

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ CHANG LIVER В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

УДК 576.535:616.36–074

Поступила 20.01.2015 г.



Е.И. Черкасова, к.б.н., зав. лабораторией кафедры биомедицины¹;
М.С. Муртазалиева, к.м.н., зав. амбулаторным центром трансплантологии и гепатологии²;
Т.Н. Горшкова, зав. лабораторией²;
И.Л. Новожилов, студент кафедры биомедицины¹;
А.В. Мелешина, к.б.н., научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий³;
В.Е. Загайнов, д.м.н., главный специалист по хирургии²; зав. кафедрой хирургических болезней³;
Е.В. Загайнова, д.м.н., директор НИИ биомедицинских технологий³; зав. кафедрой биомедицины¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России, Н. Новгород, 603001, Нижне-Волжская набережная, 2;

³Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Иммortalизованная клеточная культура гепатоцитов Chang liver является одним из претендентов на использование в составе искусственных систем «биоискусственная печень».

Цель исследования — оценка возможности применения клеточной культуры Chang liver в качестве клеточного комплекта биореактора путем комплексного изучения биохимических показателей ее воздействия на сыворотку крови пациентов с заболеваниями печени различной этиологии.

Материалы и методы. Исследованы образцы сыворотки крови от двух групп пациентов: в первую группу «желтуха» (n=9) включены пациенты с механической желтухой, во вторую группу «цирроз» (n=10) — пациенты с циррозом печени и паренхиматозной желтухой. Для изучения воздействия клеточной культуры Chang liver на сыворотку крови пациентов конфлюэнтный монослой клеток инкубировали с образцами сыворотки крови при T=37°C и атмосфере 5% CO₂, в соотношении (2,0–2,1)·10⁵ клеток на 0,105 мл сыворотки крови в течение 12 ч. По завершении инкубации в сыворотках определяли значения основных биохимических показателей синтетической (альбумин, мочеви́на, транстриретин) и детоксикационной (фракции общего билирубина) функций, а также маркеров клеточной деструкции (печеночных трансаминаз, лактатдегидрогеназы). Изменение жизнеспособности клеток после воздействия на них сыворотки определяли методом МТТ-теста.

Результаты. Установлено, что комплексная оценка биохимических показателей синтетической и детоксикационной функций, проявляемых культурой Chang liver в отношении сывороток крови пациентов обеих групп, является наиболее информативной. Данная клеточная культура наиболее синтетически активна в отношении сывороток от пациентов группы «цирроз», в то время как у группы «желтуха» наблюдается уменьшение значений биохимических показателей этой функции. Детоксикационная активность, проявляемая культурой Chang liver и выражающаяся в динамике фракций билирубина, наблюдается в обеих группах пациентов, но в группе «цирроз» является наиболее выраженной, так как происходит в половине случаев. Биохимические составляющие сывороток, в свою очередь, также оказывают влияние на жизнедеятельность клеток. Установлено, что образцы сыворотки обеих групп пациентов ингибируют жизнедеятельность клеток практически в 50% случаев для каждой группы.

Заключение. Полученные результаты могут быть использованы для оценки эффективности применения различных клеточных культур в качестве модельной системы при разработке систем «биоискусственная печень». Культура клеток Chang liver, по результатам комплексной оценки, является наиболее активной по отношению к сывороткам крови пациентов группы «цирроз», с нарушениями синтетических и детоксикационных функций печени.

Ключевые слова: клеточная культура Chang liver; биоискусственная печень; печеночная недостаточность.

English

Complex Assessment of Functional Activity of Chang Liver Cell Culture in Blood Serum of Patients with Liver Diseases of Various Etiology

E.I. Cherkasova, PhD, Head of the Laboratory, Department of Biomedicine¹;

M.S. Murtazaliyeva, PhD, Head of the Outpatient Center of Transplantology and Hepatology²;

Для контактов: Черкасова Елена Игоревна, e-mail: cherkasova.el@yandex.ru

T.N. Gorshkova, Head of the Laboratory²;
I.L. Novozhilov, Student, Department of Biomedicine¹;
A.V. Meleshina, PhD, Researcher, Institute of Biomedical Technologies³;
V.E. Zagainov, MD, DSc, Chief Specialist in Surgery²; Head of the Department of Surgical Diseases³;
E.V. Zagaynova, MD, DSc, Director of Institute of Biomedical Technologies³;
 Head of the Department of Biomedicine¹

¹Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

²Volga District Medical Centre under Federal Medical and Biological Agency of Russia, 2 Nizhne-Volzhsкая naberezhnaya St., Nizhny Novgorod, 603001, Russian Federation;

³Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

Immortalized cell culture of hepatocytes, Chang liver, is one of the candidates for the use in “bioartificial liver” systems.

The aim of the investigation was to evaluate the possibility of using the Chang liver cell culture as a bioreactor cell kit making a complex study of biochemical parameters of its effect on the blood serum of patients with liver diseases of various etiology.

Materials and Methods. Samples of blood serum from two groups of patients were investigated: patients with obstructive jaundice were included in group 1 “jaundice” (n=9), group 2 “cirrhosis” (n=10) comprised patients with hepatic cirrhosis and hepatocellular jaundice. To study the effect of the cultured Chang liver cells on the patients’ blood serum, confluent monolayer of the cells was incubated with serum samples at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere with the ratio of (2.0–2.1)·10⁵ cells per 0.105 ml of serum during 12 h. On completion of the process, the values of the main biochemical parameters of synthetic (albumin, urea, transthyretin) and detoxifying (total bilirubin fraction) functions were determined, as well as markers of cell destruction (hepatic transaminases, lactate dehydrogenases). Viability cell changes after exposure to the serum were defined by MTT test.

Results. It was estimated, that complex assessment of biochemical parameters of synthetic and detoxifying functions of the Chang liver culture relative to the blood serum of the patients of both groups, is the most informative one. This cell culture is synthetically active to the most extent in respect to the serum of the patients in “cirrhosis” group, while in “jaundice” group the reduction of this biochemical parameter was observed. Detoxifying activity of the Chang liver culture, exhibited in the dynamics of bilirubin fractions, was noted in both groups, but in “cirrhosis” group it was most marked, as it occurred in half the cases. Biochemical components of the serum, in their turn, also influenced cell viability. Serum samples of both patient groups were found to inhibit the viability of the cells almost in 50% of cases for each group.

