

Особенности выделения, криоконсервирования и аллогенной трансплантации гепатоцитов кроликов

А.С. Лебединский, А.Ю. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г.Харьков

Peculiarities of Isolation, Cryopreservation and Allogeneic Transplantation of Rabbit's Hepatocytes

Lebedinsky A.S., Petrenko A.Yu.

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

Изучали влияние скорости введения суспензии гепатоцитов в портальную вену на активность трансаминаз в крови и морфологию печени. Полученные результаты показали, что снижение скорости введения гепатоцитов при трансплантации в воротную вену приводит к равномерному распределению донорских гепатоцитов в печени реципиента, позволяя уменьшить тромбообразование в системе портального кровотока и снизить степень повреждения собственной печени реципиента. Результаты могут быть использованы для изучения влияния трансплантированных криоконсервированных гепатоцитов при экспериментальных патологиях печени кроликов.

Ключевые слова: трансплантация криоконсервированных гепатоцитов, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза.

Вивчали вплив швидкості інфузії суспензії гепатоцитів в портальну вену на активність трансаминаз в крові та морфологію печінки. Отримані результати показали, що зменшення швидкості інфузії гепатоцитів при трансплантації в воротну вену призводить до рівномірного розподілу донорських гепатоцитів в печінці реципієнта, дозволяючи зменшити тромбоутворення в системі портального кровообігу та знизити ступінь ураження власної печінки реципієнта. Результати можуть бути використані для вивчення впливу трансплантованих криоконсервованих гепатоцитів при експериментальних патологіях печінки кролів.

Ключові слова: трансплантація криоконсервованих гепатоцитів, аланінамінотрансфераза, аспаратамінотрансфераза.

The effect of introduction rate of hepatocyte suspension into a portal vein on transaminase activity in blood and liver morphology was studied. The obtained results have demonstrated, that the rate decrease of hepatocyte introduction when transplanting into a portal vein results in an even distribution of donor's hepatocytes to recipient's liver, allowing to reduce the thrombogenesis in the portal blood flow system and to decrease the damage degree for recipient's own liver. The results can be used for studying the effect of transplanted cryopreserved hepatocytes at experimental pathologies of rabbit's liver.

Key words: transplantation of cryopreserved hepatocytes, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase.

Разработанные в настоящее время технологии позволяют получать жизнеспособные изолированные гепатоциты, которые *in vitro* сохраняют функциональные свойства, характерные для целой печени [1, 13].

Данные, имеющиеся в литературе, свидетельствуют о том, что при отравлениях токсическими веществами, воспалительных процессах трансплантированные изолированные гепатоциты способны временно выполнять функцию поврежденной печеночной паренхимы, облегчая при этом восстановление печени реципиента [2, 3].

Показано, что при введении в воротную вену и селезенку как свежeweделенные, так и криоконсервированные гепатоциты могут нормально функционировать и пролиферировать, заселяя при этом печень реципиента [4, 12]. Особенности строения селезенки ограничивают объем и количество трансплантируемых клеток. Трансплантация гепатоцитов в брюшную полость

Current technologies permit to obtain the viable isolated hepatocytes, preserving *in vitro* functional properties, typical for the whole liver [1, 13].

The literature data testify to the fact that during poisoning with toxic substances, inflammatory processes, the transplanted isolated hepatocytes are capable to realise the function of damaged hepatic parenchyma, facilitating at the same time the recipient's liver recovery [2, 3].

It was shown, that during introduction into a portal vein and spleen both freshly isolated and cryopreserved hepatocytes can normally function and proliferate, by settling during this a recipient's liver [4, 12]. The peculiarities of spleen structure limit the volume and number of transplanted cells. Hepatocyte transplantation into abdominal cavity permits to introduce big volumes of cells, but at the same time the transplanted hepatocytes occur to be under conditions, sharply differing from physiological ones, that results in their death [7]. In additions, there is a huge risk of the

Адрес для корреспонденции: Лебединский А.С., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720135, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Lebedinsky A.S., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720135, fax: +38 (0570 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

позволяет вводить большие объемы клеток, однако при этом трансплантированные гепатоциты попадают в условия, резко отличающиеся от физиологических, что приводит к их гибели [7]. Кроме того, велик риск возникновения процессов воспаления в брюшной полости. Оптимальным путем введения гепатоцитов следует признать интрапортальный, поскольку он позволяет вводить в печень необходимое количество клеток, которые, попадая в естественное микроокружение, способны длительное время выполнять органоспецифические функции. Вместе с тем такой путь введения может вызвать повреждение печени, обусловленное нарушением гемодинамики [6, 11, 14]. Вопросы, касающиеся способа, дозы и скорости введения гепатоцитов в сосудистое русло, а также анализа возможных осложнений, в литературе освещены недостаточно.

