

УДК 57.085:615.361

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО СКАФФОЛДА ПЕЧЕНИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ *in vitro*¹

М. Ю. ЮРКЕВИЧ¹), А. Д. ДУБКО¹),
Д. Б. НИЖЕГОРОВОДА¹), М. В. ЛОБАЙ¹), М. М. ЗАФРАНСКАЯ¹)

¹Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Создание многокомпонентных тканеинженерных конструкций на основе децеллюляризованного скаффолда – перспективная альтернатива органной трансплантации при терминальной стадии печеночной недостаточности. Представлена технология децеллюляризации печени крыс, заключающаяся в перфузии 0,1 % раствора додецилсульфата натрия через воротную вену. Установлено отсутствие цитотоксического эффекта децеллюляризованного скаффолда на аллогенные культуры спленоцитов и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки. Полученные скаффолды печени обладают биосовместимостью, подтвержденной в культурах клеток, и соответствуют основным критериям, предъявляемым к клеточным носителям, что позволяет использовать их в тканевой инженерии для создания многоклеточных тканеинженерных конструкций печени.

Ключевые слова: децеллюляризация; перфузионно-детергентный метод; скаффолд печени; биосовместимость; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; спленоциты.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № М19АРМ-016 от 02.05.2019 г.).

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Юркевич МЮ, Дубко АД, Нижегородова ДБ, Лобай МВ, Зафранская ММ. Биосовместимость децеллюляризованного скаффолда печени в исследованиях *in vitro*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1:20–27.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-20-27>

For citation:

Yurkevich MYu, Dubko AD, Nizheharodava DB, Labai MV, Zafranskaya MM. Biocompatibility of a decellularized liver scaffold in studies *in vitro*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;1:20–27. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-20-27>

Авторы:

Мария Юрьевна Юркевич – кандидат биологических наук; доцент кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

Андрей Дмитриевич Дубко – младший научный сотрудник научно-исследовательского сектора.

Дарья Борисовна Нижегородова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

Марина Валерьевна Лобай – старший преподаватель кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

Марина Михайловна Зафранская – доктор медицинских наук, доцент; заведующий кафедрой иммунологии факультета экологической медицины.

Authors:

Mariya Yu. Yurkevich, PhD (biology); associate professor at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

marija4567@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-5082-5874>

Andrei D. Dubko, junior researcher at the research sector.

dubko.immun@gmail.com

Darya B. Nizheharodava, PhD (biology), docent; associate professor at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

nzh@tut.by

Maryna V. Labai, senior lecturer at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

marina.lobai@mail.ru

Marina M. Zafranskaya, doctor of science (medicine), docent; head of the department of immunology, faculty of environmental medicine.

zafranskaya@gmail.com

BIOCOMPATIBILITY OF A DECELLULARIZED LIVER SCAFFOLD IN STUDIES *in vitro*

M. Yu. YURKEVICH^a, A. D. DUBKO^a,
D. B. NIZHEHARODAVA^a, M. V. LABAI^a, M. M. ZAFRANSKAYA^a

^aInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daïhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

Corresponding author: M. Yu. Yurkevich (marija4567@gmail.com)

The development of multicomponent threedimensional structures based on decellularized tissue is a perspective alternative for organ transplantation in end-stage liver disease. The technology of rat liver decellularization is presented which consist in sequential perfusion of organ through the portal vein and use of 0.1 % sodium dodecyl sulfate as an active solution. The absence of the cytotoxic effect of decellularized scaffolds on allogeneic splenocytes and multipotent mesenchymal stromal cells was established. The obtained liver scaffolds are biocompatible in cells cultures and correspond criteria for cell carriers.

Keywords: decellularization; perfusion-detergent method; liver scaffold; biocompatibility; multipotent mesenchymal stromal cells; splenocytes.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. M19ARM-016 dated 02.05.2019).

Введение

На сегодняшний день использования стандартных терапевтических подходов при терминальной стадии заболеваний печени все еще недостаточно и смертность остается на уровне 80–90 %. Широкое распространение ортотопической и вспомогательной (частичной) пересадки печени ограничено дефицитом донорских органов, отсутствием эффективных методик длительного хранения печени, плохой приживляемостью трансплантата, а также частым развитием осложнений, связанных с отторжением или недостаточным функционированием органа. Использование эфферентных (аппаратных) методов при терминальной печеночной недостаточности обеспечивает лишь временную детоксикацию организма и незначительно стимулирует регенеративные процессы [1; 2]. В связи с этим актуальной задачей выступает поиск альтернативных подходов, одним из которых является клеточная терапия [3–8].

