

Использование суспензии гепатоцитов в качестве биоматериала для экстракорпоральных систем поддержки печени

Аннотация

Экспериментальные исследования *in vitro* показали принципиальную возможность и эффективность использования суспензии гепатоцитов в качестве биоматериалов для элиминации токсических соединений и нормализации обменных процессов при проведении диализа плазмы крови на аппарате «Биоискусственная печень». Разработанные схемы и устройства биореакторов создают оптимальные условия для нормального функционирования суспензии гепатоцитов крыс в течение нескольких часов и осуществления клеточного диализа.

Введение

Важное место в лечении печеночной недостаточности различного генеза занимают биологические экстракорпоральные системы временного замещения функций печени с использованием аллогенных или ксеногенных гепатоцитов [1]. В некоторых из них используются мембранные устройства массообмена с непрерывной циркулирующей взвеси изолированных гепатоцитов, другие варианты предполагают использование инкапсулированных или монослойных культур клеток печени, поддерживаемых на покрытых коллагеном или другими биосовместимыми материалами стеклянных, металлических или полимерных пластинах, а также на полых волокнах с различной проницаемостью [2].

Считается, что суспензионная культура гепатоцитов является наименее совершенной, так как гепатоциты в ней теряют свои функции уже через 4...6 ч. Однако применение методики перемешивания клеток может дать оптимальное распределение среды вокруг гепатоцитов и обеспечить высокую эффективность массопереноса. При культивировании диссоциированных клеток во вращательном шейкере они могут объединяться в кластеры (сфероиды), рост которых ограничен диффузией кислорода и углекислого газа [3]. В рассматриваемой работе представлены результаты экспериментальных исследований по изучению возможности использования суспензии гепатоцитов в качестве биоматериала для аппарата «Биоискусственная печень».

Материалы и методы

Гепатоциты из печени беспородных белых крыс получали методом, описанным в работе [4]. На первом этапе применяли перфузию с помощью раствора (рН 7,4), содержащего NaCl (142 ммоль/л), KCl (6,7 ммоль/л), NEPES (3,4 ммоль/л, «AppliChem», США) и пропускаемого со скоростью 15...20 мл/мин (общий объем перфузата – до 300 мл). На втором этапе перфузию печени проводили раствором, содержащим NaCl (66,7 ммоль/л), KCl (6,7 ммоль/л), CaCl₂ (4,8 ммоль/л), NEPES (20 ммоль/л), 0,05%-ную коллагеназу IV («ПанЭко», Россия), в течение 15...20 мин. После перфузии печень измельчали в охлажденном растворе Хенкса («ПанЭко», Россия). Полученную суспензию пропускали через нейлоновый фильтр (диаметр пор – 100 мкм), отбирали пробу (10 мкл) для подсчета клеточности, центрифугировали при 100 g 2...3 мин, удаляли надосадочную жидкость и разводили клеточный осадок раствором Хенкса до требуемой концентрации (10⁶ клеток/мл) с контрольным подсчетом клеток в суспензии и определением их жизнеспособности. После выделения клеток их еще трижды отмывали средой DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением L-глутамин, дексаметазона (1 мкмоль/л, «КРКА», Словения), 1000 ед/л пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия). После последней отмывки и удаления надосадочной жидкости осадок ресуспендировали в среде DMEM с дексаметазоном, содержащей также 20 % эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone», США). Количество выживших

клеток составляло около 80 % по результатам теста на включение трипанового синего. В общей сложности из печени одной крысы получали около 10⁸ клеток, что давало возможность проведения соответствующих экспериментов.

Биохимические исследования

Определение активности NADPH:2,6-дихлорфенол-индофенол-редуктазы и N-деметилазы диметиланилина производили методом, описанным в работе [5]. Определяли содержание общего белка [6], «средних молекул» [7], билирубина, мочевины и АЛТ (наборы реагентов «Билирубин-Витал-12», «Мочевина-Витал-03.13.23» и «АлАТ-Витал-06.16» ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия). Также определяли концентрацию аммиака [8] и анилина [9]. Концентрацию салицилата натрия определяли по цветной реакции с хлоридом железа (III) на спектрофотометре СФ-56 (ОКБ «Спектр», Россия) при длине волны 530 нм.

