

УДК 612.647.035:664.644.7:616.36-002-092.9

Д.В. Грицай, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко,
Ю.А. Петренко, В.В. Волина, Н.А. Волкова, А.Ю. Петренко*

Структурное состояние печени после имплантации макропористых матриц с криоконсервированными клетками фетальной печени крысам с экспериментальной печеночной недостаточностью

UDC 612.647.035:664.644.7:616.36-002-092.9

D.V. Gritsay, A.S. Lebedinskiy, O.V. Ochenashko,
Yu.A. Petrenko, V.V. Volina, N.A. Volkova, A.Yu. Petrenko*

Liver Structure in Rats with Experimental Hepatic Failure Following Implantation of Macroporous Carrier Seeded with Cryopreserved Fetal Liver Cells

Реферат: В работе исследовано состояние биоконструкций на основе криоконсервированных клеток фетальной печени (КФП), заселенных в макропористые альгинат-желатиновые матрицы (АЖМ), и их влияние на структуру печени после имплантации крысам с печеночной недостаточностью. В качестве носителей КФП крыс применяли широкопористые криогелевые АЖМ. Дополнительная альгинатная оболочка, сформированная вокруг АЖМ, предотвращала заселение матриц клетками реципиента *in vivo* и не влияла на жизнеспособность и экспансию КФП *in vitro*. Структура биоконструкции при имплантации сохранялась не менее 28 суток. Экспериментальное повреждение печени у крыс моделировали путем введения ингибитора пролиферации гепатоцитов 2-ацетиламинофлуорена в сочетании с частичной гепатэктомией, что вызывало выраженные изменения структуры органа в виде нарушения трабекулярного строения паренхимы и дуктулярной реакции в портальной и перипортальной зонах. Имплантация АЖМ с альгинатной оболочкой, содержащих КФП, в сальник крыс с экспериментальной печеночной недостаточностью приводила к органотипическому восстановлению структуры патологически измененной печени. Показано, что альгинатная оболочка вокруг АЖМ обеспечивает изоляцию заселенных клеток, а КФП, заселенные в широкопористые АЖМ, оказывают терапевтический эффект при имплантации животным с печеночной недостаточностью.

Ключевые слова: печень, альгинат-желатиновые матрицы, криоконсервированные клетки фетальной печени, экспериментальная печеночная недостаточность, имплантация.

Реферат: У роботі досліджено стан біоконструкцій на основі криоконсервованих клітин фетальної печінки (КФП), заселених у макропористі альгинат-желатинові матриці (АЖМ), та їх вплив на структуру печінки після імплантації щурам із печінковою недостатністю. В якості носіїв КФП щурів застосовували широкопористі криогелеві АЖМ. Додаткова альгинатна оболонка, яка сформувалася навколо АЖМ, запобігала заселенню матриць клітинами реципієнта *in vivo* та не впливала на життєздатність та експансію КФП *in vitro*. Структура біоконструкції при імплантації зберігалась не менш 28 діб. Експериментальне ураження печінки у щурів моделювали шляхом введення інгібітору проліферації гепатоцитів 2-ацетиламінофлуорена в поєднанні з частковою гепатектомією, що викликало виражені зміни структури органа у вигляді порушення трабекулярної будови паренхіми і дуктулярної реакції в портальній та перипортальній зонах. Імплантація АЖМ з альгинатною оболонкою, що містили КФП, у сальник щурів експериментальною печінковою недостатністю приводила до органотипового відновлення структури патологічно зміненої печінки. Показано, що альгинатна оболонка навколо АЖМ забезпечує ізоляцію заселених клітин, а КФП, заселені в широкопористі АЖМ, надають терапевтичний ефект при імплантації тваринам із печінковою недостатністю.

Ключові слова: печінка, альгинат-желатинові матриці, криоконсервовані клітини фетальної печінки, експериментальна печінкова недостатність, імплантация.

Abstract: The study demonstrates the state of bioconstructs based on cryopreserved fetal liver cells (FLC), seeded into macroporous alginate-gelatin matrices (AGM), as well as the effect of the bioconstructs implantation on the liver structure in hepatic failure rat models. As carriers for rat FLC the wide-porous cryogel AGM were applied. The additional alginate capsule formed around the AGM prevented the colonization of matrices by the recipient cells *in vivo* and did not affect the viability and expansion of FLC *in vitro*. The structure of bioconstructs was maintained during at least 28 days post implantation. The experimental liver damage in rats was modeled by the injection of the hepatocyte proliferation inhibitor 2-acetylaminofluorene together with the partial hepatectomy, that led to pronounced changes in liver structure (disorderin of trabecular structure of the parenchyma and ductular reaction within the portal and periportal areas). The implantation of FLC-seeded AGM additionally covered by the alginate shell into greater omentum of rats with hepatic failure led to organotypic recovery of pathologically altered liver structure. It was shown that the alginate capsule around the AGM provided isolation for seeded cells, and FLC within the wide-porous AGM had a therapeutic effect when implanted in rats with liver failure.

Key words: liver, alginate-gelatin matrices, cryopreserved fetal liver cells, hepatic failure model, implantation.

Отдел криобиохимии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-41-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: alexander_petrenko@cryo.org.ua

Поступила 24.06.2014

Принята в печать 23.07.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №4. – С. 292–301.
© 2014 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Department of Cryobiochemistry, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: alexander_petrenko@cryo.org.ua

Received June, 24, 2014

Accepted July, 23, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(4): 292–301.

© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Применение трансплантации изолированных гепатоцитов для коррекции терминальных стадий печеночной недостаточности ограничено вследствие слабого приживления, недостаточной выживаемости и низкой пролиферативной активности гепатоцитов [11]. В связи с этим актуальным является поиск альтернативных методов коррекции печеночной недостаточности с использованием методов клеточной терапии, в том числе на основе различных биоинженерных конструкций, способствующих функционированию гепатоцитов, например, путем заключения их в гидрогелевые микросферы [3], децеллюляризованные фрагменты печени [9], макропористые полимерные матрицы [4]. Перспективным является использование в подобных биоинженерных конструкциях стволовых/прогениторных клеток, имеющих высокий пролиферативный потенциал, способных к дифференцировке в гепатическом направлении [2] и продуцирующих широкий спектр ростовых факторов и цитокинов. Существенным преимуществом клеток-предшественников фетальной печени по сравнению со зрелыми клетками является их более высокая устойчивость к факторам криоконсервирования [3, 8], что позволяет создавать запас этих клеток, пригодных для трансплантации.

