

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПЕЧЕНИ (СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ПО ДАННЫМ ЗАРУБЕЖНЫХ ИСТОЧНИКОВ)

Гулай Ю.С.³, Крашенинников М.Е.¹, Шагидулин М.Ю.^{1, 2}, Онищенко Н.А.¹

¹ ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва, РФ

² ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», Москва, РФ

³ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, РФ

В статье рассматривается проблема создания имплантируемых тканеинженерных конструкций печени как современный этап комплексных исследований по созданию биоискусственной печени. Позитивное решение многочисленных биологических и технологических проблем, стоящих на пути создания таких конструкций, включает разработку и использование матриц с заданными свойствами, имитирующими свойства печеночного внеклеточного матрикса; применение технологий стереотипического заселения этих матриц как паренхиматозными, так и непаренхиматозными клетками печени и совершенствование технологий изготовления и сборки тканеинженерных конструкций печени.

Ключевые слова: клетки печени, матрицы, тканеинженерные конструкции.

HEPATIC TISSUE ENGINEERING (MODERN STATE OF THIS PROBLEM)

Gulay Y.S.³, Krasheninnikov M.E.¹, Shagidulin M.Y.^{1, 2}, Onishchenko N.A.¹

¹ V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

³ M.V. Lomonosov Moscow State University

In this article it was discussed the problem of creation implanted hepatic tissue engineering designs as a modern stage of complex investigation for working out bioartificial liver support systems. It was determined that for the positive decision of numerous biological and technological problems it is necessary: to use matrices with determined properties, which mimic properties of hepatic extracellular matrix; to use technology for stereotype sowing of these matrices by both parenchymal and non-parenchymal hepatic cells and to improve the technologies for making and assembling of hepatic tissue-engineering designs.

Key words: liver cells, matrices, tissue-engineering design.

Совершенствование методов лечения острой и хронической печеночной недостаточности (ПН) по-прежнему остается актуальной задачей современной медицины, так как смертность от хронической ПН по-прежнему занимает одно из первых мест среди других нозологий. В последние 30 лет при глубоком необратимом поражении печени стали проводить полную замену этого органа путем трансплантации донорской печени. Число таких операций в развитых странах мира из года в год увеличивается. Однако возрастающая во всем мире нехватка донорского материала и другие проблемы, сопутствующие этим операциям, заставляют в повседневной клинической практике использовать более доступные эфферентные (аппаратные) методы временной поддержки функции печени. Назначение этих методов (плазмаферез, различные варианты гемодиализа, плазмо- и гемосорбции и

др.) состоит в обеспечении детоксикации организма больного и в создании условий для аутокринной активации, восстановительных процессов поврежденной печени.

Между тем расширенное применение эфферентных методов в клинике не способствовало снижению смертности, особенно среди больных с обширным некрозом паренхимы печени. Такой результат стали связывать с тем, что эфферентные методы способствуют удалению из крови больного не только токсических веществ, но и факторов регенерации, а при замещении крови больного кровью или плазмой здорового донора в организм больного поступают факторы с цитостатическими свойствами, блокирующими процессы восстановительной регенерации печени.

Указанные обстоятельства в 80-х годах прошлого столетия способствовали внедрению в кли-

ническую практику так называемых гибридных экстракорпоральных систем детоксикации крови больного, в перфузионном контуре которых одновременно культивировалась суспензия донорских гепатоцитов с коротким сроком (1–3 часа) сохранения жизнеспособности и биорегуляторного воздействия [1]. Стала очевидной необходимость поиска путей обеспечения длительного функционирования клеток донорской печени в организме больного для индукции восстановительных процессов в поврежденной печени.

1. СПОСОБЫ ИНДУКЦИИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННОЙ ПЕЧЕНИ

В организме человека регенерация печени при повреждении происходит в течение 3–6 месяцев при условии сохранности хотя бы 30% интактной ткани [2]. Однако такая регенерация осуществляется за счет гиперплазии клеток, входящих в состав отдельных анатомо-функциональных единиц печени [3] без увеличения количества самих единиц, что способствует увеличению объема сохранившейся ткани и компенсации утраченного объема (регенерационная гипертрофия печени). Из вышеизложенного следует, что нормализация (компенсация) функции печени при регенерации достигается за счет повышения нормы функции каждой сохранившейся анатомо-физиологической единицы (структуры) органа, но не за счет увеличения количества таких структур [4].

Изучение фундаментальных основ регенерации печени послужило основанием для разработки новых методов нормализации функции поврежденной печени. Стали активно разрабатываться новые биотехнологические методы, действие которых направлено на восполнение извне дефицита функционирующей ткани, а также на стимуляцию регенерации оставшейся печеночной ткани [5].

1.1. Трансплантация клеток печени и костного мозга

И в эксперименте, и в клинике неоднократно предпринимались попытки стимулировать восстановительную регенерацию печени путем трансплантации гепатоцитов или путем мобилизации клеток-предшественников костного мозга (КМ) [6–8]. Показано, что резидентные клетки костного мозга действительно активно участвуют в регенерации печени, ускоряя дифференцировку сохранившихся гепатоцитов. Кроме того, показано, что сами клетки-предшественники КМ имеют потенциал к дифференцировке в гепатоцитарном направлении [9], однако эта их способность до сих пор не охарактеризована полностью. Выявлено множество различных популяций костномозговых клеток-предшественников, которые обладают способностью вызывать клиническое улучшение состояния пациентов с хроническими заболеваниями печени [10, 11]. Недавние клинические испытания подтвердили, что применение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) способствует мобилизации гемопоэтических стволовых клеток, которые начинают оказывать влияние на дифференцировку клеток-предшественников КМ в гепатоциты, а также на повышение активности синтеза ими фактора роста гепатоцитов [12–15].

Трансплантация суспензии гепатоцитов как альтернатива ортотопической трансплантации печени была изучена не только у взрослых, но и у детей с врожденной патологией метаболических процессов в печени [17]. В этих наблюдениях общая масса гепатоцитов, трансплантированных в селезенку или портальную вену, составляла не более 10% от эквивалента массы печени реципиента, но это количество оказалось достаточным для частичной нормализации метаболизма [16]. Несмотря на клинический эффект, выживаемость донорских гепатоцитов была низкой, и к концу наблюдения их количество не превышало 1% от массы печени реципиента [17].

Онищенко Нина Андреевна – д. м. н., проф., зав. лабораторией клеточных технологий отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ. *Крашенинников Михаил Евгеньевич* – к. б. н., старший научный сотрудник той же лаборатории. *Шагидулин Мурат Юнусович* – к. м. н., заведующий отделом экспериментальной трансплантологии и искусственных органов того же центра, доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», Москва, РФ. *Гулай Юлия Сергеевна* – студентка-дипломница факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, РФ.