Conclusion. The results of complex assessment can be used to determine the efficacy of applying various cell cultures as a model system in the development of “bioartificial liver” systems. Chang liver cell culture, according to the complex assessment results, is most active relative to the blood serum of the “cirrhosis” group of patients with impairments of synthetic and detoxifying liver functions.

Key words: Chang liver cell culture; bioartificial liver; hepatic failure.

В настоящее время наиболее эффективным методом лечения хронической печеночной недостаточности является трансплантация печени — целого органа от посмертного донора или фрагмента от живого родственного или посмертного донора с расчетом на его гипертрофию в послеоперационном периоде. Однако доступность трансплантации печени резко ограничена как в нашей стране, так и за рубежом: каждый третий пациент не доживает до трансплантации в основном из-за дефицита донорских органов и длительного процесса поиска совместимого донора [1]. Для снижения уровня смертности среди пациентов с печеночной недостаточностью продолжают развиваться эффективные экстракорпоральные системы поддержки функции печени до момента ее трансплантации, способных осуществлять не только детоксикационную [1, 2], но и метаболическую, синтетическую и регуляторную функции печени [3, 4]. В связи с этим с 80-х годов XX в. активно разрабатываются системы поддержки, совмещающие функции перфузии крови/плазмы и клеточные технологии.

Разработаны системы поддержки печени с использованием живых культур гепатоцитов — биореакторы типа «искусственная печень». Клеточные культуры гепатоцитоподобных клеток в этих системах обогащают

плазму или кровь пациента продуктами синтеза (альбумин, желчные кислоты, факторы свертываемости крови и т.д.) и способны к частичной детоксикации. Для эффективного выполнения биорегулирующей и синтетической функций клетки должны соответствовать нескольким критериям: выполнять функции нормального гепатоцита печени (детоксикация, синтез биологически активных веществ), активно пролиферировать (для накопления минимального объема до 400 г биомассы) в составе реактора, функционировать в условиях постоянного контакта с плазмой больных с острой печеночной недостаточностью [5].

Известно несколько подходов к созданию эффективно действующих клеточных линий в составе биореактора, из которых использование immortalized и генетически модифицированных линий гепатоцитов животных и человека признается наиболее перспективным [6]. Подобные клетки отличаются неограниченной, но управляемой способностью к делению и сохраняют основные биологические характеристики и функции первичных гепатоцитов [7]. Используются различные immortalized клеточные линии гепатоцитов: линия PICM-19 из клеток 8-дневного эмбриона свиньи [8], человеческие immortalized линии гепа-

тоцитоподобных клеток HepZ [9], HepG2 [10], sBAL111 [11]. Применяется также линия Chang liver, созданная в 1954 г. предположительно путем контаминации нормальных гепатоцитов печени клетками линии HeLa [12]. Исследователи высказывают различные мнения о возможности и допустимости использования данной линии в качестве модели нормального гепатоцита из-за ее онкогенного потенциала [13], однако достаточное число научных групп, занимающихся проблемой создания биореакторов «искусственная печень», рассматривают линию Chang liver как одного из претендентов на использование в составе искусственных систем [14].

С момента появления первых биореакторов прошло более двух десятилетий. За это время найдено много технических решений, усовершенствованы подходы к культивированию клеток. Созданы системы, прошедшие клинические испытания, и уже существует система ELAD (Vital Therapies, Inc., США), применяемая в клинике [15]. Но нерешенными остались многие проблемы в области клеточных технологий, в том числе связанные с увеличением долговечности культур гепатоцитов. Для повышения срока сохранения функциональности гепатоцитов ведутся исследования по созданию биоактивных матриц, поиск новых инженерных решений в области систем снабжения клеток кислородом и необходимыми веществами.

Цель исследования — оценка возможности использования клеточной культуры Chang liver в качестве клеточного комплекта биореактора путем комплексного изучения биохимических показателей ее воздействия на сыворотку крови пациентов с заболеваниями печени различной этиологии.

Материалы и методы. В работе использована клеточная линия Chang liver (ATCC®CCL-13™; НИИ вирусологии РАМН, Россия). Клетки культивировали в среде ДМЕМ («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C и атмосфере 5% CO₂, на каждом этапе пассирования клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко», Россия). Подсчет клеток осуществляли стандартным методом с использованием камеры Горяева.

Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ-теста, основанным на способности митохондриальных

дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ). Для этого готовили матричный раствор МТТ (с концентрацией 5 мг/мл в неполной клеточной среде ДМЕМ). Полученный раствор добавляли в лунки 96-луночного планшета в соотношении 1:10 по отношению к объему ростовой среды. Инкубировали 3 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. Затем жидкость удаляли, добавляли в каждую лунку по 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксида), после чего пипетировали для получения однородного окрашивания и считали оптическую плотность на планшетном ридере EMax Plus (Molecular Devices, США), используя фильтр на 540–590 нм в качестве основного, а на 630–690 нм — в качестве корректирующего. Для получения сывороток кровь пациентов собирали с использованием вакуумной системы забора крови S-Monovette (Sarstedt, Германия), смешивали с антикоагулянтом, после завершения процесса свертывания сгусток центрифугировали (10 мин, 3000 об./мин), надосадочную фракцию использовали при проведении экспериментов. Забор крови пациентов, получение сывороток, хранение и определение биохимических показателей осуществляли в клинической лаборатории Приволжского окружного медицинского центра ФМБА России. Определение биохимических параметров сывороток крови производили на автоматическом анализаторе KONELAB 20 (Thermo Electron, Финляндия) с применением наборов для определения альбумина, мочевины, аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), фракций билирубина (Analyticon Biotechnologies AG, Германия) и набора для определения транстирети-на (Thermo Fisher Scientific, Финляндия).

