

В.Н. Александров, Т.А. Камилова, Д.В. Фирсанов,
Л.И. Калюжная, А.В. Кривенцов, А.А. Кондратенко

Тканевая инженерия печени

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. В настоящее время трансплантация донорской печени является единственным методом лечения терминальной стадии цирроза. Операционные осложнения, иммунные конфликты, дефицит донорской печени и высокая стоимость процедуры требуют поиска альтернативных методов лечения. Одним из них является трансплантация биоинженерной печени как продукта тканевой инженерии. Прототип печени, включающий компоненты межклеточного матрикса, заселенный живыми гепатоцитами мыши, показал компетентность нативной печени после трансплантации его под почечную капсулу сингенному реципиенту. Для создания трансплантатной печени, а не органоида, требуется решить две задачи. Первая задача – создание носителя клеток, или матрикса, идентичного соединительнотканной строме печени. Вторая задача – поиск клеток, способных выполнять метаболическую функцию и обеспечивать длительное функционирование органа. Первую задачу удастся решить с помощью децеллюляризации. Перфузия печени детергентом (*in vivo* или *ex vivo*) удаляет эпителий, сохраняет строму со всеми особенностями микроциркуляторной системы органа, а также факторы роста и дифференцировки, экспрессированные на матриксе. Децеллюляризованная сосудистая сеть способна выдержать давление, сравнимое с давлением в сосудах интактной печени, что обеспечивает сброс крови в нижнюю полую вену. Бесклеточная сосудистая сеть в дальнейшем используется для заселения каркаса клетками. Выбор клеток составляет вторую задачу и не ограничивается только гепатоцитами. Культивирование рецеллюляризованного матрикса при нормальном давлении питательной среды в воротной вене способствует оптимальной диффузии кислорода и нутриентов. Культивирование благодаря сигнальным молекулам матрикса создает необходимые и достаточные условия для пролиферации и дифференцировки клеток. В результате формируются структурно-функциональные единицы печени – гепатоциты, способные функционировать.

Ключевые слова: трансплантация печени, биоинженеринг печеночной ткани, межклеточный матрикс, децеллюляризованная сосудистая сеть, трехмерный биоматриксный носитель, децеллюляризация, рецеллюляризация, эндотелиальные и печеночные маркеры, биоинженерная печень.

Ежегодно лист ожидания нуждающихся в трансплантации печени пополняют десятки тысяч пациентов. Ортотопическая аллотрансплантация печени (ОТП) является для них единственным способом сохранить жизнь. Однако ОТП – это не только высокая стоимость операции, хирургические риски, выживаемость, не превышающая 60%, пожизненная иммуносупрессия [19, 40], но и острый дефицит собственно донорской печени. Учитывая, что только органы в идеальном состоянии пригодны для трансплантации, возможности ОТП всегда будут ограничены.

Одним из подходов к решению этой проблемы могла стать ксенотрансплантация печени, если бы не гиперострое отторжение трансплантата. Второй подход – реанимация донорского органа с помощью аппаратной перфузии. Выживаемость этих органов незначительна по отношению к уровню смертности нуждающихся больных [12].

Третий подход – трансплантация клеток печени. Клеточная терапия может быть выполнена с гораздо меньшим риском по сравнению с трансплантацией органа и показана пациентам, которые не смогут перенести пересадку печени. Гепатоциты, имплантированные в селезенку, под кожу, почечную капсулу, в легкое, выживают и пролиферируют. Более того, гепатоциты, доставленные внутрипортально, могут

занять свою естественную нишу и интегрироваться в печеночные балки, установив межклеточные контакты с гепатоцитами хозяина. Однако ограниченный доступ трансплантированных клеток к печеночным балкам и снижение их жизнеспособности в измененной циррозом печени лимитируют использование первичных гепатоцитов при патологии, не сопровождающейся нарушением морфологии печени, например при врожденных нарушениях обмена веществ. Клеточная терапия даже этих состояний сопровождается проблемами, связанными с риском тромбоза воротной вены и легочной эмболии, дефицитом пространства для трансплантированных клеток, лимитирующим их количество, низким пролиферативным потенциалом, низкой выживаемостью и риском отторжения пересаженных клеток [2, 12, 17].