Для корреспонденции: Крашенинников Михаил Евгеньевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: 8 (499) 190-45-31. E-mail: krashen@rambler.ru.

Onishchenko Nina Andreevna – Head of the Cell Technology Laboratory of Department of biotechnologies and tissue engineering of V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation. *Krasheninnikov Mikhail Evgenievich* – Senior Research Fellow at the same laboratory. *Shagidulin Murat Yunusovich* – Head of experimental transplantology and artificial organs department at the same center, assistant professor Department of transplantology and artificial organs I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation. *Gulay Yulia Sergeevna* – diploma student of faculty of fundamental medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

For correspondence: Krasheninnikov Mikhail Evgenievich. Address: 123182, Moscow, Schukinskaya, 1. Tel. 8 (499) 190-45-31. E-mail: krashen@rambler.ru.

На данный момент большинство исследователей едины во мнении о недостаточной эффективности применения суспензии донорских клеток в организме, так как трансплантация изолированных клеток не обеспечивает стабильный терапевтический результат, характеризуется низким уровнем их приживления и исключает возможность долгосрочного воздействия введенных клеток на регенерационный процесс. Полагают, что основной причиной низкой эффективности применения суспензии клеток печени служит отсутствие условий для прикрепления и контактного взаимодействия клеток с формированием *de novo* анатомо-функциональных структур длительного регуляторного воздействия на поврежденную печень.

1.2. Трансплантация клеток печени в составе тканеподобных структур (биоинженерных конструкций)

Современный этап совершенствования разработок по созданию биоискусственной печени связывают с использованием клеток печени в составе тканеподобных структур, которые в виде тканеинженерных конструкций предназначены обеспечивать адекватные условия для долгосрочной

жизнедеятельности внесенных в них клеток (их прикрепление, контактные взаимодействия, тканеспецифическое функционирование) и способствовать достижению клинического эффекта при использовании в этих конструкциях малых доз донорских клеток [18–20]. Основные направления современных исследований и возможные области применения достижений тканевой инженерии печени обобщены и представлены на рис. 1.

Из рис. 1 видно, что в основе успешной разработки тканеинженерных конструкций печени лежит прежде всего создание и использование биоматериалов (матриц) с заданными свойствами, среди которых в качестве каркаса или носителя клеток были использованы натуральные, синтетические и композитные материалы.

При выборе оптимального материала и метода его изготовления должно быть одновременно учтено множество условий, таких как его внутренняя архитектура, время резорбции, биосовместимость, присутствие в матриксе и контролируемое высвобождение биологически активных веществ (специфичные белки внеклеточного матрикса, факторы роста, цитокины), поддерживающих пролиферацию и рост клеток. Однако, несмотря на прогресс в области изготовления имплантируемых систем

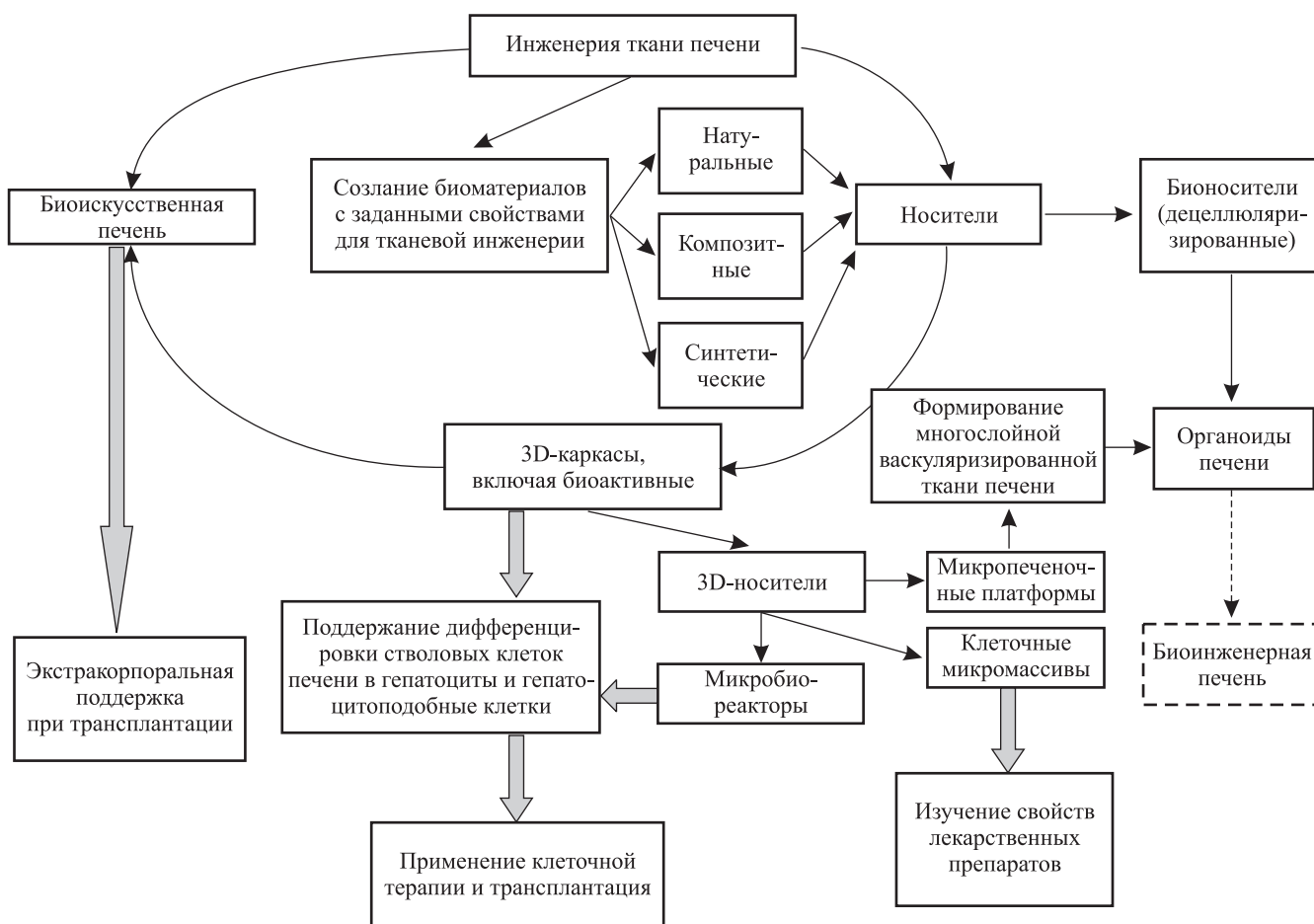


Рис. 1. Основные направления исследований и возможные области применения тканевой инженерии печени [21]

доставки биологически активных веществ и клеток из органов и тканей, создание биосовместимых матриц остается нерешенной, а потому актуальной задачей. Преимущества, недостатки, а также перспективы использования некоторых изученных к настоящему времени материалов представлены в табл. 1 [21].