Были исследованы образцы сыворотки крови от двух групп пациентов с заболеваниями печени различной этиологии. Их забирали однократно, до начала лечения основного заболевания. В группу «желтуха» включены 9 пациентов (5 мужчин и 4 женщины) с клиническими и лабораторными проявлениями механической желтухи вследствие механической обструкции внепеченочных желчных протоков (рак головки поджелудочной железы, метастатическое поражение ворот печени, холедохолитиаз). Средний возраст пациентов составил 60 лет, продолжительность заболевания — 1–3 мес. В группу «цирроз» включены 10 пациентов (5 мужчин и 5 женщин) с циррозом печени различной этиологии. Образцы сыворотки брали при постановке пациентов в Лист ожидания трансплантации печени. Средний возраст пациентов составил 42 года, продолжительность заболевания 8 мес–18 лет (в среднем 4 года). Нумерацию образцов сывороток пациентов (П-1–П-20) проводили по мере их поступления для выполнения исследований, поэтому произошла «разбивка» нумерации в группах. Образец сыворотки П-9 из группы «желтуха» был исклю-

Т а б л и ц а 1

Основные биохимические показатели сывороток крови пациентов с заболеваниями печени

Показатели	Норма	Группа «желтуха» (n=9)	Группа «цирроз» (n=10)
Альбумин, г/л	35,0–52,0	24,6–52,3	15,6–38,3
Транстиретин, г/л	0,2–0,4	0,0–0,3	0,1–0,2
Мочевина, ммоль/л	1,7–8,3	2,0–20,9	1,9–17,4
Билирубин общий, мкмоль/л	5,0–21,0	62,9–1062,7	16,5–653,4
Билирубин связанный, мкмоль/л	0,0–7,0	30,4–603,3	5,9–307,5
Билирубин несвязанный, мкмоль/л	5,0–14,0	10,7–526,5	10,9–292,2

чен из-за нарушения условий криохранения. Основные биохимические показатели сывороток крови пациентов обеих групп представлены в табл. 1.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия)) и одобрено Этическим комитетом НижГМА. От каждого пациента получено информированное согласие.

Для исследования воздействия клеточной культуры Chang liver на сыворотки крови пациентов конфлюэнтный монослой клеток инкубировали с сыворотками крови при $T=37^{\circ}\text{C}$, атмосфере 5% CO_2 , в соотношении $(2,0-2,1) \cdot 10^5$ клеток к 0,105 мл сыворотки крови в течение 12 ч. Было выбрано максимальное время инкубации гепатоцитов с сыворотками, при котором клетки не утрачивали своих метаболических функций [16].

По завершении инкубации в сыворотках определяли значения основных биохимических показателей детоксикационной и синтетической функций, а также маркеров клеточной деструкции. Изменение жизнеспособности клеток после воздействия на них сывороток определяли методом МТТ-теста.

Синтетическую активность гепатоцитов определяли по увеличению содержания альбумина (г/л), мочевины (ммоль/л) и транстретина (г/л).

Детоксикационную активность гепатоцитов определяли по содержанию общего билирубина (мкмоль/л), а также по динамике его фракций: связанного (прямого) и несвязанного (непрямого) билирубина. Прямореагирующий билирубин — это билирубин-глиукуронид, который называют связанным билирубином, поскольку его свободные молекулы соединяются в гепатоцитах печени с радикалом глюкуронида. Так как получающееся комплексное соединение является водорастворимым, то в норме происходит его экскреция через желчные пути. Непрямо реагирующий билирубин — это несвязанный билирубин, так как он не соединяется с глюкуронидом в печени. В плазме этот тип билирубина образует комплексное соединение с альбумином. Таким образом, об активной детоксикационной работе гепатоцитов свидетельствует снижение содержания общего билирубина на фоне увеличения количества связанного билирубина и уменьшения количества несвязанного билирубина в сы-

воротках крови после воздействия клеточной культуры.

Цитотоксичность сывороток по отношению к клеточным культурам определяли по изменению содержания маркеров клеточной деструкции — АсАТ (ед./л), АлАТ (ед./л) и ЛДГ (ед./л). Негативное воздействие сывороток на клетки приводило к увеличению значений этих показателей, а уменьшение значений или незначимые изменения свидетельствовали об отсутствии влияния на жизнедеятельность клеток.

Данные, полученные в экспериментах, были обработаны статистически с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel и Graf Pad. Результаты представлены в виде $M \pm \sigma$ (стандартное отклонение среднего). Статистическая значимость различий средних определялась по критерию Манна-Уитни.

Результаты. Установлено, что статистически значимое повышение уровня содержания альбумина произошло в трех образцах сыворотки группы «цирроз» (П-2, П-6 и П-10), однако значение нормы по альбумину не достигнуто ни в одном случае (рис. 1). Повышение уровня мочевины отмечено в образцах П-10, П-16 и П-18, а транстретина — в образце П-6 (табл. 2).

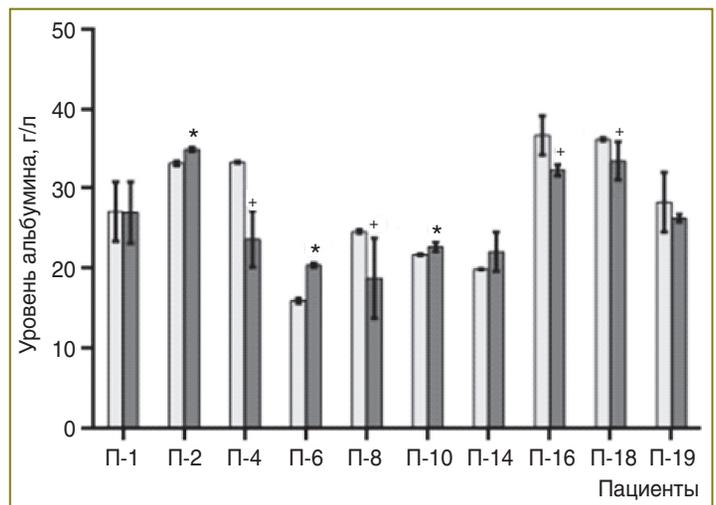


Рис. 1. Изменение уровня альбумина в сыворотках крови пациентов группы «цирроз» после инкубации с клеточной культурой (светлое поле — до воздействия, темное поле — после воздействия); * — статистически значимое увеличение уровня альбумина по сравнению с исходным у данного пациента; + — статистически значимое уменьшение уровня альбумина по сравнению с исходным у данного пациента