Очевидный исследовательский интерес при коррекции печеночной недостаточности представляет структурное состояние биоинженерного имплантата, состоящего из клеточной и матричной, неклеточной части, а также органа-мишени экспериментальных воздействий – печени крыс.

Нами был описан новый широкопористый носитель клеток на основе альгината и желатина [7]. Установлено, что модификация альгинатной матрицы путем ковалентного прикрепления желатина (в качестве якорного сайта) к поверхности стенок пор способствовала эффективной адгезии и пролиферации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга взрослого человека в составе носителя. Вопрос о способности этих матриц поддерживать рост гепатических клеток в системах *in vitro* и *in vivo* остается невыясненным.

Целью настоящей работы явилось изучение состояния биоконструкций, представляющих собой криоконсервированные клетки фетальной печени, заселенные в макропористые альгинат-желатиновые матрицы, и их влияния на структуру печени после имплантации крысам с печеночной недостаточностью.

Материалы и методы

Объектом исследования служили беспородные белые крысы. Содержание животных и экспериментальные манипуляции проводили в соответ-

Transplantation of isolated hepatocytes to correct terminal stages of liver failure is restricted by poor engraftment, low survival and proliferative activity of hepatocytes [11]. In this regard, it is important to search alternative methods of correcting liver failure using stem cell therapy, including those based on using various bioengineered structures to facilitate the functioning of hepatocytes, for example, by encapsulating them into hydrogel microspheres [2], decellularized liver fragments [9], macroporous polymeric matrix [3]. The use in such bioengineered constructs of stem/progenitor cells with a high proliferative potential, capable of differentiating in hepatic direction [1], and producing a wide range of growth factors and cytokines is promising. A significant advantage of the fetal liver progenitor cells versus mature cells is their higher resistance to cryopreservation factors [2, 8], allowing the establishing of a stock of these cells suitable for transplantation.

When correcting liver failure the structural state of bioengineered implant consisting of the cell and matrix, non-cellular parts, as well as the target organ of experimental effects, *i.e.* rat liver is of obvious research interest.

Previously we have described a new wide-porous cell carrier based on alginate and gelatin [7]. The modification of alginate matrix by covalent coupling of gelatin (as an anchor site) to the surfaces of the pore wall was established to promote an effective adhesion and proliferation of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells within a carrier. However, the ability of these matrices to support the growth of hepatic cells *in vitro* and *in vivo* remains unclear.

The aim of this work was to study the state of bioconstructs representing the cryopreserved fetal liver cells seeded into macroporous alginate-gelatin matrix, and their impact on the post-implantation liver structure in rats with liver failure.

Materials and methods

The research was performed in white rats. The maintenance and experimental manipulations in animals were carried out in accordance with the General Principles in Animal Experiments, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and the requirements of the Bioethics Committee of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine agreed with the rules of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Fetal liver cells (FLCs) were isolated from rat fetuses of 15th gestation day (identification of sperm in female vaginal smears was assumed as the first day of pregnancy) under sterile conditions by a combined



ствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и требованиями комитета по биоэтике ИПКиК НАН Украины, согласованными с правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Клетки фетальной печени (КФП) выделяли из плодов крыс 15 суток гестации (выявление спермиев в вагинальных мазках самок считали первым днем беременности) в стерильных условиях комбинированным ферментативно-механическим методом. Для этого фрагменты печени обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина в фосфатном буферном растворе 0,1 М (рН 7,4) в течение 5 мин при 20°C, затем дезинтегрировали на одиночные клетки [6]. Показатель жизнеспособности КФП в первичной суспензии по окрашиванию трипановым синим составлял $(90,6 \pm 5,9)\%$.

Полученную клеточную суспензию криоконсервировали по трехэтапной программе замораживания [10] с начальной скоростью 1 град/мин до -40°C и сидингом при -7°C со скоростью 10 град/мин от -40 до -80°C с последующим погружением в жидкий азот. Хранение клеток осуществляли при -196°C в условиях низкотемпературного банка ИПКиК НАН Украины в течение 2–3 месяцев.

Перед экспериментом КФП отогревали, отмывали от криопротектора и оценивали жизнеспособность, которая для криоконсервированных КФП составляла $(73,0 \pm 3,6)\%$ по тесту с окрашиванием трипановым синим. После этого клетки заселяли согласно описанному методу [1] в макропористые альгинат-желатиновые губки (АЖМ) диаметром 5 мм и толщиной 2 мм, полученные методом криотропного структурирования. Средний диаметр пор такой губки составляет $(106,2 \pm 39,6)$ мкм, а пористость – не менее 80% [7]. Вокруг части носителей формировали дополнительную альгинатную оболочку двукратным последовательным переносом биоконструкции сначала в 1,2%-й раствор альгината натрия («Sigma», США), приготовленный на физиологическом растворе (0,15 М NaCl; 25 мМ HEPES; рН 7,4), затем для полимеризации в такой же физраствор, обогащенный 100 мМ CaCl₂.

Клетки фетальной печени в составе макропористых АЖМ культивировали до 14 суток в среде α -MEM («Sigma»), дополненной 10% эмбриональной сывороткой крови крупного рогатого скота («РАА», Австрия), 2 мМ L-глутамина, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% с заменой среды каждые 3-е суток. Для визуализации КФП в составе носителя клетки окрашивали флуоресцеина ди-

enzymatic-mechanical method. For this purpose, the liver fragments were treated with 0.25% trypsin solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 5 min at 20°C, and disintegrated into single cells [5]. The viability index of FLCs according to trypan blue staining in a primary suspension made $(90.6 \pm 5.9)\%$.

The resulted cell suspension was cryopreserved by three-step freezing program [10] with an initial cooling rate of 1 deg/min down to -40°C, seeding at -7°C and followed cooling with the rate of 10 deg/min from -40 down to -80°C and immersion into liquid nitrogen. The cells were stored at -196°C at Low Temperature Bank of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine within 2–3 months.

