

Материал поступил в редакцию: 13-12-2013
Принят к печати: 18-12-2013
УДК 616.3; 616-089.843

Development of lyophilized drug of human hepatocytes for the liver failure treatment

Bolatbek Kayupov, Samat Saparbayev, Saltanat Ualiyeva, Zhuldizay Kassymova, Agabek Oralbay, Aigerim Zhakupova, Aizhan Kazbekova

JSC National Scientific Research Medical Center, Astana city, Kazakhstan

Over the past 10 years, we have accumulated substantial clinical experience demonstrating the ability of infused hepatocytes isolated from fetal liver, to take root in the host tissue, to proliferate, to function and participate in the regenerative process. We planned to create a new drug from lyophilized fetal hepatocytes, the therapeutic effect of which will be directed to the treatment of patients with chronic liver disease. We have described a method for cultivating cells of fetal human hepatocytes providing enough cells in the short term, reducing the amount of ballast in cultures of hematopoietic cells and significantly increase the number of terms of the experience of hepatocytes in culture. Operating protocols for lyophilized hepatocytes will create a number of alternative specific treatment, stimulation of regeneration and increased reserve capacity of the organism in various liver diseases. Correctly selected technological processes of production of the drug will keep the biologically substances, secreted by fetal hepatocytes, active as well as eliminate the need for special methods of storage and transfer of the drugs to patients outside the hospital. This preparation is essential for patients with degenerative diseases of the liver, which will significantly improve the quality of life.

KeyWords: lyophilized hepatocytes, chronic liver disease

J Clin Med Kaz 2013;4(30):70-76

Автор для корреспонденции: Каюпов Б.А

Адрес: г.Астана ул. Сембинова 9, кв 97

Тел. 87017405980, e-mail: bulat_kaupov@mail.ru

БАУЫР ЖЕТІСПЕУШІЛІГІН ЕМДЕУ ҮШІН АДАМ БАУЫРЫНАН ЛИОФИЛДЕНГЕН ПРЕПАРАТТЫ ӨНДЕУ

Болатбек А.Каюпов, Самат С.Сапарбаев, Салтанат К.Уалиева, Жұлдызай А. Касымова, Ағабек А.Оралбай, Айгерим Х. Жакупова, Айжан Р.Казбекова

АҚ «Ұлттық ғылыми медициналық орталығы», Астана қаласы, Қазақстан

Соңғы 10 жыл ішінде бізбен феталды бауырдан бөлініп алынған инфузия арқылы енгізілген гепатоциттердің иесінің діндерінде жабыса өмір сүргіштікті, пролиферациялау, регенеративтік процессте қатысу мүмкіндігін көрсететін едәуір клиникалық тәжірибе жиналды. Созылмалы бауыр жетіспеушілігі бар пациенттерді емдеуге бағытталған лиофилденген феталды гепатоциттерден жаңа дәрілік препарат жасау жоспарлануда. Көрсетілетін адам феталды гепатоциттерді өсіру әдісі қысқа мерзімде жеткілікті мөлшерде жасушаларды алуға, қан жасау қатарының балластық жасушаларын төмендетуге және гепатоциттердің өмір сүру мерзімдерін ұзартуға мүмкіндік береді.

Леофилденген гепатоциттерді алу бойынша өңделген хаптамаалар жүйелік арнайы емдеуге, регенерация процесстерін ынталандыруға және әртүрлі бауыр ауруларында организмнің резервтік мүмкіншіліктерді арттыру үшін ұқсас монопрепараттар қатарына балама жасауға мүмкіндік береді. дұрыс іріктеліп алынған технологиялық процесстер препаратты алуға феталды гепатоциттерден бөлінетін биологиялық белсенді заттарды сақтауға, сонымен бірге емдеу мекемесінен тыс науқастарға емдік препаратты жеткізуді жүзеге асыруды және арнайы сақтау әдістерін қажет етпеуге мүмкіндік береді. Аталған препарат бауыр дегенеративті ауруымен ауырған науқастар үшін таптырмайтын препарат болып, өмір сапасын едәуір жақсартуға мүмкіндік береді.