Таблица 2

Изменения биохимических показателей синтеза в сыворотках крови пациентов после инкубации с клеточной культурой

Показатели	Группа «желтуха»									Группа «цирроз»									
	П-3	П-5	П-7	П-11	П-12	П-13	П-15	П-17	П-20	П-1	П-2	П-4	П-6	П-8	П-10	П-14	П-16	П-18	П-19
Альбумин	↓	↓	↓	↓	↓		↓			↑	↓	↑	↓	↑		↓	↓		
Мочевина					↓							↓	↓		↑		↑	↑	
Транстретин		↓	↓				↓		↓	↓	↓	↑						↓	↓

Примечание: показаны статистически значимые изменения уровня каждого показателя по сравнению с исходным значением у данного пациента: ↓ — уменьшение, ↑ — увеличение.

Таблица 3

Изменения биохимических показателей детоксикации в сыворотках крови пациентов после инкубации с клеточной культурой

Показатели	Группа «желтуха»									Группа «цирроз»											
	П-3	П-5	П-7	П-11	П-12	П-13	П-15	П-17	П-20	П-1	П-2	П-4	П-6	П-8	П-10	П-14	П-16	П-18	П-19		
Связанный билирубин, %:																					
исходный	55,2±1,2	63,3±0,9	60,9±1,3	55,0±0,5										37,0±0,3	46,7±0,4	56,1±0,7				52,9±0,9	33,6±0,5
после инкубации	56,1±1,4	69,2±1,2	66,2±1,3	53,4±0,5										40,1±0,4	50,2±0,5	60,2±0,6				63,7±0,8	39,3±0,7
Несвязанный билирубин, %:																					
исходный	44,8±0,3	36,7±1,2	39,1±1,2	45,0±0,5										63,0±0,9	53,3±0,3	43,9±0,9				47,1±1,2	66,4±1,2
после инкубации	43,9±0,3	30,8±0,6	33,8±0,8	46,6±0,4										59,0±0,5	49,0±0,9	39,8±1,2				36,3±0,8	60,7±0,5
Общий билирубин	↓	↓	↓	↓										↓	↓	↓				↓	↓

Примечание: показаны статистически значимые изменения уровня связанного и несвязанного билирубина (в процентах от уровня общего билирубина) у данного пациента и уровня общего билирубина по сравнению с исходным значением у данного пациента: ↓ — уменьшение.

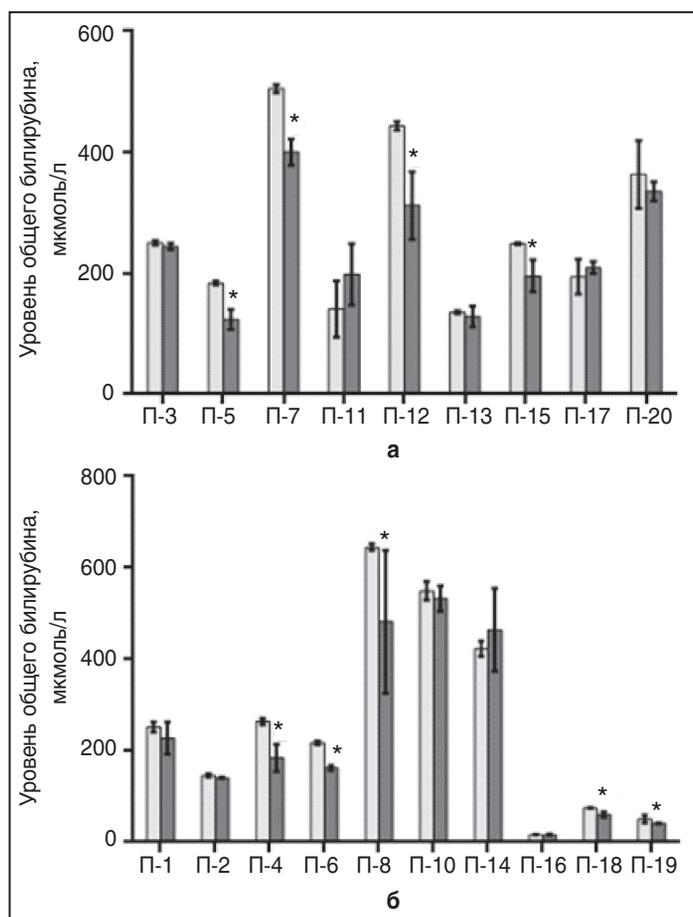


Рис. 2. Изменение уровня общего билирубина в сыворотках крови у пациентов группы «желтуха» (а) и группы «цирроз» (б) после инкубации с клеточной культурой (светлое поле — до воздействия, темное поле — после воздействия); * — статистически значимое снижение уровня общего билирубина по сравнению с исходным у данного пациента

Следует также отметить, что положительная динамика синтетической функции проявилась при культивировании клеточной культуры только с сыворотками пациентов группы «цирроз», в то время как в сыворотках группы «желтуха» наблюдается только статистически значимое уменьшение значений биохимических показателей синтетической функции.

В отношении детоксикационной активности, проявляемой культурой *Chang liver*, установлено, что статистически значимое снижение уровня общего билирубина происходит в 4 образцах сыворотки из группы «желтуха» — П-5, П-7, П-12 и П-15. При этом в 3 образцах (П-5, П-7 и П-15) отмечаются положительные изменения в процентном составе его фракций: одновременное увеличение уровня связанного билирубина и уменьшение уровня несвязанного (табл. 3). Такая же динамика фракций билирубина на фоне достоверного снижения уровня общего билирубина отмечена в 5 образцах из группы «цирроз» — П-4, П-6, П-8, П-18 и П-19. Следует отметить, что уменьшение уровня общего билирубина в сыворотках после воздействия культуры клеток не зависит от первоначального значения этого показателя — снижение происходит как в образцах с низкими значениями уровня общего билирубина (П-18 и П-19), так и с уровнями, резко превышающими норму — П-7, П-8 и П-12 (рис. 2).