Материалы и методы

В работе выполнена модификация метода выделения гепатоцитов для последующего криоконсервирования и аллогенной трансплантации кроликам с целью изучения влияния скорости введения клеточной суспензии в портальную вену на активность трансаминаз в крови и морфологию печени.

Гепатоциты получали на основе ферментативного метода [9, 10]. Для этого брюшную полость анестезированных тиопенталом натрия кроликов массой 0,7-1 кг вскрывали, канюлировали портальную вену и закрепляли ее лигатурой, а нижнюю полую надсекали в месте ответвления правых почечных сосудов для оттока перфузата. Перфузию проводили изотоническим сахарозолевым раствором, содержащим 4 Мм ЭДТА, рН 7,4 при 38°C в течение 15 мин со скоростью 80 мл/мин. После окончания перфузии печень извлекали из брюшной полости, помещали в среду дезагрегации, содержащую 250 мМ сахарозы, 5 мМ КСl, 0,8 мМ MgCl₂, 1,6 мМ Na₂HPO₄, 0,4 мМ KH₂PO₄, 1,2 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES, 1% БСА (рН 7,4, температура 0°C) и измельчали на кусочки величиной 2-3 мм. Измельченную печень переносили в пробирку, добавляли двойной объем охлажденной до 0°C среды дезагрегации и подвергали действию вибрации с частотой 50 Гц в течение 60 с. В процессе вибрации более 70% массы печени разделялось на одиночные клетки. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр и очищали 2-3-кратным центрифугированием при 200g в течение 1-4 мин, приводившим к разделению гепатоцитов на два слоя, из которых нижний, более темный, содержал в основном клетки с нативной плазматической мембраной, устойчивой к окрашиванию витальным кра-

inflammatory process appearance in abdominal cavity. The intraportal way for hepatocyte introduction should be considered as the optimal one, since it allows the introduction into liver of necessary amount of cells, which being in natural microenvironment, are capable to perform for a long time the organ-specific functions. However, such way of introduction can cause the liver damage, stipulated by hemodynamics disorder [6, 11, 14]. The questions, related to the way, dose and rate of hepatocyte introduction into the blood channel, as well as the analysis of possible complications are not widely covered in the literature.

Materials and methods

In the work there was performed the modification of hepatocyte isolation method for following cryopreservation and allogeneic transplantation to rabbits with the aim of studying the effect of cell suspension introduction rate into a portal vein on transaminase activity in blood and liver morphology.

Hepatocytes were obtained at the base of non-enzymatic method [9, 10]. For this purpose the abdominal cavity of sodium thiopental-anesthetised rabbits of 0.7-1 kg mass was opened, the portal vein was cannuled and ligature-fixed, and the inferior caval vein was slightly incised at the site of right kidney vessel branching for perfusate outflow. Perfusion was done in isotonic sucrose-saline solution, containing 4 Mm of EDTA, pH 7.4 during 15 min with the rate of 80 ml/min. After finishing perfusion the liver was extracted from abdominal cavity, placed into desaggregation medium, containing 150 mM of sucrose, 5mM of KCl, 0.8 mM of MgCl₂, 1.6 mM of Na₂HPO₄, 0.4 mM of KH₂PO₄, 1.2 mM of CaCl₂, 10 mM of HEPES, 1% of BSA (pH 7.4, temperature of 0°C) and reduced to 2-3 mm' pieces. Crushed liver was transferred into a vial, a double volume of cooled down to 0°C desaggregation medium was added and the liver was subjected to the vibration effect with 50Hz frequency during 60 sec. During vibration more than 70% of liver mass was divided into single cells. The obtained suspension was filtered through a nylon filter and purified by 2-3 time's centrifugation at 200 g during 1-4 min, resulted in hepatocyte division in 2 layers, where the inferior one, more dark, contained mostly the cells with native plasmatic membrane, resistant to staining by trypane blue vital dye [13].

Cell suspension was frozen in desaggregation medium, described above and with 5% DMSO adding, on cooled down to -25°C alcohol bath during 30 min with following material transfer into liquid nitrogen [8].

Hepatocytes were thawed on water bath at 37°C, afterwards they were twice washed-out from cryoprotectant at 200 g during 2 min.

The investigations were carried-out in breedless

сителем трипановым синим [13].

Суспензию клеток замораживали в среде дезагрегации, описанной выше и дополненной 5% ДМСО, на охлажденной до -25°C спиртовой бане в течение 30 мин с последующим переносом материала в жидкий азот [8]. Отогревали гепатоциты на водяной бане при температуре 37°C , после чего дважды отмывали от криопротектора при 200g в течение 2 мин.