Важно также подчеркнуть, что формирование самих тканеинженерных конструкций также не может считаться решенной проблемой. Используются разные технологии их изготовления, которые могут различаться по принципу сборки отдельных элементов [22] и по масштабу создаваемых при этом конструкций [23].

Различают два основных подхода при сборке элементов тканеинженерных конструкций: принцип «сверху вниз» и принцип «снизу вверх» [22]. При осуществлении принципа «сверху вниз» (нисходящий принцип) биodeградируемый и биосовместимый носитель (матрикс) заселяется клетками в расчете на то, что они проникнут в носитель, колонизируют его и начнут синтезировать собственный матрикс. При реализации принципа «снизу вверх» (восходящий принцип) с помощью различных методов создаются тканевые строительные блоки, которые в последующем объединяются в более крупные тканевые конструкции.

Масштаб создаваемых конструкций может колебаться от размера целого органа (например, использование каркасов после децеллюляризации печени) до размера микротканевого элемента (сфероиды).

Для реализации любого из этих технологических подходов исследуются матрицы с различными заданными биофизическими и биотехнологическими свойствами, наиболее пригодные из которых для тканевой инженерии печени представлены в табл. 2.

Среди используемых технологий для более эффективной защиты донорских гепатоцитов при пересадке первыми были применены технологии инкапсуляции клеток и создания системы микроносителей (от 20 до 1000 мкм) [24]. Было продемонстрировано, что микроинкапсулированные гепатоциты выживали в течение длительного времени (более 3 месяцев) после их интраперитонеального введения реципиенту на фоне иммунопротекции; микроинкапсулированные гепатоциты функционировали и компенсировали дефицит функции печени до 4 недель у животных с моделью печеночной недостаточности [25–27]. Точно так же была протестирована эффективность микросфер в качестве матриц для гепатоцитов при трансплантации животным с моделями метаболической (энзимной) недостаточности [28] и острой печеночной недостаточности [29].

На культурах клеток печеночных линий было показано, что матрицы не просто служат опорой для клеток – их функции намного сложнее и разнообразнее. Каждый материал, использованный для изготовления матриц, должен исполнять роль каркаса и создавать трехмерную структуру, требуемую для обеспечения клеточной пролиферации, дифференцировки, а также клеточно-матричных

Таблица 1

Преимущества, недостатки и перспективы использования основных групп материалов

Тип материала	Преимущества	Недостатки	Сложности	Перспективы
Биологические материалы	Естественное происхождение, биосовместимость, свойства натурального матрикса	Ограниченная возможность создания материала с заданными характеристиками	Потенциальная иммуногенность, деградация, возможность создания композитных матриц с синтетическим компонентом	Создание носителей с заданными свойствами, развитие композитных материалов, создание биоактивных носителей
Синтетические материалы	Возможность создания биополимеров с заданными свойствами, регулируемая биосовместимость и биodeградируемость	Потенциальная иммуногенность, химическая нестабильность, токсичность	Создание материалов с более выраженными биометрическими свойствами	Конструирование носителей с заданными свойствами, композитных биоматериалов, биоактивных носителей
Композитные материалы	Сочетание лучших свойств натуральных и биосинтетических матриц	Нет	Создание неиммуногенных и биodeградируемых матриц, обладающих свойствами натуральных матриц	Конструирование носителей с заданными свойствами, биоактивных носителей
Материалы, полученные путем децеллюляризации целых органов	Натуральное происхождение, сохранение структуры и архитектуры нативной ткани	Необходимость наличия доноров	Полная, тщательная децеллюляризация органа для предотвращения реакции отторжения; максимально выраженные свойства натурального матрикса	Создание органоидов печени и прототипов биоинженерной печени

Таблица 2

Результаты изучения и оценки пригодности матриц с различными биофизическими и биотехнологическими свойствами для тканевой инженерии печени [23]

Тип каркаса	Материал	Тип использованных клеток	Результат
Пористый материал	PLGA, PLLA	rHCs, rBMMSCs, rFLCs	Клетки садились на матриксе высокой плотностью, выживали, синтезировали альбумин [69], демонстрировали длительную выживаемость до 4 недель культивирования [70, 71]
Полые волокна	PET, PU, PES, PTFE, EVAL	HCs, ESCs	Высокий уровень пролиферации $1 \times 10^8/\text{см}^3$ матрикса в течение 20 дней с экспрессией специфических эндодермальных генов [72]
Внеклеточный матрикс	Хитозан, гиалуроновая кислота	HCs, rLSCs, QSG-7701, rFLCs	Сборка клеток в тканеподобную структуру, синтез трансаминаз, альбумина, мочевины, креатинина, глюкозы [73, 74]
Микроинкапсулирование	PEG-гидрогель	rHCs, hFLCs, hESCs	Клетки образовали конструкцию гепатоподобную, в течение 12 дней проявляющую высокую синтетическую активность альбумина, мочевины
	Альгинат	HepG ₂ , C3A, BMMSCs	Поддержание роста и функционирования клеток [75, 76]
Коллагеновый сэндвич	Коллагеновый каркас	HCs, hFLCs, hESCs, HepG ₂	Выживаемость клеток, синтез мочевины, активизация P450, в течение 14 дней [77]
Сфероиды	PDMS	rHCs, NIH/3T3, HepG ₂	Выживаемость клеток при высокой плотности заселения
	Фибриновый гель	hFLCs, hUVECs	Формирование сосудистоподобных структур, высокая пролиферация [78]
Гепатоподобный каркас	Нативный матрикс из децеллюляризированной печени	rHCs	Выживание клеток с функционированием в сроках более 45 дней [79]. Сохранение лобулярной структуры и сосудистого русла с минимальным ишемическим повреждением при пересадке <i>in vivo</i> [65]

Примечание. PLGA – сополимер молочной и гликолевой кислот; PLLA – полимер молочной кислоты; PET – полиэтилен-терефталат; PU – полиуретан; PES – полисульфон; PTFE – политетрафлюорэтилен; EVA – этиленвинилацетат; PEG – полиэтиленгликоль; PDMS – полидиметилсилоксан; HCs – гепатоцитоподобные клетки; BMMSCs – мезенхимальные стромальные клетки костного мозга; FLCs – фетальные клетки печени; ESCs – эмбриональные стволовые клетки; LSCs – лейкемические стволовые клетки; QSG-7701 – линия человеческих гепатоцитоподобных клеток; HepG₂ – линия клеток гепатокарциномы человека; C3A – линия клеток гепатокарциномы человека; NIH/3T3 – мышечные эмбриональные фибробласты; UVECs – эндотелиальные клетки пупочной вены.