Проведены как экспериментальные, так и клинические исследования трансплантации различных типов клеток (гепатоцитов [5–7], мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) [8] и др.) при острой и хронической печеночной недостаточности [5; 6; 8], наследственных метаболических нарушениях [7]. Однако практически во всех случаях клеточная терапия не обеспечивала стабильный терапевтический эффект: наблюдалась временная нормализация печеночных функций, продолжительность которой варьировалась от нескольких дней до 6–18 мес. Кроме того, отмечался крайне низкий уровень приживляемости клеток (менее 1 % от всех введенных клеток), что связано с отсутствием условий для их прикрепления и контактного взаимодействия с последующим формированием *de novo* анатомически функциональной структуры [1; 5–7].

Современный этап разработок в области терапии заболеваний печени связывают с использованием клеточных культур в составе тканеинженерных конструкций (скаффолдов) [9; 10]. Скаффолды должны обладать рядом свойств, дающих возможность сформировать полноценную ткань: биосовместимостью и отсутствием иммунологического отторжения, адгезивной поверхностью, способствующей прикреплению и пролиферации клеток, пористостью, нетоксичностью [3; 9; 10]. Каркасы из синтетических материалов не позволяют повторить необходимую архитектуру, микро- и наноструктурные особенности и функциональную активность нативных тканей [11]. В связи с этим в регенеративной медицине преимущество отдается биологическим конструкциям, включающим в себя компоненты нативной ткани, полученные различными методами децеллюляризации (экстракция детергентами или ферментами, промывание гипотоническими и гипертоническими растворами, разрушение ультразвуком, механическое давление, чередование циклов замораживание – оттаивание и т. д.) [12–15].

Децеллюляризация целого органа или его части позволяет получить соединительнотканый каркас с сохраненными архитектурой печеночного матрикса и проходимостью сосудистого русла. При этом

в ткани сохраняются внеклеточные элементы (коллаген, фибронектин, ламинин, гликозаминогликаны, протеогликианы), выступающие в роли сайтов прикрепления, а также факторы роста, миграции и дифференцировки клеток (эндотелиальный фактор роста сосудов, инсулиноподобный фактор роста, фактор роста гепатоцитов и др.) [13]. Важным показателем децеллюляризованных скаффолдов является их биосовместимость, оцениваемая в культурах клеток и на экспериментальных моделях у лабораторных животных [16].

Цель исследования заключалась в модификации технологии децеллюляризации печени перфузионно-детергентным методом и оценке биосовместимости полученных скаффолдов в аллогенных культурах клеток.

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования. Экспериментальное исследование включало следующие этапы: получение скаффолда методом децеллюляризации ткани печени, гистологическое исследование конечного продукта, определение содержания остаточной ДНК, оценку биосовместимости в клеточных культурах ММСК и спленоцитов.

Материалы и оборудование. В работе использовались гепаринат натрия (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), 0,9 % раствор натрия хлорида (РУП «Белмедпрепараты»), вода дистиллированная, подготовленная по требованиям ГОСТ 6709-72, фиколл-верографин (*Sigma*, Германия), коллагеназа типа IV (*Sigma*), эмбриональная телячья сыворотка (*Capricorn Scientific*, Германия), минимальная среда Игла с низким содержанием глюкозы, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM, *Gibco*, США), смесь антибиотиков и антимикотика (бензилпенициллин натрия, стрептомицина сульфат, неомицина сульфат, *Lonza*, США), L-глутамин (*Lonza*), додецилсульфат натрия (SDS, *Sigma*), диметилсульфоксид (*Sigma*), гематоксилин (Россия), спиртовой раствор эозина (Россия), железный гематоксилин Вейгерта (Россия), 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, *Sigma*), набор Annexin V – FITC Apoptosis Detection Kit (*BD Pharmingen*, США), культуральные чашки Петри, пробирки культуральные на 15 и 50 мл, медицинские инструменты – пинцеты, зажимы, хирургические ножницы, периферический венозный катетер 18G.