Исследования проводили на беспородных кроликах массой 1,5-2,4 кг. Трансплантацию гепатоцитов животным проводили под внутривенным наркозом (тиопентал натрия, 50 мг/кг массы) путем инфузии в воротную вену. Животные были разбиты на три группы. В группе I (n=5) деконсервированные гепатоциты (концентрация 5×10^6 клеток/мл, общий объем суспензии 20 мл) вводили со скоростью 4 мл/мин. В группе II (n=5) гепатоциты в той же концентрации и в том же количестве вводили со скоростью 1 мл/мин. Общее количество гепатоцитов, трансплантируемых одному животному, составляло 10^8 . Распределение гепатоцитов в печени оценивали визуально по результатам введения в трансплантируемую суспензию 0,6%-го трипанового синего. Контрольную группу составляли кролики, которым вводили в воротную вену 20 мл раствора Хенкса (n=5). После окончания инфузии в брюшную полость животных вводили по 1 млн ед. пенициллина. Операционную рану послойно зашивали наглухо и животных помещали в стандартные условия вивария. Послеоперационной гибели животных не наблюдалось. На 1, 2, 3, 5 и 7-е сутки производили забор крови из ушной вены для определения активности трансаминаз в крови. Через неделю животных забивали и фиксировали фрагменты печени для гистологических исследований.

Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) определяли по методу Вроблевского, аспартатаминотрансферазы (АсАТ) - по методу Бергмейера с использованием диагностических наборов фирмы Sigma. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали в световом микроскопе. В гистологических препаратах проводили морфометрическое исследование клеток печени.

Статистически результаты обрабатывали по методу Манна-Уитни.

Неферментативный метод выделения гепатоцитов из печени крыс был разработан в ИПКиК НАНУ [9,10] и в настоящее время используется в ряде лабораторий. В данной работе этот метод послужил основой для выделения гепатоцитов из печени более крупного объекта – кроликов. При смене объекта критическим моментом явилась скорость перфузии органа. Во время перфузии с

rabbits of 1.5-2.4 kg mass. Hepatocyte transplantation to the animals was performed under intravenous anaesthesia (sodium thiopental, 50 mg/kg of mass) by infusion into portal vein. Animals were divided into 3 groups. In the group I (n=4) the frozen-thawed hepatocytes (concentration of 5×10^6 cells/ml, total suspension volume was 20 ml) were introduced with the rate of 4 ml/min. In the group II (n=4) hepatocytes in the same concentration and the same amount were introduced with 1 ml/min rate. The total number of hepatocytes, transplanted to one animal made 10^8 . Hepatocyte distribution in liver was visually estimated by the results of introduction into transplanted suspension of 0.6% trypane blue. The control group comprised the rabbits, to whom 20 ml of Hens solution (n=4) were introduced into a portal vein. When infusion was finished, one introduced into abdominal cavity by 1 ml units of penicillin. Operative wound was tightly sutured by layers and the animals were placed under vivarium standard conditions. No postoperative death of animals was observed. To the 1st, 2nd, 3rd, 5th and 7th day there was conducted the blood taking from otic vein to determine the activity of transaminases in blood. In a week the animals were killed and the liver fragments were fixed for histological examination.

The activity of alanine aminotransferase (AlAT) was determined on the method of Wroblevski, aspartate aminotransferase (AsAT) on the method of Bergmeyer using diagnostic sets (Sigma). Histological slices were stained with haematoxylin and eosin and were investigated with light microscope. In histological preparations morphometric studies of liver were performed.

Statistically the results were processed with the Mann-Whitney test.

Non-enzymatic method of hepatocyte isolation from rat's liver has been developed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine [9, 10] and now is used in some laboratories. In this paper the method served as the base for isolation of hepatocytes from liver of bigger object, rabbits. When changing the object the perfusion rate of an organ is crucial moment. During the perfusion with low rates the liver was evenly washed-out of blood and saturated with perfusate. At the perfusion rate of 60 ml/min we have obtained the cells with viability of 78%. The increase of perfusion rate up to 80 ml/min allowed the increasing of viability of the obtained cells up to 86%. Other stages of hepatocyte isolation did not require the significant modification and were carried-out in the same way as for rats. Cryopreservation of hepatocytes, including rapid two-stage freezing under the protection of 5% DMSO, resulted in the death of a part of cells. Their viability after cryopreservation and