При изучении эффективности диализных процедур использовали аппарат «Биоискусственная печень» [10], диализаторы «Hemoflow F3», «Helixone FX5» и «Helixone FX40» («Fresenius», Германия). В ходе экспериментов в межкапиллярном пространстве половолоконных диализаторов циркулировала суспензия гепатоцитов, а в интракапиллярном пространстве – плазма крови доноров. Скорости перфузии суспензии и плазмы составляли 50 мл/мин. Суспензия аэрировалась с помощью компрессора. В оксигенационной ячейке для повышения интенсивности аэрации находился якорь магнитной мешалки. Давление в системе контролировали с помощью манометров, следя за тем, чтобы давление в плазме было на 20 мм рт. ст. выше, чем в суспензии. Для оценки эффективности диализа в плазму добавляли следующие вещества (в конечной концентрации): салицилат натрия (3625 мкмоль/л или 500 мкг/мл), аммиак (1000 мкмоль/л), анилин (3 ммоль/л). Пробы для оценки биохимических показателей брали через 30, 60, 120 и 180 мин диализа. Надосадочную жидкость и осадок после центрифугирования суспензии гепатоцитов ресуспендировали в объеме 6 мл, делили на аликвоты по 1 мл и замораживали для анализа. Полученные данные подвергали обработке с помощью методов вариационной статистики. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Определяли средние значения трех экспериментов.

Результаты

При изучении эффективности низкопоточного диализа создавались следующие параметры эксперимента: объем плазмы – 200 мл, объем суспензии гепатоцитов – 200 мл, скорость перфузии в обоих контурах – 50 мл/мин, время перфузии – 180 мин, низкопоточные диализаторы «Hemoflow F3» и «Helixone FX5». Концентрация анилина и салицилата натрия в плазме через 30 мин уменьшалась на 40 и 55 % соответственно и в дальнейшем существенно не менялась. Активное удаление из плазмы и биоматериала аммиака свидетельствует о высокой метаболической активности суспензии гепатоцитов (табл. 1).

При использовании диализатора FX5 более эффективно удалялись салицилат натрия (70, 74 и 80 % через 60, 120 и 180 мин соответственно) и средние молекулы (до 39 % через 180 мин диализа), но процент удаления аммиака из плазмы был несколько ниже. В суспензии гепатоцитов сохранялся высокий уровень активности деметилазы диметиланилина, NADPH:2,6-дихлорфенол-индофенол-редуктазы и АЛТ, тогда как в супернатанте он был на несколько порядков ниже (табл. 2), что свидетельствует о сохранности полученных клеток.

При этом отмечалось снижение содержания белка за счет возможного усиления протеолиза в течение эксперимента. Пересчет на удельную активность АЛТ показывал более стабильные значения, возраставшие почти в 2 раза через 30 мин и остававшиеся далее примерно на одном уровне.

При использовании мембранного диализатора FX5 активность АЛТ снижалась в первые 30 мин и далее оставалась на

одном уровне (как и концентрация белка). В этой серии опытов, может быть за счет более высокого содержания живых клеток (клеточность выше в 1,5 раза), наблюдалась более низкая активность АЛТ в суспензии, тогда как активность в супернатанте была выше по сравнению с предшествующим опытом. Удельная активность АЛТ была стабильной в суспензии и в супернатанте.

При использовании обоих мембранных модулей уже через 30 мин в суспензии и в супернатанте увеличивалось количество мочевины, снижалась концентрация аммиака с дальнейшей стабилизацией уровня. При этом не достигалась равновесная его концентрация в плазме и в суспензии. При использовании диализаторов F3 и FX5 наблюдалось увеличение содержания в супернатанте непрямого билирубина, уровень которого продолжал оставаться высоким на протяжении всего эксперимента (возможно, за счет связывания с альбумином гепатоцитов).

Таблица 1

Динамика изменения концентраций тестовых химических соединений в процессе клеточного диализа на низкопоточном диализаторе F3 («Polysulfone») и высокопоточном диализаторе FX40 («Helixone»)