Биохимические составляющие сывороток, в свою очередь, также оказывали влияние на жизнедеятельность гепатоцитов. Установлено, что сыворотки обеих групп пациентов ингибировали жизнедеятельность клеток, при этом наиболее сильное негативное воздействие оказывали сыворотки пациентов группы «цирроз»: уровень ЛДГ увеличился в образцах всех пациентов, а уровень

Таблица 4

Изменения биохимических показателей маркеров клеточной деструкции в сыворотках крови пациентов после инкубации с клеточной культурой

Показатели	Группа «желтуха»									Группа «цирроз»									
	П-3	П-5	П-7	П-11	П-12	П-13	П-15	П-17	П-20	П-1	П-2	П-4	П-6	П-8	П-10	П-14	П-16	П-18	П-19
АсАТ	↑	↓	↓	↑	↓	↑									↑	↑	↑		
АлАТ	↑			↑	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↑			↑	↑	↑		↑	
ЛДГ	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

Примечание: показаны статистически значимые изменения уровня каждого показателя по сравнению с исходным значением у данного пациента: ↓ — уменьшение, ↑ — увеличение.

АлАТ — в половине случаев. Сыворотки крови пациентов группы «желтуха» не оказывали значимого негативного воздействия на культуру клеток (табл. 4). Кроме того, методом МТТ-теста определено изменение жизнеспособности клеток после воздействия образцов сывороток обеих групп (рис. 3). Установлено, что статистически значимое снижение жизнеспособности клеток происходит после инкубации с пятью из девяти образцов группы «желтуха» и с шестью из десяти — группы «цирроз».

Обсуждение. Для изучения функционирования клеток в условиях биореактора создаются различные модели, отличающиеся происхождением гепатоцитов (человеческие иммортализованные, крысиные первичные), условиями культивирования (монослой, сфероиды на подложке, скаффолды), происхождением сывороток крови (человеческая, свиная) и временем воздействия сывороток на клеточные культуры [17, 18]. Используемая нами в работе клеточная культура Chang liver исторически применяется в качестве гепатоцитоподобной тест-системы для проверки цитотоксичности различных искусственных и естественных препаратов [19, 20]. По мнению некоторых авторов [14], линия Chang liver может применяться и как клеточная составляющая в искусственных системах биореакторов. Однако целью нашего исследования являлось изучение воздействия клеточной культуры Chang liver на сыворотки крови пациентов с заболеваниями печени различной этиологии.

В группу «желтуха» вошли пациенты с механической желтухой и развившейся печеночной недостаточностью разной степени выраженности. Это состояние характеризуется нарушением оттока желчи и обезвреживания непрямого билирубина: снижением его элиминации из крови, нарушением конъюгации в печени и выведением в виде прямого билирубина. При этом

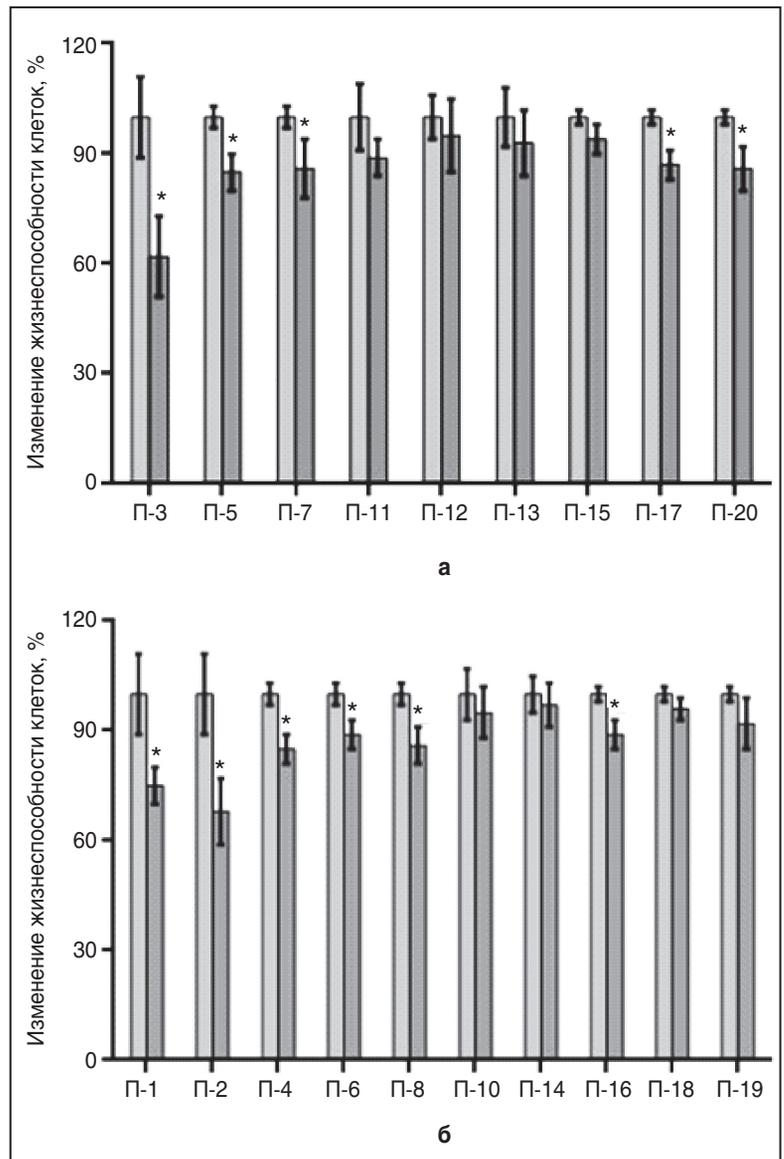


Рис. 3. Изменение уровня жизнеспособности клеток после инкубации с сыворотками крови у пациентов группы «желтуха» (а) и группы «цирроз» (б) (светлое поле — жизнеспособность клеток после инкубации в полной питательной среде, темное поле — жизнеспособность клеток после инкубации в сыворотках крови пациентов); * — статистически значимое уменьшение уровня жизнеспособности клеток

происходит нарушение детоксикационной функции печени. Сыворотки крови этих больных характеризуются высоким содержанием билирубина и его фракций; разрушение гепатоцитов приводит к повышению концентрации трансаминаз — АсАТ, АлАТ, а также ЛДГ. Кроме того, наблюдается снижение содержания альбумина в результате нарушения синтетической функции. Нарушение синтетической функции возможно в результате как депрессии клеточных функций, так и уменьшения числа функционирующих клеток.