Тканеинженерные конструкторы в меньшей мере, чем клеточная терапия, ограничивают количество используемых при их создании клеток. Качество тканеинженерных конструкторов в основном зависит от носителей клеток – аналогов межклеточного матрикса (МКМ), обеспечивающих адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток. Носитель должен обладать уникальными свойствами гепатоспецифичной среды для поддержания межклеточных взаимодействий и гепатоспецифичной архитектуры, достаточной меха-

нической прочностью для трансплантации и пористой структурой для диффузии нутриентов, контролируемого выделения продуктов деструкции и газообмена. Кроме того, он должен поддерживать фенотип и функции гепатоцитов аутентичными регуляторными сигналами, способствовать васкуляризации [18, 40, 42] и находиться в состоянии динамического взаимодействия с клетками ткани в ответ на изменения микросреды, обеспечивая сигналы, инициирующие миграцию, пролиферацию [41] и дифференцировку клеток [32].

Разработаны трехмерные носители из синтетических биосовместимых и биodeградируемых полимеров. Включение в состав носителя нановолоконного галактозилированного хитозана способствует порообразованию, клеточной адгезии, образованию из гепатоцитов сфероидных структур, повышающих клеточную выживаемость [47]. Однако полимеры естественного происхождения от коллагенового геля до комплексов с тканевыми экстрактами на основе матригеля лучше стимулируют адгезию, выживаемость и функционирование гепатоцитов, чем синтетические полимеры [17]. Наиболее эффективными оказались биоматриксные носители, содержащие тканеспецифичные экстракты, факторы роста и компоненты МКМ. Стволовые клетки (СК) печени человека [44], клетки-предшественники гепатоцитов мыши [35], фибробласты, изолированные из измененной циррозом печени человека [37], высеваемые на биоматрикс, дифференцируются в гепатоциты взрослой печени. Фенотип и гепатоспецифичные функции, такие как секреция мочевины, синтез альбумина и активность ферментов системы цитохрома CYP450, поддерживаются в подобном биоинженерном конструкте, как правило, лишь в течение нескольких недель [22, 35, 44].

Е. Torok и др. [38] описали технологию, включающую в себя биodeградируемый полимерный носитель, гепатоциты человека и перфузионную систему. В процессе культивирования на носителе клетки формируют сфероид и выполняют синтетическую и детоксикационную функции в течение нескольких дней. Имплантация созданной *de novo* инженерной печеночной ткани, содержащей МКМ и гепатоциты трансгенных мышей, экспрессирующих ген hA1AT (human α -1 antitrypsin), под почечную капсулу сингенных мышей после резекции двух третей печени, показала ее пожизненную стабильность и функциональную активность [32, 41]. В течение всего эксперимента в сыворотке крови реципиентов регистрировали hA1AT, а исследование функции трансплантата (синтез гликогена, метаболизм лекарственных препаратов) и регенеративного потенциала, проведенное через 450 дней, показало полную его компетентность.

Известно, что клетки могут выжить на расстоянии не более 1–3 мм от источника нутриентов и кислорода, и данное исследование в этой связи не рассматривается как преклиническое испытание [30], а лишь устанавливает факт возможности создания

функциональной ткани печени. Основной задачей на пути успешной биоинженерии органа является поиск путей обеспечения метаболических потребностей конструкта. Достижения в области генетических манипуляций сделали возможным использование органогенного потенциала трансгенных животных для создания целой, а не части, инженерной печени, с низким риском отторжения [10, 20]. Например, гепатоциты человека, пересаженные в печень трансгенной свиньи (с фатальным для гепатоцитов дефектом), способны обеспечить формирование химерной печени (ХП) – печени с паренхимой человека (вследствие замещения погибших клеток) и стромой свиньи [20]. ХП была создана и у мышей линии uPA/SCID (urokinase type plasminogen activator/severe combined immunodeficiency), чьи гепатоциты, поврежденные вследствие накопления плазминогена урокиназного типа, обеспечили появление ниш, необходимых для репопуляции трансплантированными гепатоцитами крысы. Через 3 месяца печень имела массу $1,69 \pm 0,04$ г с более чем 90% замещением мышинных гепатоцитов крысинными. Трансплантат, пересаженный крысе вместо удаленной почки и выведенным в просвет двенадцатиперстной кишки желчным протоком, показал полную компетентность – продукцию крысиного альбумина и достаточный регенераторный потенциал в ответ на резекцию собственной печени [16].