Применяемое оборудование: ламинарный бокс класса защиты II (ОДО «Белаквилон», Беларусь), CO₂-инкубатор CO2CELL 50 (*MMM Group*, Германия), перистальтический насос, центрифуга лабораторная Liston C 2201 (ООО «Листон», Россия), инвертированный флуоресцентный микроскоп BS-2036F (*BestScope*, Китай), проточный цитометр CytoFLEX (*Beckman Coulter*, США), дозаторы автоматические (*Thermo Scientific*, Россия).

Лабораторные животные. Экспериментальные исследования проводили на половозрелых лабораторных крысах (масса тела 220–280 г) с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), и в соответствии с Ветеринарно-санитарными правилами по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках (утверждены постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 21 мая 2010 г. № 36).

Клеточные культуры. В работе использовались культуры ММСК, полученные согласно стандартному протоколу ферментативной дезагрегации жировой ткани (0,075 % раствор коллагеназы типа IV) [17], а также спленоциты, выделенные путем центрифугирования гомогената селезенки на градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,083 \text{ г/см}^3$).

Децеллюляризация печени крыс. На фоне тиопенталового наркоза (интракардиальное введение 45 мг тиопентала натрия на 1 кг веса) проводили срединную и поперечную лапаротомию лабораторных животных, края раны фиксировали, катетеризировали нижнюю полую и воротную вены, на остальные сосуды накладывали швы. В сосудистую систему печени вводили 2000 ЕД гепарината натрия в охлажденном до 4 °С растворе лактата Рингера. Далее печень отделяли от связочного материала, помещали в емкость с дистиллированной водой и перфузировали 0,1 % раствором SDS. Подачу раствора со скоростью 25 мл/мин осуществляли с помощью перистальтического насоса через катетер воротной вены. Систему отведения подключали к катетеру нижней полой вены. Перфузию останавливали при полной диссоциации клеток печени, которую оценивали эмпирически на основе изменения окраски и прозрачности органа. Для очищения сосудистого русла от децеллюляризирующего раствора и тканевого детрита ткань перфузировали дистиллированной водой, содержащей 1 % смеси антибиотиков и антимикотика.

Анализ содержания ДНК в децеллюляризованном скаффолде. Образцы децеллюляризованного скаффолда лизировали в 1 мл буферного раствора, содержащего 100 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л трис-HCl, 25 ммоль/л ЭДТА, 0,5 % SDS, в течение 16–18 ч при 37 °С в условиях постоянного помешивания. Далее образцы центрифугировали (1 мин, 3000 об/мин) в 1 мл фенол-хлороформной смеси

(фенол, хлороформ и изоамиловый спирт в соотношении 25 : 24 : 1, pH 7,5–8,5). Полученные водные фазы последовательно центрифугировали в 1 мл раствора 8 моль/л ацетата аммония (20 мин, 14 000 об/мин, 4 °C) и 1 мл изопропанола (10 мин, 14 000 об/мин, 4 °C). Осадки ДНК отмывали в 0,7 мл 70 % раствора этилового спирта (10 мин, 14 000 об/мин, 4 °C). После удаления жидкой части и полного высыхания осадка (5–10 мин) к образцам добавляли 0,05 мл деионизированной воды. Измерение концентраций ДНК осуществляли на спектрофотометре серии NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*) при длинах волн 260 и 280 нм.

Исследование биосовместимости скаффолда *in vitro*. На сегменты децеллюляризованного скаффолда размером 10 × 5 мм, помещенные в лунки 24-луночного планшета, вносили ММСК первого пассажа в концентрации $4 \cdot 10^4$ клеток на лунку или суспензию спленоцитов в концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток на лунку. Культивирование осуществлялось 13 дней при условиях 37 °C и 5 % CO₂ в питательной среде DMEM, содержащей 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамин и 1 % смеси антибиотиков и антимиотика.

Оценка жизнеспособности клеток. Жизнеспособность ММСК оценивали методом флуоресцентной микроскопии с использованием 1 мкг/мл DAPI (спектр возбуждения 360–370 нм, диапазон эмиссии 420–470 нм). Спленоциты окрашивали пропидий йодидом и антителами к аннексину V, меченным флуоресцеином, с регистрацией результатов на проточном цитометре на 50 000 событий.

