемые факторы гипоксии, играют решающую роль практически во всех патологических состояниях, в которых имеет место ангиогенез. В настоящее время изучается возможность терапевтических методов, направленных на блокировку механизма действия данного фактора.

Стимулировать пролиферацию эндотелиальных клеток могут и другие факторы роста, например, кислотный и щелочной факторы роста фибробластов, фактор роста гепатоцитов и преобразующий фактор роста. Организованная пролиферация эндотелиальных клеток приводит к образованию полости. Образуется структурированная однородная трёхмерная сосудистая сеть, организация которой, регулируется механизмами сигнальных путей, для формирования базальной мембраны и компонентов внеклеточного матрикса, а также миграцией и дифференцировкой клеток. Созревание новых сосудов, нуждается в восполнении набора перицитов, формировании новой базальной мембраны и внеклеточного матрикса для обеспечения структурной стабилизации сосудов [18].

### **1.3. Трансплантация печени**

Трансплантация печени (пересадка печени) – единственный радикальный метод лечения больных с необратимым, прогрессирующим поражением печени, когда другие альтернативные методы лечения отсутствуют. Пациенты, нуждающиеся в трансплантации печени, и их близкие должны осознавать сложность операции, быть готовыми к длительной реабилитации в послеоперационном периоде и к пожизненному приёму иммуносупрессивной терапии.

Трансплантация печени – сложнейший метод лечения, который не начинается с операции и не заканчивается ею. Пациенты пожизненно находятся под наблюдением врачей, периодически проходят обследования. Большинство пациентов после пересадки печени ведут активную жизнь, приступают к прежней работе, рожают детей и занимаются спортом.

Трансплантация печени в настоящее время является методом выбора при конечных стадиях цирроза печени различной этиологии, а также ряде

врожденных нарушений метаболизма и опухолях печени. Первая трансплантация печени была выполнена в 1963 году американским хирургом Т.Старзлом в г. Денвере. С тех пор в мире выполнено сотни тысяч трансплантаций печени, потребность в этой операции составляет 10-20 на 1 млн населения. Только в США существует более 200 центров трансплантации печени, при этом ежегодно выполняется более 5000 операций, т.е. 1/3 от ежегодной потребности США в трансплантации печени, таким образом, средняя нагрузка на 1 центр трансплантации составляет 25 операций в год. Пионером отечественной трансплантации печени является Александр Константинович Ерамишанцев, выполнивший эту операцию в РНЦХ 14 февраля 1990 года.

Виды операций:

- трансплантация частей печени – уменьшенной или разделённой печени (каждая из долей донорского органа пересаживается разным реципиентам, т.н. сплит-трансплантация)
- трансплантация печени от живого родственного донора, когда кровный родственник больного отдаёт ему часть своей печени
- ортотопическая трансплантация печени – пересадка донорской печени на место удалённой печени реципиента
- гетеротопическая трансплантация добавочной печени – в этом случае донорская ткань печени пересаживается реципиенту и при этом сохраняется его собственная печень.

После выполнения трансплантации печени пациент обычно проводит около 5-10 дней в отделении реанимации и в среднем через 20-30 дней при благоприятном течении послеоперационного периода выписывается из стационара. Начиная с первого дня после трансплантации, пациент пожизненно начинает принимать специальные препараты – иммуносупрессоры – для

предотвращения отторжения донорского органа. Каждые две недели пациенты посещают трансплантационный центр – сдают анализы, выполняют УЗИ брюшной полости [2].

Если у пациента благоприятные жизненные показатели, трансплантация печени является единственным доступным и обычно успешным методом лечения. Однако количество трансплантаций печени ограничено из-за недостатка донорских органов [22].

"Когда мы пытаемся лечить печеночную недостаточность, главная проблема заключается в поиске печени для трансплантации", говорит профессор Яков Барух, Director of the Liver Unit at Rambam Healthcare Campus. "Хотя мы можем использовать живого донора для трансплантации, потому что одной доли печени достаточно, но операция сложная и связана с осложнениями как для донора так и для реципиента."

Например, после резекции 70% от объема печени у крыс, печень регенерирует в течение одной недели, а печень человека регенерирует в течение двух месяцев. Одним из преимуществ имплантации клеток в печень, перед целым трансплантом, является возможностью продолжения восстановления больной печени, подкрепляемое здоровыми клетками [11].

В результате роста заболеваемости болезнью печени, многие пациенты умирают, находясь в листе ожидания трансплантации до того как появится донорский орган. Достижением огромного прогресса стало видоизменение человеческих стволовых клеток в гепатоциты и использование их в тканевой инженерии печени [26].

#### **1.4. Лечение стволовыми клетками**

Стволовые клетки печени вырабатывают б-клеточный маркер, кератин -19, кератин-7 и участвуют в выработке гематопоэтическими клетками некоторых

маркеров, таких как Thy-1, CD34 (кластер дифференцировки) и антиген-1 стволовых клеток. Кроме того, клетки поджелудочной железы могут конвертировать в гепатоциты. Взрослые стволовые клетки, такие как мезенхимальные стволовые клетки (МСК), как правило дают начало многим видам мезодермальных тканей, как костная, хрящевая, гладкомышечная и жировая. Как было недавно исследовано, эти клетки могут не только дифференцироваться в печеночные клональные клетки, но также функционально облегчить химическое индуцирование фиброза печени, показывая потенциал использования в печеночной терапии. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) являются частью внепеченочного составляющего. Благодаря плюрипотентной способности стволовые клетки, полученные из ЭСК, могут стать потенциальным будущим источником гепатоцитов. *In vitro* под определенными химическими условиями они могут дифференцироваться в функциональные гепатоцито-подобные клетки. Некоторые молекулы могут активироваться благодаря активации активин А-рецептора, а также Wnt (сигнальные пути) способами: активин А, факторы роста фибробластов (bFGF, aFGF, FGF10), костные морфогенетические белки (КМБ2, КМБ4), ретиноевая кислота, фактор роста гепатоцитов (ФРГ), эпидермальный фактор роста, дексаметазон, инсулин-трансферрин-селен, онкостатин М, диметилсульфоксид, бутират натрия и т.д. Тканевая инженерия требует три важных компонента: клетки, “каркас” и факторы роста [29, 31].

По данным Forbes et al установлено, что стволовые клетки крови, происходящие из костного мозга, могут дифференцироваться в гепатоциты и клетки эпителия желчных протоков. Ученые из компании Stem Cells California Inc. сообщили, что им удалось получить зрелые клетки печени из тщательно очищенных стволовых клеток крови мыши. В этом исследовании впервые было продемонстрировано восстановление функций печени после лечения стволовыми клетками крови. Открытие, что стволовые клетки крови могут

давать начало зрелым клеткам печени (гепатоцитам), открывает путь к использованию стволовых клеток крови для замещения или восстановления поврежденной в результате болезней или травм ткани у пациентов с заболеваниями печени. Способность СК крови взрослых людей дифференцироваться в клетки печени важна по нескольким причинам. Во-первых, это может обеспечить относительно доступный источник СК для клеточной терапии печени. Во-вторых, это дает возможность решить проблему отторжения ткани после трансплантации путем использования клеток, из которых развивается как система кроветворения, так и печень. В-третьих, это даёт путь к лучшему пониманию свойств СК крови и возможности управлять ими для лечения различных болезней. Наконец, если окажется, что циркулирующие в крови СК, происходящие из костного мозга, могут дифференцироваться в различные типы клеток, они могут быть более мультипотентными, чем думали раньше. Ученые из Stem Cells разработали новый метод выявления в культуре той популяции человеческих СК крови, которая дает начало и клеткам желчных протоков, и гепатоцитам.

По результатам новых исследований, проведенных в Johns Hopkins Kimmel Cancer Center (Baltimore, MD), СК костного мозга при контакте с поврежденной тканью печени могут быстро превращаться в здоровые клетки печени и способствовать восстановлению поврежденного органа. Ученые обнаружили, что в культуре мышечной ткани в присутствии клеток из поврежденной печени превращение СК в гепатоциты происходит всего за семь часов. Слияния клеток обнаружено не было, и это указывает на то, что причиной превращения были сигналы, передающиеся уже существующими клетками печени через микроокружение. Также было показано, что трансплантация СК мышам с поврежденной печенью помогала восстановить функцию печени в течение двух-семи дней. Эта технология дифференцировки стволовых клеток в конечном итоге может найти применение в лечении таких хронических

болезней, как диабет, цирроз печени, болезни сердца и рак. Однако до того как методы терапии СК можно будет проверять на людях, должно быть выполнено еще много исследований.

Ученые из Imperial College and Hammersmith Hospital (London, UK) считают, что инъекции пациентам их собственных СК прямо в кровоток смогут улучшить функции печени, поскольку из СК образуются новые клетки печени. В ноябре 2004 года ученые из этого учреждения искали пациентов с хронической печёночной недостаточностью для участия в клинических испытаниях. Каждый пациент должен был в течение двух месяцев 13 раз посетить больницу для различных процедур, в том числе рентгеновского обследования и лейкофореза – процедуры, во время которой у пациента берут кровь и разделяют ее на составные части. Выделяют белые кровяные клетки и из них отбирают СК. Эритроциты затем возвращают в кровоток, а СК вводят в печеночную артерию, снабжающую кровью печень [1].

### **1.5. Генная терапия цирроза печени**

В последние годы всё чаще появляются экспериментальные работы, посвященные эффективности генной терапии фиброза и цирроза печени. Большой интерес представляет фактор роста гепатоцитов (HGF). Он оказывает антифибротическое действие за счет ингибирования фрагментации ДНК и апоптоза клеток печени, подавления активности трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) и ослабления экспрессии генов коллагена  $1\alpha 1$  (Coll  $1\alpha 1$ ), фибронектина, ингибитора активатора плазминогена 1-го типа, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го типа (TIMP-1), участвует в регенерации печёночной ткани. Одной из задач генной терапии заболеваний человека является поиск эффективных и безопасных способов доставки генетического материала в клетки [12, 28]

1-5 ЭФРС является важным проангиогенным фактором, выступающим как связующее звено между ангиогенезом, иммунной тканью и ремоделируемой тканью. Экспрессия ЭФРС при ангиогенезе усиливается. CD 34, который является маркером эндотелиальных клеток не выражен нормальными эндотелиальными клетками, тем не менее когда эндотелиальные клетки изменяют свой фенотип, они способны продуцировать CD34 [4].