Группа «цирроз» объединяла пациентов с циррозом печени класса С по Чайлд–Пью, находящихся в Листе ожидания трансплантации печени. Цирроз печени — заболевание, характеризующееся очаговым некрозом печеночной паренхимы с последующим замещением фокусов некроза соединительной тканью. Очаги регенерации из функционирующих клеток не способны компенсировать утраченную функцию печеночной паренхимы. Длительное течение заболевания приводит к развитию печеночной недостаточности в виде нарушения синтетических и детоксикационных функций печени. В этом случае для сывороток крови пациентов характерно значительное снижение уровня альбумина, а также более низкие показатели билирубина и его фракций в сравнении с группой «желтуха».

В подавляющем большинстве работ, посвященных данной тематике, в качестве функциональной составляющей эффективной работы клеточных культур используются показатели либо синтетической (альбумин, мочевины) [21], либо детоксикационной (аммиак) [22] функций. В нашей работе использована комплексная оценка биохимических показателей синтетической и детоксикационной функций, проявляемых культурой Chang liver, что является наиболее информативным для оценки эффективности воздействия клеток на сыворотки крови и определения жизнеспособности самих клеток. При помощи этой модели была исследована активность клеточной культуры в отношении образцов сывороток крови пациентов с печеночной недостаточностью.

Культура Chang liver проявляет синтетическую активность в сыворотках пациентов группы «цирроз», при этом сыворотки пациентов группы «желтуха» не стимулируют синтетическую функцию клеток культуры.

Детоксикационная активность, проявляемая культурой Chang liver и выражающаяся в снижении уровня общего билирубина и положительной динамике его фракций, наблюдается в обеих группах пациентов, но в группе «цирроз» она наиболее выражена, так как происходит в половине случаев. Биохимические составляющие сывороток оказывают негативное влияние на жизнедеятельность клеток культуры. Установлено, что сыворотки ингибируют жизнедеятельность клеток практически в 50% случаев в каждой группе.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что культура клеток Chang liver является наиболее активной по отношению к сывороткам крови пациентов группы «цирроз», где изначально наблюдаются как значительное снижение уровня альбумина, так и более низкие показатели билирубина и его фракций.

Полученные результаты частично коррелируют с данными работы G.A. Nibourg с соавт. [23], в которой авторы исследовали влияние цитотоксических компонентов плазмы крови крыс с индуцированной острой печеночной недостаточностью на клеточную линию HераRG в модельных условиях биореактора. Авторы показали, что клетки HераRG способны выполнять синтетическую функцию (синтез мочевины, липопротеинов), находясь под воздействием плазмы, но также проявляют снижение жизнеспособности после 10 ч нахождения под воздействием.

Заключение. Полученные результаты комплексной оценки основных биохимических показателей сывороток крови могут быть применены для определения эффективности использования различных клеточных культур в качестве модельных при разработке систем «биоискусственная печень», а также для оценки состояния клеток в составе биореактора. Иммутиализованная клеточная культура гепатоцитов Chang liver является одним из претендентов на использование в составе искусственных систем «биоискусственная печень».

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №13-04-97141 «Исследование функциональной активности клеточных популяций гепатоцитов для создания биореактора «искусственная печень».

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Stockmann H.B., IJzermans J.N. Prospects for the temporary treatment of acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14(2): 195–203, <http://dx.doi.org/10.1097/00042737-200202000-00016>.
2. Sauer I.M., Zeilinger K., Pless G., Kardassis D., Theruvath T., Pascher A., Goetz M., Neuhaus P., Gerlach J.C. Extracorporeal liver support based on primary human liver cells and albumin dialysis — treatment of a patient with primary graft non-function. *J Hepatol* 2003; 39(4): 649–653, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00348-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00348-9).
3. Рябинин В.Е., Грбовой С.И., Ткачев С.И., Кравчук И.Е. Исследование свойств цитозоля печени и эффективности способа его использования в аппарате «биологическая вспомогательная печень». *Вестник РАМН* 2002; 3: 21–24.
4. Рябинин В.Е., Супрун В.И., Ткачев С.И. Использование искусственных систем жизнеобеспечения и клеточных технологий при лечении заболеваний печени. Челябинск: Юж.-Урал. науч. центр РАМН; 2007.
5. Pan X.-P., Li L.-J. Advances in cell sources of hepatocytes for bioartificial liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012; 11(6): 594–605, [http://dx.doi.org/10.1016/S1499-3872\(12\)60230-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1499-3872(12)60230-6).
6. Priesner C., Hesse F., Windgassen D., Klocke R., Paul D., Wagner R. Liver-specific physiology of immortal, functionally differentiated hepatocytes and of deficient hepatocyte-like variants. *In Vitro Cell Dev Biol* 2004; 40(10): 318–330, <http://dx.doi.org/10.1290/0404031.1>.
7. Matsumura T., Takesue M., Westerman K.A., Okitsu T., Sakaguchi M., Fukazawa T., Totsugawa T.,

Noguchi H., Yamamoto S., Stolz D.B., Tanaka N., Leboulch P., Kobayashi N. Establishment of an immortalized human-liver endothelial cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation* 2004; 77(9): 1357–1365, <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000124286.82961.7e>.

8. Sussman N.L., Chong M.G., Koussayer T., He D.E., Shang T.A., Whisennand H.H., Kelly J.H. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 1992; 16(1): 60–65, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840160112>.