Маңызды сөздер: лиофилденген гепатоциттер, созылмалы бауыр жетіспеушілігі

РАЗРАБОТКА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ГЕПАТОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Болатбек А.Каюпов, Самат С.Сапарбаев, Салтанат К.Уалиева, Жұлдызай А. Касымова, Агабек А.Оралбай, Айгерим Х. Жакупова, Айжан Р.Казбекова

АО «Национальный научный медицинский центр», г.Астана, Казахстан

На протяжении последних 10 лет нами был накоплен значительный клинический опыт, демонстрирующей способность инфузировавшихся гепатоцитов, выделенных из фетальной печени, приживаться в ткани хозяина, пролиферировать, функционировать и участвовать в регенеративном процессе. Планируется создать новый лекарственный препарат из лиофилизированных фетальных гепатоцитов, терапевтическое действие которого будет направлено на лечение пациентов с хронической печеночной недостаточностью. Описанный нами метод культивирования клеток фетальных гепатоцитов человека позволяет получить достаточное количество клеток в короткий срок, снизить в культурах количество балластных клеток кроветворного ряда и значительно увеличить сроки переживания гепатоцитов в культуре.

Отработанные протоколы по получению лиофилизированных гепатоцитов позволяют создать альтернативу монопрепаратам подобного ряда как для системного специфического лечения, стимуляции процессов регенерации и повышения резервных возможностей организма при различных заболеваниях печени. Правильно подобранные технологические процессы получения препарата позволяют сохранять биологически активные вещества выделяемые фетальными гепатоцитами, а также исключить необходимость специальных методов хранения и осуществления трансфера лекарственных препаратов до пациентов за пределами лечебного учреждения. Данный препарат будет незаменим для пациентов с дегенеративными заболеваниями печени, что позволит значительно улучшить качество жизни.

Ключевые слова: лиофилизированные гепатоциты, хроническая печеночная недостаточность

АКТУАЛЬНОСТЬ

Трансплантация печени остается единственным радикальным способом лечения при хронической печеночной недостаточности, годовая выживаемость после трансплантации печени достигает 60–80%, однако более половины больных, находящихся на листе ожидания, не доживают до операции [1]. В связи с этим трансплантацию гепатоцитов все чаще рассматривают как единственную альтернативу пересадке печени или же используют для пролонгации времени поиска гистосовместимого трансплантата печени.

Первые клинические попытки применения трансплантации фетальных гепатоцитов были предприняты группой профессора Nabibullah С.М. в 1994 году для лечения острой печеночной недостаточности и по понятным причинам успеха не имели, хотя введение аллогенных гепатоцитов и сопровождалось временным улучшением биохимических показателей крови [3].

На протяжении последних 10 лет нами был накоплен значительный клинический опыт, демонстриру-

ющей способность инфузировавшихся гепатоцитов, выделенных из фетальной печени, приживаться в ткани хозяина, пролиферировать, функционировать и участвовать в регенеративном процессе [2]. Многочисленными экспериментальными исследованиями было установлено, что «фетальные гепатоциты» обладают антиоксидантным, гепатопротекторным, противовоспалительным, иммуномодулирующим и регенеративными свойствами. Было показано, что трансплантация гепатоцитов корректировала дефекты метаболизма на многочисленных моделях, повторно заселяла печень хозяина в условиях, в которых клетки печени были утрачены или имели уменьшенную продолжительность жизни, обеспечивала функции печени во время острой печеночной недостаточности, индуцированной различными повреждениями, улучшала функции печени и пролонгировала выживание на CCl_4 -индуцированных моделях цирроза [4,5].

МЕТОДЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования была печень плода. Забор материала производился непосредственно после прерывания беременности по социальным показаниям, по оригинальной разработанной научной группой, методике, с последующей обработкой и гомогенизацией при помощи устройства для отделения клеток от стромы [2].