Таким образом, ХП, полученная в организме свиньи, может в перспективе составить альтернативу донорской, если будет способна долговременно поддерживать свою структуру и функцию после трансплантации и не нести риска ксенозооноза [27]. Однако в целом описанные подходы, опробованные в небольших, в основном неконтролируемых исследованиях, не дали возможность разработать протоколы, достаточные для клинического использования [17, 40].

Более реалистичным выглядит проект создания биоинженерной печени, заключающийся в использовании в качестве носителя клеток бесклеточного каркаса децеллюризованной печени. Ряд авторов [1, 3, 7] предложил протоколы децеллюризации, отличающиеся путями доставки перфузионного раствора в орган и используемых в его составе детергентов. Степень удаления клеток, белков МКМ и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) детергентами варьирует в зависимости от типа детергента, времени экспозиции и возраста донора [7, 15].

В.Е. Uygun и соавт. [39] перфузировали печень 0,1% раствором анионного детергента додецилсульфата натрия (SDS), а Т. Shupe и соавт. [33] использовали неионный детергент Triton X-100, SDS и сыворотку. В обоих случаях печень становилась прозрачной (рис. 1) с видимыми при малом увеличении структурами триад печени и окружающих их печеночных долек. Анализ изображений показал, что число триад в бесклеточной печени подобно их количеству в интактной печени. Показано сохранение МКМ, матрикса крупных сосудов (коллаген I типа, ламинин), синусоидов (коллаген IV типа, фибронектин), декорина, гликозаминогликанов

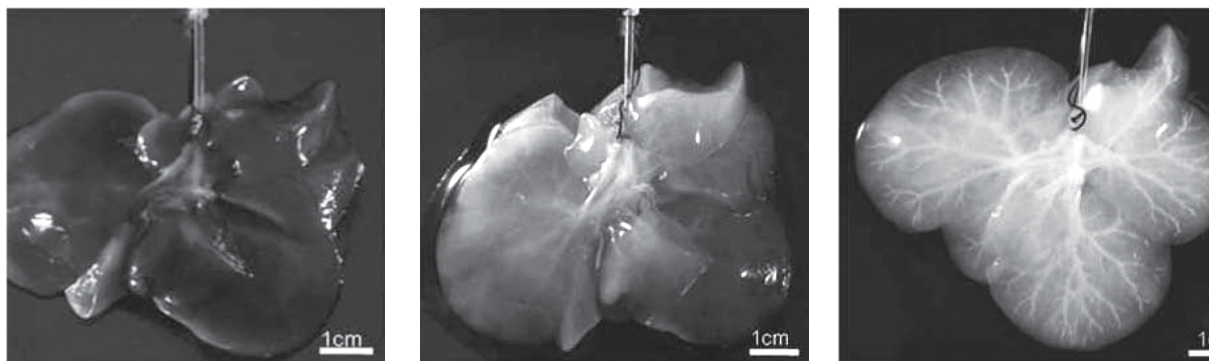


Рис. 1. Децеллюризация печени крысы [3]

[3] и практически полное отсутствие ДНК как показателя эффективности децеллюризации [28] и иммуногенности [7], что весьма важно для формирования и функционирования будущей ткани [28, 45].

Таким образом, преимуществом этой методики является сохранение сигнальных молекул МКМ, необходимых для сайт-специфичного приживления и/или дифференцировки трансплантированных или эндогенных гепатоспецифических клеток [23], и сосудистой сети, позволяющей с эффективностью более 90% выполнить рецеллюляризацию стромы посредством перфузии органоспецифической клеточной суспензией. Образование трубчатых структур из клеток с фенотипом $CK19^+/CK18^-/ALB^-$, а также кластеров клеток $ALB^+/CK18^+$ после рецеллюризации фетальными гепатобластами подтверждает, что этот бионоситель способен поддерживать дифференцировку трансплантированных клеток в клетки желчевыводящих путей и гепатоциты, соответственно [3].