9. Werner A., Duvar S., Müthing J., Büntemeyer H., Lünsdorf H., Strauss M., Lehmann J. Cultivation of immortalized human hepatocytes HepZ on macroporous Cultispher G microcarriers. *Biotechnol Bioeng* 2000; 68(1): 59–70, [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(20000405\)68:1<59::aid-bit7>3.0.co;2-n](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(20000405)68:1<59::aid-bit7>3.0.co;2-n).

10. Hsieh S., Lin P.-Y., Hsieh C.-W., Li I.-T., Hsieh S.-L., Wu C.-C., Huang Y.-S., Wang H.-M., Tu L.-W., Cheng K.-H., Wang H.-Y.J., Wu D.-C. Probing the adhesion of hepatocellular carcinoma HepG2 and SK-Hep-1 cells. *J Chin Chem Soc* 2012; 59(8): 929–933, <http://dx.doi.org/10.1002/jccs.201200129>.

11. Deurholt T., van Til N.P., Chhatta A.A., ten Bloemendaal L., Schwartlander R., Payne C., Plevris J.N., Sauer I.M., Chamuleau R.A., Elferink R.P., Seppen J., Hoekstra R. Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes. *BMC Biotechnol* 2009; 9: 89–104, <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-9-89>.

12. Qiang Gao, Xiao-Ying Wang, Jian Zhou, Jia Fan. Cell line misidentification: The case of the Chang liver cell line. *Hepatology* 2011; 54(5): 1894–1895, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24475>.

13. Talbot N.C., Caperna T.J., Wells K.D. The PICM-19 cell line as an in vitro model of liver bile ductules: effects of cAMP inducers, biopeptides and pH. *Cells Tissues Organs* 2002; 171(2–3): 99–116, <http://dx.doi.org/10.1159/000063704>.

14. Yang T., Li C., Zhang L., Li M., Zhou P. A promising hepatocyte-like cell line, CCL-13, exhibits good liver function both in vitro and in an acute liver failure model. *Transplant Proc* 2013; 45(2): 688–694, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.11.012>.

15. Ellis F.J., Hughes R.D., Wendon J.A., Dunne J., Langley P.G., Kelly J.H., Gislason G.T., Sussman N.L., Williams R. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24(6): 1446–1451, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510240625>.

16. Török É., Vogel C., Lütgehetmann M., Ma P.X., Dandri M., Petersen J., Burda M.R., Siebert K., Düllmann J., Rogiers X., Pollok J.M. Morphological and functional analysis of rat hepatocyte spheroids generated on poly(L-lactic acid) polymer in a pulsative flow bioreactor. *Tissue Eng* 2006; 12(7): 1881–1890, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2006.12.1881>.

17. Hoekstra R., Nibourg G.A., van der Hoeven T.V., Ackermans M.T., Hakvoort T.B., van Gulik T.M., Oude Elferink R.P., Chamuleau R.A. The effect of rat acute-liver-failure plasma on HepaRG cells. *Int J Artif Organs* 2012; 35(11): 1006–1014, <http://dx.doi.org/10.5301/ijao.5000121>.

18. Lee J.-H., Lee D.-H., Park J.-K., Kim S.-K., Kwon C.H.D., Lee S.-K. Effect of fulminant hepatic failure porcine plasma supplemented with essential components on encapsulated rat hepatocyte spheroids. *Transplant Proc* 2012; 44(4): 1009–1011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.01.106>.

19. Otang W.M., Grierson D.S., Ndip R.N. Cytotoxicity of three South African medicinal plants using the Chang liver cell line. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2014; 11(2): 324–329, <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v11i2.16>.

20. Trinh M.D., Ngo D.H., Tran D.K., Tran Q.T., Vo T.S., Dinh M.H., Ngo D.N. Prevention of H₂O₂-induced oxidative stress in Chang liver cells by 4-hydroxybenzyl-chitooligomers. *Carbohydr Polym* 2014; 103: 502–509, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.061>.

21. Yang Y., Li J., Pan X., Zhou P., Yu X., Cao H., Wang Y., Li L. Co-culture with mesenchymal stem cells enhances metabolic functions of liver cells in bioartificial liver system. *Biotechnol Bioeng* 2013; 110(3): 958–968, <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24752>.

22. Guoliang L., Anye Z., Lifu Z., Xiaoping P., Yimin Z., Chengbo Y., Yuemei C., Lanjuan L. Effects of plasma from acute-on-chronic liver failure patients on immortalized human hepatocytes in vitro. *Hepatogastroenterology* 2011; 58(109): 1328–1333.

23. Nibourg G.A., Hoekstra R., van der Hoeven T.V., Ackermans M.T., Hakvoort T.B., van Gulik T.M., Chamuleau R.A. Effects of acute-liver-failure-plasma exposure on hepatic functionality of HepaRG-AMC-bioartificial liver. *Liver Int* 2013; 33(4): 516–524, <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12090>.

References

1. Stockmann H.B., IJzermans J.N. Prospects for the temporary treatment of acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14(2): 195–203, <http://dx.doi.org/10.1097/00042737-200202000-00016>.

2. Sauer I.M., Zeilinger K., Pless G., Kardassis D., Theruvath T., Pascher A., Goetz M., Neuhaus P., Gerlach J.C. Extracorporeal liver support based on primary human liver cells and albumin dialysis — treatment of a patient with primary graft non-function. *J Hepatol* 2003; 39(4): 649–653, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00348-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00348-9).

3. Ryabinin V.E., Grobovoy S.I., Tkachev S.I., Kravchuk I.E. The study of hepatic cytosolic properties and the efficiency of its use in biological liver assist device. *Vestnik RAMN* 2002; 3: 21–24.

4. Ryabinin V.E., Suprun V.I., Tkachev S.I. *Ispol'zovanie iskusstvennykh sistem zhizneobespecheniya i kletchnykh tekhnologiy pri lechenii zabolevaniy pecheni* [Application of artificial life support systems and cellular technologies in hepatotherapy]. Chelyabinsk: Yuzh.-Ural. nauch. tsentr RAMN; 2007.