низкими скоростями печень равномерно отмывалась от крови и насыщалась перфузатом. При скорости перфузии 60 мл/мин получили клетки с жизнеспособностью 78%. Увеличение скорости перфузии до 80 мл/мин позволило повысить жизнеспособность полученных клеток до 86%. Другие этапы выделения гепатоцитов не требовали существенной модификации и проводились так же, как и на крысах. Криоконсервирование гепатоцитов, включающее быстрое двухступенчатое замораживание под защитой 5% ДМСО, приводило к гибели части клеток. Их жизнеспособность после криоконсервирования и отмывки от криопротектора составляла 56%. Таким образом, неферментативный метод выделения гепатоцитов и способ их криоконсервирования, разработанные на крысах и адаптированные нами для более крупных животных, оказались пригодными для получения жизнеспособных гепатоцитов из печени кроликов.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния разных скоростей введения донорских клеток на состояние печени реципиента показало, что при инфузии суспензии гепатоцитов со скоростью 4 мл/мин распределение донорских клеток в печени не было равномерным. Визуально на поверхности печени, в норме имеющей красно-коричневый цвет, выявлялись в виде мозаики участки, отличающиеся более темной окраской. Спустя 7 суток при сравнении гистологических препаратов нативной печени (рис. 1,а) и печени после введения суспензии гепатоцитов со скоростью 4 мл/мин при сохранении общего плана строения наблюдались видимые деструктивные изменения печеночной паренхимы (рис. 1,б). Гепатоциты печени были значительно увеличены в размерах, отмечали выраженное просветление их цитоплазмы, пикноз большинства ядер. Более того, встречались безъядерные гепатоциты. Часть центральных вен была заполнена кровью. В некоторых венах обнаруживались тромбы, в состав которых входили клеточные элементы, по морфологии сходные с введенными гепатоцитами. В области триад зачастую наблюдалась выраженная клеточная инфильтрация.

Снижение скорости введения суспензии гепатоцитов до 1 мл/мин приводило к более равномерному распределению трансплантируемой клеточной суспензии в ткани печени, что визуально выражалось в достаточно однородной темной окраске поверхности органа. На гистологических препаратах (рис. 1,в) наблюдались дистрофические изменения печеночной паренхимы, однако они были менее выражены, чем при скорости введения 4 мл/мин. Отмечались умеренная отечность

washing-out of cryoprotectant made 56%. Thus non-enzymatic method of hepatocyte isolation and the way of their cryopreservation, developed in rats and adapted by us to bigger animals, occurred to be suitable for the obtaining of viable hepatocytes derived from rabbit's liver.

Results and discussion

The study of the effect of different introduction rates for the of donor's cells on the state of a recipient's liver has shown that during the infusion of hepatocyte suspension with the rate of 4 ml/min the distribution of donor's cells in liver was uneven. Visually on the surface of liver, which is in the norm of red-brownish colour, there were revealed as the mosaics the sites, differing with darker colour. In 7 days when comparing histological preparations of native liver (Fig. 1a) and liver after introduction of hepatocyte suspension with the rate of 4 ml/min with keeping the total structure plan there were observed visible destructive changes in hepatic parenchyma (Fig. 1b). Liver hepatocytes were considerably increased in sizes, there was found a pronounced enlightenment of their cytoplasm, pyknosis of the majority of nuclei. Moreover there were met free-nuclei hepatocytes. The part of central veins was filled with blood. On some veins we have found the thrombus, comprising cellular elements, which were similar on morphology with introduced hepatocytes. In the area of triads often there was observed a manifested cellular infiltration.

The reduction in the rate of hepatocyte suspension introduction down to 1 ml/min resulted in more even distribution of cellular suspension being transplanted to liver tissues, which visually was manifested in quite homogenous dark colour of organ surface. On histological preparations (Fig.1c) we observed dystrophic changes in hepatic parenchyma, but they were less manifested, than at the introduction rate of 4 ml/min. There was noted a moderate oedema of hepatocytes with enlightenment of cytoplasm, as well as slightly manifested pyknosis of part of the nuclei. Sometimes central veins contained blood elements, partially destroyed, as well as the cells which likely are of donor's origin. In the triads' site a cellular infiltration was moderately manifested.

The change in linear sizes of recipient's hepatic cells in response to transplantation of allogeneic frozen-thawed hepatocytes' suspension into a portal vein were morphometrically estimated on histological slices and were presented in the percentage in respect of the control (Figure 2). In the group I there was found practically two-fold increase in linear sizes of hepatocytes. In group II the rise in sizes of cells was observed, but it was not statistically true in respect to the control ($p < 0.05$).