В клеточном гомеостазе печени принимают участие зрелые гепатоциты, способные пролиферировать в ответ на повреждение [24], региональные СК (терминальные желчных протоков), пролиферирующие при блокаде пролиферации первичных гепатоцитов, и кроветворные СК, мигрирующие в печень для восстановления пула региональных СК. Таким образом, гепатоциты являются важной, но не могут считаться единственной популяцией клеток для создания полноценной биоинженерной печени.

Гепатоциты, трансплантированные в среднюю долю децеллюризованной печени крысы в конечной концентрации 200 млн (4-кратно по 50×10^6 клеток с интервалом в 10 мин), достаточно равномерно распределялись и сохраняли жизнеспособность. Количественная оценка TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)-позитивных клеток показала, что после первых 2 суток культивирования апоптозными были менее 20% клеток. Секреция лактатдегидрогеназы во время перфузии не отличалась от нормы, свидетельствуя о приемлемом уровне клеточной смертности. Гистологический анализ и сканирующая электронная микроскопия показали, что гепатоциты приживляются вокруг крупных сосудов, заселяя окружающую строму

и достигая синусоидальных пространств. Функциональные характеристики приживленных гепатоцитов, оцененные по уровням экспрессии фермента UGT1A (UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1) и каталитической субъединицы G6PC (glucose-6-phosphatase), оказались близки к таковым в нормальной печени [39]. Однако гепатоциты (как непрямой клеточный компартмент для рецеллюризации), хотя и имеют отличный репликативный потенциал и способность к репопуляции печени, в культуре (лишенные МКМ и опосредованных им межклеточных взаимодействий) в течение недели теряют фенотипические признаки, что особо касается клеток взрослых доноров [8, 29], и вскоре погибают [11, 47].

Преимущество рецеллюризации фетальными клетками печени состоит в том, что они содержат большое количество органоспецифических клеток-предшественников, способных дифференцироваться в гепатоциты, холангиоциты и эндотелиальные клетки (ЭК), имеют большую способность к пролиферации, чем гепатоциты взрослых, и менее туморогенны, чем immortalized клетки [26]. С.А. Lazaro и соавт. [21] показали, что фетальные гепатоциты поддерживаются в первичной культуре в течение нескольких месяцев, не теряя функции и основные дифференцировочные признаки. Однако ограниченная доступность фетальных гепатоцитов вместе с отсутствием убедительных данных относительно их трансдифференцировочного потенциала в различные типы клеток печени лимитируют их клиническое применение.

Стволовые клетки, в том числе СК печени, считаются альтернативным возобновляемым источником гепатоцитов. Растет количество данных, свидетельствующих о том, что дифференцировка СК в гепатоциты достигается в соответствующей микросреде при стимуляции печеночными факторами роста [4, 25, 36, 46].

Потомками региональной СК печени являются овальные клетки. Бипотентность овальных клеток – способность пролиферировать и дифференцироваться в функциональные клетки гепатоцитарной или билиарной линии [18] в ответ на повреждение печени [34] и улучшать ее функцию и выживаемость экспериментальных животных [43] – делает их неза-

менимыми для рецеллюризации. О. Barakat и коллеги [4] выбрали в качестве со-культурального компонента звездчатые клетки фетальной печени (ФЗК) человека из-за их роли в гомеостазе и регенерации печени, реализуемой посредством межклеточных контактов или секреции растворимых ростовых факторов. Децеллюрированный матрикс печени свиньи засеивали ФЗК за 2 дня до инфузии фетальных гепатоцитов в соотношении 1:3, поскольку *in vivo* звездчатые клетки окружают 2/3 гепатоцитов. Авторы получили эффективность приживления > 90%, используя прерывистую инфузию через печеночные и воротную вены. Матрикс печени, засеянный гепатоцитами и ФЗК, более интенсивно окрашивался на фибронектин по сравнению с ММК, рецеллюрированным только гепатоцитами, указывая, что ФЗК активно продуцируют и секретируют этот белок, способный поддерживать приживание фетальных гепатоцитов. Фетальные гепатоциты, культивируемые две недели совместно с ФЗК, сохраняют свою пролиферативную способность в непрерывно перфузируемом рецеллюрированном свином матриксе. Однако нормальный гепатоцитарный паттерн метаболизма и генной транскрипции может потребовать более длительного периода культивирования для полного созревания. Количество инфузировавшихся гепатоцитов составило примерно 2,5% от числа гепатоцитов в 200 г ткани печени (139 ± 25 млн клеток на 1 г или 4×10^9 клеток на кг ткани печени) человека. Печень такого размера будет достаточной, чтобы заменить печень только у педиатрического пациента весом 20–30 кг [4].