Рецеллюляризация скаффолда печени. Рецеллюляризация скаффолда осуществлялась путем паренхиматозного введения суспензии ММСК жировой ткани первого пассажа в полной питательной среде. Концентрация ММСК составляла $2,5 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл в зависимости от объема используемого сегмента. Рецеллюляризованные скаффолды на 72 ч помещались в среду DMEM (37 °C и 5 % CO₂).

Гистологическое исследование. Образцы децеллюляризованной ткани до и после рецеллюляризации фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине, обезвоживали в спиртах восходящей крепости и фиксировали в парафине. Изготовленные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином с последующей микроскопической оценкой результатов. Морфометрическое исследование проводили на микроскопе Leica DMLS (Германия) с цифровой видеокамерой JVC (Япония) (разрешающая способность 7 Мп) с помощью программы для анализа и обработки изображений *Leica QWin* (версия 1.56). Количество клеток подсчитывалось в шести неперекрывающихся полях зрения.

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты анализировались с использованием стандартного пакета прикладных программ *Statistica 8.0*. Данные представляли в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (25–75-й процентиля). Для оценки различий между двумя группами использовали непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Процесс децеллюляризации органа направлен на удаление всех антигенных структур (нуклеиновых кислот, клеточных мембран, цитоплазматических структур и т. д.) из ткани без повреждения сети экстрацеллюлярного матрикса и нарушения его целостности. Степень удаления клеточных компонентов варьирует в зависимости от пути доставки перфузионного раствора в ткани, типа используемого детергента и времени его экспозиции [12–15].

В рамках данного исследования образцы печени лабораторных крыс перфузировали 0,1 % раствором SDS через воротную вену, что обеспечивало эффективную доставку анионного детергента к клеткам. При визуальном осмотре децеллюляризованные скаффолды характеризовались прозрачностью и однородностью с визуализирующимися в толще контурами сосудов и сохранной капсулой Глиссона (рис. 1, *a*). Согласно данным гистологического исследования взаимная ориентация волокон внеклеточного матрикса в децеллюляризованной ткани не отличалась от таковой в нативных органах, обнаруживались лишь единичные разрывы, отсутствовали признаки дегградации коллагеновых волокон и тканевого отека (см. рис. 1, *b–z*). Сохранность сосудистой сети, наличие целостного внеклеточного матрикса, формирующего естественную клеточную нишу, а также пространственная архитектура ткани скаффолдов позволяют в дальнейшем осуществлять их успешную рецеллюляризацию различными типами клеток (ММСК, гепатоцитами, эндотелиальными клетками, непаренхиматозными клетками печени и др.).

Децеллюляризованные скаффолды не должны содержать клеток, включая клеточные компоненты – цитоплазму и ядра. Их присутствие в матриксе может приводить к нарушению клеточной биосовместимости *in vitro* и вызывать нежелательные реакции в условиях *in vivo*. С. Ф. Бадилак с соавторами (2011) на основе результатов оценки эффективности применения скаффолдов на клеточном и организменном уровнях выделил следующие минимальные критерии для оценки децеллюляризации: содержание

ДНК менее 50 нг в 1 мг сухого веса внеклеточного матрикса; наличие фрагментов ДНК длиной менее 200 пар нуклеотидов; отсутствие видимого ядерного материала в срезах ткани, окрашенных гематоксилином и эозином или другими красителями [15]. Гистологическая оценка не выявила ядерного или цитоплазматического окрашивания в полученных децеллюляризированных образцах (см. рис. 1, б–г) при сохранной пористой структуре ткани. Концентрация ДНК в скаффолдах соответствовала 0,13 (0,08–0,35) нг/мг, что составляло менее 1 % от количества ДНК в нативной ткани (529,06 (527,03–541,09) нг/мг, $p < 0,01$) (см. рис. 1, д).

При культивировании ММСК жировой ткани на подложке из децеллюляризированной ткани клетки адгезировались к скаффолду в течение 24 ч, что соответствует степени адгезии к лабораторному пластику. Кроме того, ММСК, культивируемые на децеллюляризированных скаффолдах, сохраняли типичную для монослойных культур веретеновидную морфологию, а также характеризовались сходной с нативными клетками пролиферативной активностью (рис. 2). Жизнеспособность ММСК в присутствии скаффолда варьировала от 92 до 99 % (95 (93–99) % по медиане) и не отличалась от аналогичного показателя для нативных культур (96 (92–99) %, $p > 0,05$). Морфологические особенности, высокая жизнеспособность и пролиферативный потенциал сохранялись в ММСК, культивируемых на подложке из децеллюляризированной ткани, на протяжении всего периода наблюдения.