Трансплантация гепатоцитов также предлагается в качестве метода генной терапии множества врождённых болезней печени, причем могут быть использованы как свежеполученные, так и генетически модифицированные гепатоциты. Цель генной терапии печени – ввести в гепатоциты правильно работающие гены и добиться их экспрессии, а также выживания в организме пациента этих генетически модифицированных гепатоцитов. Идеал – коррекция дефекта в 100% клеток, но, в зависимости от болезни, и более низкий уровень может оказаться достаточным. Печень является превосходным органом-мишенью для переноса генов по следующим причинам:

- Печень является главным органом биосинтеза, ответственным за продукцию нескольких белков, которые выделяются в кровотоки
- Печень является единственным внутренним органом (за исключением костного мозга), который может самостоятельно регенерировать после повреждения или частичного удаления [5, 9, 11].

Цели генной терапии печени:

- Лечение специфических болезней печени
- Угнетение иммунной реакции реципиента против трансплантированной печени/гепатоцитов.

## **1.6. Трансплантация генетически модифицированных фибробластов**

Из данных профильной литературы, в частности, по данным Serpen et al - была выполнена работа на крысах линии Gunn (модель врожденной гипербилирубинемии (синдром Криглера-Найяра)), у которых имеется дефект в ферменте печени билирубин-UDP-глюкуронозилтрансферазе (bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (B-UDP)), ведущий к высокому содержанию билирубина в сыворотке крови. Трансплантация этим крысам фибробластов, экспрессирующих B-UDP, приводила к падению сывороточного билирубина до нормального уровня. Осложнением этой процедуры было развитие опухолей у экспериментальных животных после трансплантации [1].

### **1.6.1. Трансплантация генетически модифицированных гепатоцитов**

Генетически модифицированные гепатоциты могут быть трансплантированы в различные местоположения, например, в селезенку или в брюшную полость. Трансплантация гепатоцитов в селезенку может восстановить 1-5% массы гепатоцитов реципиента и может быть адекватным методом, если для лечения болезни требуется небольшое количество белков.

Гепатоциты могут трансплантироваться не в печень, а в другие органы, например, в легкие, особенно если у пациента портальная гипертензия. Поводом для рассмотрения возможности использования такого метода генной терапии может быть гиперхолестеролемиа, которая может привести к изменениям в воротной вене. Методом лечения таких пациентов могут быть повторные трансплантации генетически модифицированных ex vivo гепатоцитов, но состояние их портальной гемодинамики требует тщательной оценки во избежание серьезных осложнений.

### **1.6.2. Генетически модифицированные гемопоэтические стволовые клетки**

Выращивание в культуре эмбриональной печени – новый и привлекательный подход к получению *ex vivo* большого количества гемопоэтических стволовых клеток и клеток печени. Генная терапия с использованием аутологичных гемопоэтических стволовых клеток и клеток печени представляет альтернативный трансплантации печени подход при лечении генетических и метаболических болезней. Экспрессия переданного через вирусный вектор гена зеленого флуоресцирующего белка возрастает при долговременной культуре в различных условиях печеночных и гемопоэтических СК. Таким образом, культура эмбриональной печени – привлекательный источник клеток-предшественников печени и возможный шаг к получению нетуморогенных иммортализованных гепатоцитов, которые могут быть использованы для трансплантации [1].

### **1.7. Клеточная терапия**

В настоящее время среди доступных методов лечения печеночной недостаточности наиболее эффективным является ортопическая трансплантация печени. Трансплантация функциональных клеток, включая гепатоциты, печеночные клональные стволовые клетки или клетки-предшественники, может предложить альтернативный метод клеточной терапии - ортопической трансплантации печени, для лечения печеночной недостаточности и наследственных болезней печени. Было опубликовано множество работ о использовании первичных гепатоцитов в тканевой инженерии. Первичные гепатоциты обычно получают методом двойной или тройной коллагеназной обработки печени. Однако, их использование ограничено, из-за нехватки количества гепатоцитов, которых можно выделить и культивировать. Это зрелые клетки с короткими теломерами.

Дополнительными источниками гепатоцитов может быть фетальная печень на 12-16 дне эмбриогенеза. Она содержит два типа печеночных клеток: фетальные стволовые клетки и клетки-предшественники печени (гепатобласты), которые Delta-Like 1 Homolog (Dlk1) позитивны и негативны к антиген-1 дифференцированным тимоцитам, соответственно [1, 29, 31].

По данным Петренко, Оченашко - в Институте проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков) оценивали эффективность действия клеток печени разного происхождения и степени зрелости в условиях алло- и ксенотрансплантации крысам с экспериментальным циррозом. Полученные данные свидетельствуют, что течение экспериментально вызванного  $CCl_4$ -индуцированного цирроза облегчается и приобретает обратимый характер в результате введения в селезенку суспензий криоконсервированных клеток печени. При этом максимальный и долгосрочный эффект достигается при введении алло- и ксеногенных клеток фетальной печени, что, возможно, отражает реализацию их пролиферативно-дифференцировочного потенциала.

По данным Пирогова и др. - в городских больницах Челябинска для стимуляции регенерации при хронических гепатитах и циррозах печени пациентам в дополнение к стандартному лечению проводили трансплантацию фетальных тканей - ТФТ (суспензия фетальной ткани печени, надпочечников, тимуса, селезенки). Осложнений после ТФТ не наблюдали; стабильная ремиссия при хроническом гепатите достигнута у вдвое большей доли пациентов, чем в контрольной группе, при циррозе – у втрое большей. Прослежены отдаленные результаты лечения (более 3 лет) [1].

По данным Сообщества Трансплантации Органов за январь 2011г., лист ожидания донорской печени превысил 16000 человек. Трансплантация гепатоцитов в какой-то степени решает проблемы нехватки донорских органов [9].

К тому же, гепатоциты обладают превосходной регенеративной способностью, что делает трансплантацию клеток важным терапевтическим методом для пациентов с метаболическими дефектами или острой печеночной недостаточностью, по мере того как собственная печень сохраняется, а дисфункция разрешается регенерацией. Dr. Joerg-Matthias Pollok, заведующий лабораторией тканевой инженерии и клеточной трансплантации, Департамента гепатобилиарной и трансплантационной хирургии в Медицинском центре университета в Гамбурге, Германия объясняет: "В настоящее время в трансплантологии используются отдельные клетки печени, но они претерпевают изменения в процессе их выделения и криоконсервации, что является одной из причин достижения успеха использования данной процедуры трансплантации. Ученые выделили клетки из 12 образцов печени человека с жизнеспособностью 82%. После двухдневного периода культивирования клетки печени сгруппировались в плотные скопления, так называемые сфероиды, похожие на клетки печени. Эти клетки распределили по всей трехмерной пористой структуре полимерного "каркаса". Со второго по четвертый день среднее число сфероидов увеличилось с 18 до 41 в поле зрения. "Наша экспериментальная модель представляет собой подающую надежду технику культивирования и подготовки клеток человеческой печени для их трансплантации на биоразлагаемый полимерный "каркас", считает Dr. Pollok. "Ведутся дальнейшие исследования для подтверждения наших результатов и возможно, в будущем, мы сможем предложить жизнеспособный клинический вариант трансплантации клеток печени." [9].

## **1.8. Тканевая инженерия**

Биоинженерную печень, сходную по строению и свойствам с природным органом, еще предстоит создать, однако активные работы в этом направлении уже ведутся. Как сообщают новые исследовательские данные, ученые добились

успеха в выращивании клеток печени, на основе рассасывающихся “каркасов” из материалов, подобных хирургическому шовному материалу. Исследователи полагают, что эту ткань можно использовать как донорский материал при трансплантации печени или в то время, пока пациент с острой печеночной недостаточностью ждет донорский орган [9].

Так, в октябре 2010г. американскими исследователями из Института регенеративной медицины при медицинском центре Университета Вейк-Форест (Бостон, штат Массачусетс) был разработан биоинженерный органоид печени, выращенный на основе биокаркаса из натурального ВКМ (внеклеточный матрикс) из культур клеток-предшественников печени и эндотелиальных клеток человека. Биокаркас печени с сохраненной после децеллюляризации системой кровеносных сосудов был заселен популяциями клеток-предшественников и эндотелиальных клеток через воротную вену. После инкубации биокаркаса в течение недели в специальном биореакторе при непрерывной циркуляции питательной среды было отмечено формирование печеночной ткани с фенотипом и метаболическими характеристиками печени человека.

Тканевая инженерия использует биосовместимые каркасы, которые обеспечивают оптимальную среду для роста и дифференцирования клеток, с целью создания конструкции, которая найдет применение либо *in vitro* либо *in vivo* [10]. Тканевая инженерия печени главным образом связана с экстракорпоральным развитием, устройства поддерживающие печень в естественных условия (*in vivo*) регенерации с помощью трансплантации стволовых клеток или имплантируемых устройств [3].

Последние тенденции в этой области включают в себя создание микротканевых структур, в частности, подготавливая клетки с использованием нанотехнологий [23].

Тканевая инженерия направлена на имитацию связей между клетками с помощью специального “каркаса”. Специфические материалы, или матрица служит в качестве основы, и обеспечивает трёхмерную среду для пролиферации и взаимодействия клеток. Кроме того, “каркас” через эти связи действует на созревание и функции клеток. В культурах клональных печеночных клеток была продемонстрирована регуляция пролиферации клеток и их специфическая функция, с использованием биосовместимых синтетических биоразлагаемых биопроизводных матриц, материалов покрытых белковой оболочкой, нановолокон с модифицированной поверхностью и бесклеточная биоматрица. Более того, наблюдался положительный эффект в потоке биореактора или системы сокультивирования жизнеспособности и функции клеток, благодаря добавлению факторов роста. Вдобавок была разработана животная модель системы выращивания стволовых клеток, клеток-предшественников печени и первичных гепатоцитов для трансплантации. Она производит клональные клетки печени, которые являются функциональными и показывают длительный срок пролиферации, с последующей трансплантацией. Основным недостатком клеток на основе трансплантационной матрицы является высокая начальная потеря и дисфункция клеток, что может быть связано с отсутствием кровотока и изменениями в питательных веществах [29, 31].

Подобно скелету, каркас обеспечивает биомеханическую поддержку клеток до их превращения в функциональную ткань. Разработка и создание этих каркасов является одним из научных направлений, в которые вовлечены ученые биомедицинской инженерии, пытаясь создать эти каркасы на основе природных и клеточно-чистых материалов [11].