Малые гепатоциты (МГ) – коммитированные клетки-предшественники, отличные и независимые от овальных клеток [6], способны дифференцироваться в зрелые гепатоциты, обеспечить полную репаративную регенерацию печени после частичной резекции у крыс. МГ поддерживают пролиферативную способность и функцию дифференцированных клеток печени даже после длительной криоконсервации и могут быть альтернативным источником клеток для рецеллюризации [47].

Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ), особенно аутологичные, считаются наиболее подходящими для клеточной терапии благодаря их доступности, быстрой пролиферации, мультипотентной дифференцировке, успешной интеграции в ткани хозяина и иммунологической толерантности [31]. Незрелые предшественники гепатоцитов и холангиоциты могут быть получены из МСК КМ, а бесклеточный матрикс печени как трехмерный биоскаркас способствует их линейнорестриктивному созреванию [21]. Эти особенности МСК КМ делают их желательными для тканевой инженерии печени [13, 14]. Тем не менее, эффективность дифференцировки (соотношение альбумин-позитивных клеток к исходному числу МСК) клеток на носителе относительно низка (~5%) [36]. Для достижения максимальной печеночной индукции R. Ji и соавт. [19] ввели в протокол клеточной дифференцировки печеночные ростовые факторы.

Анализ генной экспрессии показал, что комбинация цитокинов оказывает синергический эффект на дифференцировку МСК в функциональные гепатоциты, при этом большее число клеток экспрессирует более высокие уровни гепатоспецифичных рибонуклеиновых кислот и белков в течение более длительного периода. Поскольку это исследование является первой попыткой получения гепатоцитоподобных клеток из МСК, ряд вопросов остается без ответа. В частности, по степени созревания эти гепатоцитоподобные клетки обладают лишь частью маркеров и функций гепатоцитов и необходимы исследования для оптимизации протокола дифференцировки МСК с целью получения зрелых, полностью функциональных клеток печени. Кроме того, система динамического культивирования повышает риск клеточной контаминации. Индикатором успешной репопуляции децеллюрированного матрикса печени (ДМП) клетками является видимое его изменение от прозрачного белого до непрозрачного желтого через 3–4 дня после посева (рис. 2) [3]. Специфическое окрашивание выявляет плотную клеточность, большое количество пролиферирующих (Ki67-позитивных) клеток по всему засеянному ДМП. Количественный анализ изображений показывает 3-кратное преобладание пролиферирующих клеток над апоптозными. Иммунофлуоресцентное окрашивание демонстрирует экспрессию клетками маркеров гепатоцитарной линии, таких как α -фетопротейин, цитохромы CYP2A и CYP3A, цитокератин-18, альбумин, и интенсивную экспрессию цитокератина-19 (маркера эпителиальных клеток) в структурах желчных протоков. Ко-экспрессия этих маркеров в одних и тех же сайтах была очень слабой, то есть ДМП содержит дискретные ниши для клеток желчных протоков и гепатоцитов. Рецеллюрированный ДМП поддерживает специфические функции (секреция альбумина, синтез лактатдегидрогеназы, мочевины, метаболизм жирных кислот и экспрессию CYP450) на уровне, сопоставимом с таковым у нормальной печени [9, 33, 39]. Однако она остается лишь объектом для исследования при отсутствии полноценной сосудистой сети.