Время перфузии, мин	Вещества, определяемые в плазме									
	Анилин		Салицилат натрия		Аммиак		Средние молекулы, 254 нм		Средние молекулы, 260 нм	
	мкмоль/л	%	мкмоль/л	%	мкмоль/л	%	у. е.	%	у. е.	%
Низкопоточный диализатор F3 («Polysulfone»)										
0	3000	–	3143	–	329	–	0,212	–	0,163	–
30	1800	40	1417	55	190	42	0,190	10	0,132	19
60	1700	43	1374	56	200	39	0,170	20	0,115	29
120	1620	46	1533	51	168	49	0,188	11	0,134	18
180	1550	48	1399	55	162	51	0,169	20	0,115	29
Высокопоточный диализатор FX40 («Helixone»)										
0	3100	–	4671	–	860	–	0,575	–	0,551	–
30	1870	40	3643	78	230	73	0,359	38	0,320	42
60	1550	50	3643	78	223	74	0,362	37	0,317	42
120	1510	51	3456	74	223	74	0,384	33	0,341	38

Таблица 2

Функциональная активность гепатоцитов печени крыс при низкопоточном диализе (F3, «Fresenius») плазмы с тестовыми химическими соединениями

Измеряемый показатель	Время перфузии, мин				
	0	30	60	120	180
Суспензия гепатоцитов					
Деметилаза диметиланилина, нмоль/мин/мг белка	10,1	7,3	5,0	4,4	3,8
NADPH:2,6-дихлорфенол-индофенол-редуктаза, нмоль/мин/мг белка	20,9	22,9	22,1	29,5	33,2
Общий белок, мг/мл	5,1	2,2	2,2	1,3	0,6
Мочевина, ммоль/л	0,58	4,8	5,9	5,4	5,5
АЛТ, ед/л	385	315	220	142	70
АЛТ, ед/мг белка	75,6	140	102	109	110
Аммиак, мкмоль/л	198	181	136	119	99
Супернатант суспензии гепатоцитов					
Деметилаза диметиланилина, нмоль/мин/мг белка	1,0	1,7	1,5	2,4	1,3
NADPH:2,6-дихлорфенол-индофенол-редуктаза, нмоль/мин/мг белка	8,5	8,8	9,2	10,1	9,4
Общий белок, мг/мл	2,5	2,5	2,6	2,7	2,6
Мочевина, ммоль/л	1,8	4,0	5,2	3,6	4,0
АЛТ, ед/л	4,3	7,9	1,9	9,2	4,8
АЛТ, ед/мг белка	1,7	2,1	1,7	2,4	1,9
Аммиак, мкмоль/л	738	759	750	796	749
Билирубин общий, мкм/л	7,90	27,7	22,9	25,8	21,3
Билирубин прямой, мкм/л	0,99	0,34	2,47	1,58	0,06
Билирубин не прямой, мкм/л	6,9	27,3	20,4	24,2	21,2

При изучении эффективности высокопоточного диализа создавались аналогичные параметры эксперимента, но использовался высокопоточный диализатор «Helixone FX40». Уже через 30 мин происходило удаление из плазмы 78 % салицилата натрия, 73 % аммиака и около 40 % средних молекул, что значительно превосходит подобную направленность массообмена при использовании низкопоточного клеточного диализа (табл. 1).

Сравнение с низкопоточным диализом показало более высокую активность деметилазы диметиланилина через 60, 120 и 180 мин опыта, более низкую активность NADPH:2,6-дихлорфенол-индофенол-редуктазы в суспензии гепатоцитов при сходной динамике изменения концентраций мочевины и аммиака (табл. 3).

Таблица 3

Функциональная активность гепатоцитов печени крыс при высокопоточном диализе плазмы с тестовыми химическими соединениями

Измеряемый показатель	Время перфузии, мин				
	0	30	60	120	180
Суспензия гепатоцитов					
Деметилаза диметиланилина, нмоль/мин/мг белка	7,6	9,1	7,8	7,7	8,1
NADPH:2,6-дихлорфенол-индофенол-редуктаза, нмоль/мин/мг белка	12,5	10,6	11,4	10,9	9,8
Общий белок, мг/мл	1,2	0,9	0,9	0,7	0,7
Мочевина, ммоль/л	0,7	1,4	1,9	2,8	2,9
Аммиак, ммоль/л	0,28	0,27	0,21	0,21	0,22
АЛТ, ед/л	297	234	167	33	41
АЛТ, ед/мг белка	247	260	172	46	57
Билирубин общий	0,8	2,5	1,8	2,3	1,7
Билирубин прямой	0,5	0,2	1,7	0,5	0,7
Билирубин непрямой	0,3	2,3	0,1	1,8	1,0
Супернатант суспензии гепатоцитов					
Деметилаза диметиланилина, нмоль/мин/мг белка	0,95	0,69	1,7	0,61	0,56
NADPH:2,6-дихлорфенол-индофенол-редуктаза, нмоль/мин/мг белка	3,5	4,9	8,1	5,5	4,8
Общий белок, мг/мл	1,7	2,6	1,8	2,1	1,4
Мочевина, ммоль/л	0,85	2,4	2,6	2,5	2,5
Аммиак, ммоль/л	1,19	1,23	0,95	1,28	1,12
АЛТ, ед/л	4,0	7,8	6,5	7,0	4,6
АЛТ, ед/мг белка	2,3	3,0	3,6	3,3	3,3
Билирубин общий, мкм/л	2,8	0,7	2,2	1,1	1,1
Билирубин прямой, мкм/л	2,8	0,7	0,14	0,1	0,1
Билирубин непрямой, мкм/л	0	0	2,0	1,0	1,0