Децеллюляризированная ткань не обладала цитотоксичностью в отношении аллогенных спленоцитов (рис. 3). На 4-й день совместного культивирования количество некротических спленоцитов на сегментах скаффолда составляло 1–2 % (1,2 (0,8–1,6) %), количество апоптотических клеток не превышало 13 % (10,6 (7,5–12,0) %), что соответствовало результатам, полученным в нативных культурах спленоцитов (1,0 (0,5–1,5) и 8,9 (6,3–11,2) % соответственно, $p > 0,05$).

При культивировании ММСК в трехмерных условиях скаффолда также наблюдалось прикрепление клеток к соединительнотканым структурам матрикса (рис. 4). Выход клеток из скаффолда через 72 ч после его заселения путем паренхиматозной инъекции не превышал 10 % (8,0 (5,6–9,1) % по медиане). В гистологических препаратах рецеллюляризированных скаффолдов наблюдалось диффузное расположение клеток, количество которых, по данным морфометрического исследования, варьировалось от 5 до 17 (8 (6–11) ММСК) в поле зрения.

Представленные данные свидетельствуют о биосовместимости полученных перфузионно-детергентным методом децеллюляризированных скаффолдов печени с культурами клеток и указывают на отсутствие у них цитотоксических свойств, что возможно лишь в случае надлежащей элиминации из ткани печени клеточных элементов и детергентов, используемых для перфузии.

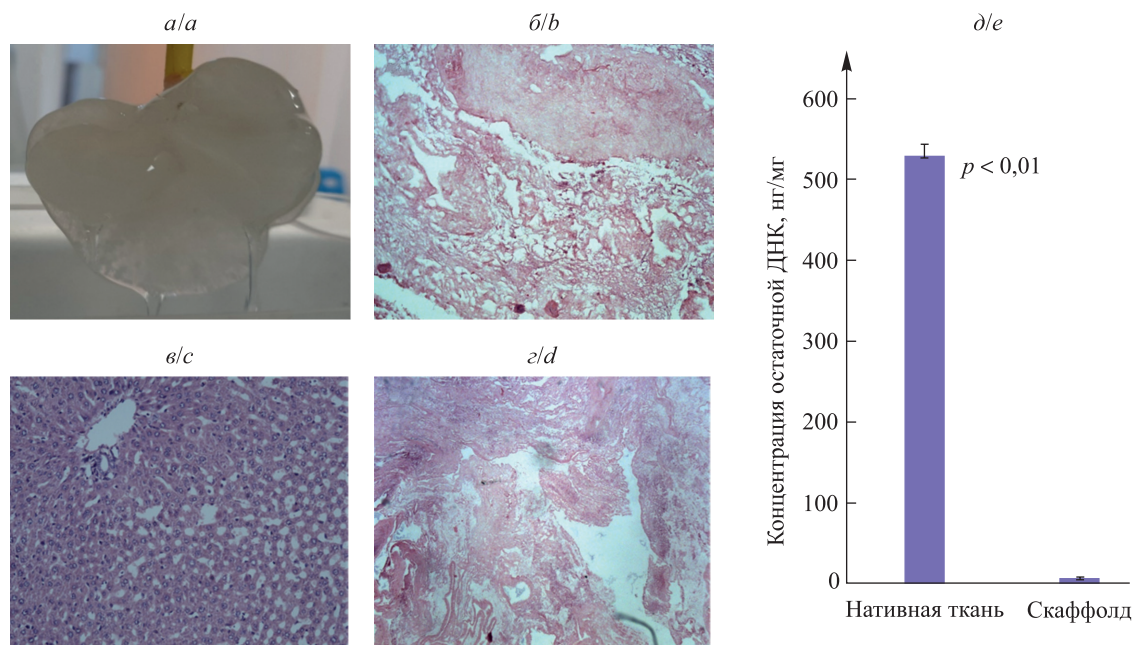


Рис. 1. Внешний вид (а) и гистологическая структура скаффолда (б – нативная ткань, увеличение $\times 20$; в – децеллюляризированная ткань, увеличение $\times 20$; г – децеллюляризированная ткань, увеличение $\times 5$; окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия), содержание остаточной ДНК (д)