Биодеградируемые матриксы создают каркасы для тканевой регенерации и трансплантации клеток, постепенно разрушаясь со временем. В настоящее время наиболее широко распространенными и используемыми в тканевой

инженерии биodeградируемыми полимерами являются полимолочная кислота (полилактат), поли-L-молочная кислота (поли-L-лактат), полигликолевая кислота, полиангидриды, полифумараты, полиортоэферы, поликарболактоны и поликарбонаты. В тканевой инженерии печени гидроксиполикислоты показали себя как отличный материал для создания трехмерных каркасов, которые при добавлении соответствующих факторов роста способствуют ускорению созревания гепатобластов плода в зрелые гепатоциты. Недостатком поликислот является их химическая нестойкость и гидрофобность. Дegrадация полигидроксикислот происходит в результате гидролиза и приводит к образованию побочных продуктов, которые могут вызвать воспалительную реакцию. Данный недостаток может быть преодолен химической модификацией полимера, встраиванием белков и включением в состав биоинженерного матрикса специальных биоактивных доменов, стимулирующих прикрепление и миграцию клеток и способствующих заживлению ткани [8,19].

Известно, что культивируемые клетки чувствительны к физическим параметрам субстрата, на котором они растут. Следовательно, при создании каркасов, оптимальных для клеточного развития, необходимо контролировать такие характеристики каркасов, как их внутренняя поверхность, механические свойства, наличие пустот и т.д. Пористые и губчатые каркасы обладают тем преимуществом, что позволяют контролировать их пористость и число межпоровых каналов, что важно учитывать при культивировании клеток печени. Например, гепатоциты линии HepG2, выращиваемые в губчатых полистиреновых матриксах, показали гораздо лучшую выживаемость и функциональность, чем клетки монослойных культур [17].

Эксперименты по разработке биокаркасов печени из синтетических материалов имеют крайне широкие перспективы для дальнейшего развития ввиду практически неограниченных возможностей в получении новых

искусственных полимеров и модификации уже имеющихся, а также манипуляции характеристиками и химической структурой данных материалов. Большой перспективой в данном направлении обладает разработка каркасов на основе синтетических биополимеров с вкраплениями составных компонентов из натуральных полимеров и структурных элементов ВКМ, что позволяет приблизить свойства и строение биоинженерного матрикса к характеристикам и структуре нативного ВКМ печени [6].

Лечение крыс с гепатэктомией с помощью тканевой инженерии печени улучшает функцию печени и увеличивает выживаемость; средняя продолжительность жизни крыс увеличилась с 16 до 72 часов. Эти результаты показывают, что топографические свойства нановолокон повышают дифференциацию стволовых клональных печёночных клеток из МСК, и поддерживают функцию долгосрочной культуры, которая важна для клеточной терапии. С помощью таких клеток и нановолокон можно достичь 4-х недельного срока выживаемости мышей. Из результатов исследования *in vivo* видно, что „каркас” содействует с производными стволовыми клетками гепатоцитов и делает возможной жизнеспособность клеток в течении, по крайней мере, 2 недель. В течении этого времени инженированная ткань может укрепиться и анастомозировать с главной кровеносной сетью. Объединение непаренхимальных типов клеток (эндотелиальных, звездчатых и холангиоцитов) с гепатоцитами имеет решающее значение для формирования структур печени и может расширить срок эффективности вспомогательных механизмов печени до 7 дней. В частности, МСК не только стабилизируют первичные клеточные функции в биомедицинских механизмах, но и обеспечивают иммуномодулирующий компонент терапии, непосредственно влияющий на системное воспаление и повреждение тканей. Этот компонент к тому же поддерживает идею вспомогательных печеночных механизмов о совместном культивировании МСК и гепатоцитов как потенциальную терапию при острой печеночной недостаточности.

Благодаря превосходным исследованиям стволовых клеток, инженерии биоматериалов и нанобиотехнологии, коллективные результаты обещают дальнейшую революцию регенерирующей медицины печени. Однако прогресс ограничивается отсутствием понимания конкретных молекулярных механизмов в микросреде, которые влияют на печёночные клональные клетки и сигнальные пути, регулирующие эффективную дифференциацию из стволовых клеток и формирование взрослых тканей. На основе продолжающегося изучения биоматериалов для каркасов и стволовых клеток, стало возможным комбинирование бесклеточной матрицы с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками для тканевой инженерии, клеточной терапии и регенеративной медицины. В заключении, можно сделать вывод что система имитирования печеночной ткани в сочетании с генной инженерией имеет большой потенциал для распространения и поддержания зрелых функций для будущих персонализированных подходов к трансплантации [29, 31].

В сотрудничестве с профессором Smadar Cohen из Университета Ben Gurion в Негеве, Beer Sheva, был рассмотрен каркас трёхмерной конструкции «альгинат» (вещества извлекались из бурых водорослей). В основу непосредственно и под строжайшим контролем были включены мельчайшие капсулы (3 микрона - 3 тысячи миллиметра - в диаметре) релизинг-фактор роста фибробластов – основной фактор роста. Оказалось, что непрерывное высвобождение фактора роста привело к образованию зрелых кровеносных капилляров в самой ткани каркаса, тем самым стимулируя жизнеспособность и функционирование имплантированной ткани.

Определение правильного баланса между структурой и функцией по-прежнему является проблемой для ученых. Возможность регулировать взаимодействие клеток с окружающей их средой, используя каркас, состоящий

из способствующих росту наноматериалов, может стать преимуществом в тканевой инженерии.

По словам профессора Баруха, рассматривается введение печеночных клеток в селезенке, что позволяет им достичь печень через кровоток. Основной риск для клеток, которые попали в кровоток это воздействие на них давления, которое разрывает их на части. Полимеры создают специальную структуру в виде «клетки», которая защищает от давления и атак клеток иммунной системы. Еще одно преимущество полимеров связано с тем, что они состоят из биологического материала, который разрушается после завершения своей миссии. Существует возможность контролировать скорость разрушения полимера, воздействуя на его состав.

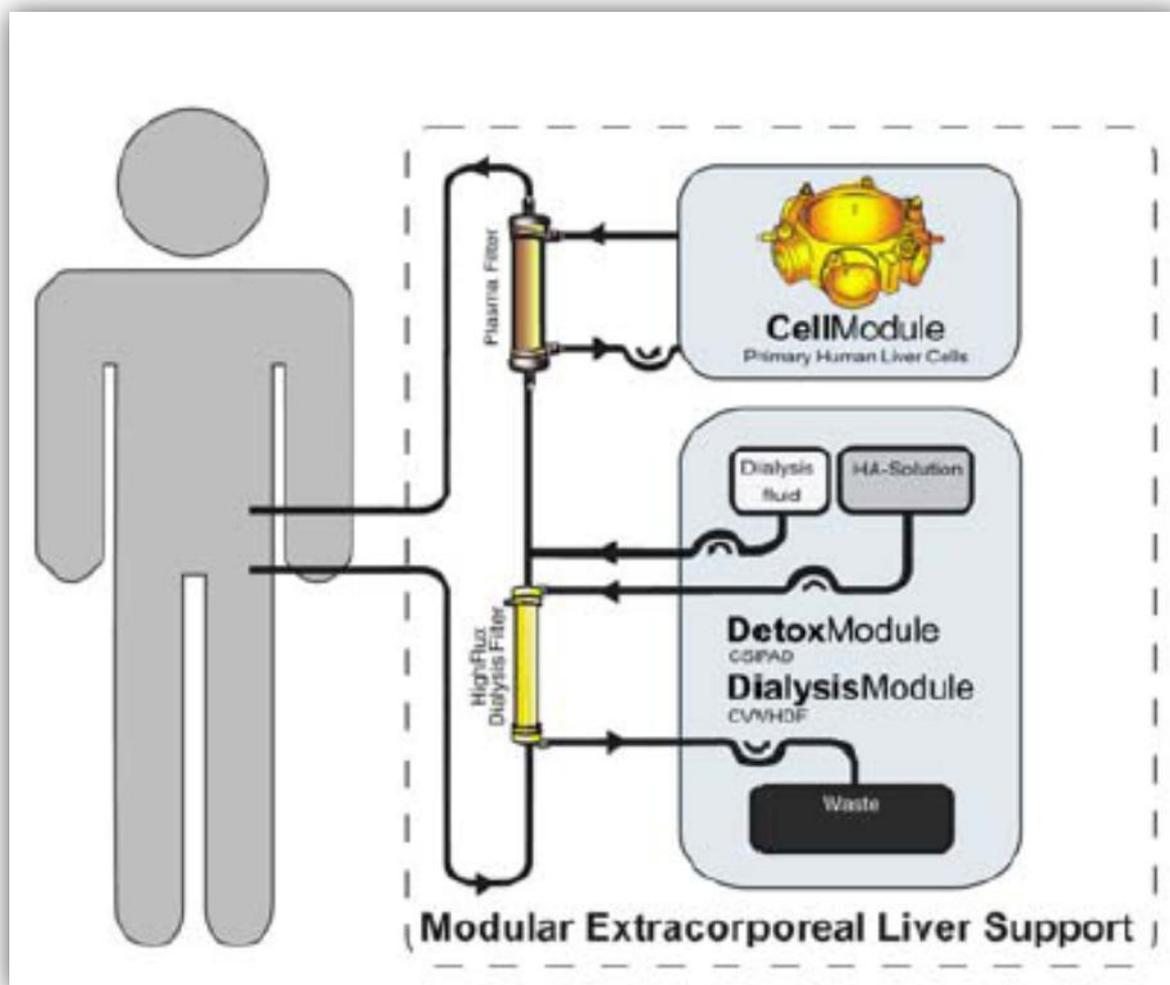
Научные исследования доктора Dr. Dror Seliktar Инженерного департамента медико-биологических наук, Техниона, затрагивают тканевую инженерию регенеративную медицину, и особо выделяют биоматериалы и биомеханику. Доктор Seliktar разработал трёхмерный каркас на основе гидрогеля. Это жидкий гель, который объединяет эти два свойства важны для биологической каркасов - структура и функции, путем объединения двух компонентов в одной части. Материал успешно исследовали на примере гладкомышечных клеток, клеток хрящевой ткани и кардиомиоцитов. Имплантируемые клетки вводятся в жидком геле, и время полимеризации (конверсии жидкого вещества в виде вязкого полимера) управляемо. Жидкость вводят в определенную полость внутри печени с последующей локальной полимеризацией с помощью УФ-света, подобно образованию твердой пломбы [11].