Заключение

Проведенные исследования показали возможность элиминации гидрофобных и гидрофильных токсических веществ с использованием клеточного диализа. Наряду с высоким уровнем элиминации аммиака отмечалось и увеличение концентраций мочевины, что свидетельствует об усилении соответствующих обменных процессов. Более эффективным оказался высокопоточный диализ, при котором удаление из плазмы салицилата натрия, аммиака и средних молекул происходило интенсивнее.

Высокая активность деметилазы диметиланилина и NADPH:2,6-дихлорфенол-индофенол-редуктазы в суспензии гепатоцитов на протяжении 180 мин проведения диализа, при одновременно низкой активности этих ферментов и АЛТ в су-

пернатанте суспензии гепатоцитов, свидетельствует о высокой функциональной активности и достаточной интактности гепатоцитов, возможности их использования в качестве биоматериала для диализного модуля к аппарату «Биоискусственная почка» с целью осуществления экстракорпоральной детоксикации.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» (договор № 16-29-07354/16).

Список литературы:

1. Zhao L.F., Pan X.P., Li L.J. Key challenges to the development of extracorporeal bioartificial liver support systems // Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 2012. Vol. 11. № 3. PP. 243-249.
2. Рябинин В.Е. Проблемы и перспективы создания экстракорпоральных систем поддержки функционального состояния печени // Биомед. химия. 2015. Т. 61. № 5. С. 545-559.
3. Sajiki T., Iwata H., Paek H.J., Tosha T., Fujita S., Ueda Y., Park Y.G., Zhu B., Satoh S., Ikai I., Yamaoka Y., Ikada Y. Morphologic studies of hepatocytes entrapped in hollow fibers of a bioartificial liver // ASAIO J. 2000. Vol. 46. № 1. PP. 49-55.
4. Seglen P.O. Methods in cell biology. – New York: Academic Press, 1976. PP. 29-83.
5. Карузина И.И., Арчаков А.И. Современные методы в биохимии. – М.: Издательство «Медицина», 1977. С. 49-62.
6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Издательство «Высшая школа», 1980. 272 с.
7. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей // Лаб. дело. 1984. Т. 19. № 3. С. 138-140.
8. Белкин А.Л., Осадчая Л.П. Определение концентрации аммиака в небольших количествах крови // Лаб. дело. 1977. Т. 12. № 3. С. 177.
9. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – М.: Издательство «Химия», 1970. 343 с.
10. Рябинин В.Е., Полевщикова Е.Е., Супрун В.И., Егоров А.П. Аппарат для альбуминовой и цитозольной детоксикации // Медицинская техника. 2014. № 3 (285). С. 14-17.

Вячеслав Евгеньевич Рябинин,
 д-р биолог. наук, профессор,
 кафедра биохимии,
 Елена Евгеньевна Полевщикова,
 ст. преподаватель,
 кафедра фармации и химии
 фармацевтического факультета,
 Павел Николаевич Пошков,
 ст. преподаватель,
 Сергей Анатольевич Пушкарев,
 канд. биолог. наук, ст. преподаватель,
 кафедра биохимии,
 Антон Иванович Синицкий,
 д-р мед. наук, доцент,
 кафедра фармации и химии
 фармацевтического факультета,
 Андрей Алексеевич Стасюк,
 ординатор,
 кафедра травматологии и ортопедии,
 Павел Олегович Платковский,
 лаборант,
 кафедра биохимии,
 ФГБОУ ВО «Южно-Уральский
 государственный медицинский университет»
 Минздрава России,
 г. Челябинск,
 e-mail: veryabinin@mail.ru