Fig. 1. The appearance (a) and the histological structure of the scaffold (b – native tissue, magnification $\times 20$; c – decellularized tissue, magnification $\times 20$; d – decellularized tissue, magnification $\times 5$; hematoxylin eosin staining, light microscopy), residual DNA content (e)

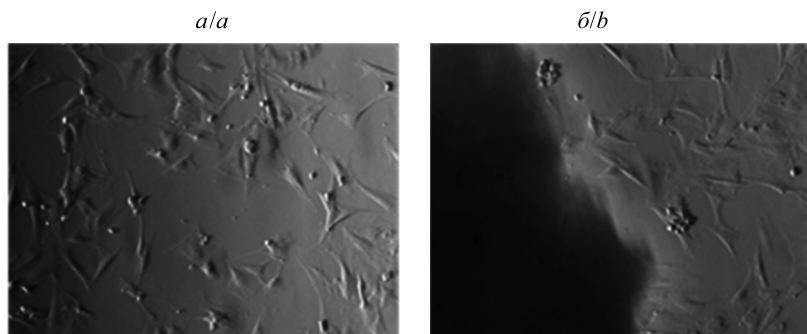


Рис. 2. Морфология ММСК, культивируемых в стандартных условиях в течение 10 дней в отсутствие (а) и в присутствии (б) подложки из децеллюляризованного скаффолда печени. Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 40$

Fig. 2. The morphology of MMSCs in the absence (a) and the presence (b) of a decellularized liver scaffold on the 10th cultivation day under standard conditions. Phase-contrast microscopy, magnification $\times 40$

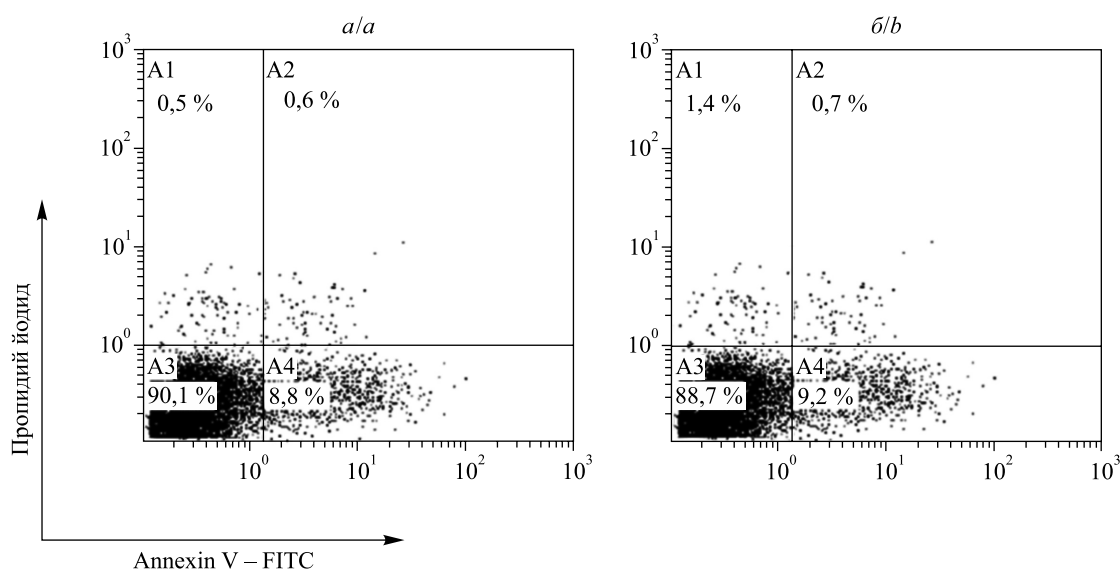


Рис. 3. Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии, отражающие экспрессию пропидий йодида и аннексина V в спленocyтaх, культивируемых в отсутствие (а) и в присутствии (б) скаффолда на основе децеллюляризованной ткани печени

Fig. 3. Representative flow cytometry diagrams of propidium iodide and annexin V expression in the absence (a) and the presence (b) of decellularized liver scaffold