## 1.9 Биореакторы

Экстракорпоральные механизмы лишь временно поддерживают функции печени, время ожидания донорского органа. Ранее усилия по разработке искусственных или небιологических механизмов использовали механический метод удаления токсичных соединений, который не обеспечивал значительные улучшения в жизни пациента. Биологические поддерживающие механизмы (биоинженерная печень) состоят из клеточного компонента, гепатоцитов, в сочетании с биореактором для повышения производительности клеток (Рис.1.8). Биореакторы специально предназначены для обеспечения оптимальных условий для производительности клеток и должны обеспечивать безопасность пациентов. Считается что, в результате различной биохимической активности гепатоцитов, механизм биоинженерной печени (БИП) гораздо более эффективен чем небιологические механизмы, обеспечивающие синтетические и биохимические функции [20, 21]. Другие способы с частями печени свиньи находятся в стадии разработки (HEPANOPE). Считается, что для эффективности клинической терапии, БИП должна быть в состоянии обеспечить по крайней мере 10% от общей функции печени, что требует около 1010 гепатоцитов. Одной из основных проблем является приобретение такого огромного числа человеческих гепатоцитов, так как большинство этих клеток были ранее выделены ткани, непригодной для трансплантации [7]. В отличие культуры *in vitro*, условия механизма БИП очень сложны. Гепатоциты будут присоединены к плазме (или фракции плазмы), которая имеет различные физико-химические свойства и плохую кислородную растворимость по сравнению с средним значением.

Для выращивания гепатоцитов и гепатоцитоподобных клеток в биореакторах используется полиуретановая пена, в порах которой гепатоциты формируют многоклеточные сфероиды. Полиуретановая пена была предложена для использования в качестве поддерживающего каркаса для гепатоцитов в

аппаратах биоискусственной печени. Недавно была показана эффективность использования каркасов из полиуретановой пены для превращения ЭСК мышцы в функциональные гепатоциты [16].



**Рисунок 1.9.1** Схема Модульной Экстракорпоральной Поддержки функции Печени, оснащённая клеточным модулем биореактора, а также, модулем детоксикации для удаления токсинов путём диализа концентрированного раствора человеческого альбумина и почечного диализа [30].

Исследования показали, что гепатоциты не показали хороших результатов в культивируемой плазме [25]. В виду того что, гепатоциты имеют высокую скорость поглощения кислорода и очень чувствительны к его концентрации,

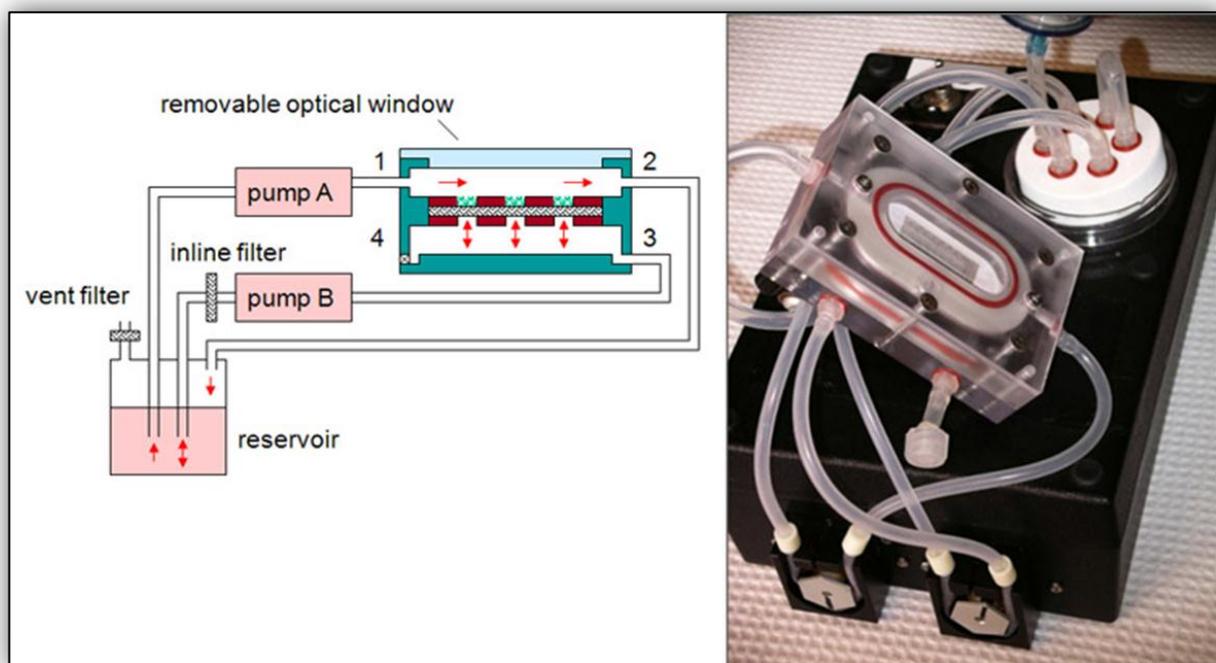
одной из главных проблем в механизме БИП является обеспечение тесно упакованных гепатоцитов достаточным количеством кислорода. Еще одной важной задачей является давление, с которым сталкиваются гепатоциты в механизме БИП, зависящее от проектирования самого механизма. Любой сдвиг давления свыше  $5 \text{ дин/см}^2$  может повлиять на функцию гепатоцитов [7].

Было предложено несколько биореакторов для динамического посева клеток в „каркасы”, толщиной несколько мм. Путем посева хондроцитов и фибробластов в пористые „каркасы” биореакторов, определили, что эффективность выше, чем в статическом биореакторе. Другие биореакторы использовать конвекцию, вызванную прямой перфузией клеток печени через „каркас”, обусловленный градиентом давления или под действием центробежных сил. Независимо от типа клеток, прямая перфузия из пор „каркаса” позволяет посев концентрированных суспензий и даёт более высокую эффективность посева, происходит более равномерное распределение клеток по всему „каркасу”, по сравнению с посевом в статических условиях или во вращающихся колбах. Тем не менее, для колонизации долгосрочных „каркасов” требуется высокая плотность начальных клеток. [2, 30].

Подводя итоги, можно сказать что БИП пригодна к медленной перфузии, при условии достаточной оксигенации. Последние методы, использующие модули для оксигенации и компьютерное моделирование функциональной жидкости для культивирования гепатоцитов в механизме БИП, дают большие надежды. Ограниченный объем биореактора является трудностью, потому 1 литр – это максимальное количество крови/плазмы, которое можно безопасно извлечь из гемодинамически неустойчивой печени пациента. Это подвергает сомнению выполнение функции в размере 10% от общей функции печени [27].

Большинство биореакторов, предложенных для тканевой инженерии печени говорит об изобретательности исследователей, работающих в данной

области. Тем не менее, только сейчас предстоит разгадать клеточный ответ к растворимым и иммобилизованным сигналам (Рис. 1.8.2).



**Рисунок 1.9.2** Биореактор со шкалой соединён газопроницаемыми трубками с двумя наружными помпами, которые прогоняют среду для клеточных культур между резервуаром и биореактором. Все составные части находятся внутри двухуглеродистом инкубаторе под контролем температуры и рН [30].

Количественная информация о метаболических реакциях клеток на каждой стадии созревания проверяется. Тип и количество биохимических стимулов должны способствовать формированию тканей *in vitro*. Предстоит сделать много работы в направлении понимания и моделирования явления транспортировки в предполагаемые биореакторы. Таким образом, были специально разработаны биореакторы непрерывного потока, которые должны отвечать условиям *in vitro* и активировать клеточную реорганизацию в 3D, подобных печени „каркасах”. Лечение экстракорпоральными методами основано на этих биореакторах и должно обеспечить необходимые функции

печени у пациентов с ОПН до ОТП или до регенерации их собственной печени.  
[30]

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Влияние CD34 и ЭФРС на ангиогенез в печени

Всего в это исследование были включены 79 пациентов с хронической патологией печени и 21 пациент с гепатоцеллюлярной карциномой, которым сделали биопсию печени. 30 биоптатов нормальной печени, без признаков патологии, были приняты в качестве контроля. Согласие исследовательского комитета института было получено до проведения исследования. История и клиническое обследование полученных данных были взяты из больничных записей. Лабораторные тесты, такие как: печеночные пробы, HBsAg, anti HCV, аутоантитела и клиническое обследование на болезнь Вильсона, были сделаны всем пациентам. В зависимости от полученных данных, все пациенты были разделены на категории по этиологии печеночной патологии. Причины были следующие: 21 чел. – алкогольный цирроз, 29 чел. – HBV, 3 чел. – HCV, 17 чел. – неалкогольная болезнь печени, 5 чел. – аутоиммунная патология и 4 чел. - криптогенная патология. В 21 случае гепатоцеллюлярной карциномы диагноз был поставлен благодаря УЗИ, уровню альфафетопротеина и гистопатологическому подтверждению. Диагностика хронической патологии была проведена при помощи системы Ishak Scoring . Иммуногистохимия была проведена во всех случаях с помощью стандартного авидин-биотин-пероксидазного метода для экспрессии эндотелиальных клеточных маркеров CD 34 и ЭФРС. Моноклональные антитела CD 34 и QB End-10 (Dako Corp.) были использованы в разведении 1:50 и ЭФРС (Santa Cruz) в разведении 1:80. За позитивную окраску приняли все клетки, коричневого цвета, точечной, линейной, полукруглой и круглой формы, четко отделенные друг от друга. Крупные сосуды с толстой мышечной стенкой не были приняты в счет. В случаях хронической алкогольной болезни печени и гепатоцеллюлярной карциномы окрашивали только CD 34. Была проведена количественная оценка

CD 34 и ЭФРС. Статистический анализ с использованием метода  $\chi^2$  для оценки значительной разницы в ангиогенезе на 1 и 2, 3 и 4 стадиях фиброза [4].

## **2.2 Стимуляция ангиогенеза ангиостатином**

Мышам, которым провели 70% частичную гепатэктомию вводили человеческий ангиостатин (100 мг/кг массы тела). Регенерацию печени, вызванную ангиогенезом определили путем оценки внутрипеченочной плотности микрососудов с помощью CD 31 окрашивания замороженных срезов печени. Регенерация оценивалась по уровню концентрации CD 31 и включению BrdU (Бромдезоксинуридина) в ДНК через регулярные промежутки времени после частичной резекции печени. Оценив активность печеночных ферментов (АСАТ, АЛАТ, билирубин, лактатдегидрогеназа), (МТТ) цитотоксичности, выработка аминафенола (метаболическая функция) были изучены непосредственные побочные эффекты.