Prior to the experiment, the FLCs were thawed, washed of a cryoprotectant and the viability was assessed by trypan blue staining. The viability of cryopreserved FLCs made $(73.0 \pm 3.6)\%$. Afterwards the cells were seeded in accordance with the method described previously [6] into macroporous alginate-gelatin matrices (AGM) which were obtained by cryotropic gelation and had 5 mm diameter and of 2 mm thickness. The average pore diameter of such a sponge was (106.2 ± 39.6) μ m and the porosity made not less than 80% [7]. Around the carriers an additional alginate shell was formed by two-fold sequential immersion of bioconstruct into a 1.2% solution of sodium alginate (Sigma, USA), prepared with the saline (0.15 M NaCl; 25 mM HEPES; pH 7.4), followed by polymerization in the same saline, enriched with 100 mM CaCl₂.

Fetal liver cells within a macroporous AGM were cultured up to 14 days in a α -MEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum, (PAA, Austria), 2 mM L-glutamine, 50 units/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity with replacing the medium each 3 days. To visualize FLCs within the carriers the cells were stained with fluorescein diacetate (FDA) and examined with a fluorescence microscope (CETI, Belgium).

The studies on implantation of cell-free and FLC-seeded AGM were performed in 35 adult male rats. Cell-free AGM were implanted into an omentum of five rats. Another animal group (5 rats) was implanted with the matrices additionally coated with an alginate. The remaining 25 animals were divided into 4 experimental groups. Group 1 (control of the same age norm, $n = 4$) consisted of the rats not subjected to any stress. In the animals of groups 2–4 ($n = 7$ in each group) an acute liver failure was simulated by administration for 5 days of hepatocyte proliferation inhibitor 2-acetylaminofluorene (AAF) consisting in 30 mg/kg of body weight intragastrically as an oil solution. After AAF administration, the Higgins partial hepatectomy (PH) has been used as a signal for proliferation of hepatic progenitor cells. In the animals of group 2 (control of



ацетатом (ФДА) и наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа («СЕТІ», Бельгия).

Исследования по имплантации бесклеточных и заселенных клетками фетальной печени АЖМ проводили на 35 взрослых крысах-самцах. Бесклеточные АЖМ имплантировали в сальник пяти крыс. Другой группе (5 крыс) имплантировали матрицы, дополнительно покрытые оболочкой из альгината. Остальных 25 животных разделили на 4 экспериментальные группы. Группу 1 (контроль одновозрастной нормы, $n = 4$) составили крысы, которые не подвергались никаким воздействиям. У животных 2–4 групп ($n = 7$ в каждой) формировали модель острой печеночной недостаточности на основе введения в течение 5 суток ингибитора пролиферации гепатоцитов 2-ацетиламинофлуорена (ААФ) из расчета 30 мг/кг массы тела интрагастрально в виде масляного раствора. После введения ААФ проводили частичную гепатэктомию (ЧГЭ) по Хиггинсу, которая является сигналом к пролиферации гепатических клеток-предшественников. Животным группы 2 (контроль модели ААФ/ЧГЭ) в дальнейшем не проводили никаких манипуляций. Остальным крысам одновременно с проведением частичной гепатэктомии в большой сальник имплантировали макропористые АЖМ, покрытые альгинатной оболочкой: группы 3 – бесклеточные матрицы, а группы 4 – носители с иммобилизованными в них КФП крыс. Период наблюдения за животными после формирования модели и имплантации макропористых губок составил 4 недели.

Препараты для гистологического исследования имплантатов и печени крыс-реципиентов готовили по общепринятой методике: после фиксации в 4%-м формалине фрагменты тканей промывали, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином, а затем анализировали с помощью светового микроскопа («СЕТІ», Бельгия).

Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования была поставлена задача оценить состояние АЖМ после имплантации здоровым животным. Для ее решения бесклеточные макропористые криогелевые матрицы на основе альгината, модифицированного путем химического присоединения к поверхности пор молекул желатина, имплантировали в сальник intactных животных. Гистологическое наблюдение за состоянием носителей через 2 недели после имплантации выявило большое количество клеточных элементов на поверхностях пор матрицы. Значительная часть клеток была распластана и демонстрировала фибробластоподобный вид, местами

ААФ/PH model) no manipulations were performed later. Simultaneously with the partial hepatectomy the remaining rats were implanted with alginate-coated macroporous AGM into the greater omentum. The animals from Group 3 obtained a cell-free matrix and group 4 got the carriers with immobilized rat FLCs. The observation period for the animals after the model simulation and implantation of macro-porous sponges comprised 4 weeks.

Samples for histology of implants and liver of the recipient rats were prepared by the traditional method: after fixation with 4% formalin the tissue fragments were washed, dehydrated in alcohols of increasing concentration and paraffin embedded. Histological sections of 4.5 μm thickness were stained with Ehrlich hematoxylin and eosin, and then analyzed with light microscope (CETI, Belgium).

Results and discussion

At an initial stage of the research the task was to assess the AGM state after implantation to healthy animals. To solve it the cell-free macroporous cryogel matrices based on alginate, modified by chemical coupling of gelatin molecules to a surface of the pores were implanted into the omentum of intact animals. Histological study of the state of the carriers in 2 weeks after implantation has revealed a large number of cells on the surfaces of the matrix pores. Most cells were flattened and had a fibroblast-like morphology, sometimes forming dense areas with fibrous stroma. The larger macrophage cells were observed on the background of fibroblast-like cells; in the lumens of some pores the capillary-like structures, containing predominantly red blood cells were indicated (see Fig. 1A). The signs of an acute inflammation response to the implant as lymphocyte-leukocyte infiltration were observed. The obtained results showed an intensive populating of the implanted AGM with the recipient's cells, accompanied by the implant vascularization.