и межклеточных взаимодействий. На культурах клеток печеночных линий была продемонстрирована способность этих клеток к реализации указанных функций при использовании натуральных и синтетических совместимых биodeградируемых материалов, полимеров с белковым покрытием, различных типов нановолокон, в том числе нановолокон с модифицированной поверхностью, матриц из децеллюляризированных органов, а также показана способность к усилению этих клеточных функций при добавлении в среду ростовых факторов [30, 31].

При выборе матриц для тканевой инженерии печени предпочтение отдается наличию у них сходства с 3D-структурой и внутренней архитектоникой нативного внеклеточного матрикса печени [32]. Размер пор и общая пористость матрикса играют важную роль в поддержании специфических функций адгезированных клеток печени. Размер пор влияет на массоперенос кислорода и питательных веществ

внутри носителя, тем самым поддерживая рост, жизнеспособность и функцию клеток в трансплантате. Клетки не мигрируют, когда размеры пор более 500 мкм, поскольку они не распознают поверхность. Каркасы с пористостью от 50 до 150 мкм и большим количеством сообщающихся пор наиболее желательны для культивирования гепатоцитов в биоинженерных конструкциях [33].

Размер пор и общая пористость матрикса должны обеспечивать в нем не только диффузионные процессы (поступление кислорода, питательных веществ, факторов роста, элиминацию продуктов распада), но также осуществлять активный массоперенос – дренаж и доставку кислорода, питательных веществ, регуляторных факторов и удаление продуктов метаболизма за счет прорастания в него сосудов для долговременного обеспечения биологических свойств и физиологических функций клеток, а также предотвращения их ишемического повреждения и гибели [34].

Первыми такими гепатоподобными функциональными структурами были преваскуляризованные, недеградируемые поливинилалкогольные губки с адгезированными на них гепатоцитами. Такие губки содержали до 500 миллионов гепатоцитов, и этого количества было вполне достаточно для замещения функций всей печеночной массы крысы [35–37]. Преваскуляризация всей толщи конструкта достигалась путем предварительной имплантации пустых губок в хорошо васкуляризованные ткани (типа брыжейки кишки) на срок более недели с последующим заселением гепатоцитами [36]. Преваскуляризация в данном случае обеспечивала доставку кислорода и питательных веществ к клеткам по всей толще конструкта.

В более поздних исследованиях ускоренной васкуляризации конструкта добивались путем включения в него факторов роста, таких как VEGF [38, 39], а применение таких конструктов способствовало увеличению выживаемости животных в моделях острой и хронической печеночной недостаточности, в том числе на крупных животных [40, 41].

Показано [42], что использование 3D-биоматрикса само по себе способствует формированию разветвленной сети сосудистоподобных структур и

анастомозов с сосудами реципиента, и эти данные служат дополнительным подтверждением предпочтительности использования технологии 3D-культивирования клеток печени в тканеинженерных конструктах [43, 44].

Предложен еще один способ ускоренной васкуляризации трансплантата путем использования биологически васкуляризованного матрикса-каркаса (BioVaSc®). Его получают из децеллюляризованного сегмента тонкого кишечника свиньи, который после обработки представляет собой сохраненные трубчатые капиллярные структуры в коллагеновой матрице [45].

В целом для обеспечения длительной жизнедеятельности клеток печени и выполнения ими тканеспецифических функций в составе тканеинженерных конструкций матрикса, используемые в этих конструкциях для засева их клетками, должны обладать свойствами, имитирующими регуляторные свойства аутологичного нативного внеклеточного матрикса (рис. 2).

Хотя «идеальные» матриксы еще не созданы, важно, что уже к настоящему времени определены направления поиска для создания матрикса со

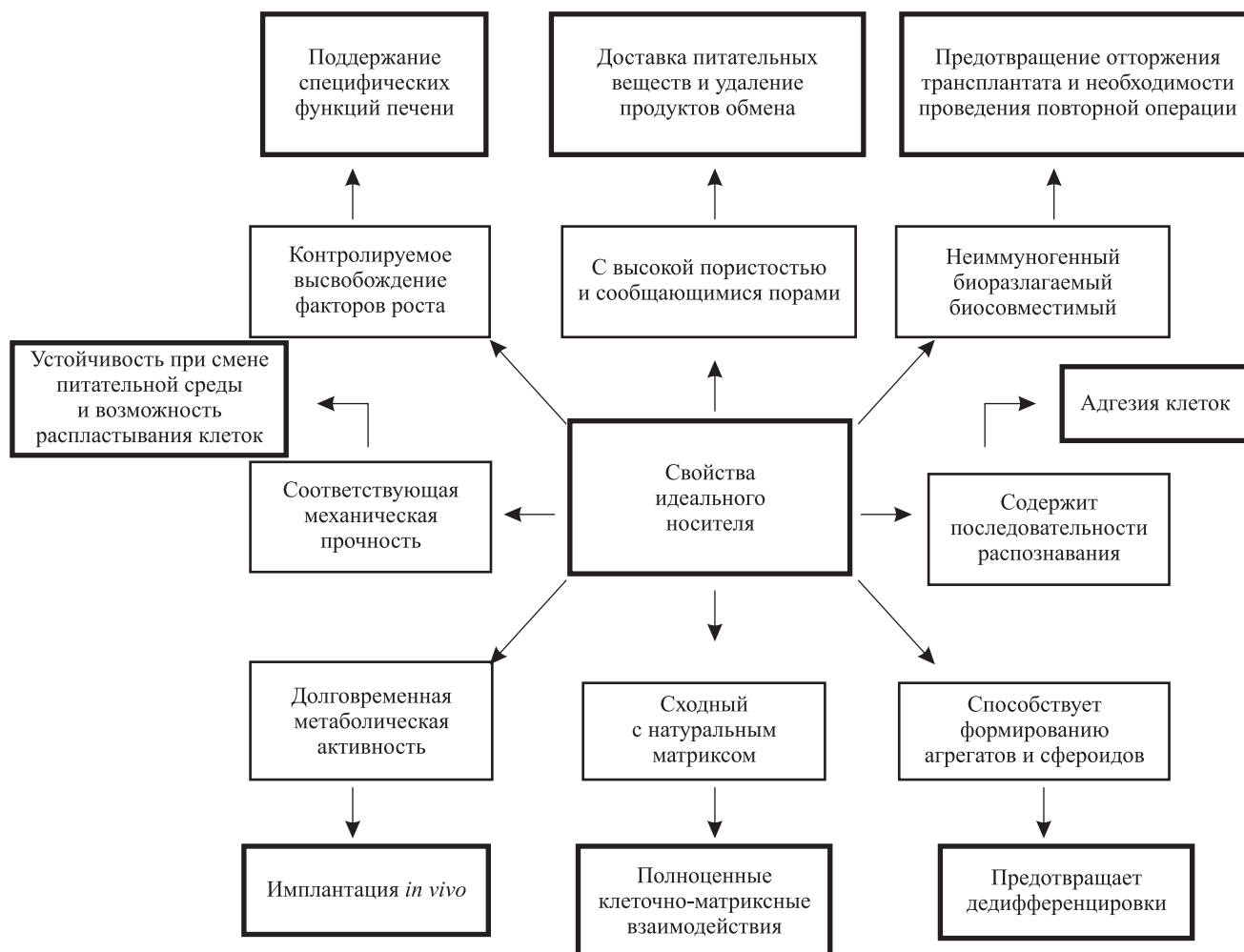


Рис. 2. Свойства идеального матрикса, необходимого для тканевой инженерии печени [32]

свойствами, идентичными печеночному внеклеточному матриксу.