Из клинического опыта трансплантации печени известно, что тромбоз является фактором риска отторжения трансплантата [5]. С целью создания функциональной сосудистой сети ДМП перфузируют

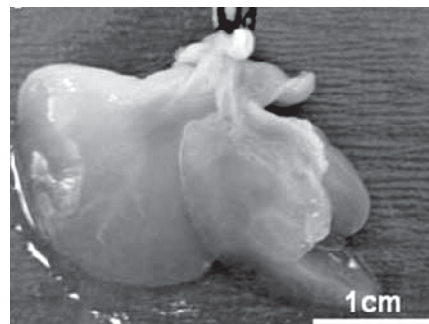


Рис. 2. Рецеллюрированный матрикс правой доли печени крысы [3]

сuspензией ЭК. При этом ЭК способны выстилать всю поверхность просвета сосудов от крупных до капилляров, с образованием межклеточных контактов между двумя соседними ЭК через 3 дня культивирования ДМП [3].

Заключение. Биоинженерная печень, созданная посредством рецеллюризации ее бесклеточного матрикса органоспецифическими клетками, рассматривается как реальная альтернатива аллогенного органа. На этом пути достигнуты немалые успехи и становится очевидным, что для получения биоинженерной печени, достаточной для трансплантации, должна быть решена фундаментальная проблема – воссоздание стромально-эпителиальной архитектоники, аутентичной таковой нативного органа. Решение этой проблемы связано с такими задачами, как получение бесклеточного матрикса печени, колонизация его органоспецифическими клетками, достаточная для ее пожизненного функционирования, правильный выбор биореактора для оптимального (по скорости, времени) перфузионного культивирования.