5. Pan X.-P., Li L.-J. Advances in cell sources of hepatocytes for bioartificial liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012; 11(6): 594–605, [http://dx.doi.org/10.1016/S1499-3872\(12\)60230-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1499-3872(12)60230-6).

6. Priesner C., Hesse F., Windgassen D., Klocke R., Paul D., Wagner R. Liver-specific physiology of immortal, functionally differentiated hepatocytes and of deficient hepatocyte-like variants. *In Vitro Cell Dev Biol* 2004; 40(10): 318–330, <http://dx.doi.org/10.1290/0404031.1>.

7. Matsumura T., Takesue M., Westerman K.A., Okitsu T., Sakaguchi M., Fukazawa T., Totsugawa T., Noguchi H., Yamamoto S., Stolz D.B., Tanaka N., Leboulch P., Kobayashi N. Establishment of an immortalized human-liver endothelial cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation* 2004; 77(9): 1357–1365, <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000124286.82961.7e>.

8. Sussman N.L., Chong M.G., Koussayer T., He D.E.,

Shang T.A., Whisennand H.H., Kelly J.H. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 1992; 16(1): 60–65, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840160112>.

9. Werner A., Duvar S., Müthing J., Büntemeyer H., Lünsdorf H., Strauss M., Lehmann J. Cultivation of immortalized human hepatocytes HepZ on macroporous CultiSpher G microcarriers. *Biotechnol Bioeng* 2000; 68(1): 59–70, [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(20000405\)68:1<59::aid-bit7>3.0.co;2-n](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(20000405)68:1<59::aid-bit7>3.0.co;2-n).

10. Hsieh S., Lin P.-Y., Hsieh C.-W., Li I.-T., Hsieh S.-L., Wu C.-C., Huang Y.-S., Wang H.-M., Tu L.-W., Cheng K.-H., Wang H.-Y.J., Wu D.-C. Probing the adhesion of hepatocellular carcinoma HepG2 and SK-Hep-1 cells. *J Chin Chem Soc* 2012; 59(8): 929–933, <http://dx.doi.org/10.1002/jccs.201200129>.

11. Deurholt T., van Til N.P., Chhatta A.A., ten Bloemendaal L., Schwartlander R., Payne C., Plevris J.N., Sauer I.M., Chamuleau R.A., Elferink R.P., Seppen J., Hoekstra R. Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes. *BMC Biotechnol* 2009; 9: 89–104, <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-9-89>.

12. Qiang Gao, Xiao-Ying Wang, Jian Zhou, Jia Fan. Cell line misidentification: The case of the Chang liver cell line. *Hepatology* 2011; 54(5): 1894–1895, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.24475>.

13. Talbot N.C., Caperna T.J., Wells K.D. The PICM-19 cell line as an in vitro model of liver bile ductules: effects of cAMP inducers, biopeptides and pH. *Cells Tissues Organs* 2002; 171(2–3): 99–116, <http://dx.doi.org/10.1159/000063704>.

14. Yang T., Li C., Zhang L., Li M., Zhou P. A promising hepatocyte-like cell line, CCL-13, exhibits good liver function both in vitro and in an acute liver failure model. *Transplant Proc* 2013; 45(2): 688–694, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.11.012>.

15. Ellis F.J., Hughes R.D., Wendon J.A., Dunne J., Langley P.G., Kelly J.H., Gislason G.T., Sussman N.L., Williams R. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24(6): 1446–1451, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510240625>.

16. Török É., Vogel C., Lütgehetmann M., Ma P.X., Dandri M., Petersen J., Burda M.R., Siebert K., Düllmann J., Rogiers X., Pollok J.M. Morphological and functional analysis of rat hepatocyte spheroids generated on poly(L-lactic acid) polymer in a pulsative flow bioreactor. *Tissue Eng* 2006; 12(7): 1881–1890, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2006.12.1881>.

17. Hoekstra R., Nibourg G.A., van der Hoeven T.V., Ackermans M.T., Hakvoort T.B., van Gulik T.M., Oude Elferink R.P., Chamuleau R.A. The effect of rat acute-liver-failure plasma on HepaRG cells. *Int J Artif Organs* 2012; 35(11): 1006–1014, <http://dx.doi.org/10.5301/ijao.5000121>.

18. Lee J.-H., Lee D.-H., Park J.-K., Kim S.-K., Kwon C.H.D., Lee S.-K. Effect of fulminant hepatic failure porcine plasma supplemented with essential components on encapsulated rat hepatocyte spheroids. *Transplant Proc* 2012; 44(4): 1009–1011, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.01.106>.

19. Otang W.M., Grierson D.S., Ndip R.N. Cytotoxicity of three South African medicinal plants using the Chang liver cell line. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2014; 11(2): 324–329, <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v11i2.16>.

20. Trinh M.D., Ngo D.H., Tran D.K., Tran Q.T., Vo T.S., Dinh M.H., Ngo D.N. Prevention of H₂O₂-induced oxidative stress in Chang liver cells by 4-hydroxybenzyl-chitooligomers. *Carbohydr Polym* 2014; 103: 502–509, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.061>.

21. Yang Y., Li J., Pan X., Zhou P., Yu X., Cao H., Wang Y., Li L. Co-culture with mesenchymal stem cells enhances metabolic functions of liver cells in bioartificial liver system. *Biotechnol Bioeng* 2013; 110(3): 958–968, <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24752>.

22. Guoliang L., Anye Z., Lifu Z., Xiaoping P., Yimin Z., Chengbo Y., Yuemei C., Lanjuan L. Effects of plasma from acute-on-chronic liver failure patients on immortalized human hepatocytes in vitro. *Hepatogastroenterology* 2011; 58(109): 1328–1333.

23. Nibourg G.A., Hoekstra R., van der Hoeven T.V., Ackermans M.T., Hakvoort T.B., van Gulik T.M., Chamuleau R.A. Effects of acute-liver-failure-plasma exposure on hepatic functionality of HepaRG-AMC-bioartificial liver. *Liver Int* 2013; 33(4): 516–524, <http://dx.doi.org/10.1111/liv.12090>.