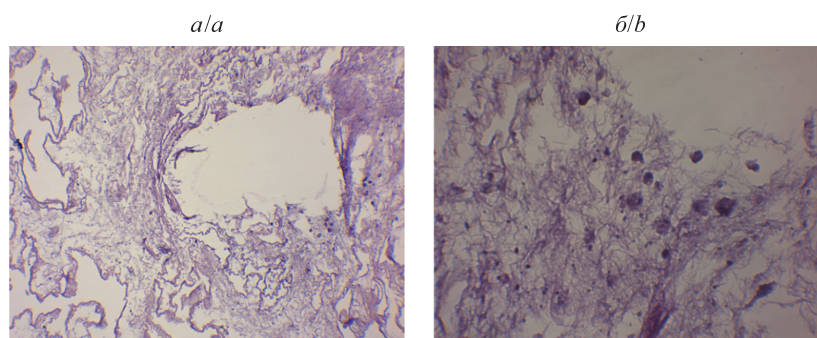


Рис. 4. Структура децеллюляризованного скаффолда печени, заселенного путем паренхиматозного введения аллогенных ММСК жировой ткани: а – увеличение $\times 10$; б – увеличение $\times 40$. Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия

Fig. 4. The structure of the decellularized liver scaffold populated by parenchymal administration of allogeneic adipose-derived MMSC: a – magnification $\times 10$; b – magnification $\times 40$. Hematoxylin eosin staining, light microscopy

Заклучение

Метод децеллюляризации печени на основе перфузии органа анионным детергентом (SDS) через воротную вену обеспечивает практически полное удаление клеточных компонентов из нативной ткани, максимально сохраняя целостность внеклеточных волокон. Полученные скаффолды печени обладают биосовместимостью, подтвержденной в культурах клеток, и отвечают основным критериям, предъявляемым к клеточным носителям, что дает возможность использовать их в тканевой инженерии для создания многоклеточных тканеинженерных конструкций печени.

Библиографические ссылки

1. Uhl P, Fricker G, Haberkorn U, Mier W. Current status in the therapy of liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(5):7500–7512. DOI: 10.3390/ijms15057500.
2. Akamatsu N, Sugawara Y, Kokudo N. Acute liver failure and liver transplantation. *Intractable and Rare Diseases Research*. 2013;2(3):77–87. DOI: 10.5582/irdr.2013.v2.3.77.
3. Гулай ЮС, Крашенинников МЕ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА. Тканевая инженерия печени (современное состояние проблемы по данным зарубежных источников). *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014;16(2):103–113. DOI: 10.15825/1995-1191-2014-2-103-113.
4. Heydari Z, Najimi M, Mirzaei H, Shpichka A, Ruoss M, Farzaneh Z, et al. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies. *Cells*. 2020;9(2):304. DOI: 10.3390/cells9020304.
5. Hamooda M. Hepatocyte transplantation in children with liver cell failure. *Electronic Physician*. 2016;8(10):3096–3101. DOI: 10.19082/3096.
6. Wang F, Zhou L, Ma X, Ma W, Wang C, Lu Y, et al. Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplantation Proceedings*. 2014;46(1):192–198. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.10.042.
7. Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенинников МЕ. Трансплантация гепатоцитов как метод лечения печеночной недостаточности: экспериментальный и клинический опыт. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2010;12(4):53–60. DOI: 10.15825/1995-1191-2010-4-53-60.
8. Alfaihi M, Eom YW, Newsome PN, Baik SK. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2018;68(6):1272–1285. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.030.
9. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, Nies C, Zantl R, Wagner H, et al. 3D cultivation techniques for primary human hepatocytes. *Microarrays*. 2015;4(1):64–83. DOI: 10.3390/microarrays4010064.
10. Mazza G, Al-Akkad W, Rombouts K, Pinzani M. Liver tissue engineering: from implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatology Communications*. 2018;2(2):131–141. DOI: 10.1002/hep4.1136.
11. Grant R, Hay D, Callanan A. From scaffold to structure: the synthetic production of cell derived extracellular matrix for liver tissue engineering. *Biomedical Physics and Engineering Express*. 2018;4(6):065015. DOI: 10.1088/2057-1976/aacbe1.
12. Coronado RE, Somaraki-Cormier M, Natesan S, Christy RJ, Ong JL, Half GA. Decellularization and solubilization of porcine liver for use as a substrate for porcine hepatocyte culture: method optimization and comparison. *Cell Transplantation*. 2017;26(12):1840–1854. DOI: 10.1177/0963689717742157.
13. Wang Y, Nicolas CT, Chen HS, Ross JJ, De Lorenzo SB, Nyberg SL. Recent advances in decellularization and recellularization for tissue-engineered liver grafts. *Cells Tissues Organs*. 2017;204:125–136. DOI: 10.1159/000479597.
14. Zhou P, Lessa N, Estrada DC, Severson EB, Lingala S, Zern MA, et al. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. *Liver Transplantation*. 2011;17(4):418–427. DOI: 10.1002/lt.22270.
15. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
16. Hussein KH, Park K-M, Kang K-S, Woo H-M. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;67:766–778. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.068.
17. Зафранская ММ, Ламовская НВ, Нижегородова ДБ, Юркевич МЮ, Багатка СС, Мечковский СЮ и др. Морфология, кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2010;4:86–93.