To prevent populating the macroporous AGM with the recipient cells an additional external alginate capsule capable of isolation of the porous carriers from the migration of the cells of both macrophage, lymphoid systems and connective tissue of the recipient was formed. It has been established that the cells inside the implant covered by additional alginate capsule were virtually absent after 2 weeks of cell-free AGM implantation in omentum of healthy rats (Fig. 1C). At the same time the layer of fibrous tissue formed by the recipient's cells was observed on outer surface of the alginate shell surrounding AGM, *i.e.* the connective tissue capsule was formed.

The findings showed that the external alginate capsule effectively protected porous AGM from penetration of the recipient's cell elements. However, the question about an influence of alginate coating on the



образуя плотные участки с волокнистой стромой. На фоне фибробластоподобных клеток присутствовали более крупные клетки макрофагального ряда; в просветах отдельных пор встречались капилляроподобные структуры, содержащие свободные элементы крови, среди которых преобладали эритроциты (рис. 1, А). Признаки острой воспалительной реакции на имплантат в виде лимфоцитарно-лейкоцитарной инфильтрации не наблюдались. Полученные результаты свидетельствовали об интенсивном заселении имплантированных АЖМ клеточными элементами реципиента, сопровождающемся васкуляризацией имплантата.

Чтобы предотвратить заселение макропористых АЖМ клетками реципиента была поставлена задача сформировать дополнительную внешнюю альгинатную капсулу, способную отграничивать пористые носители от миграции как клеток макрофагальной и лимфоидной систем, так и соединительнотканых клеток реципиента. Было установлено, что после 2-х недель пребывания инкапсулированных бесклеточных АЖМ в сальнике здоровых крыс клеточные элементы внутри имплантата, заключенного в альгинатную капсулу, практически отсутствовали (рис. 1, В). В то же время на внешней поверхности альгинатной оболочки, окружающей АЖМ, наблюдался слой фиброзной ткани, образованный клетками реципиента, то есть формировалась соединительнотканная капсула.

Полученные результаты свидетельствовали, что внешняя альгинатная капсула эффективно защищает пористую АЖМ от проникновения клеточных элементов реципиента. Однако открытым оставался вопрос о влиянии альгинатного покрытия на состояние клеток, заселенных внутри матриц.

Для выявления возможного негативного действия альгинатной оболочки, изолирующей матрицу от клеток хозяина, на состояние криоконсервированных КФП внутри АЖМ проводили исследование *in vitro*. Для этого заселенные АЖМ со сформированной альгинатной оболочкой помещали в условия культивирования на срок до 14 суток.

Из рис. 2, А видно, что на 3-и сутки культивирования в составе инкапсулированных АЖМ криоконсервированные КФП активно метаболизировали ФДА, что свидетельствовало об их жизнеспособности и позволяло оценить их форму. Была выяв-

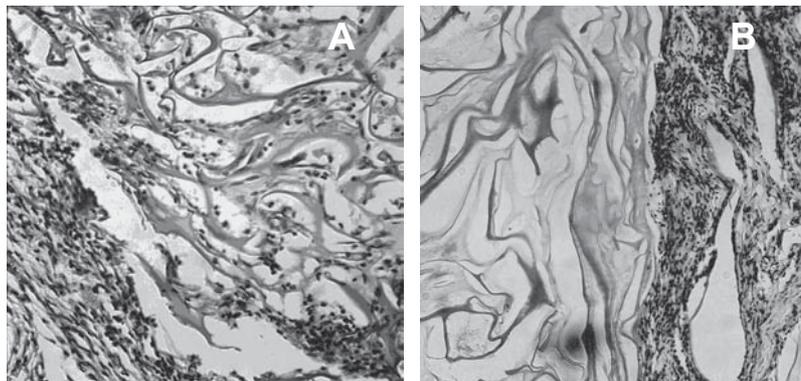


Рис. 1. Гистологические срезы макропористых альгинат-желатиновых матриц через 14 суток после имплантации в сальник крыс: **А** – «открытая» матрица без альгинатной оболочки; **В** – матрица с внешней альгинатной оболочкой. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$.

Fig. 1. Histological sections of macroporous alginate-gelatin matrix in 14 days after implantation into omentum of rats: **A** – 'open' matrix without alginate shell; **B** - matrix with outer alginate shell. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$.

state of the cells populated inside the matrix has remained open.

To reveal possible negative effect of the alginate shell isolating the matrix from the host cells, the *in vitro* study of the state of cryopreserved FLCs inside AGM was performed. For this aim cell-seeded AGM covered by alginate shell were placed into culturing conditions for up to 14 days.

Fig. 2 shows that to the 3rd day of culturing the cryopreserved FLCs within the encapsulated AGM actively metabolized FDA, indicating their viability and enabling to assess their shape. The significant heterogeneity of the attached cultured FLCs was found: along with rounded ones there were revealed elongated, dendritic and widely flattened cells, the linear dimensions of cell elements varied, likely indicating the presence of representatives of various histogenetic lineages in initial suspension.

To the 7th days of culturing (see Fig. 2B) the number of flattened cells significantly increased. The number of rounded-shape cells reduced. To the 14th day of observation only small amount of these cells was detected (see Fig. 2C), while the flattened fibroblastic cells made the bulk and formed the monolayer on surfaces of the carrier pores. Thus it has been established that encapsulation into alginate AGM seeded with fetal liver cells, did not vitally affect the viability and expansion of cryopreserved FLCs during *in vitro* culturing.