При проверке фетального материала применялась стандартизованная схема аттестации фетального материала, соответствующая международным стандартам на инфицированность тканей, используемых при проведении терапии фетальными тканями и клетками. Фетальный материал тестировался методом ПЦР на следующие возбудители: *chlamydia trachomatis*, *chlamydia*

pnevmonica, *ureaplasmas urelyticum*, *ureaplasmas parvum*, *mycoplasma hominis*, *mycoplasma genitalium*, *neiseria gonorrhoeae* т.1, *neiseria gonorrhoeae* т.2, *trichomonas vaginalis*, *cytomegalovirus*, *gardnerella vaginalis*, HSV 1,2 (герпеперус), HSV 16 (папилломавирус), HPV 18 (папилломавирус), HSV 6 (герпеперус), *candida albicans*, *treponema pallidum*, *toxoplasma gondii*, *mycobacterium tuberculosis*, hepatitis A virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, hepatitis D virus, hepatitis G virus, *brucelle species*, *epshteina Barr virus*, *salmonella*. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) фетальный материал исследовался на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ).

У плодов учитывались пол, масса тела, рост эмбриона, характеристика которых приведена в таблице 1.

Таблица 1 - Антропометрические данные исследуемых плодов

Данные плода					
масса (в граммах)	кол-во	рост (в см)	кол-во	Пол	
				Жен.	Муж.
200 –250	6	15-18	5	24	36
250-300	9	18-21	10		
300-350	10	21-24	11		
350-400	11	24-27	11		
400-450	12	27-30	12		
450-490	12	30-32	11		
Количество эмбрионов – 60					

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК

Забор материала производился непосредственно после прерывания беременности по социальным показаниям.

При этом должно учитываться, что для получения максимального количества фетальных гепатоцитов необходимо свести до минимума период тепловой ишемии органа. Проведенная затем оценка жизнеспособности эмбриональных гепатоцитов человека, после выделения клеток этим способом, показала, что выход жизнеспособных гепатоцитов составил (94,2±4,2)%.

В основе методики выделения фетальных гепатоцитов лежит комбинированная (механическая и химическая) фрагментация эмбриональной печени. Для деагрегации ткань печени инкубировали в ферментном растворе, содержащем 0.25% раствор трипсина и 0.05% раствор коллагеназы в соотношении 1:1 в течение 20-30 минут с последующим многократным суспендированием до получения одноклеточной суспензии, далее последнюю трижды отмывают центрифугированием при 700 об/мин.

МЕТОДИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Полученную взвесь первичных диссоциированных клеток культивировали в ростовой среде RPMI+F12 (1:1), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мкг/мл инсулина, 10 мкг/мл гентамицина, с добавлением дексаметазона 0.00125 мл/мл, до достижения клеточной культуры конфлюэнтного состояния. Жизнеспособность клеток определяли с использованием витального красителя – трипановая синь: каплю полу-

ченной суспензии окрашивали 0,1% раствором трипанового синего.

Все вышеперечисленные условия приготовления рабочей взвеси фетальных гепатоцитов в совокупности дали достаточно высокий, на наш взгляд, исходный уровень жизнеспособных изолированных гепатоцитов плода человека (94,2±4,2%) (Рисунок 1).