The results of investigation of the dynamics of

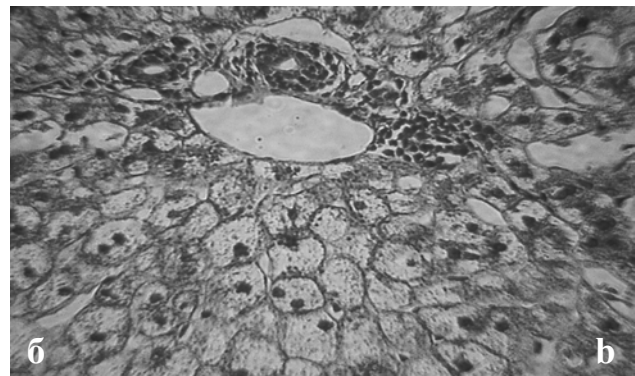
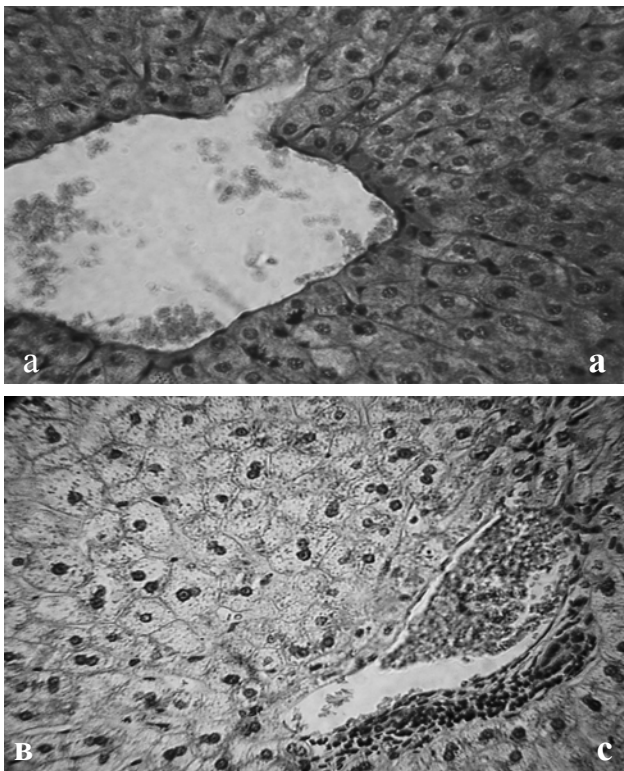


Рис. 1. Гистологическая картина печени кролика после введения аллогенных гепатоцитов: а – нативный препарат; б – введение гепатоцитов со скоростью 4 мл/мин; в – введение гепатоцитов со скоростью 1 мл/мин. Окраска гематоксилином и эозином, х 250.

Fig. 1. Histological picture of rabbit's liver after introduction of allogeneic hepatocytes: a – native preparation; b – introduction of hepatocytes with the rate of 4ml/min; c – introduction of hepatocytes with the rate of 1 ml/min. Staining with haematoxylin and eosin, x 250.

гепатоцитов с некоторым просветлением цитоплазмы, а также слабо выраженный пикноз части ядер. Иногда центральные вены содержали форменные элементы крови, частично разрушенные, а также клетки, видимо, донорского происхождения. В области триад имелась умеренно выраженная клеточная инфильтрация.

Изменение линейных размеров печеночных клеток реципиента в ответ на трансплантацию в портальную вену суспензии аллогенных деконсервированных гепатоцитов было оценено морфометрически на гистологических срезах и выражено в процентах по отношению к контролю (рис.2). В группе I отмечено практически двукратное увеличение линейных размеров гепатоцитов. В группе II увеличение размеров клеток наблюдалось, но не было достоверным по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Результаты исследования динамики изменения активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови приведены на рис. 3,4. Установлено, что уже на 2-е сутки после трансплантации при скорости введения 4 мл/мин имелось достоверное повышение активности АлАТ в крови в 4,1 раза (рис. 3), причем активность данного фермента оставалась повышенной до третьих суток включительно. При снижении скорости введения до 1 мл/мин повышение активности АлАТ наблюдалось в те же сроки (рис. 3), однако выражено было гораздо слабее. Высокий уровень АлАТ в течение 3-х суток после трансплантации при скорости введения клеточной суспензии 4 мл/мин, по-видимому, связан как с деструктивными процессами парен-

change in АлАТ and АсАТ activity in blood serum are presented in Fig. 3, 4. It has been established that even to the 2-nd day after transplantation at the introduction rate of 4 ml/min there was a statistically true rise in АлАТ activity in blood in 4.1 times (Fig. 3), moreover the activity of this enzyme remained to be an increased up to the third day inclusively. When decreasing the introduction rate down to 1ml/min the rise in АлАТ

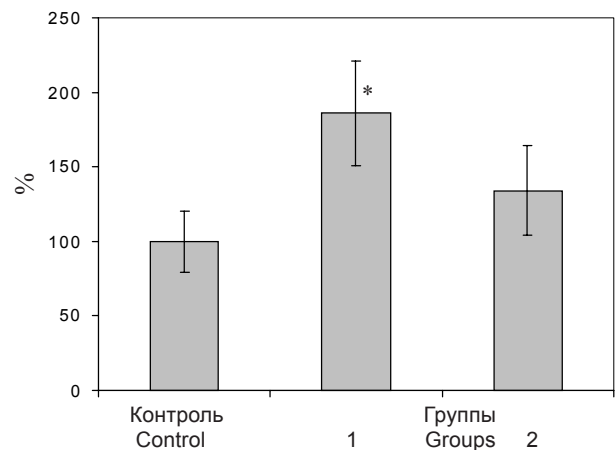


Рис. 2. Изменение линейных размеров клеток в ответ на трансплантацию в портальную вену суспензии аллогенных деконсервированных гепатоцитов в зависимости от скорости введения. Изменение линейных размеров клеток печени выражено в процентах по отношению к контролю (*- $p < 0,05$ относительно контрольной группы).

Fig. 2. Change of linear sizes of cells in response to the transplantation to portal vein of the suspension of allogeneic frozen-thawed hepatocytes depending on the rate of introduction. Change in linear sizes of cells is in terms of the percentage in respect of the control (*- $p < 0.05$ in respect of the control group).

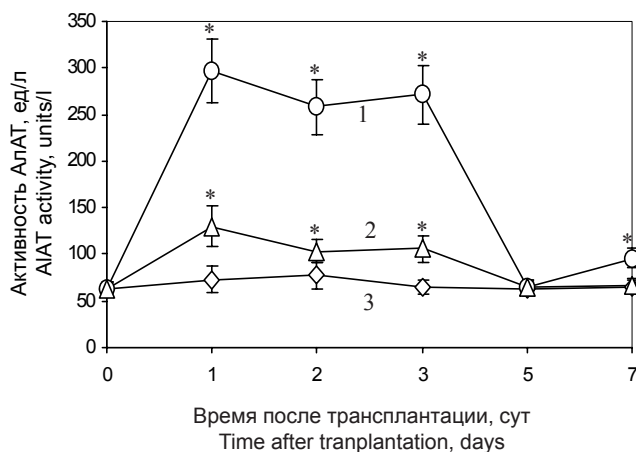


Рис. 3. Динамика изменения активности АЛАТ в сыворотке крови кроликов после трансплантации аллогенных деконсервированных гепатоцитов в зависимости от скорости введения. 1 – группа I; 2 – группа II; 3 – контроль (*- $p < 0,05$ относительно контрольной группы).

Fig. 3. Dynamics of the change in ALAT activity in rabbit's blood serum after transplantation of allogeneic frozen-thawed hepatocytes depending on the rate of introduction: 1 – group I; 2 – group II, 3 – control (* - $p < 0.05$ in respect of the control group).

химии печени реципиента вследствие грубых нарушений микроциркуляторного звена, так и с гибелью трансплантированных клеток в сосудистом русле. Активность АсАТ изменялась иным образом (рис.4): при скорости введения 4 мл/мин достоверное увеличение активности АсАТ наблюдалось, начиная с третьих суток после трансплантации, и достигало максимума на 7-е сутки. При скорости введения 1 мл/мин активность АсАТ достоверно увеличивалась, начиная с 5-х суток после трансплантации, однако степень его повышения была ниже по сравнению с группой I.

Согласно данным литературы после трансплантации гепатоциты попадают в капиллярную сеть портальной системы кровообращения, однако уже в первые 2-е суток после их введения происходит потеря из печени реципиента большинства трансплантированных клеток [12] вследствие вымывания кровью, а также процессов образования тромбов, содержащих донорские клетки и ухудшающих кровоснабжение [5]. Можно предположить, что повышение активности АЛАТ после трансплантации гепатоцитов связано не только с повреждением собственной печеночной паренхимы реципиента в результате нарушения микроциркуляции, но и с гибелью донорских клеток. Повышение активности АсАТ в сыворотке на 3-7 сутки после введения гепатоцитов свидетельствует, по-видимому, о степени нарушений гемодинамики и, как следствие этого, о повреждении печеночной паренхимы реципиента, а также, возможно, связано с реакциями иммунного отторжения

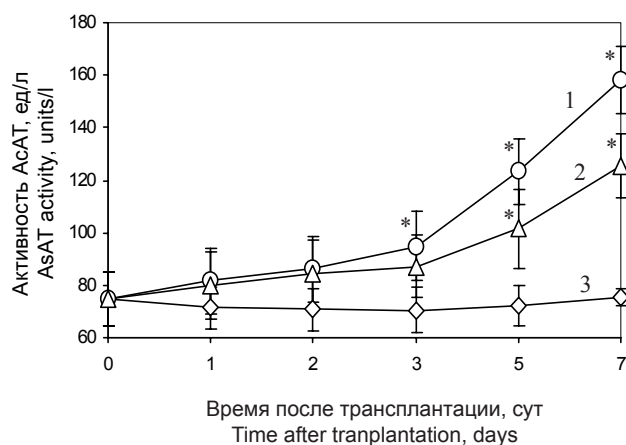


Рис. 4. Динамика изменения активности АсАТ в сыворотке крови кроликов после трансплантации аллогенных деконсервированных гепатоцитов в зависимости от скорости введения: 1 - группа I; 2 - группа II; 3 – контроль (*- $p < 0,05$ относительно контрольной группы).