To identify potential therapeutic effect the encapsulated into alginate shell bioconstructs consisting of macroporous AGM with inoculated therein cryopreserved FLCs were grafted into omentum of the rats with experimental hepatic failure (AAP/PH) (group 4). The



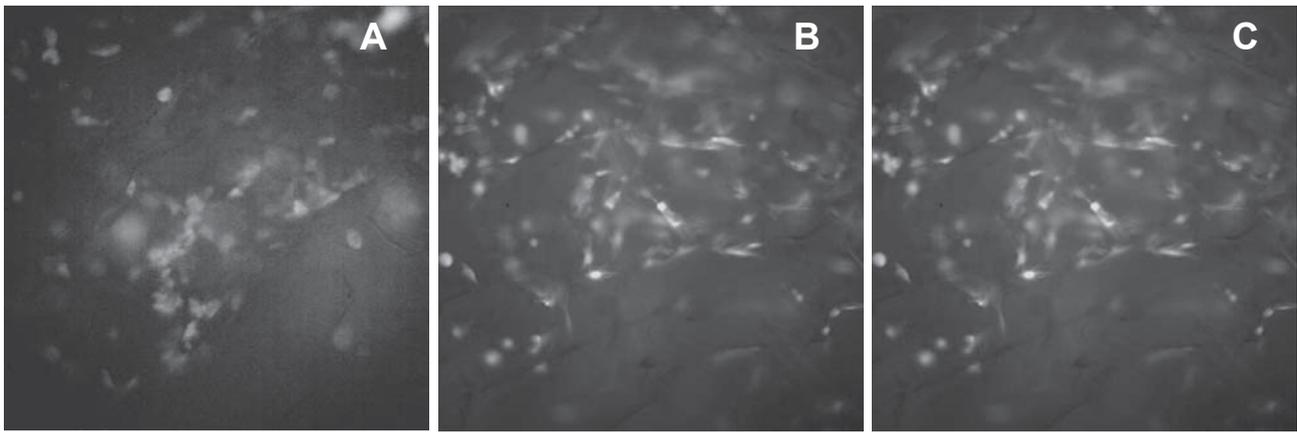


Рис. 2. Криоконсервированные КФП в составе инкапсулированной альгинат-желатиновой губки на 3-и (А), 7-е (В) и 14-е (С) сутки культивирования. Прижизненное наблюдение, окрашивание FDA, $\times 250$.

Fig. 2. Cryopreserved FLCs within 'coated' alginate-gelatin sponge to the 3rd (A), 7th (B) and 14th (C) days of culturing. Vital observation, FDA staining, $\times 250$.

лена значительная гетерогенность прикрепленных культивируемых КФП: наряду с округлыми встречались удлиненные, отростчатые и широкораспластанные клетки, линейные размеры клеточных элементов варьировали, что может указывать на наличие в исходной суспензии представителей различных гистогенетических ростков.

К 7-м суткам культивирования (рис. 2, В) количество распластанных клеток значительно увеличилось, местами из них образовывались тяжи. Содержание клеток округлой формы уменьшалось. На 14-е сутки наблюдения эти клеточные элементы выявлялись лишь в незначительном количестве (рис. 2, С), в то время как распластанные фибробластоподобные клетки составляли большинство и образовывали монослой на поверхностях пор носителя. Таким образом установлено, что инкапсуляция в альгинат АЖМ, заселенных клетками фетальной печени, существенно не влияла на жизнеспособность и экспансию криоконсервированных КФП при культивировании.

Для выявления возможного терапевтического эффекта инкапсулированные в альгинатную оболочку биоконструкции, состоящие из макропористых АЖМ с инокулированными в них криоконсервированными КФП, подсаживали в сальник крысам с экспериментальной печеночной недостаточностью (ААФ/ЧГЭ) (группа 4). Негативным контролем служили животные с модельной печеночной недостаточностью ААФ/ЧГЭ, которым в сальник имплантировали бесклеточные инкапсулированные АЖМ (группа 3).

Микроскопическое строение печени здоровых крыс (группа 1), являющихся одновозрастным контролем для животных, которые перенесли экспериментальные вмешательства, соответствовало норме: печеночные доли были правильно организованы, паренхима печени имела регулярное

строение. Животные с модельной печеночной недостаточностью ААФ/ЧГЭ (группа 2) и животные с модельной печеночной недостаточностью ААФ/PH (группа 3) служили отрицательным контролем.

Микроскопическая структура печени здоровых крыс (группа 1), являющаяся контролем для животных, подвергшихся экспериментальным вмешательствам, соответствовала норме: печеночные доли были правильно организованы, паренхима имела регулярную трабекулярную структуру, наблюдались типичные капилляры синусоидального типа. Междольковая соединительная ткань содержала ограниченное количество фибробластных клеточных элементов, в некоторых местах она была инфильтрирована лимфоцитами. В портальных зонах междольковые артерии, вены и желчные протоки были свободны. В этих зонах обнаружены регенерирующие гепатоциты с крупными светлыми ядрами на стадии митоза (см. рис. 3А).

Структура печени крыс (группа 2) подверглась ААФ-интродукции после PH, в 21 день после воздействия сильно отличалась от нормальной. В частности, характерная трабекулярная структура паренхимы печени практически отсутствовала (рис. 3В). Увеличилось количество желчных протоков и появились структуры, образованные клетками, подобными эпителию желчных протоков (реакция протоков), а также значительное количество молодых гепатоцитарных структур, соседствующих с этими структурами, часть из которых находилась на стадии митоза, были обнаружены. В перипортальных зонах печеночных долей выявлены гепатоциты, нагруженные липидами и некротизированные гепатоциты. Круглая инфильтрация портальных трактов печени почти отсутствовала. В целом, состояние печени указывало на восстановление гепатоцеллюлярной компоненты паренхимы печени, пораженной ААФ, но нормальная архитектура органа не была восстановлена.

Гистология печени крыс (группа 3) (имплантированные с матрицей) в 21 день после операции отражала значительно нарушенную архитектуру органа: почти полное отсутствие характерной трабекулярной структуры и образование пораженных паренхимы в нескольких местах. Те

трабекулярное строение, наблюдались типичные капилляры синусоидного типа. Междольковая соединительная ткань содержала ограниченное количество фибробластических клеточных элементов и местами была инфильтрирована лимфоцитами. В портальных зонах междольковые артерии, вены и желчные протоки были свободны. В этих областях обнаруживались регенерирующие гепатоциты с большими светлыми ядрами, находящиеся на стадии митотического деления (рис. 3, А).

Структура печени крыс (группа 2), которые перенесли введение ААФ с последующей ЧГЭ, через 21 сутки после воздействий резко отличалась от нормальной. В частности, практически не выявлялось характерное трабекулярное строение печеночной паренхимы (рис. 3, В). Обращали на себя внимание увеличенное количество желчных протоков и наличие структур, сформированных клетками, подобными желчному эпителию (дуктулярная реакция), а также значительное количество близлежащих по отношению к этим структурам групп молодых гепатоцитов, часть из которых находилась в состоянии митотического деления. В перипортальных областях печеночных долек выявлялись нагруженные липидами и некротизированные гепатоциты. Круглоклеточная инфильтрация портальных трактов печени практически отсутствовала. В целом структурное состояние печени указывало на процессы репарации гепатоклеточной составляющей печеночной паренхимы, пораженной в результате введения ААФ, однако нормальная архитектура органа не восстанавливалась.

Гистологическая картина печени крыс группы 3, которым была имплантирована бесклеточная матрица, на 21-е сутки после операции отражала значительные нарушения архитектоники органа: практически полное отсутствие характерного трабекулярного строения и формирование множества участков пораженной паренхимы. По всей площади препарата были рассеяны молодые крупные печеночные клетки, а также дистрофически измененные и некротизированные гепатоциты. Отмечалась дуктулярная реакция в виде разрастания желчных протоков и дуктальных структур, которые в портальной области были окружены инфильтратом

young large liver cells as well as necrotic hepatocytes and the cells with dystrophic changes had been scattered within the entire area of the section. There was observed the ductular reaction as outgrowth of the bile ducts and ductal structures, which in the portal areas were surrounded with an infiltrate of poorly identifiable small cell elements (Fig. 3C). In a whole there was observed a morphological similarity with the liver structure of rats with experimental AAF/PH model.

In the rats with experimental hepatic insufficiency which additionally received the carriers with CFP (group 4), there was traced the characteristic to the norm trabecular structure of the regenerating liver parenchyma (Fig. 3D). Number of bile ducts in the portal areas was somewhat increased, they were surrounded by predominantly full value hepatocytes, among which there were mitotically dividing cells. Hepatocytes in the state of fatty degeneration were occasionally detected. Inflammatory infiltration of portal tracts was almost absent. In general, the observed morphological pattern

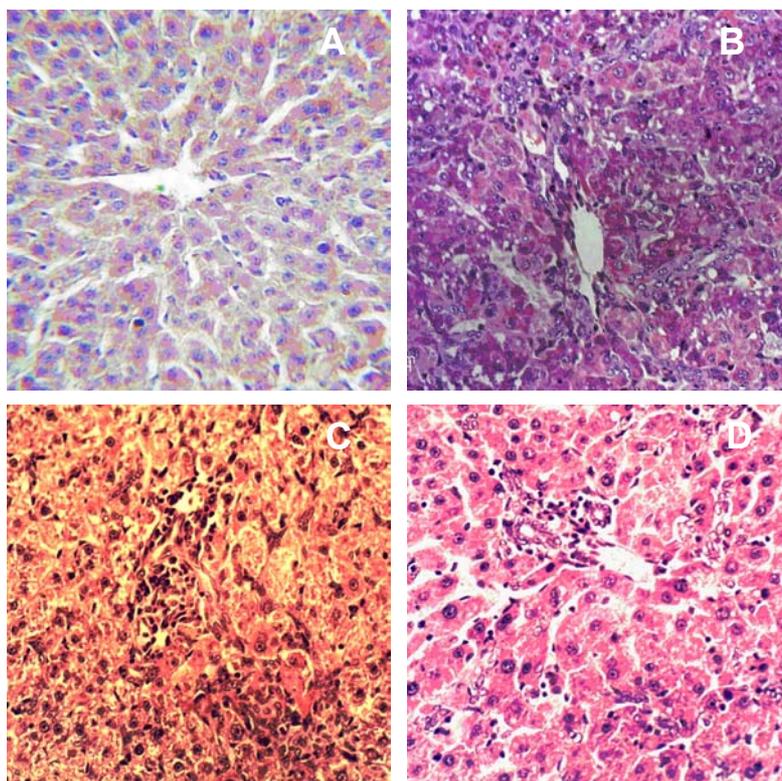


Рис. 3. Структура печени крыс через 21 сутки после ААФ/ЧГЭ с введением альгинат-желатиновых матриц: **А** – норма (одновозрастной контроль); **В** – модель гепатита ААФ/ ЧГЭ; **С** – модель гепатита ААФ/ ЧГЭ, имплантация бесклеточных АЖМ; **Д** – модель гепатита ААФ/ЧГЭ, имплантация АЖМ с КФП. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 400$.

Fig. 3. Structure of rats liver in 21 days after AAF/PH with the introduction of alginate-gelatin matrices: **A** – norm (the same age control); **B** – hepatitis modelling with AAF/PH; **C** – hepatitis modelling with AAF/PH, implantation of cell-free AGM; **D** – hepatitis modelling with AAF/PH, implantation of AGM with FLCs. Hematoxylin and eosin staining, $\times 400$.



мелкоклеточных плохо идентифицируемых элементов (рис. 3, С). В целом наблюдалось морфологическое сходство со структурой печени крыс с экспериментальной моделью ААФ\ЧГЭ.

У крыс с экспериментальной печеночной недостаточностью, которым вводили носители с КФП (группа 4), прослеживалось свойственное норме трабекулярное строение регенерирующей паренхимы печени (рис. 3, D). Количество желчных протоков в портальных областях было несколько увеличено, они были окружены преимущественно полноценными гепатоцитами, среди которых встречались митотически делящиеся клетки. Изредка выявлялись гепатоциты в состоянии жировой дистрофии. Воспалительная инфильтрация портальных трактов практически отсутствовала. В целом наблюдаемая морфологическая картина указывала на нормотипический ход восстановления структуры патологически измененной печени. Таким образом, структурные проявления деструктивно-восстановительных процессов в печени крыс с экспериментальной моделью ААФ/ЧГЭ различались в зависимости от наличия КФП в имплантированных в сальник биоконструкциях.

При окончании эксперимента на 28-е сутки после ЧГЭ была проведена оценка состояния имплантированных инкапсулированных АЖМ и заселенных в них клеток. Из рис. 4 видно, что вокруг матриц сохранялась альгинатная оболочка, сами АЖМ не проявляли убедительных признаков биодеградации и сохраняли свою макропористую структуру. Внутри носителей выявлялись клеточные элементы, преимущественно в состоянии дистрофии, а также внеклеточный матрикс. Вокруг окруженных альгинатной оболочкой матриц наблюдалась сформированная соединительнотканная капсула.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что имплантация широкопористых матриц, заселенных криоконсервированными КФП, крысам с экспериментальной печеночной недостаточностью (модель ААФ/ЧГЭ) приводит к существенному улучшению структуры печени, что, в свою очередь, указывает на определенный терапевтический потенциал КФП.