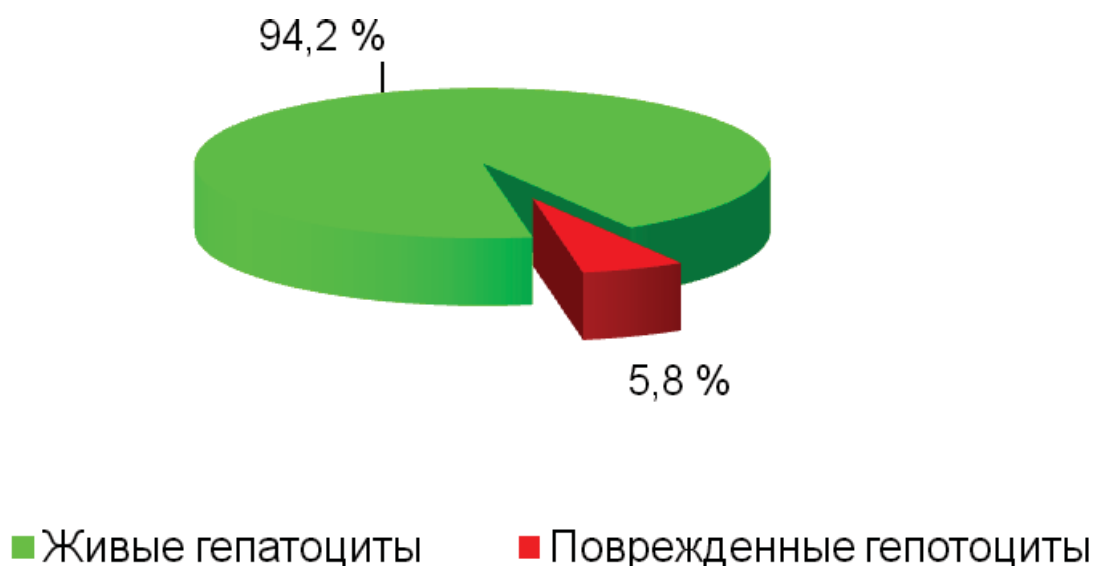


Рисунок 1. Жизнеспособность фетальных гепатоцитов

Для определения эффективности культивирования мы определяли индекс пролиферации - отношение чис-

ла выросших к количеству засеянных клеток. В качестве факторов роста при культивировании фетальных

гепатоцитов нами были использованы инсулин в концентрации 0,12 Ед/мл и дексаметазон (0,05 мг/мл). На 3-5е сутки наблюдалось хорошее прикрепление клеток при культивирования.

Жизнеспособность клеток на различных сроках культивирования определялась с помощью морфологического исследования. На 1 сутки от начала культивирования в культуре присутствуют клетки печени и элементы кроветворения на различных стадиях дифференцировки. Гепатоциты в культуре представлены скоплениями полигональных клеток с крупными ядрами со значительным количеством эухроматина, содержащими до пяти ядрышек (рисунок 2). Среди гепатоцитов отмечаются клетки, содержащие два ядра, в цитоплазме клеток присутствуют базофильные включения. К 3 суткам

культивирования доля клеток кроветворного ряда значительно снижается, гепатоциты формируют клеточные агрегаты (до 25-30 клеток), напоминающие печеночные балки. Кроме того, в культуре присутствуют веретенообразные фибробластоподобные клетки, содержащие мелкие, вытянутые, интенсивно окрашенные ядра (рисунок 3). По мере увеличения сроков культивирования продолжает снижаться количество клеток кроветворного ряда, к 6 суткам культивирования в культуре сохраняются клеточные агрегаты гепатоцитов, со светлыми ядрами и базофильными включениями в цитоплазме. К 7 суткам культивирования вокруг скоплений гепатоцитов. При культивировании в отсутствие факторов роста гепатоциты сохраняли жизнеспособность в культуре не более 5-6 суток.

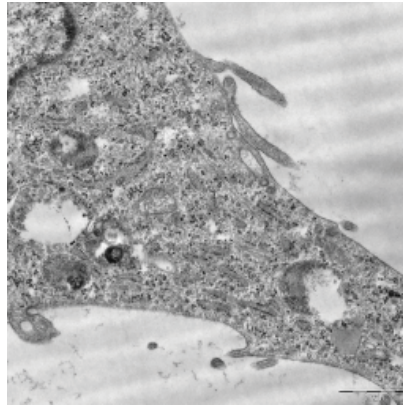


Рис.2 Ядро с высоким содержанием эухроматина и тонкой полоской гетерохроматина. Электроннограмма