Важно также подчеркнуть, что внеклеточный матрикс является предпочтительным субстратом для адгезии и функционирования не только паренхиматозных клеток (гепатоциты составляют 60% от общей популяции клеток в печени), но и непаренхиматозных (холангиоциты, купферовские, звездчатые, эндотелиальные клетки, рѳ-клетки и др.) клеток печени. Структура и состав внеклеточного матрикса, в свою очередь, зависят от метаболической активности ансамблей прикрепившихся клеток, которые за счет синтеза и секреции внеклеточных матриксных белков могут менять не только состав, но и свойства внеклеточного матрикса, определяя состояние микросреды и микроокружения для всех типов клеток.

Из вышеизложенного следует, что помимо гепатоцитов, чья тканеспецифическая функция нужна прежде всего, необходимо, чтобы все остальные типы непаренхиматозных клеток также присутствовали в составе тканеинженерной конструкции, так как они играют важную роль в поддержании жизнедеятельности гепатоцитов и участвуют в производстве белков внеклеточного матрикса [46]. Обеспечение стереотипического изготовления матриксов с набором всех клеток печени пока остается нерешенной задачей. К этому следует добавить, что современные стратегии сборки элементов тканеинженерных конструкций печени не обеспечивают наличия в конструкторе печени венозной, портальной и желчной сетей. И хотя некоторые исследователи, использующие принцип сборки «снизу вверх» (bottom-up), сообщают об успешном создании перфузируемой синусоидальной микроархитектуры печени, полученной с помощью микротехнологии [47, 48], такие конструкторы очень сложны в производстве и потому далеки от клинического применения [49]. Иными словами, поиск технологии создания идеального каркаса с микроархитектурой [50], активно производящего регуляторные сигналы [51] для стимуляции выживаемости гепатоцитов, продолжается.

2. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ПЕЧЕНИ

2.1. Способы изготовления микромасштабных тканеинженерных конструкций

Способы изготовления микромасштабных тканеинженерных конструкций основаны на применении BioMEMS-технологий и технологии создания 3D-культуры ткани печени методом наложения.

BioMEMS-технология применяется для конструирования 3D-тканей, в том числе печени, путем

культивирования клеток в предварительно организованном пространстве в условиях контролируемого микроокружения (путем пространственного и временного распределения клеток, а также управляемого воздействия биофизических и биохимических факторов на микроуровне). Для этих целей используются микроэлектромеханические системы BioMEMS, которые уже в настоящее время применяют для проведения биомедицинских исследований (создание кремниевых, стеклянных и полимерных подложек, ДНК и белковых микрочипов и др.) [52].

BioMEMS-технологии могут позволить конструировать более сложную тканевую структуру печени при использовании микрофлюидных систем. Эти системы характеризуются использованием матриксов с микроканалами для распределения клеток и свободного проникновения кислорода при культивировании в условиях биореактора [53]. При культивировании отдельных типов клеток либо их смесей в микрофлюидных системах формируются сосудистоподобные структуры [54, 55], желчные капилляры и поддерживается активная синтетическая функция гепатоцитов на сроках более 30 суток [56].

Так как при помощи BioMEMS-технологий возможно построить печеночноподобную структуру только на микроуровне, полученный конструктор используется в качестве модели печеночной ткани для тестирования *in vitro* лекарственных средств, химических и биологических агентов [57].

Создание 3D-культуры ткани печени методом наложения предусматривает сложение нескольких 2D-слоев клеток и служит для имитации естественной структуры ткани печени. Метод [58] позволяет создать условия для формирования желчных капилляров и гепатоподобных высокодифференцированных структур, секретирующих альбумин спустя 5 суток [59] после наложения слоев при культивировании гепатоцитов (малых гепатоцитов) или смеси клеток (малые гепатоциты, звездчатые и эндотелиальные клетки) на пористых мембранах [60].

2.2. Технология изготовления среднемасштабных тканеинженерных конструкций

Культивирование гепатоцитов на полимерных дисках в биореакторе. Выделенные из печени человека гепатоциты культивировали в проточном биореакторе (скорость потока питательной среды, подаваемой перпендикулярно поверхности диска – 24 мл/мин) на дисках (18 мм в диаметре, 1 мм толщина) из биodeградируемого матрикса – полимера молочной кислоты (poly-(L-lactic acid), PLLA) в течение 6 дней. В результате при использовании такой технологии формируются сфероиды из живых гепатоцитов диаметром от 50 до 250 мкм со

структурой, напоминающей строение печени и с признаками активной синтетической функции этих клеток (синтез альбумина), выраженной детоксикационной активностью (цитохром P-450), а также с отчетливым интактным гепатоцитспецифическим цитоскелетом. На 6-й день культивирования выявление актиновых филаментов рассматривали как признак формирования желчных капилляров [61].

Технология 3D-биопечати тканей представляет собой послонную автоматическую (роботизированную) сборку трехмерных функционирующих массивов тканей и органных конструкторов с использованием клеточных сфероидов в качестве строительных блоков. Благодаря своим размерам, физическим свойствам, форме, контролируемому составу, известным пространственным характеристикам сфероида или тканеподобные микрокусочки используются в качестве исходного конструктора для автоматизированного распределения или цифрового «впечатывания» их в матричные слои, например гидрогелевые. После заполнения каждого отдельного матричного слоя клеточными сфероидами следует их сборка и создание макротканевых структур или органных конструкторов с помощью биопринтера [62].

В настоящее время использование технологии биопечати не привело к получению длительно функционирующей культуры клеток: описана методика культивирования смеси клеток на микрочипах (подушечки из акриламидного геля с добавлением белков внеклеточного матрикса) в течение 7 дней, причем для сокультивирования использовалась смесь клеток, состоящая из HepG2, LX-2 (hepatic stellate cells), первичных фибробластов из стенки воротной вены (PFs) и эндотелиальных клеток аорты быка (bovine aortic endothelial cells, BAECs) [63].