В настоящей работе для имплантации использовали оригинальные широкопористые АЖМ, полученные методом криотропного гелирования и хорошо зарекомендовавшие себя в качестве носителя клеток в культуре [7]. При имплантации в сальник они сохраняли свою структуру в течение, по крайней мере, 4-х недель, что свидетельствовало об их медленной биодеградации и перспективности применения в качестве скаффолда для разработки биоинженерных эквивалентов печени. В то же время широкопористые криогелевые матрицы,

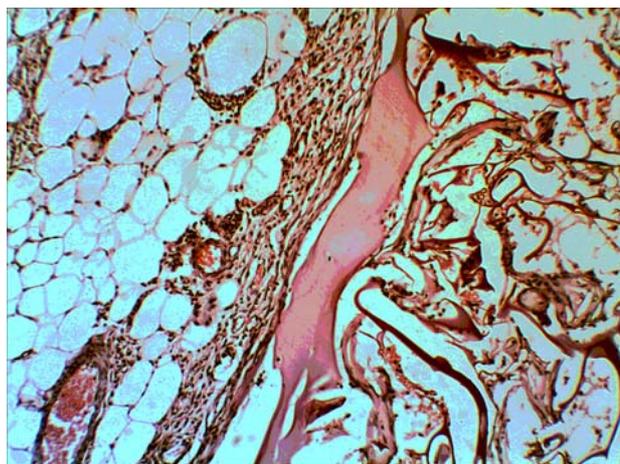


Рис. 4. Гистологический срез инкапсулированной альгинат-желатиновой матрицы, заселенной КФП, через 28 суток после имплантации в сальник крыс со сформированной моделью ААФ/ЧГЭ. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$.

Fig. 4. Histological section of encapsulated alginate-gelatin matrix populated with FLCs, 28 days post implantation in the omentum of rats with simulated AAF/PH. Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$.

indicated the progress in recovery of normotypical structure of the changed liver. Thus, the structural manifestations of destructive and regenerative processes in the liver of the rats with AAF/PH experimental model differed depending on the presence of the FLCs in implanted into the omentum bioconstructs.

To the day 28 after PH the state of implanted encapsulated AGM and the state of both encapsulated AGM and cells seeded inside the scaffolds was evaluated. Fig. 4 shows that around the matrices an alginate shell was preserved, the AGM themselves did not demonstrate evident signs of degradation and retained their macroporous structure. Predominantly dystrophic cells as well as extracellular matrix were identified within the carriers (scaffolds, AGM). Around matrices surrounded with an alginate shell the capsule of connective tissue was formed.

The results presented indicate that implantation of wide-porous matrices seeded with cryopreserved FCLs to the rats with experimental hepatic failure (AAF/PH model) leads to a significant improvement of the liver structure, which in turn points to a specific therapeutic potential of the FLCs.

In this paper for implantation we used the original wide-porous AGM obtained by cryotropic gelation and well proved as carrier of cells in culture [7]. When implanted into the omentum, they maintained their structure for at least 4 weeks, confirming their slow biodegradation and promise to be used as scaffolds for developing the liver bioengineered equivalents. At the same time the wide-porous cryogel matrices with open pores after the implantation into the omentum



имеющие открытые поры, после имплантации в сальник заселялись клетками реципиента и, таким образом, не были способны обеспечить *in vivo* иммуноизоляции и, соответственно, сохранность заселенных в них клеток.

Нами показано, что модификация АЖМ, заселенных клетками фетальной печени, путем заключения таких биоконструкций в альгинатную оболочку не препятствовала экспансии в них КФП при культивировании вне организма, но позволяла предотвратить массовое заселение широкопористых АЖМ клетками реципиента при имплантации.

Известно, что помещение клеток-предшественников в альгинатную гидрогелевую капсулу позволяет сохранить их в области введения и предохраняет от неблагоприятного воздействия окружения. При этом клетки реагируют на состояние окружающей среды реципиента и в ответ на него синтезируют и высвобождают ростовые факторы, цитокины, а также другие пептиды и белки, диффундирующие наружу. В то же время гидрогелевая капсула препятствует проникновению внутрь нее крупных белков, в частности антител, нарушающих процесс регенерации [5].

В наших экспериментах альгинатная капсула была непроницаемой для клеток реципиента, выраженная реакция отторжения отсутствовала, вокруг альгинатной оболочки к 21-м суткам наблюдения образовывалась соединительнотканная капсула, сформированная по морфотипу реакции на инородное тело. На основании этих данных можно предполагать, что КФП внутри матрицы оставались функционально активными до тех пор, пока соединительнотканная капсула не блокировала диффузионные и осмотические процессы, происходившие между КФП в матрице и интерстициальной жидкостью реципиента, причем этого времени было достаточно для запуска процессов нормотипической регенерации паренхимы печени, подвергавшейся ААФ/ЧГЭ.

Таким образом, выявленная нормализация структуры органа-мишени – печени в состоянии экспериментальной недостаточности – в присутствии АЖМ, заселенных клетками фетальной печени, может служить аргументом в пользу терапевтического действия криоконсервированных КФП, конкретные клеточные источники и механизмы которого требуют дальнейшего углубленного изучения.

Выводы

Имплантация здоровым животным бесклеточных альгинат-желатиновых матриц приводит к их интенсивному заселению клеточными элементами реципиента и сопровождается васкуляризацией имплантата.

were populated with the recipient's cells and therefore were not be able to provide *in vivo* immune isolation and correspondingly the preservation of the cells populated therein.

We have shown that the modification of AGM, seeded with fetal liver cells, by means of additional coating of these bioconstructs into alginate shell did not affect the expansion of FLCs within the AGM during *in vitro* culture, but helped preventing massive populating of wide-porous AGM with the recipient's cells after implantation.