## **2.3 Внутрипеченочная васкуляризация**

Иммуногистохимическое окрашивание проводили на ацетон-фиксированных 5 мкм криосрезах печеночной ткани. Срезы выдерживают в натрий-фосфатном растворе (PBS), содержащем 1,5% перекись водорода при комнатной температуре в течение 15 минут, чтобы блокировать активности эндогенной пероксидазы. Срезы окрашивали анти-CD 31 mAb (моноклональные антитела) (MEC 13.3; любезно предоставленные доктором Vecchi, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milan, Italy) в течение 60 минут, после чего фиксировали в фосфатно-буферном 3,7% формальдегиде (10 минут). Срезы были инкубированы с лошадиной пероксидазной сывороткой соединённой с кроличьей сывороткой с антикрысиными антителами. После трёхразовой промывки, маркировка визуализировалась с 0,03% раствором 3,3 -

диаминобензидин тетрагидрохлорида (DAB), содержащего 0,1% перекись водорода, в течение 10 минут. Срезы окрашивали 45 секунд гематоксилином Мейера и зафиксировали. (Klinipath BV, The Netherlands). Плотность микрососудов определяли путем анализа минимум четырех независимых микроскопических полей на срезе ткани и, по меньшей мере, двух срезов на остатке печени. Были исключены зоны с большим макрососудистыми структурами (портальные/центральные венулы и печеночные артериолы), подсчитывали только микрососуды. Количество микрососудов, окрашенных CD 31 подсчитывалось двумя независимыми наблюдателями, при увеличении в 250×. Плотность микрососудов была выражена как среднее количество микрососудов в поле зрения высокого разрешения [24].

#### **2.4 Генная терапия фактором роста гепатоцитов**

В задачи настоящей работы входило, во-первых, изучение эффективности генной терапии на примере экспериментальной модели фиброза печени у мышей после введения генетических конструкций, содержащих комплементарную ДНК (кДНК) фактора роста гепатоцитов человека, во-вторых, оценка возможностей метода гидродинамического введения плазмидных конструкций в печень. В последнем случае в хвостовую вену животного вводили большой объем раствора за 4–7 с в зависимости от массы мыши. Точный расчет вводимого объема выполнялся по формуле:  $V(\text{мл}) = 0,057143 \times m_{\text{ср}} + 0,5143$ , где  $m_{\text{ср}}$  – средняя масса животного. Для отработки модели фиброза печени использовали мышей-самцов линии Balbc массой 18–22 г (n=25). Все животные были разбиты на 5 групп: первая (контрольная) – здоровые особи, вторая – мыши, у которых печень и кровь забирали через неделю после начала эксперимента, третья – через 2 нед, четвертая – через 4 нед и пятая – через 6 нед. 30% масляный раствор четыреххлористого углерода (CCl<sub>4</sub>) вводили из расчета 1 мкл/1 г массы тела 1 раз в неделю. Перед

инъекцией каждое животное взвешивали. У всех мышей ткань печени и кровь забирали через неделю после последней инъекции. Далее на основании полученной модели проводили анализ терапевтического воздействия HGF. Вся выборка животных была разбита на две группы: первая (контрольная) группа (n=5) – мыши, которым в хвостовую вену под давлением вводился физиологический раствор, и вторая группа (n=5) – животные, получавшие аналогичным способом плазмидную ДНК, содержащую кДНК HGF человека.

Для анализа содержания мРНК из образцов печеночной ткани выделяли тотальную РНК с помощью набора «RNeasy Mini Kit» – «Qiagen» (США). Качественный и количественный анализ РНК проводили с помощью аналитической системы «Experion» (Automated Electrophoresis Station) и набора реактивов «RNA StdSens Kit» – «BioRad» (США). Для построения кДНК использовали тотальную РНК и набор реактивов «Fermentas» (Латвия). Для изучения экспрессии выбранных генов применялся метод полимеразной цепной реакции в реальном времени – ПЦР-РВ (Real-Time PCR), выполненной на амплификаторе «RotorGene 3000» («Corbett Reaserch», Австралия). Был использован набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I – «Синтол» (Россия). Дизайн праймеров выполняли с использованием программы DNASTAR. Специфичность отжига праймеров проверяли с помощью программы «Blast» ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/)). Праймеры по предоставленным последовательностям были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Россия). В работе использовали следующие последовательности праймеров: HPD-for-mouse (GGC CGC CCC ATC TTC TTA CTA C) и HPD-rev-mouse (CCT GGT GGT TGT GAC GTT GAA TGA) длина ампликона 206; TIMP-1for-mouse (GCA TGG ACA TTT ATT CTC CAC TGT) и TIMP-1-rev-mouse (TCT CTA GGA GCC CGA TCT G) длина продукта 66; aSMA-for-mouse (CAG CGC CTC CAG TTC CT) и aSMA-rev-mouse (AAA AAA AAC CAC GAG TAA CAA ATC AA) длина

продукта 67; Coll1 $\alpha$ 1-for-mouse (GAA ACC CGA GGT ATG CTT GA) и Coll1 $\alpha$ 1-rev-mouse (GAC CAG GAG GAC CAG GAA GT) длина продукта 274; MMP-13-for-mouse (GCT GGT CAG TCG CCC TTT T) и MMP-13-rev-mouse (TAA GGA AAG CAG AGA GGG ATT AAC A) длина продукта 73; TGF $\beta$ 1-for-mouse (TGA GTG GCT GTC TTT TGA CG) и TGF $\beta$ 1-rev-mouse (ACT TCC AAC CCA GGT CCT TC) длина продукта 350; HGF-for-human (CAT GTC AGC GTT GGG ATT CTC AG) и HGF-rev-human (ATT TTT GCC ATT CCC ACG ATA AC) длина продукта 221. Для каждой матрицы кДНК одновременно ставилась ПЦР в 2 пробирках: с геном домашнего хозяйства и одним из исследуемых генов. Для анализа экспрессии гена HGF (hHGF) в составе мышинной кДНК животных использовали ПЦР. После ее окончания ампликоны детектировались с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

Для гистологического анализа ткань печени помещали в 4% раствор формалина на 24 ч. Затем образцы ткани обезживали в спиртах восходящей концентрации (3 смены 96° спирта по 30 мин и 30 мин в 100° спирте). На следующем этапе кусочки печени помещали в 3 смены ксилола по 20 мин. После этого ткань пропитывали в 3 сменах парафина по 1 ч и по окончании работы кусочки заливали расплавленным парафином. Срезы толщиной 6 мкм готовили на микротоме «Місrom». Для изучения общей морфологической картины готовые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а для оценки накопления коллагена использовали краситель пикросириус красный. Перед окраской срезы депарафинировали в ксилоле и проводили по спиртам нисходящей концентрации. Срезы заключали с помощью синтетического средства – «BioOptica» (Италия). Степень повреждения печени после внутрибрюшинного введения CCl<sub>4</sub> оценивали с помощью полуколичественного индекса гистологической активности (ИГА), или системы Кноделя [13].

Степень регрессии фиброза печени на фоне генной терапии определяли методом морфометрии в программе «MetaMorph 7.1» (Molecular Devices).

Для изучения степени выраженности цитолиза клеток печени проводили сравнение активности печеночных ферментов – аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаргатаминотрансферазы (АсАТ) в плазме крови в каждой группе животных на базе клинической лаборатории ФГУ РКНПК Минздравсоцразвития РФ.

Для выбора оптимального способа введения генетического материала в клетки печени сравнивали эффективность трансфекции плазмидной конструкцией рс-DNA3-β-Gal при прямой инъекции и с помощью гидродинамического метода. Многие клетки млекопитающих имеют собственный ген Lac Z, продуцирующий эукариотическую β-галактозидазу. Поскольку она может давать фон, мешающий идентификации маркированных клеток, была выделена группа контрольных животных, которым путем прямого введения в паренхиму печени и методом гидропорации в хвостовую вену вводился физиологический раствор. Проверку функциональной активности плазмиды рс-DNA3-β-Gal выполняли на клетках линии НЕК-293.

Трансфекцию клеток проводили с использованием коммерческого реагента липофектамина – Lipofectamine (Invitrogen, N11668-027) по предложенному протоколу, после чего подсчитывали процентное содержание клеток, экспрессирующих ген β-галактозидазы. Плазмидную ДНК рс-DNA3-β-Gal перед инъекцией в паренхиму органа смешивали с Lipofectamine в соотношении 1:1. Методом гидропорации вводили незащищенную плазмидную ДНК. Работу выполняли на разработанной ранее модели фиброза печени.

В эксперименте участвовали мыши после 4 нед от начала введения CCl<sub>4</sub>, т.е. на стадии развернутого фиброза. Печень для гистологического исследования забирали через сутки, 3 и 6 дней после введения генетического материала. Далее получали криосрезы печеночной ткани, которые окрашивали с помощью субстрата X-Gal для обнаружения активности β-галактозидазы в трансфицированных клетках и пикросириусом красным. Для этого криосрезы

фиксируют раствором 2% формалина и инкубировали в растворе 1 мг/мл X-gal в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в присутствии 5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 5 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] и 2 mM MgCl при комнатной температуре в течение 14 ч. Затем использовали стандартную методику окраски срезов тканей пикросириусом красным для выявления коллагена. Расчет эффективности трансфекции клеток печени проводили с помощью программы «MetaMorph». При этом вычисляли отношение всей площади окрашенных клеток к общей площади клеток среза.

Плазмидные конструкции, содержащие кДНК фактора роста гепатоцитов человека (hHGF), были созданы в ООО «МОНА» и ООО «Генная и клеточная терапия» и переданы для данной работы. Раствор плазмиды с кДНК HGF вводили гидродинамическим методом в хвостовую вену. Инъекция выполнялась 1 раз в неделю в течение 3 нед в дозе 75 мкг плазмидной ДНК на животное начиная с 4-й недели от начала эксперимента. Параллельно в течение 6 нед от начала опытов выполняли внутрибрюшинное введение СС14. Через неделю после последней инъекции животных выводили из эксперимента, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

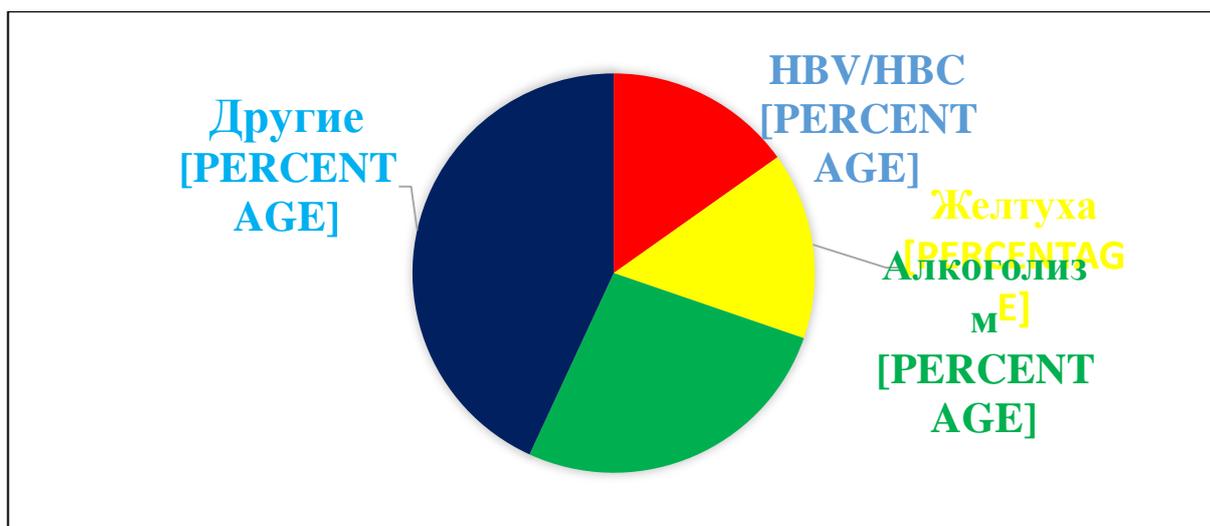
Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического метода Краскела – Уоллиса для множественного сравнения независимых групп и непараметрического критерия Манна–Уитни для сравнения двух независимых групп в статистическом пакете Statistica 6.0. [13].