2.3. Создание крупномасштабных тканеинженерных конструкций: технология децеллюляризации-рецеллюляризации

Децеллюляризация целого органа позволяет получить соединительно-тканый каркас (коллаген I, III, IV типов, фибронектин, ламинин) с сохраненной архитектоникой печеночного матрикса: остается практически интактной глиссонова капсула (играет важную роль при перфузии органа), сохраняются каркасы печеночных долек, триад, центральных вен, воротной вены и микропористая структура матрикса паренхимы; сосуды сохраняют диаметр просвета и форму, остается проходимым микрососудистое русло; желчные протоки также остаются практически сохраненными, кроме минимальных разрывов в мелких ветвях [64]. Эти же авторы показали, что в децеллюляризированной печени присутствуют и ростовые факторы: VEGF (19%), IGF-1 (13%), HGF

(19%) и bFGF (20%) в сравнении с их содержанием в нативной печени (100%).

Метод создания трансплантатов печени путем децеллюляризации-рецеллюляризации представляется очень перспективным [65–68], так как на сегодняшний день максимальный вес свиной печени, поддающейся децеллюляризации, составляет 506 ± 27 г [64], а такой вес органа может обеспечить компенсацию печеночных функций.

После частичной рецеллюляризации нативными свинными гепатоцитами в перфузируемой культуре печени наблюдался синтез альбумина и мочевины. На 4-й день в перфузируемой культуре уровень альбумина и мочевины был выше, чем в культуре свиных гепатоцитов на коллагеновом слое, но ниже, чем в культуре гепатоцитов в двойном коллагеновом геле.

Частично рецеллюляризованная печень крысы сохраняла белково-синтетическую функцию в течение 5 суток в условиях непрерывной перфузии, а после пересадки признаки ишемического повреждения гепатоцитов отсутствовали в течение 8 часов [65].

При заселении каркаса децеллюляризированной печени крысы смесью человеческих эндотелиальных клеток и человеческих фетальных печеночных прогениторных клеток наблюдалась дифференцировка этих клеток в гепатоциты, холангиоциты и эндотелиальные клетки с сохранением микроархитектуры печени и формированием сосудистой выстилки [68]. Изучение состава каркаса с помощью иммуногистохимического окрашивания выявило сохранение ряда гликозаминогликанов, выступающих в качестве сайтов прикрепления факторов роста, регулирующих клеточный фенотип, миграцию и дифференцировку клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание имплантируемых тканеинженерных конструкций диктуется необходимостью эффективного лечения тяжелых необратимых форм ПН. Эффективная коррекция таких состояний и перепрограммирование процессов регенерации П у таких больных возможны лишь при постоянном и непрерывном регуляторном воздействии на поврежденную П активно пролиферирующих клеток донорской П. Для проявления и поддержания свойств малодифференцированных клеток клеткам П в составе тканеинженерных конструкций должны быть созданы условия для прикрепления, контактного взаимодействия и формирования *de novo* анатомических структур (тканевых ниш, пространств Диссе, синусоидов и др.), способных длительно обеспечивать тканеспецифические функции входящих в них клеток.

Работы по созданию тканеинженерных конструкций с указанными свойствами должны предусматривать комплексное решение многочисленных биологических и технологических проблем, главными из которых являются:

- изготовление и применение матриц из различных типов материалов с заданными биологическими и биотехнологическими свойствами, имитирующими свойства печеночного внеклеточного матрикса, обеспечивающими условия для прикрепления донорских клеток с формированием из них тканеподобных ассоциатов;
- разработка технологии получения и программируемого заселения матриц различными типами клеток печени – паренхиматозными (гепатоцитов) и непаренхиматозными (эндотелиоциты, звездчатые клетки, рiт-клетки), а также клетками различной онтогенетической зрелости для создания технологии их предварительного 3D-культивирования с формированием *de novo* тканевых ниш, для обеспечения пролонгированной жизнедеятельности клеток;
- совершенствование известных и создание новых технологий изготовления и сборки отдельных блоков тканеинженерных конструкций печени, с включением в них венозных, портальных и желчных коллекторов;
- разработка новых методов культивирования, пригодных для получения культур, обогащенных малодифференцированными тканеспецифичными клетками (например, в виде сфероидов) для формирования и длительного функционирования тканеинженерных конструкций;
- расширение исследований по углубленному изучению и применению децеллюляризованных матриц печени не только в составе крупномасштабных, но и в составе микромасштабных тканеинженерных конструкций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Fox I.J., Langnas A.N., Fristoe L.W., Shaefer M.S., Vogel J.E., Antonson D.L. et al. Successful application of extracorporeal liver perfusion: a technology whose time has come. *Am J Gastroenterol.* 1993; 88 (11): 1876–1881.
2. Minuk G.Y. Hepatic regeneration: If it ain't broke, don't fix it. *Can J Gastroenterol.* 2003; 17 (7): 418–424.
3. Kay M.A., Fausto N. Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies. *Mol Med Today.* 1997; 3 (3): 108–115.
4. Igarashi Y., D'Hoore W., Goebbels R.M., Gianello P., Dufrene D. Beta-5 score to evaluate pig islet graft function in a primate pre-clinical model. *Xenotransplantation.* 2010; 17 (6): 449–459.
5. Booth C., Soker T., Baptista P., Ross C.L., Soker S., Farooq U. et al. Liver bioengineering: current status and future perspectives. *World J Gastroenterol.* 2012; 18 (47): 6926–6934.
6. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999; 284 (5417): 1168–1170.
7. Theise N.D., Nimmakayalu M., Gardner R., Illei P.B., Morgan G., Teperman L. et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology.* 2000; 32 (1): 11–16.
8. Alison M.R., Poulson R., Jeffery R., Dhillon A.P., Quaglia A., Jacob J. et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature.* 2000; 406 (6793): 257.
9. Oh S.H., Witek R.P., Bae S.H., Zheng D., Jung Y., Piscaglia A.C. et al. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology.* 2007; 132 (3): 1077–1087.
10. Terai S., Ishikawa T., Omori K., Aoyama K., Marumoto Y., Urata Y. et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells.* 2006; 24 (10): 2292–2298.
11. Mohamadnejad M., Alimoghaddam K., Mohyeddin-Bonab M., Bagheri M., Bashtar M., Ghanaati H. et al. Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med.* 2007; 10 (4): 459–466.
12. Piscaglia A.C., Shupe T.D., Oh S.H., Gasbarrini A., Petersen B.E. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology.* 2007; 133 (2): 619–631.
13. Gaia S., Smedile A., Omede P., Olivero A., Sanavio F., Balzola F. et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol.* 2006; 45 (1): 13–19.
14. Di Campli C., Zocco M.A., Saulnier N., Grieco A., Rappaccini G., Addolorato G. et al. Safety and efficacy profile of G-CSF therapy in patients with acute on chronic liver failure. *Dig Liver Dis.* 2007; 39 (12): 1071–1076.
15. Spahr L., Lambert J.F., Rubbia-Brandt L., Chalandon Y., Frossard J.L., Giostra E. et al. Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. *Hepatology.* 2008; 48 (1): 221–229.
16. Asonuma K., Gilbert J.C., Stein J.E., Takeda T., Vacanti J.P. Quantitation of transplanted hepatic mass necessary to cure the Gunn rat model of hyperbilirubinemia. *J Pediatr Surg.* 1992; 27 (3): 298–301.
17. Dhawan A., Puppi J., Hughes R.D., Mitry R.R. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010; 7 (5): 288–298.
18. Bates R.C., Edwards N.S., Yates J.D. Spheroids and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000; 36 (2–3): 61–74.
19. Zahir N., Weaver V.M. Death in the third dimension: apoptosis regulation and tissue architecture. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14 (1): 71–80.
20. Grossmann J. Molecular mechanisms of «detachment-induced apoptosis – Anoikis». *Apoptosis.* 2002; 7 (3): 247–260.