It is known that the encapsulation of progenitor cells into alginate hydrogel allows fixing them in the site of administration as well as protects from the environmental unfavourable effects. Herewith the cells react to the environmental state of a recipient, synthesize and release growth factors, cytokines, as well as other peptides and proteins diffusing outwards. At the same time the hydrogel capsule prevents the penetration of large proteins, in particular the regeneration impairing antibodies [4].

In our experiments, the alginate capsule was non-penetrable to the recipient's cells, the expressed rejection was absent. To the 21st day of observation the connective tissue capsule around the alginate shell was formed due to morphotype response to the foreign object. On the basis of these data, we can assume that the FLCs inside the matrix remained functionally active for as long as the connective tissue capsule did not block the diffusive and osmotic processes occurring between FLCs in the matrix and interstitial fluid of a recipient. Moreover this time period was enough to start the normotypical regeneration of liver parenchyma which underwent AAF/PH.

Thus, the revealed normalization of the liver structure as a target organ in the state of experimental failure in the presence of AGM seeded with fetal liver cells, can serve as an argument for the therapeutic effect of cryopreserved FLCs, but the specific mechanisms of such effect require further profound study.

Conclusions

Implantation of cell-free alginate-gelatin matrices to healthy animals leads to an intensive populating with the recipient's cells and accompanied by vascularization of the implant.

Formation of the outer alginate capsule effectively protects the porous AGM from penetration of the recipient cells, and does not significantly affect the viability and expansion of cryopreserved FLCs seeded into the matrix.

Implantation of encapsulated wide-porous matrices containing FLCs, into the omentum of the rats with liver failure (AAF/PH model) leads to the organotypic restoration of the liver structure of experimental animals.



Формирование внешней альгинатной капсулы эффективно защищает пористую АЖМ от проникновения клеточных элементов реципиента, а также существенно не влияет на жизнеспособность и экспансию криоконсервированных КФП, заселенных в матрицу.

Имплантация инкапсулированных широкопористых матриц, содержащих КФП, в сальник крыс с печеночной недостаточностью (модель ААФ/ЧГЭ) приводит к органотипическому восстановлению структуры печени экспериментальных животных.

Литература

1. Петренко Ю.А., Иванов Р.В., Лозинский В.И., Петренко А.Ю. Сравнительное исследование методов заселения широкопористых носителей на основе альгинатного криогеля мезенхимальными стромальными клетками костного мозга человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – №4. – С. 225–228.
2. Dolle L., Best J., Mei J. et al. The quest for liver progenitor cells: A practical point of view // J. Hepatol. – 2010. – Vol. 52, №1. – P. 117–129.
3. Fuller B.J., Petrenko A.Yu., Rodriguez J.V. et al. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification // CryoLetters. – 2013. – Vol. 34, №4. – P. 432–452.
4. Glicklis R., Shapiro L., Agbaria R. et al. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds // Biotechnology and Bioengineering. – 2000. – Vol.67, №3. – P. 344–353.
5. Levit R.D., Landazuri N., Phelps E.A. et al. Cellular encapsulation enhances cardiac repair // J. American Heart Association – 2013. – Vol. 2, №5. – P. 1–11.
6. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // Analytical Biochem. – 1991. – Vol. 194, №2. – P. 326–332.
7. Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Yu., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells // J. Mater Sci: Mater Med. – 2011. – Vol. 22, №6. – P. 1529–1540.
8. Petrenko Y.A., Jones D.R.E., Petrenko A.Y. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem / progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium // Cryobiology. – 2008. – Vol. 57, №3. – P. 195–200.
9. Ping Zhou, Lessa N., Estrada D.C. et al. Decellularized liver matrix as a carrier for transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice // Liver Transpl. – 2011. – Vol. 17, №4. – P. 418–427.
10. Skorobogatova N.G., Novikov A.N., Fuller B.J., Petrenko A.Yu. Importance of a three-stage cooling regime and induced ice nucleation during cryopreservation on colony-forming potential and differentiation in mesenchymal stem/progenitor cells from human fetal liver // CryoLetters. – 2010. – Vol.31, №5. – P. 371–379.
11. Soltys K.A., Soto-Gutierrez A., Nagaya M. et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation // J. Hepatol. – 2010. – Vol.53, №4 – P. 769–774.

References

1. Dolle L., Best J., Mei J. et al. The quest for liver progenitor cells: A practical point of view. J Hepatol 2010; 52(1): 117–129.
2. Fuller B.J., Petrenko A.Yu., Rodriguez J.V. et al. Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. CryoLetters 2013; 34(4): 432–452.
3. Glicklis R., Shapiro L., Agbaria R. et al. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. Biotechnology and Bioengineering 2000; 67(3): 344–353.
4. Levit R.D., Landazuri N., Phelps E.A. et al. Cellular encapsulation enhances cardiac repair. J American Heart Association 2013; 2(5): 1–11.
5. Petrenko A.Yu., Sukach A.N. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. Analytical Biochem 1991; 194(2): 326–332.
6. Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Petrenko A.Yu. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers. Cell Technologies in Biology and Medicine 2010; (4): 225–228.
7. Petrenko Yu.A., Ivanov R.V., Petrenko A.Yu., Lozinsky V.I. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells. J Mater Sci: Mater Med 2011; 22(6): 1529–1540.
8. Petrenko Y.A., Jones D.R.E., Petrenko A.Y. Cryopreservation of human fetal liver hematopoietic stem / progenitor cells using sucrose as an additive to the cryoprotective medium. Cryobiology 2008; 57(3): 195–200.
9. Ping Zhou, Lessa N., Estrada D.C. et al. Decellularized liver matrix as a carrier for transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. Liver Transpl 2011; 17(4): 418–427.
10. Skorobogatova N.G., Novikov A.N., Fuller B.J., Petrenko A.Yu. Importance of a three-stage cooling regime and induced ice nucleation during cryopreservation on colony-forming potential and differentiation in mesenchymal stem/progenitor cells from human fetal liver. CryoLetters 2010; 31(5): 371–379.
11. Soltys K.A., Soto-Gutierrez A., Nagaya M. et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. J Hepatol 2010; 53(4): 769–774.