## ГЛАВА III: РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1. Влияние CD34 и ЭФРС на ангиогенез в печени

Вмешательство ангиогенеза может быть потенциальной целью во избежание прогрессирования патологии. Поэтому планировалось определить количество CD34 и эндотелиального фактора роста сосудов (ЭФРС), маркеры ангиогенеза при хронических заболеваниях.

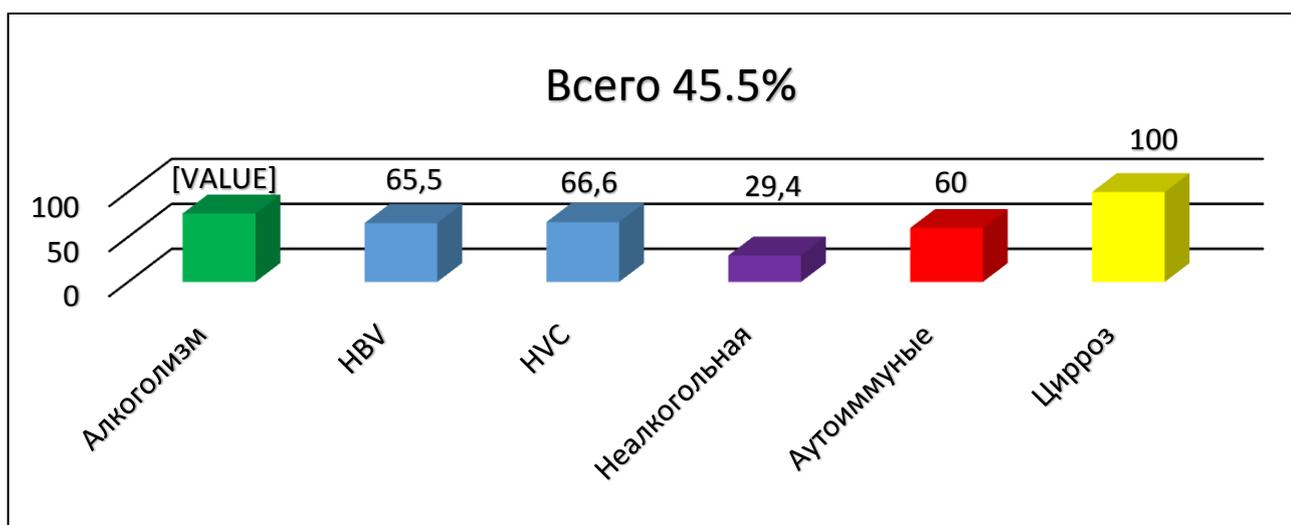
Клинически были представлены: желтуха в 12 случаях (15,1%), случайно обнаруженная инфекция HBV и HCV в 12 случаях (15,1%), хронический алкоголизм с или без осложнения в виде цирроза у 21 человека (26,5%) и другие симптомы (недомогание, потеря аппетита, потеря веса, лихорадка, боли в животе) в 34 (43%) случаях (Рис. 3.1.1).



**Рисунок 3.1.1** На рисунке изображены статистические данные полученные в результате клинического исследования [4].

Из 79 пациентов с хроническими заболеваниями печени ангиогенез наблюдался в 45,5% случаев. Ни один из биоптатов нормальной печени не был CD34 или ЭФРС позитивным. Развитие кровеносных сосудов при хронической патологии (CD34/ЭФРС) было таковым: ангиогенез наблюдался в 16/21 (76,1%)

случаях алкогольной патологии, 19/29 (65,5%) в случаях HBV инфекции, 2/3(66,6%) HCV инфекции, 5/17 (29,4%) неалкогольной патологии, 3/5 (60%) аутоиммунных гепатитов и 4/4 (100%) случаев криптогенного цирроза. (Рисунок 3.1.2)



**Рисунок 3.1.2** На рисунке изображено статистическое распределение случаев ангиогенеза у исследуемых пациентов [4].

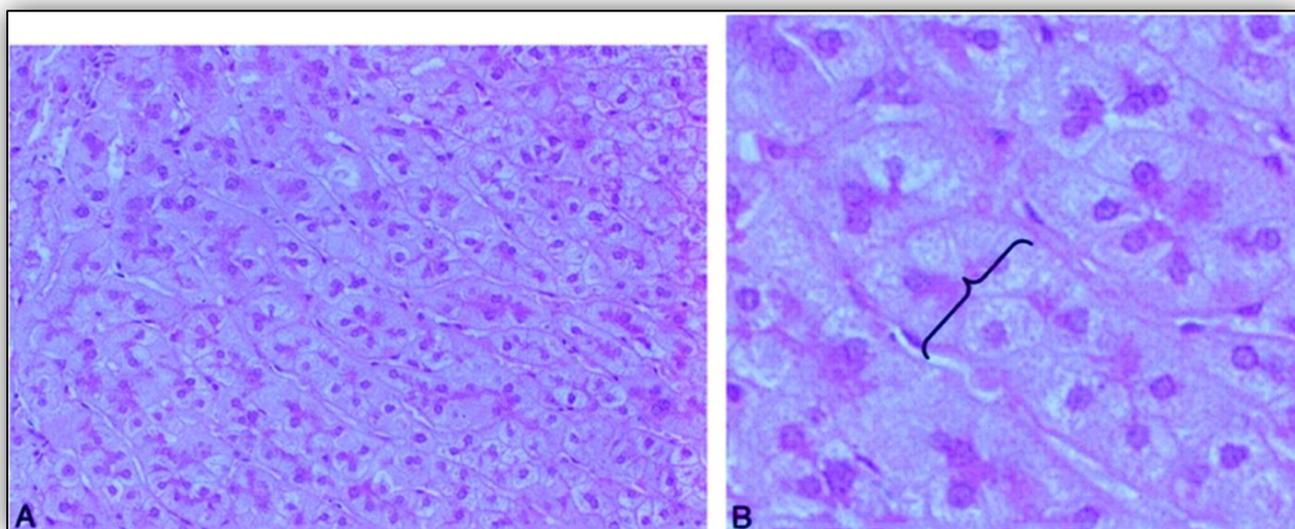
Т.о. следует, что ангиогенез присутствует в 45,5% случаев хронических заболеваний печени. Это пропорционально увеличению стадии фиброза. Экспрессия ЭФРС обычно встречаются на ранних стадиях фиброза. Следовательно, терапевтические стратегии ингибирования экспрессии ЭФРС могут иметь важное значение в предотвращении прогрессии хронического заболевания печени в ранней стадии [4].

### 3.2. Стимуляция ангиогенеза ангиостатином

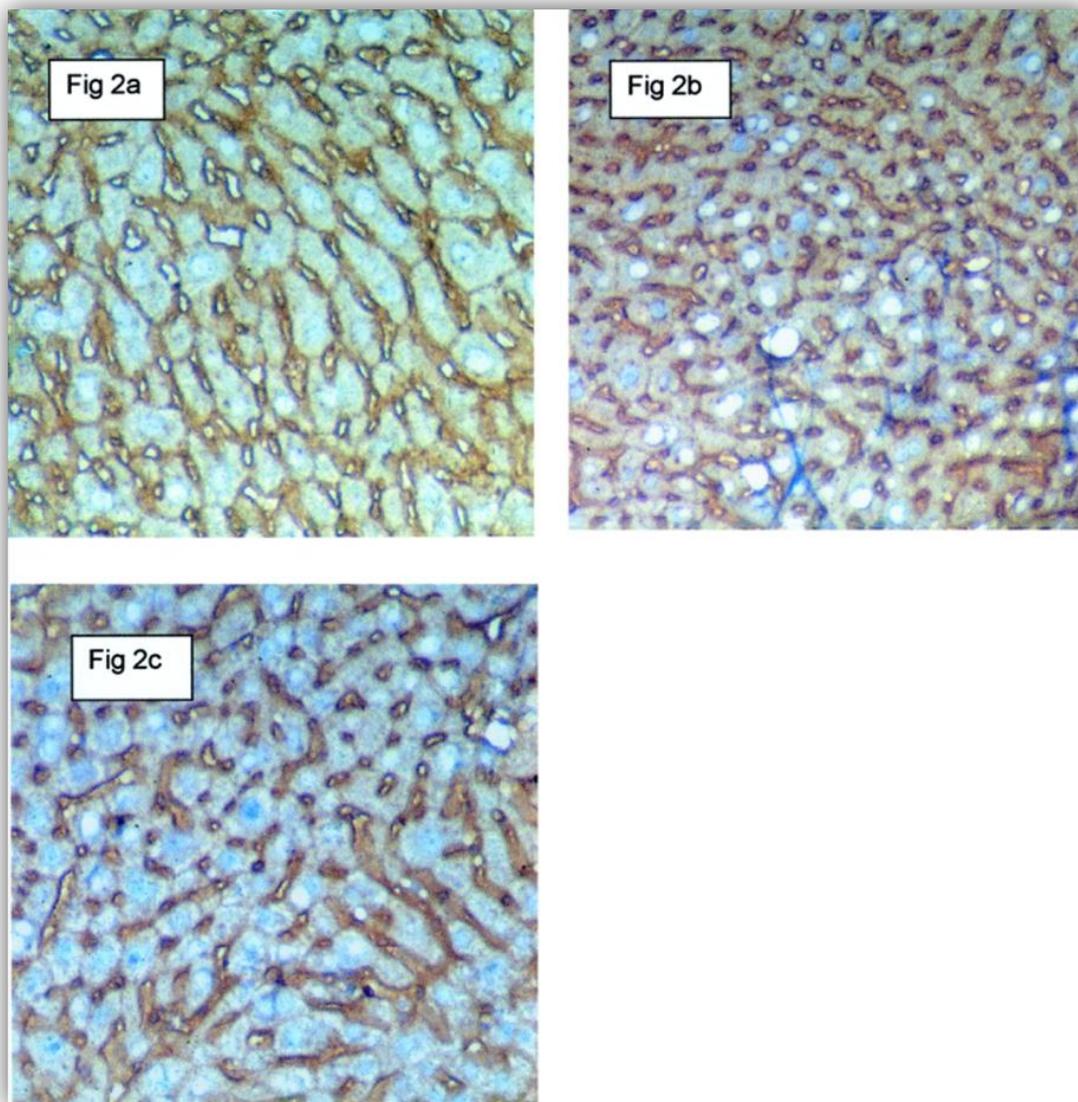
У лабораторных мышей из контрольной группы (ложнопрооперированных) насчитали  $63 \pm 5$  кровеносных сосудов (Рис. 3.2.1), в то время как у мышей, подверженных частичной гепатэктомии, спустя первые 3

дня, плотность микрососудов значительно выросла до  $81 \pm 5$  кровеносных сосудов. После этого количество кровеносных сосудов достигло фазы плато  $87 \pm 5.7$  и оставалось неизменным до конца контрольного периода, 21 постоперационного дня.