References

1. Uhl P, Fricker G, Haberkorn U, Mier W. Current status in the therapy of liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(5):7500–7512. DOI: 10.3390/ijms15057500.
2. Akamatsu N, Sugawara Y, Kokudo N. Acute liver failure and liver transplantation. *Intractable and Rare Diseases Research*. 2013;2(3):77–87. DOI: 10.5582/irdr.2013.v2.3.77.
3. Gulay YS, Krasheninnikov ME, Shagidulin MY, Onishchenko NA. Hepatic tissue engineering (modern state of this problem). *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2014;16(2):103–113. Russian. DOI: 10.15825/1995-1191-2014-2-103-113.
4. Heydari Z, Najimi M, Mirzaei H, Shpichka A, Ruoss M, Farzaneh Z, et al. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies. *Cells*. 2020;9(2):304. DOI: 10.3390/cells9020304.
5. Hamooda M. Hepatocyte transplantation in children with liver cell failure. *Electronic Physician*. 2016;8(10):3096–3101. DOI: 10.19082/3096.
6. Wang F, Zhou L, Ma X, Ma W, Wang C, Lu Y, et al. Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplantation Proceedings*. 2014;46(1):192–198. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.10.042.

7. Shagidulin MY, Onishchenko NA, Krashennikov ME. Transplantation of hepatocytes as the method of treatment of liver failure: experimental and clinical experience. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2010;12(4):53–60. Russian. DOI: 10.15825/1995-1191-2010-4-53-60.
8. Alfaifi M, Eom YW, Newsome PN, Baik SK. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2018; 68(6):1272–1285. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.030.
9. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, Nies C, Zantl R, Wagner H, et al. 3D cultivation techniques for primary human hepatocytes. *Microarrays*. 2015;4(1):64–83. DOI: 10.3390/microarrays4010064.
10. Mazza G, Al-Akkad W, Rombouts K, Pinzani M. Liver tissue engineering: from implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatology Communications*. 2018;2(2):131–141. DOI: 10.1002/hep4.1136.
11. Grant R, Hay D, Callanan A. From scaffold to structure: the synthetic production of cell derived extracellular matrix for liver tissue engineering. *Biomedical Physics and Engineering Express*. 2018;4(6):065015. DOI: 10.1088/2057-1976/aacbe1.
12. Coronado RE, Somaraki-Cormier M, Natesan S, Christy RJ, Ong JL, Half GA. Decellularization and solubilization of porcine liver for use as a substrate for porcine hepatocyte culture: method optimization and comparison. *Cell Transplantation*. 2017;26(12): 1840–1854. DOI: 10.1177/0963689717742157.
13. Wang Y, Nicolas CT, Chen HS, Ross JJ, De Lorenzo SB, Nyberg SL. Recent advances in decellularization and recellularization for tissue-engineered liver grafts. *Cells Tissues Organs*. 2017;204:125–136. DOI: 10.1159/000479597.
14. Zhou P, Lessa N, Estrada DC, Severson EB, Lingala S, Zern MA, et al. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. *Liver Transplantation*. 2011;17(4):418–427. DOI: 10.1002/lt.22270.
15. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32(12):3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
16. Hussein KH, Park K-M, Kang K-S, Woo H-M. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;67:766–778. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.068.
17. Zafanskaya MM, Lamouskaya NV, Nizheharodava DB, Yurkevich MYu, Bagatka SS, Mechkovsky SYu, et al. Morphology, growth kinetics and cell phenotype of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2010;4:86–93. Russian.

Статья поступила в редакцию 30.06.2020.
Received by editorial board 30.06.2020.