21. *Chistiakov D.A.* Liver regenerative medicine: advances and challenges. *Cells Tissues Organs*. 2012; 196 (4): 291–312.
22. *Lu T., Li Y., Chen T.* Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 337–350.
23. *Li Y.S., Harn H.J., Hsieh D.K., Wen T.C., Subeq Y.M., Sun L.Y. et al.* Cells and materials for liver tissue engineering. *Cell Transplant*. 2013; 22 (4): 685–700.
24. *Davis M.W., Vacanti J.P.* Toward development of an implantable tissue engineered liver. *Biomaterials*. 1996; 17 (3): 365–372.
25. *Balladur P., Crema E., Honiger J., Calmus Y., Baudrimont M., Delelo R. et al.* Transplantation of allogeneic hepatocytes without immunosuppression: long-term survival. *Surgery*. 1995; 117 (2): 189–194.
26. *Dixit V., Darvasi R., Arthur M., Brezina M., Lewin K., Gitnick G.* Restoration of liver function in Gunn rats without immunosuppression using transplanted microencapsulated hepatocytes. *Hepatology*. 1990; 12 (6): 1342–1349.
27. *Wong H., Chang T.M.* Bioartificial liver: implanted artificial cells microencapsulated living hepatocytes increases survival of liver failure rats. *Int J Artif Organs*. 1986; 9 (5): 335–336.
28. *Demetriou A.A., Whiting J.F., Feldman D., Levenson S.M., Chowdhury N.R., Moscioni A.D. et al.* Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. *Science*. 1986; 233 (4769): 1190–1192.
29. *Bosman D.K., de Haan J.G., Smit J., Jorning G.G., Maas M.A., Chamuleau R.A.* Metabolic activity of microcarrier attached liver cells after intraperitoneal transplantation during severe liver insufficiency in the rat. *J Hepatol*. 1989; 9 (1): 49–58.
30. *Kazemnejad S., Allameh A., Soleimani M., Gharehbaghian A., Mohammadi Y., Amirizadeh N. et al.* Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 24 (2): 278–287.
31. *Piryaei A., Valojerdi M.R., Shahsavani M., Baharvand H.* Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. *Stem Cell Rev*. 2011; 7 (1): 103–118.
32. *Vasanthan K.S., Subramanian A., Krishnan U.M., Sethuraman S.* Role of biomaterials, therapeutic molecules and cells for hepatic tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2012; 30 (3): 742–752.
33. *Wu C., Pan J., Bao Z., Yu Y.* Fabrication and characterization of chitosan microcarrier for hepatocyte culture. *J Mater Sci Mater Med*. 2007; 18 (11): 2211–2214.
34. *Murua A., Portero A., Orive G., Hernandez R.M., de Castro M., Pedraz J.L.* Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J Control Release*. 2008; 132 (2): 76–83.
35. *Uyama S., Kaufmann P.M., Takeda T., Vacanti J.P.* Delivery of whole liver-equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation. *Transplantation*. 1993; 55 (4): 932–935.
36. *Takeda T., Murphy S., Uyama S., Organ G.M., Schloo B.L., Vacanti J.P.* Hepatocyte transplantation in Swine using prevascularized polyvinyl alcohol sponges. *Tissue Eng*. 1995; 1 (3): 253–262.
37. *Kneser U., Kaufmann P.M., Fiegel H.C., Pollok J.M., Kluth D., Herbst H. et al.* Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *J Biomed Mater Res*. 1999; 47 (4): 494–503.
38. *Kedem A., Perets A., Gamlieli-Bonshtein I., Dvir-Ginzberg M., Mizrahi S., Cohen S.* Vascular endothelial growth factor-releasing scaffolds enhance vascularization and engraftment of hepatocytes transplanted on liver lobes. *Tissue Eng*. 2005; 11 (5–6): 715–722.
39. *Hou Y.T., Ijima H., Takei T., Kawakami K.* Growth factor/heparin-immobilized collagen gel system enhances viability of transplanted hepatocytes and induces angiogenesis. *J Biosci Bioeng*. 2011; 112 (3): 265–272.
40. *Navarro-Alvarez N., Soto-Gutierrez A., Chen Y., Caballero-Corbalan J., Hassan W., Kobayashi S. et al.* Intramuscular transplantation of engineered hepatic tissue constructs corrects acute and chronic liver failure in mice. *J Hepatol*. 2010; 52 (2): 211–219.
41. *Katsuda T., Teratani T., Ochiya T., Sakai Y.* Transplantation of a fetal liver cell-loaded hyaluronic acid sponge onto the mesentery recovers a Wilson's disease model rat. *J Biochem*. 2010; 148 (3): 281–288.
42. *Zhou P., Lessa N., Estrada D.C., Severson E.B., Lingala S., Zern M.A. et al.* Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. *Liver Transpl*. 2011; 17 (4): 418–427.
43. *Levenberg S., Huang N.F., Lavik E., Rogers A.B., Itskovitz-Eldor J., Langer R.* Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100 (22): 12741–12746.
44. *Soto-Gutierrez A., Zhang L., Medberry C., Fukumitsu K., Faulk D., Jiang H. et al.* A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011; 17 (6): 677–686.
45. *Schanz J., Pusch J., Hansmann J., Walles H.* Vascularized human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research. *J Biotechnol*. 2010; 148 (1): 56–63.
46. *Textbook of Hepatology / Rodes J., Benhamou J., Blei A., Reich J., M.R.: Blackwell Publishing Ltd, 2007.*
47. *Liu Tsang V., Chen A.A., Cho L.M., Jadin K.D., Sah R.L., DeLong S. et al.* Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels. *FASEB J*. 2007; 21 (3): 790–801.
48. *Hsu W.M., Carraro A., Kulig K.M., Miller M.L., Kaazempur-Mofrad M., Weinberg E. et al.* Liver-assist device with a microfluidics-based vascular bed in an animal model. *Ann Surg*. 2010; 252 (2): 351–357.
49. *Borenstein J.T., Weinberg E.J., Orrick B.K., Sundback C., Kaazempur-Mofrad M.R., Vacanti J.P.* Microfabrication of three-dimensional engineered scaffolds. *Tissue Eng*. 2007; 13 (8): 1837–1844.