Кроме разницы в количестве кровеносных сосудов изменился также гистологический вид гепатоцитов. Это изменение характеризуется гепатоцеллюлярной гиперплазией и утолщение печеночных хорд. (рис.3.2.2)



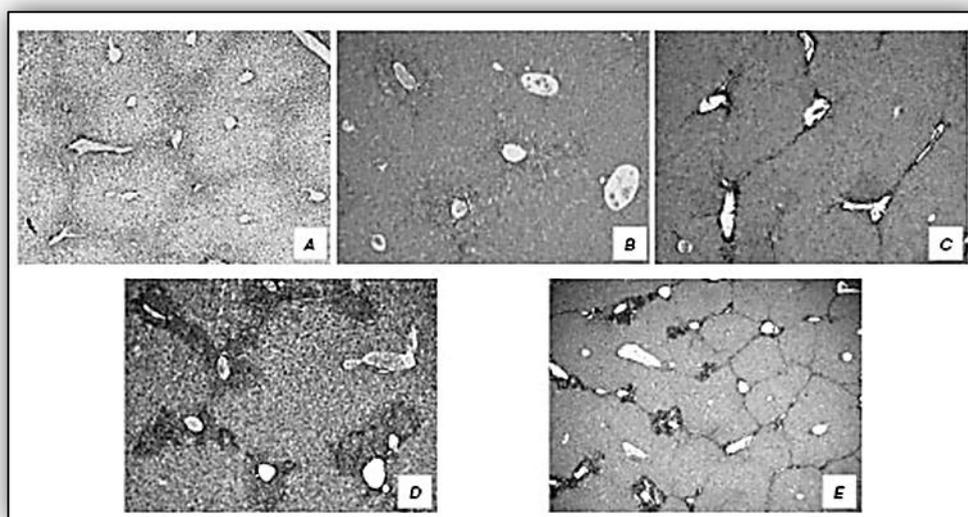
**Рисунок 3.2.1** Гистологическое проявление регенерации печени на 7 день после 70% частичной резекции печени. (А)У мышей, которым вводили ангиостатин, после частичной гепатэктомии некроз не наблюдается. (В) Гиперплазия. (Окраска гематоксилином и эозином, увеличением  $100 \times$ ) [24].



**Рисунок 3.2.2** Действие ангиостатина на микроваскулярную плотность у регенерирующей печени на 14 день после 70% гепатэктомии. Определение синусоидных эндотелиальных клеток было выполнено с помощью иммуноокрашивания антителами к CD 31 (PECAM). А, В, и С представлены как контрольная группа, группа с частичной гепатэктомией, группа с частичной гепатэктомией с ангиостатином, соответственно. На 21 день после гепатэктомии микроваскулярная плотность значительно увеличилась по сравнению с обеими группами (контрольная группа и группа мышей с ангиостатином). Увеличение 250×[24].

### 3.3 Генная терапия фактором роста гепатоцитов

С помощью окрашивания срезов печени мышей, которым внутрибрюшинно вводился  $CCl_4$ , пикросириусом красным – красителем, специфично окрашивающим коллаген в красный цвет, было обнаружено, что уже после 2 нед эксперимента в области портальных трактов начинается формирование фиброза печени (Рис. 3.3.1).



**Рисунок 3.3.1** Динамика развития фиброза и цирроза печени мышей послебрюшинного введения четырёххлористого углерода [32].

А – печень мыши контрольной группы, В – через 1 нед., С – через 2 нед., D – через 4 нед., Е – через 6 нед. Окраска пикросириусом красным, увеличение  $\times 10$

На основании расчета полуколичественного ИГА, или системы Кноделя, было показано, что фиброз печени достигает наибольшего развития к 4–5-й неделе эксперимента, а к 6-й неделе у животных формируется цирроз (см. Рис. 3.3.1). Так, через 1 нед после введения  $CCl_4$  нормальное строение печени сохраняется только на периферии дольки, а в ее центре обнаруживаются участки ацидофильного некроза, признаки фиброза отсутствуют. Отмечаются

умеренная интралобулярная дистрофия и фокальный некроз: процесс затрагивает более 1/2 дольки. ИГА равен 4.

Через 2 нед от начала эксперимента сохранность структуры долек наблюдается только на периферии, а в центральных отделах находятся участки ацидофильного некроза, занимающие от 1/2 до 2/3 дольки. Видно начало формирования мостовидного фиброза: от портальных триад в глубь паренхимы дольки тянутся пучки волокон вновь синтезированного коллагена. В некоторых участках они формируют портопортальные септы. ИГА равен 8.

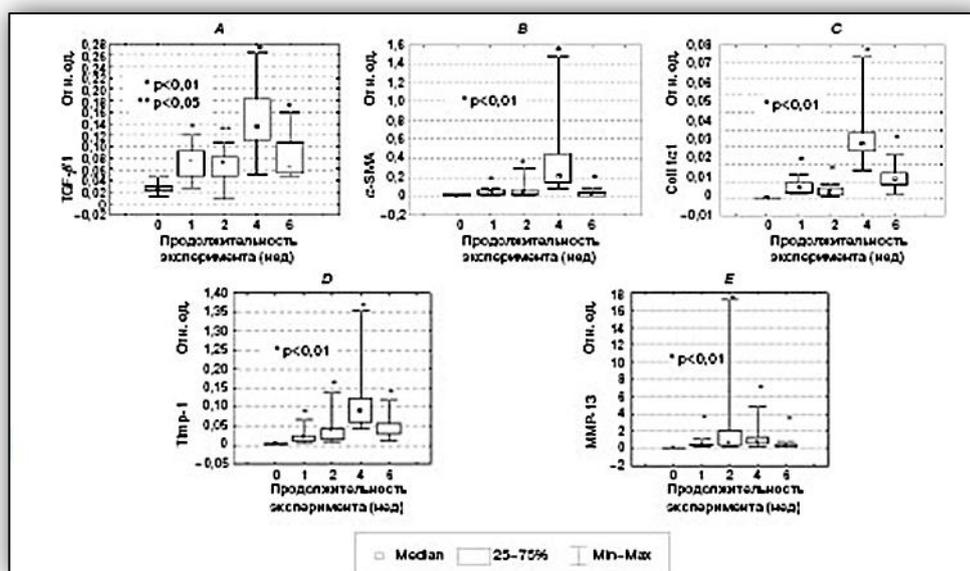
Спустя 4 нед в центральных отделах долек располагаются участки ацидофильного некроза и гепатоциты в состоянии жировой дистрофии. Портальная вена расширена. Имеются признаки значительного портального воспаления. Мостовидный фиброз выражен в большей степени, чем у мышей через 2 нед после начала эксперимента. ИГА равен 11.

Сравнивая морфологические изменения печеночной ткани животных трех рассмотренных групп можно заметить общие для них признаки: нарушение долькового и балочного строения вокруг центральных вен, выраженность портального воспаления, прогрессирование интралобулярной дистрофии. Разрастание соединительной ткани в области портальных трактов на фоне длительно существующего воспаления с переходом в мостовидный фиброз начинается после 2 нед эксперимента. Через 6 нед балочное строение долек полностью нарушено. Есть признаки цирроза печени в виде перестройки гистоархитектоники органа – ложные дольки. При окраске пикросириусом красным можно видеть выраженный ступенчатый некроз, который захватывает более 2/3 портальных трактов. ИГА составляет 12 баллов.

Полученные выводы согласовываются с результатами изучения активности печеночных ферментов: для АлАТ получено статистически значимое отличие между группами при множественном сравнении, а также между контрольной группой и каждой из исследуемых групп, для АсАТ

имеется статистически значимое отличие только между группой здоровых мышей и животными, которым CCl<sub>4</sub> вводился в течение 4 нед.

Для того чтобы выяснить, как изменяется экспрессия генов, участвующих в развитии фиброза, в ткани печени мышей, получавших CCl<sub>4</sub>, мы проанализировали содержание мРНК этих генов с помощью ПЦР (рис. 3.3.2).



**Рисунок 3.3.2** Динамика экспрессии генов, участвующих в развитии фиброза печени. А - TGF-β1, В - α-SMA, С - Coll1α1, D - TIMP-1, Е - MMP-13 [32].

Так, коллаген 1α1 является основным компонентом патологического внеклеточного матрикса. TGF-β1 считают ключевым цитокином фиброгенеза. Под его влиянием происходит активация генов коллагена 1α1 и гладкомышечного α-актина (α-SMA). Также, оценили изменение экспрессии α-SMA, поскольку он является маркером активированных клеток Ито. В настоящее время эти клетки относят к основным источникам избыточного внеклеточного матрикса. Вследствие того, что в активации клеток Ито участвует матриксная металлопротеиназа 13-го типа (MMP-13), мы изучили уровень ее экспрессии, а также тканевого ингибитора матриксных

металлопротеиназ 1-го типа. Согласно данным литературы, характер экспрессии гена MMP-13 в ходе развития фиброза печени имеет волнообразный характер. Первый пик активности приходится на начало фиброгенеза. Возможное объяснение заключается в профиброгенном действии матриксной металлопротеиназы за счет разрушения нормального микроокружения клеток Ито с последующей их активацией. Затем следует спад уровня экспрессии гена MMP-13. Следующее повышение приходится на период репарации поврежденной ткани.

Таким образом, внутрибрюшинное введение четыреххлористого углерода вызывает статистически значимое повышение уровня экспрессии генов, участвующих в фиброгенезе. При этом пик экспрессии генов *Coll1 $\alpha$ 1*, TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA и TIMP-1 приходится на 4-ю неделю эксперимента, а для MMP-13 – на 2-ю и 4-ю. Снижение экспрессии всех генов наблюдается к 6-й неделе эксперимента. Эти данные согласуются с результатами гистологического исследования печеночной ткани и свидетельствуют о том, что внутрибрюшинное введение CCl<sub>4</sub> приводит к развитию фиброза печени на сроке от 2 до 4 нед, а в период с 4-й по 6-ю неделю формируется цирроз. После анализа полученных результатов было решено вводить плазмидные конструкции начиная с 4-й недели эксперимента.

Для того чтобы подобрать оптимальные условия доставки плазмидных конструкций в ткань печени, вводили раствор кДНК  $\beta$ -галактозидазы с помощью локальных инъекций и методом гидропорации. Сохранность ткани оценивали после окраски срезов печени гематоксилином и эозином, эффективность трансфекции – морфометрическим методом. В случае обкалывания паренхимы печени на срезах отмечали значительную лейкоцитарную инфильтрацию и обширное повреждение печеночной ткани с последующим замещением жировой тканью. При этом эффективность трансфекции, подсчитанная морфометрическим методом, составила 0,05%.

После введения раствора кДНК методом гидропорации признаков повреждения ткани не выявлено. Клетки, трансфицированные плазмидной ДНК, располагались преимущественно по ходу кровеносных сосудов.

Эффективность трансфекции составила 1,4%. Содержание мРНК HGF человека в печени мышей оценивали через неделю после последней инъекции плазмиды с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к кДНК HGF человека. Проведенный анализ подтвердил экспрессию кДНК HGF человека в печеночной ткани мышей, получавших внутривенные инъекции плазмидной конструкцией.

Эффективность генной терапии фактором роста гепатоцитов изучали с помощью морфометрического анализа срезов печеночной ткани, окрашенных пикросириусом красным. Установлено статистически значимое снижение площади фиброза печени в группе животных с индуцированным фиброзом, получавших генную терапию HGF, начиная с 4-й недели от начала введения четыреххлористого углерода.

Таким образом, введение в печень плазмидной конструкции, несущей кДНК фактора роста гепатоцитов, вызывает значительное снижение площади фиброза у мышей. Указанная плазмидная конструкция вводилась в организм животных в физиологическом растворе методом гидропорации без дополнительных трансфекционных агентов. Этот факт имеет большое значение для клинической практики, так как невирусные способы трансфекции не вызывают иммунного ответа, обладают меньшей токсичностью и позволяют проводить генную терапию многократно. Также важно отметить, что в настоящее время ведутся работы по оптимизации метода гидродинамического введения генетических конструкций в печень крупных млекопитающих с целью его применения в клинической практике. Полученные результаты открывают перспективы генной терапии фиброза печени человека, основанной на использовании невирусных векторов [32].

## **ВЫВОДЫ:**

1. За последние 10 лет повысился интерес к поиску и разработке новейших методов и технологий в лечении хронических заболеваний печени, и, в особенности, цирроза печени.
2. Наряду с развитием биотехнологий терапевтическая тактика в лечении цирроза печени не только не потеряла своей актуальности, но и приобрела качественно новые направления в генной инженерии, а также в создании биореакторов и клеточной терапии.
3. Существуют предпосылки для дальнейшего развития и усовершенствования описанных в работе техник, что в свою очередь даёт большую вероятность решения большинства проблем с трансплантацией печени.
4. Основным недостатком клеток на основе трансплантационной матрицы является высокая начальная потеря и дисфункция клеток, что может быть связано с отсутствием кровотока и изменениями в питательных веществах, что в свою очередь указывает на преимущество биореакторов, как метод лечения цирроза печени, перед другими методами, в частности, перед генной инженерией.
5. Современные методы, использующие модули для оксигенации и компьютерное моделирование функциональной жидкости для культивирования гепатоцитов в механизме биоинженерной печени, дают большие надежды в решении вопросов использования биореакторов как основной метод в лечении цирроза печени.

## Библиография

1. <http://www.cmbt.su/eng/science/science81.html>
2. Ananthanarayanan A, Narmada BC, Mo X, Mcmillian M, Yu H. Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2011;29: 110–8.
3. Anjali D. Amarpurkar; Deepak N. Amarpurkar; Vibhav; Nikhil D. Patel, Department of Pathology, BYL Nair Charitable Hospital & TN Medical College; Department of Gastroenterology & Hepatology, Bombay; Hospital and Medical Research Centre Mumbai, India.- Angiogenesis in chronic liver disease- 1 July 2007
4. Anwar A. Palakkan, David C. Hay, Anil K. PR, Kumary TV and James A. Ross, Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges - 27 January 2013
5. Bokhari M., Carnachan R.J., Cameron N.R., Przyborski S.A. Novel cell culture device enabling three-dimensional cell growth and improved cell function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354: 1095–1100.
6. Chan C, Berthiaume F, Nath BD, et al. Hepatic tissue engineering for adjunct and temporary liver support: critical technologies. *Liver Transpl* 2004;10: 1331–42.
7. Desai J.P., Pillarisetti A., Brooks A.D. Engineering approaches to biomanipulation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007; 9: 35–53.
8. Eva Török, Marc Lutgehetmann, Jeanette Bierwolf, Stefan Melbeck, Jochen Düllmann, Bjoern Nashan, Peter X. Ma, Joerg M. Pollok. Primary human hepatocytes on biodegradable PLLA-matrices: A promising model for improving transplantation efficiency using tissue engineering. *Liver Transplantation*, 2010; DOI: 10.1002/lt.22200 Humphrey Hodgson, Clare Selden. Liver cell implants - a long road. *Liver Transplantation*, 2010; DOI: 10.1002/lt.22245

9. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 211–24.
10. Hadas Goshen and Prof. Yaacov Baruch, Director of the Liver Unit, Rambam Health Care Campus, and Dr. Dror Seliktar of the Biomedical Engineering Department, the Technion- Engineering the liver
11. Jing-Lin Xia et al. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol. 168. – P. 1500–151.
12. Knodell R.G. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis // *Hepatology.* – 1981. – Vol. 1. – P. 431–435.
13. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Measuring the global burden of disease and risk factors, 1990–2001. 2006; 1 :1–14.
14. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3: e442.
15. Matsumoto K., Mizumoto H., Nakazawa K., Ijima H., Funatsu K., Kajiwara T. Hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells in a three-dimensional culture system using polyurethane foam. *J Biosci Bioeng.* 2008; 105: 350–354.
16. McCullen S.D. Ramaswamy S., Clarke L.I., Gorga R.E. Nanofibrous composites for tissue engineering applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2009; 1: 369-390.
17. Paloma Sanz-Cameno, María Trapero-Marugán, María Chaparro, Evan Anthony Jones, and Ricardo Moreno-Otero, Laboratory of Investigation, Molecular Biology Unit, Hospital Universitario de la Princesa, Spain Hepatology Unit, Spain CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, 28006 Madrid, Spain - Angiogenesis: From Chronic Liver Inflammation to Hepatocellular Carcinoma - Accepted 16 March 2010
18. Ratner B.D., Bryant S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004; 6: 41–75.

19. Rozga J. Liver support technology—an update. *Xenotransplantation* 2006; 13: 380–9.
20. Rozga J, Malkowski P. Artificial liver support: quo vadis? *Ann Transplant* 2010; 15:92–101.
21. Schramm C, Bubenheim M, Adam R, et al. Primary liver transplantation for autoimmune hepatitis: a comparative analysis of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 2010; 16: 461–9.
22. Toh YC, Zhang C, Zhang J, et al. A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. *Lab Chip* 2007; 7: 302–9
23. Tom A. Drixler, MD, Mathys J. Vogten, MD, Ewan D. Ritchie, MD, Theo J. M. V. van Vroonhoven, MD, PhD, Martijn F. B. G. Gebbink, PhD, Emile E. Voest, MD, PhD, and Inne H. M. Borel Rinkes, MD, PhD - Liver regeneration is an angiogenesis – Associated phenomenon, *Ann Surg.* Dec 2002; 236(6): 703–712
24. Washizu J, Chan C, Berthiaume F, et al. Amino acid supplementation improves cell-specific functions of the rat hepatocytes exposed to human plasma. *Tissue Eng* 2000; 6: 497–504.
25. Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 521–6.
26. Wnek GE, Bowlin GL. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. New York: Marcel Dekker; 2004
27. Xue F. et al. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy // *Gut.* – 2003. – Vol. 52. – P. 694–700.
28. Yi-Maun Subeq, Li-Yi Sun, Shinn-Zong Lin, and Tzyy-Wen Chiou
29. Yuan-Sheng Li, 1 Horng-Jyh Harn, 1 Dean-Kuo Hsieh, Tung-Chou Wen
30. Zeuli L, Di Nicuolo G, Amoroso P, Calise F, Chamuleau RA. Bridging a patient with acute liver failure to liver transplantation by the AMC-bioartificial liver. *Cell Transplant* 2003; 12(6): 563-568
31. Внутренние болезни / Под. ред. проф. Г. И. Бурчинского. — 4-е изд., перераб. и доп. — К. Вицашк. Головное изд-во, 2000. — 656 с.

32. Н.А. Джояшвили, Н.И. Калинина, И.Б. Белоглазова, З.И. Цоколаева, П.И. Макаревич, Ю.Л. Перов, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук (Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра биологической и медицинской химии, лаборатория генных и клеточных технологий в медицине, кафедра общей и частной патологии, ФГУ РКНПК Минздравсоцразвития РФ, лаборатория ангиогенеза) - Генная терапия фактором роста гепатоцитов приводит к регрессии экспериментального фиброза печени

## Declarație

Prin prezența declar că Lucrarea de licență cu titlul «*Particularitățile de angiogeneză în ciroza hepatică*» este scrisă de mine și nu a mai fost prezentată niciodată la o altă facultate sau instituție de învățământ superior din țară sau străinătate. De asemenea, că toate sursele utilizate, inclusive cele de pe Internet, sunt indicate în lucrare, cu respectarea regulilor de evitare a plagiatului:

- toate fragmentele de text reproduse exact, chiar și în traducere proprie din altă limbă, sunt scrise între ghilimele și dețin referința precisă a sursei;
- reformularea în cuvinte proprii a textelor scrise de către alți autori deține referința precisă;
- rezumarea ideilor altor autori deține referința precisă la textul original.

Data \_\_\_\_\_

Absolventă Colomîcenco Irina  
\_\_\_\_\_