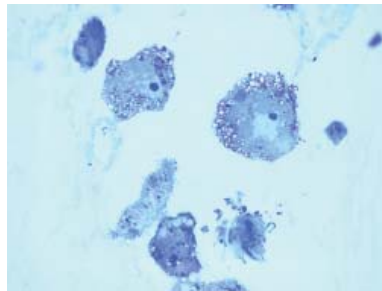


Рис.3 Культуральные фетальные фибробласты печени полиморфной величины и формы с плотными гранулами и вакуолями. Полутонкий срез. Окраска метиленовым синим, азуром 2 и основным фуксином. X 1000

Таким образом, описанный метод культивирования клеток фетальных гепатоцитов человека позволяет получить достаточное количество клеток в короткий срок,

снизить в культурах количество балластных клеток кроветворного ряда и значительно увеличить сроки переживания гепатоцитов в культуре.

МЕТОДИКА ЛИОФИЛИЗАЦИИ ФЕТАЛЬНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ

Методика лиофилизации культур клеток включает в себя стадии: замораживания при температуре ниже эвтектических значений (при которых растворы защитных сред полностью замерзают); первичное высушивание, когда вся выморозенная в лед свободная влага су-

блимируется под воздействием движущих сил-вакуума и подводимой тепловой энергии; вторичное высушивание (досушивание) когда удаляется связанная влага под воздействием тех же сил, но с более интенсивным подводом тепла [4,5,6]. Гепатоциты, подлежащие лиофили-

зации, выращивали по выше описанной методике до начала стационарной фазы роста или окончания процесса культивирования в питательной среде, при достижении обильного роста клеток. Подготовка клеток к высушиванию на всех стадиях технологического цикла проводилась с учетом функционального состояния клеток. Для того чтобы клетки при низкой температуре сохраняли способность полностью контролировать последовательность и характер биохимических превращений, клеточный материал хранили и смешивали с защитной средой при низких температурах, но не ниже минимальной температуры роста.

В состав защитных сред входят различные вещества, которые предохраняют клетки от повреждений в период замораживания и высушивания:

- Желатин -1г
- Сахароза 10мг.
- Вода дистиллированная 100мл.
- Молоко обезжиренное
- 6% раствор желатины 2,5мл

10% раствор сахарозы 0,5мл
сыворотка фетальная 2,5

Как правило клеточный препарат достаточно нестабилен и автоклавирование в конечной емкости невозможно и при обычной для фармакопей стерилизации склонен к разложению. Для успешной лиофилизации в защитной среде создавали высокую плотность клеток 10^9 - 10^{10} в 1мл. Полученную суспензию разливали в ампулы или в пенициллиновые флаконы из нейтрального стекла по 1 мл., замораживали при температуре от -20° до -70° , затем высушивали на аппарате лиофильной сушки Bench Top (Virtis, США), в период высушивания для предотвращения выноса активных веществ добавляли в качестве структурообразователей 6% раствор желатины 2,5мл и 10% раствор сахарозы 0,5мл

Остаточная влажность лиофилизированных клеток колебалась от 1-6%. Хранение осуществляли в течение 8 месяцев при температуре $+4$ (Рисунок 4,5).



Рисунок 4. Лиофилизированные гепатоциты на 8 месяце хранения

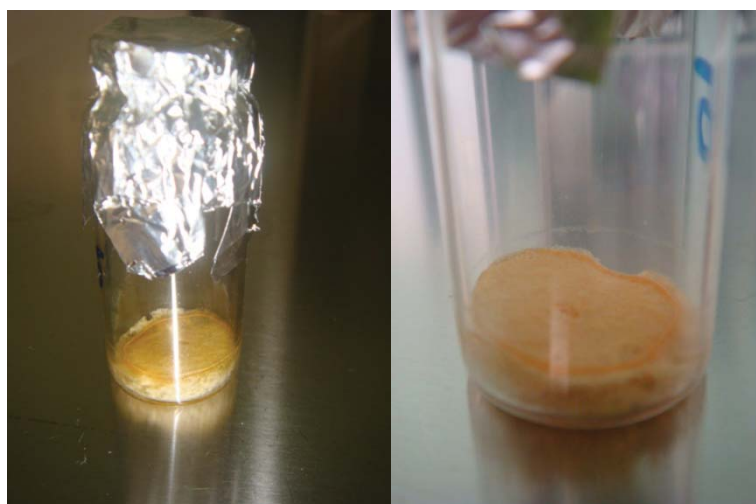


Рисунок 5. Лиофилизированные гепатоциты фасованные во флаконы из нейтрального стекла