Fig. 4. Dynamics of the change in AsAT activity of in rabbit's blood serum after transplantation of allogeneic frozen-thawed hepatocytes depending on the rate of introduction: 1 – group I; 2 – group II, 3 – control (* - $p < 0.05$ in respect of the control group).

activity was observed at the same terms (Fig. 3), but it was less manifested.

A high level of ALAT during 3 days after transplantation at the introduction rate of cellular suspension of 4 ml/min is likely connected to both destructive processes of recipient's liver parenchyma as a consequence of flagrant impairments in microcirculatory link and the death of the cells being transplanted in blood channel.

AsAT activity changed by the different way (Fig. 4): at the introduction rate of 4ml/min a statistically true increase in AsAT was observed starting from the 3rd day after transplantation and reached the maximum to the 7th day.

With the introduction rate of 1 ml/min the AsAT activity statistically and significantly increased, starting from the 5th day after transplantation, however its increase rate was lower in comparison with the group I.

According to literature data after transplantation hepatocytes are getting to a capillary net of blood circulation portal system, however even in the first 2 days after their introduction, however even in the first 2 days after their introduction there is a loss from a recipient's liver of the majority of transplanted cells [12] due to the washing-out with blood, as well as the processes of formation of thrombus, containing donor's cells and aggravating blood supply [5].

One can suppose that an increase in ALAT activity after transplantation of hepatocytes is related not only to damage of own hepatic parenchyma of a recipient as a result of disorder in microcirculation, but to the death of donor's cells. A rise in AsAT activity in serum

трансплантированных клеток. Исходя из полученных нами результатов, можно предположить, что скорость введения клеточной суспензии является важным параметром, во многом определяющим успешность трансплантации гепатоцитов. Снижение скорости введения позволяет добиться более равномерного распределения трансплантируемой суспензии в объеме печени реципиента, что значительно снижает риск образования тромбов в системе портального кровообращения и позволяет не только уменьшить повреждение печени реципиента, но и увеличить приживаемость клеток донора после трансплантации. Это особенно важно при исследованиях на моделях различных патологий печени, когда желателно выявить функциональный эффект трансплантата.

Выводы

Таким образом, снижение скорости введения гепатоцитов при трансплантации в воротную вену приводит к равномерному распределению донорских гепатоцитов в печени реципиента, позволяя при этом уменьшить тромбообразование в системе портального кровотока и снизить степень повреждения собственной печени. Выявлено соответствие между гистологическими, морфометрическими и биохимическими исследованиями. Полученные нами результаты могут быть использованы для изучения влияния трансплантированных криоконсервированных изолированных гепатоцитов на течение различных экспериментальных патологий печени кроликов.

Литература

1. *Petrenko A.Yu.* Энергетическое состояние и метаболизм ксенобиотиков в изолированных гепатоцитах в зависимости от условий выделения и криоконсервирования клеток: Дис... доктора биол. наук.– Харьков, 1993.– 337 с.
2. *Avital I., Feraresso C., Aoki T. et al.* Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection // *Surgery.*– 2002.– Vol.132, N2.– P. 384-390.
3. *Bilir B.M., Guinette D., Karrer F. et al.* Hepatocyte transplantation in acute liver failure//*Liver Transpl.*– 2000.– Vol.6, N1.– P. 32-40.
4. *Jamal H.Z., Weglarz T.C., Sandgren E.P.* Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity *in vivo* // *Gastroenterology.*– 2000.– Vol. 118, N2.– P. 390-394.
5. *Kocken J.M., Bouwman E., Scheringa M. et al.* Acute death after intraportal hepatocyte transplantation in an allogeneic rat strain combination: a possible role for complement activation // *Transplantation Proceedings.*– 1997.– Vol. 29.– P. 2067-2068.
6. *Muraca M., Neri D., Parenti A. et al.* Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study// *Transplantation.* - 2002. – Vol. 73, N 6. - P. 890-896.
7. *Onodera K, Kasai S, Mito M.* Hepatocellular transplantation in rats with congenital ascorbic acid deficiency // *Nippon Geka Gakkai Zasshi.*– 1995.– Vol. 96, N5.– P. 301-308.
8. *Petrenko A.Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D. et al.* Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethylsulfoxide and separation in Percoll density gradient //

to the 3rd-7th day after hepatocytes' introduction testifies probably to a injury of hepatic parenchyma of a recipient, as well as is likely connected to the reactions of immune rejection of transplanted cells. Proceeding from the obtained by us results, one can suppose that the rate of cellular suspension introduction is an important parameter, mainly determining the successful transplantation of hepatocytes. Reduction of the introduction rate allows the managing of more even distribution of the suspension being transplanted in the volume of a recipient's liver, that considerably diminishes the risk of thrombus formation in the system of portal blood circulation and permits not only to reduce a recipient's liver injury, but also increase the grafting of donor's cells after transplantation. This is of special importance to study in models the various liver pathologies, when the transplant functional effect is preferably to be revealed.

Conclusions

Thus the reduction in hepatocyte introduction rate during the transplantation to a portal vein results in an even distribution of donor's hepatocyte in a recipient's liver, in this case allowing to decrease thrombus formation in the system of portal blood flux and reduce the extent of own liver damage. There was revealed the conformity between histological, morphometric and biochemical investigations. Obtained by us results can be used for studying the effect of transplanted cryopreserved isolated hepatocytes on the course of various experimental pathologies of rabbits' liver.

References

1. *Petrenko A. Yu.* Energetic state and metabolism of xenobiotics in isolated hepatocytes depending on the isolation conditions and cryopreservation of cells: Thesis of doctor of biological sciences. – Kharkov, 1993.– 337p.
2. *Avital I., Feraresso C., Aoki T. et al.* Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection // *Surgery.*– 2002.– Vol.132, N2.– P. 384-390.
3. *Bilir B.M., Guinette D., Karrer F. et al.* Hepatocyte transplantation in acute liver failure//*Liver Transpl.*– 2000.– Vol.6, N1.– P. 32-40.
4. *Jamal H.Z., Weglarz T.C., Sandgren E.P.* Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity *in vivo* // *Gastroenterology.*– 2000.– Vol. 118, N2.– P. 390-394.
5. *Kocken J.M., Bouwman E., Scheringa M. et al.* Acute death after intraportal hepatocyte transplantation in an allogeneic rat strain combination: a possible role for complement activation // *Transplantation Proceedings.*– 1997.– Vol. 29.– P. 2067-2068.
6. *Muraca M., Neri D., Parenti A. et al.* Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study// *Transplantation.* - 2002. – Vol. 73, N6. - P. 890-896.
7. *Onodera K, Kasai S, Mito M.* Hepatocellular transplantation in rats with congenital ascorbic acid deficiency // *Nippon Geka Gakkai Zasshi.*– 1995.– Vol. 96, N5.– P. 301-308.
8. *Petrenko A.Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D. et al.* Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethylsulfoxide and separation in Percoll density gradient //

- Cryo-Letters.– 1992.– Vol. 13.– P. 87-98.
9. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Grischuk V.P. et al.* Separation of intact and damaged hepatocytes in sucrose following non-enzymatic liver perfusion // *Cytotechnology.*– 1995.– Vol. 17.– P. 127-131.
 10. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.*– 1991.– Vol. 194, N2.– P. 326-329.
 11. *Rozga J., Holzman M., Moscioni A.D. et al.* Repeated intraportal hepatocyte transplantation in albuminemic rats // *Cell Transplant.*– 1995.– Vol. 4, N2.– P. 237-243.
 12. *Roos W.K., Geusau B.A., Bouwman E. et al.* Monitoring engraftment of transplanted hepatocytes in recipient liver with 5-bromo-2'-deoxyuridine // *Transplantation.* – 1997. – Vol. 63, N4.– P. 513-518.
 13. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.*– 1976.– Vol. 13.– P. 29-83.
 14. *Sleehria S., Rajvanshi P., Ito Y. et al.* Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver// *Hepatology.* – 2002.– Vol. 35, N6.– P. 1320-1328.

Поступила 15.04.2003

- Cryo-Letters.– 1992.– Vol. 13.– P. 87-98.
9. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Grischuk V.P. et al.* Separation of intact and damaged hepatocytes in sucrose following non-enzymatic liver perfusion // *Cytotechnology.*– 1995.– Vol. 17.– P. 127-131.
 10. *Petrenko A.Yu., Sukach A.N.* Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration // *Analytical Biochem.*– 1991.– Vol. 194, N2.– P. 326-329.
 11. *Rozga J., Holzman M., Moscioni A.D. et al.* Repeated intraportal hepatocyte transplantation in albuminemic rats // *Cell Transplant.*– 1995.– Vol. 4, N2.– P. 237-243.
 12. *Roos W.K., Geusau B.A., Bouwman E. et al.* Monitoring engraftment of transplanted hepatocytes in recipient liver with 5-bromo-2'-deoxyuridine // *Transplantation.* – 1997. – Vol. 63, N4.– P. 513-518.
 13. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells // *Meth. Cell Biol.*– 1976.– Vol. 13.– P. 29-83.
 14. *Sleehria S., Rajvanshi P., Ito Y. et al.* Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver// *Hepatology.*– 2002.– Vol. 35, N6.– P. 1320-1328.

Accepted in 15.04.2003