50. Kulig K.M., Vacanti J.P. Hepatic tissue engineering. *Transpl Immunol.* 2004; 12 (3–4): 303–310.
51. Mooney D.J., Vandenburgh H. Cell delivery mechanisms for tissue repair. *Cell Stem Cell.* 2008; 2 (3): 205–213.
52. Sudo R. Multiscale tissue engineering for liver reconstruction. *Organogenesis.* 2014; 10 (2).
53. Goral V.N., Hsieh Y.C., Petzold O.N., Clark J.S., Yuen P.K., Faris R.A. Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants. *Lab Chip.* 2010; 10 (24): 3380–3386.
54. Chung S., Sudo R., Mack P.J., Wan C.R., Vickerman V., Kamm R.D. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab Chip.* 2009; 9 (2): 269–275.
55. Zervantonakis I.K., Kothapalli C.R., Chung S., Sudo R., Kamm R.D. Microfluidic devices for studying heterotypic cell-cell interactions and tissue specimen cultures under controlled microenvironments. *Biomicrofluidics.* 2011; 5 (1): 13406.
56. Yamada M., Utoh R., Ohashi K., Tatsumi K., Yamato M., Okano T. et al. Controlled formation of heterotypic hepatic micro-organoids in anisotropic hydrogel microfibers for long-term preservation of liver-specific functions. *Biomaterials.* 2012; 33 (33): 8304–8315.
57. Borenstein J.T., Vunjak-Novakovic G. Engineering tissue with BioMEMS. *IEEE Pulse.* 2011; 2 (6): 28–34.
58. Sudo R., Mitaka T., Ikeda M., Tanishita K. Reconstruction of 3D stacked-up structures by rat small hepatocytes on microporous membranes. *FASEB J.* 2005; 19 (12): 1695–1697.
59. Okano T. Current Progress of Cell Sheet Tissue Engineering and Future Perspective. *Tissue Eng Part A.* 2014.
60. Kasuya J., Sudo R., Mitaka T., Ikeda M., Tanishita K. Spatio-temporal control of hepatic stellate cell-endothelial cell interactions for reconstruction of liver sinusoids *in vitro*. *Tissue Eng Part A.* 2012; 18 (9–10): 1045–1056.
61. Torok E., Lutgehetmann M., Bierwolf J., Melbeck S., Dullmann J., Nashan B. et al. Primary human hepatocytes on biodegradable poly(L-lactic acid) matrices, a promising model for improving transplantation efficiency with tissue engineering. *Liver Transpl.* 2011; 17 (2): 104–114.
62. Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C.J., Markwald R.R. Organ printing, tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials.* 2009; 30 (12): 2164–2174.
63. Woodrow K., Wood M., Saucier-Sawyer J. Biodegradable Meshes Printed with Extracellular Matrix. *TISSUE ENGINEERING.* 2009; 15 (5).
64. Yagi H., Fukumitsu K., Fukuda K., Kitago M., Shinoda M., Obara H. et al. Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation, a regenerative medicine approach. *Cell Transplant.* 2013; 22 (2): 231–242.
65. Uygun B.E., Soto-Gutierrez A., Yagi H., Izamis M.L., Guzzardi M.A., Shulman C. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med.* 2010; 16 (7): 814–820.
66. Baptista P.M., Siddiqui M.M., Lozier G., Rodriguez S.R., Atala A., Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology.* 2011; 53 (2): 604–617.
67. Shupe T., Williams M., Brown A., Willenberg B., Petersen B.E. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis.* 2010; 6 (2): 134–136.
68. Wang Y., Cui C.B., Yamauchi M., Miguez P., Roach M., Malavarca R. et al. Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology.* 2011; 53 (1): 293–305.
69. Kim S.S., Utsunomiya H., Koski J.A., Wu B.M., Cima M.J., Sohn J. et al. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels. *Ann Surg.* 1998; 228 (1): 8–13.
70. Hanada S., Kojima N., Sakai Y. Soluble factor-dependent *in vitro* growth and maturation of rat fetal liver cells in a three-dimensional culture system. *Tissue Eng Part A.* 2008; 14 (1): 149–160.
71. Jiang J., Kojima N., Guo L., Naruse K., Makuuchi M., Miyajima A. et al. Efficacy of engineered liver tissue based on poly-L-lactic acid scaffolds and fetal mouse liver cells cultured with oncostatin M, nicotinamide, and dimethyl sulfoxide. *Tissue Eng.* 2004; 10 (9–10): 1577–1586.
72. Matsumoto K., Mizumoto H., Nakazawa K., Ijima H., Funatsu K., Kajiwara T. Hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells in a bioreactor using polyurethane/spheroid culture. *Transplant Proc.* 2008; 40 (2): 614–616.
73. Yan Y., Wang X., Pan Y., Liu H., Cheng J., Xiong Z. et al. Fabrication of viable tissue-engineered constructs with 3D cell-assembly technique. *Biomaterials.* 2005; 26 (29): 5864–5871.
74. Zhang F., Xu R., Zhao M.J. QSG-7701 human hepatocytes form polarized acini in three-dimensional culture. *J Cell Biochem.* 2010; 110 (5): 1175–1186.
75. Kinasiewicz A., Gautier A., Lewinska D., Bukowski J., Legallais C., Werynski A. Culture of C3A cells in alginate beads for fluidized bed bioartificial liver. *Transplant Proc.* 2007; 39 (9): 2911–2913.
76. Lan S.F., Safiejko-Mroccka B., Starly B. Long-term cultivation of HepG2 liver cells encapsulated in alginate hydrogels: a study of cell viability, morphology and drug metabolism. *Toxicol in vitro.* 2010; 24 (4): 1314–1323.
77. Zhang S., Tong W., Zheng B., Susanto T.A., Xia L., Zhang C. et al. A robust high-throughput sandwich cell-based drug screening platform. *Biomaterials.* 2011; 32 (4): 1229–1241.
78. Xiong A., Austin T.W., Lagasse E., Uchida N., Tamaki S., Bordier B.B. et al. Isolation of human fetal liver progenitors and their enhanced proliferation by three-dimensional coculture with endothelial cells. *Tissue Eng Part A.* 2008; 14 (6): 995–1006.
79. Lin P., Chan W.C., Badylak S.F., Bhatia S.N. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng.* 2004; 10 (7–8): 1046–1053.

Статья поступила в редакцию 31.03.2014 г.