Для сохранения активных веществ содержащихся в клетках принципиально важно было держать рН в нейтральных цифрах. Изначальное значение рН рав-

нялось $7,4 \pm 0,0$ как до, так и после лиофилирования. Затем произошёл стремительный спад в интервале от 0 до 90 минут в сторону закисления, достигнув отметки

6,72±0,089 и 6,78±0,089 соответственно при времени 90 минут. В дальнейшем, происходило незначительное снижение уровня рН с угасанием активности, достигая значений 6,46±0,077 для гепатоцитов не подвергшихся лифилизации и 6,54±0,077 для клеток прошедших все этапы лиофилирования (Рисунок 6). Концентрация HCO_3^- менялась в обратном направлении в сравнении с динамикой рН надосадка. При изначальных концентрационных значениях равных

2,1 ±0,0 и 2,08±0,089 ммоль/л (до и после лиофилирования) динамичное падение уровня наблюдалось до 60 минутного барьера, и была равна 2,58±0,089 и 2,6±0,022 ммоль/л соответственно. В дальнейшем определялась картина замедленного снижения показателей, вплоть до фактической остановки с концентрацией равной 3,08 ±0,89 и 3,02±0,089 ммоль/л при 180 минутной экспозиции клеток в водяной бане при $t = 37^\circ\text{C}$.

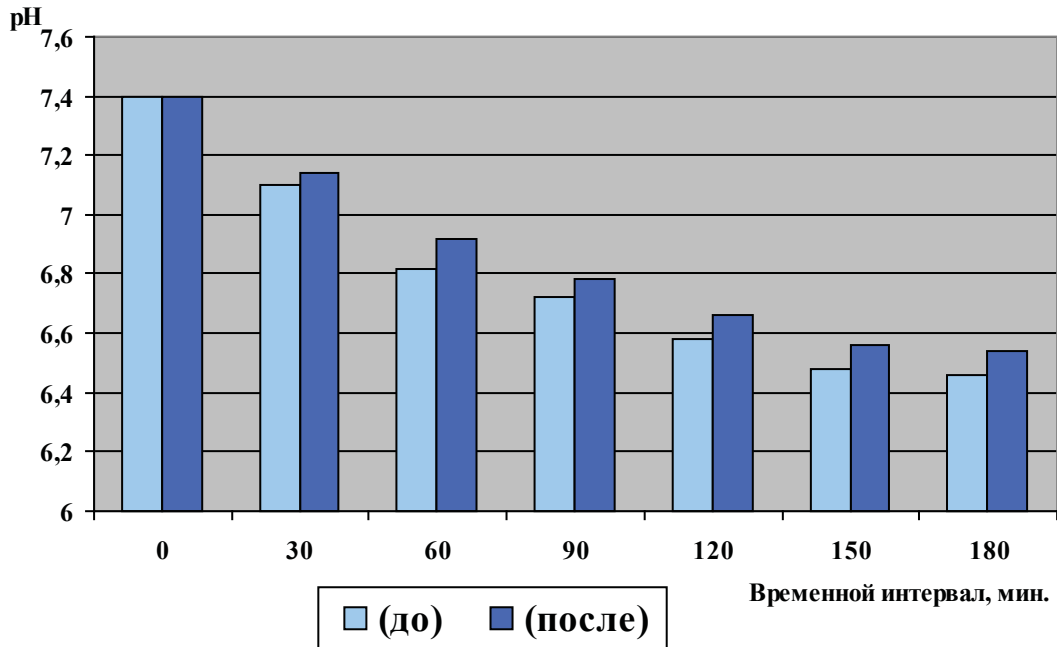


Рисунок 6- Динамика изменения рН надосадка взвеси фетальных гепатоцитов в зависимости от времени (до и после лиофилизации)