Литература

- Alhamedani, M.S. Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays / M.S. Alhamedani [et al.] // *J. proteome res.* – 2010. – Vol. 9, № 2. – P. 963–971.
- Bao, J. Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats / J. Bao [et al.] // *Cell transplant.* – 2011. – Vol. 20, № 5. – P. 753–766.
- Baptista, P.M. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid / P.M. Baptista [et al.] // *Hepatology.* – 2011. – Vol. 53, № 2. – P. 604–617.
- Barakat, O. Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ / O. Barakat [et al.] // *J. surg. res.* – 2012. – Vol. 173, № 1. – P. 11–25.
- Bekker, J. Early hepatic artery thrombosis after liver transplantation: a systematic review of the incidence, outcome and risk factors / J. Bekker [et al.] // *Am. j. transplant.* – 2009. – Vol. 9, № 4. – P. 746–757.
- Best, D.H. Treatment with 2-AAF blocks the small hepatocyte-like progenitor cell response in retrorsine exposed rats / D.H. Best, W.B. Coleman // *J. hepatol.* – 2007. – Vol. 46, № 6. – P. 1055–1063.
- Crapo, P.M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo [et al.] // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32, № 12. – P. 3233–3243.
- De Bartolo, L. Human hepatocyte functions in a crossed hollow fiber membrane bioreactor / L. De Bartolo [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – Vol. 30, № 13. – P. 2531–2543.
- Detzel, C.J. Engineered three-dimensional liver mimics recapitulate critical rat-specific bile acid pathways / C.J. Detzel [et al.] // *Tissue eng. Part A.* – 2011. – Vol. 17, №5–6. – P. 677–689.
- Ekser, B. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model / B. Ekser [et al.] // *Transpl. immunol.* – 2009. – Vol. 21, № 2. – P. 87–92.
- Elaut, G. Molecular mechanism underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures / G. Elaut [et al.] // *Curr. drug metabol.* – 2006. – Vol. 7, № 6. – P. 629.
- Fukumitsu, K. Bioengineering in organ transplantation: targeting the liver / K. Fukumitsu [et al.] // *Transplant. proc.* – 2011. – Vol. 43, № 6. – P. 2137–2138.
- Gu, J. Establishment of a three-dimensional co-culture system by porcine hepatocytes and bone marrow mesenchymal stem cells in vitro / J. Gu [et al.] // *Hepatol. res.* – 2009a. – Vol. 39, № 4. – P. 398–407.
- Gu, J. Heterotypic interactions in the preservation of morphology and functionality of porcine hepatocytes by bone marrow mesenchymal stem cells in vitro / J. Gu [et al.] // *J. cell physiol.* – 2009b. – Vol. 219, № 1. – P. 100–108.
- Gui, L. Novel utilization of serum in tissue decellularization / L. Gui [et al.] // *Tissue eng. Part C. Methods.* – 2010. – Vol. 16, № 2. – P. 173–184.
- Hata, T. Transplantation of engineered chimeric liver with autologous hepatocytes and xenobiotic scaffold / T. Hata [et al.] // *Ann. surg.* – 2012. – Vol. 257, № 3. – P. 1–6.
- Hodgson, H. Liver cell implants: a long road / H. Hodgson, C. Selden // *Liver transpl.* – 2011. – Vol. 17, № 2. – P. 99–101.
- Ishikawa, M. Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor / M. Ishikawa [et al.] // *J. biosci. bioeng.* – 2011. – Vol. 111, № 6. – P. 711–718.
- Ji, R. The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice / R. Ji [et al.] // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33, № 5. – P. 8995–9008.
- Klymiuk, N. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation / N. Klymiuk [et al.] // *Mol. reprod. dev.* – 2010. – Vol. 77, № 3. – P. 209–221.
- Lazaro, C.A. Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes / C.A. Lazaro [et al.] // *Hepatology.* – 2003. – Vol. 38, № 5. – P. 1095–1096.
- Li, J. 3D PLGA scaffolds improve differentiation and function of bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes / J. Li. [et al.] // *Stem cells dev.* – 2010. – Vol. 19, № 9. – P. 1427–1436.
- McClelland, R. Gradients in the liver's extracellular matrix chemistry from periportal to pericentral zones: influence on human hepatic progenitors / R. McClelland [et al.] // *Tissue eng. Part A.* – 2008. – Vol. 14, № 1. – P. 59–70.
- Michalopoulos, G.K. Liver regeneration / G.K. Michalopoulos [et al.] // *J. cell physiol.* – 2007. – Vol. 213, № 2. – P. 286–300.
- Miyoshi, H. Three-dimensional perfusion cultures of mouse and pig fetal liver cells in a packed-bed reactor: effect of medium flow rate on cell numbers and hepatic functions / H. Miyoshi [et al.] // *J. biotechnol.* – 2010. – Vol. 148, № 4. – P. 226–232.
- Monga, S. Human fetal hepatocyte behavior in dynamic 3D perfusion culture bioreactors / S. Monga, J.C. Gerlach // *J. organ dysfunction.* – 2007. – Vol. 3, № 3. – P. 183–192.
- Mueller, N.J. Microbial safety in xenotransplantation / N.J. Mueller [et al.] // *Curr. opin. organ. transplant.* – 2011. – Vol. 16, № 2. – P. 201–206.
- Nagata, S. Autoimmunity and the clearance of dead cells / S. Nagata [et al.] // *Cell.* – 2010. – Vol. 140, № 5. – P. 619–630.
- Nieto, N. Extracellular matrix bioengineering and systems biology approaches in liver disease / N. Nieto, M.P. Lutolf // *Syst. synth. biol.* – 2011. – Vol. 5, № 1–2. – P. 11–20.
- Ohashi, K. Functional life-long maintenance of engineered liver tissue in mice following transplantation under the kidney capsule / K. Ohashi [et al.] // *J. tissue eng. regen. med.* – 2010. – Vol. 4, № 2. – P. 141–148.
- Parekkadan, B. Mesenchymal stem cells as therapeutics / B. Parekkadan, J.M. Milwid // *Annu. rev. biomed. eng.* – 2010. – Vol. 12, № 6. – P. 87–117.
- Sellaro, T.L. Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels / T.L. Sellaro [et al.] // *Tissue eng. Part A.* – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 1075–1082.
- Shupe, T. Method for the decellularization of intact rat liver / T. Shupe [et al.] // *Organogenesis.* – 2010. – Vol. 6, № 2. – P. 134–136.
- Singh, A.K. Omentum facilitates liver regeneration / A.K. Singh [et al.] // *World j. gastroenterol.* – 2009. – Vol. 15, № 9. – P. 1057–1064.

35. Song, L. Proliferation and differentiation potential of mouse adult hepatic progenitor cells cultured in vitro / L. Song [et al.] // Acta. biochim. biophys. sin. – 2010. – Vol. 42, № 2. – P. 122–128.
36. Subramanian, K. Enhanced differentiation of adult bone marrow-derived stem cells to liver lineage in aggregate culture / K. Subramanian [et al.] // Tissue eng. Part A. – 2011. – Vol. 17, № 17–18. – P. 2331–2341.
37. Sun, Y.L. Hepatocyte differentiation of human fibroblasts from cirrhotic liver in vitro and in vivo / Y.L. Sun [et al.] // Hepatobiliary pancreat. dis. int. – 2011. – Vol. 10, № 1. – P. 55–63.
38. Torok, E. Primary human hepatocytes on biodegradable PLLA matrices: a promising model for improving transplantation efficiency using tissue engineering / E. Torok [et al.] // Liver transpl. – 2010. – Vol. 17, № 2. – P. 104–114.
39. Uygun, B.E. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix / B.E. Uygun [et al.] // Nat. med. – 2010. – Vol. 16, № 7. – P. 814–820.
40. Vasanthan, K.S. Role of biomaterials, therapeutic molecules and cells for hepatic tissue engineering / K.S. Vasanthan [et al.] // Biotechnol. adv. – 2012. – Vol. 30, № 3. – P. 742–752.
41. Vorotnikova, E. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo / E. Vorotnikova [et al.] // Matrix biol. – 2010. – Vol. 29, № 8. – P. 690–700.
42. Vosough, M. Cell-based therapeutics for liver disorders / M. Vosough [et al.] // Br. med. bull. – 2011. – Vol. 100. – P. 157–172.
43. Wang, P. Expression of extracellular matrix genes in cultured hepatic oval cells: an origin of hepatic stellate cells through transforming growth factor beta? / P. Wang [et al.] // Liver int. – 2009. – Vol. 29, № 4. – P. 575–584.
44. Wang, Y. Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds / Y. Wang [et al.] // Hepatology. – 2011. – Vol. 53, № 1. – P. 293–305.
45. Zhang, Q. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 464, № 7285. – P. 104–107.
46. Zhao, W. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis / W. Zhao [et al.] // World j. gastroenterol. – 2012. – Vol. 18, № 10. – P. 1048–1058.
47. Zheng, M.H. Liver tissue engineering: promises and prospects of new technology / M.H. Zheng [et al.] // Cytotherapy. – 2010. – Vol. 12, № 3. – P. 349–360.

V.N. Alexandrov, T.A. Kamilova, D.V. Firsanov, L.I. Kalyuzhnaya, A.V. Kriventsov, A.A. Kondratenko

Liver tissue engineering

Abstract. Nowadays donor liver transplantation is the only treatment for end-stage cirrhosis. Surgical complications, immune conflicts, lack of donor's livers and high cost of the procedure require searching of alternative methods of treatment. Transplantation of bioengineered liver as a product of tissue engineering is one of them. The prototype bioengineered liver consisted of components of extracellular matrix and was inhabited by living mouse hepatocytes. When it was transplanted under the recipient renal capsule, it showed functional competence of the liver structures. To create transplantable liver required to resolve two problems. The first is to create a cell scaffold, or matrix, completely identical of stroma liver. The second problem is to find the cells capable to performing the metabolic functions and provide long-term functioning of the organ. The first problem can be resolved using the method of perfusion of native liver by detergents (in vivo or ex vivo) to remove the epithelium. The method saves the stroma with all the features of the microcirculatory system body, as well as factors of growth and differentiation, expressed on the matrix. Decellularised vascular network is able to maintain the same pressure as it is in the vessels of the native liver. It provides as a result flow of blood into the inferior Vena cava. Cell free vascular network is ready for the further occupancy by the cells. Searchig cell type is the second problem and it is not restricted to only hepatocytes. Cultivating of recellularised matrix in conditions of normal pressure of a nutrient medium in the portal vein promotes optimal diffusion of oxygen and nutrients. Cultivating due to signal molecules of matrix creates the necessary and sufficient conditions for the proliferation and differentiation of implanted cells. As a result, structural-functional hepatic units are able to function. The obtained results are experimental and demonstrate significant progress in the development of bioengineering of the whole organs and unique opportunity to create functioning, immune tolerant and biologically safe organs, parts of organs and tissues as alternative allogene transplants.

Key words: liver transplantation, liver tissue engineering, extracellular matrix, decellularized vascular network, 3-dimensions biomatrix scaffold, decellularization, recellularization, endothelial and hepatic markers, bioengineered liver.

Контактный телефон 8-921-637-46-51; e-mail: kamilovaspb@mail.ru