Для применения лиофилизированную культуру гепатоцитов переводили в суспензию, сразу после вскрытия ампул добавляя в каждую 0,5-1,0 мл 0,9 % физиологического раствора или воды для инъекций, тщательно перемешивали.

Таким образом нам удалось получить стабильную форму лиофилизированных фетальных гепатоцитов.

Дальнейшие наши исследования направлены на определение условий длительного хранения лиофилизата, биохимического, фенотипического и цитохимического состава.

Использование результатов фундаментальных работ целого ряда наук (эмбриологии, биологической медицины, биологической химии, криобиологии, физико-химической химии) при создании препарата лиофилизированных гепатоцитов позволяет получить в конечном итоге лекарственные препараты с сохраненными уникальными свойствами фетальных клеток и тканей.

Отработка протоколов по получению лиофилизированных гепатоцитов позволит создать альтернативу монопрепаратам подобного ряда как для системного специфического лечения, стимуляции процессов регенерации и повышения резервных возможностей организма при различных заболеваниях печени. Данный препарат будет незаменим для пациентов с дегенеративными заболеваниями печени, что позволит значительно улучшить качество жизни.

Все методики и наши разработки получили международный патент (WO2012154016 A1) «Способ получения лиофилизата из гепатоцитов человека» от 14 ноября 2012г. [11]. Данный метод позволит внедрить технику получения лиофилизированных гепатоцитов для исключения специальных методов хранения и осуществления безпрепятственного трансфера лекарственных препаратов до пациентов за пределами лечебного учреждения

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoofnagle JH, DiBisceglie AM: The treatment of chronic viral hepatitis. N Engl J Med 336:347, 1997
2. Байгенжин А.К., Доскалиев Ж.А., Каюпов Б.А., Сапарбаев С.С. Способ получения лиофилизата из гепатоцитов человека. Патент. АО «НННМЦ», 2012

3. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation*; 1994 Oct 27; 58(8): 951-2.
4. International patent Method for producing freeze-dried product of human hepatocytes (WO2012154016), 25.11.2013
5. Доскалиев Ж.А., Асабаев А.Ш., Жетимкаринова А.Д., Стикеева Р.К., Попова Н.В., Каюпов Б.А., Конакбай Б.К. Опыт применения клеточных медиаторов в иммунокоррекции панкреонекроза // Матер. XIV междунар. Конгресса хирургов-гепатологов стран СНГ, С.-Петербург *Анналы хирургической гепатологии*, 2007. -С.185.
6. Стикеева Р.К. Влияние трансплантации неклеточных фракций фетальных тканей на процессы иммунитета и воспаления // *Актуальные вопросы хирургии.*- Омск, 2008.- С.121-125
7. Uzunova-Doneva, T. Anabiosis and conservation of microorganisms/T/ *Journal of culture collections.*-204;2005-V.4.-P.1728
8. Бланков Б.И. Применение лиофилизации в микробиологии// *Медгиз*,1961.-282 с.
9. Давыдкин Ю.П. О движущей силе процесса сублимации влаги из различных материалов// *Системы управления и автоматизации технологических процессов-М.:НИИСЭНТИ*,1993.-Вып.1.-40 с.
10. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Перспективы и проблемы использования трансплантации клеток эмбриональной и фетальной печени для коррекции наследственной патологии // *Трансплантология*, 22, 2005.
11. Baigenjin, A. K., Kayupov, B. A., Saparbaev, S. S., Askarov, M. B., Doskaliev, Z. A., Akhaeva, A. A., ... & Sembaev, K. D. (2012). WIPO Patent No. 2012154016. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization