

А. Д. Дубко¹, М. Ю. Юркевич¹, М. В. Лобай¹, А. В. Свирская¹, Н. Г. Юханов²,
Т. В. Савицкая², Д. Б. Нижегородова¹, М. М. Зафранская¹

¹Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минск, Республика Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ ЦЕЛЬНООРГАННОГО СКАФФОЛДА ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

(Представлено членом-корреспондентом А. В. Воробьем)

Аннотация. Получение трехмерного скаффолда открывает широкие перспективы для инженерии биоискусственных органов. В работе представлен метод перфузионной децеллюляризации печени крысы с анализом основных проблем и вариантов их решения. Перфузия донорской печени 0,1 %-ным раствором додецилсульфата натрия (SDS) позволяет получить качественный бесклеточный матрикс, характеризующийся сохранностью печеночной архитектоники, проходимостью сосудистого русла, остаточной ДНК менее 1 %, отсутствием признаков деструкции коллагеновых волокон и тканевого отека. Полученный предложенным методом скаффолд может использоваться для рецеллюляризации аллогенными клеточными культурами при создании объемных тканеинженерных конструкций.

Ключевые слова: децеллюляризация, скаффолд печени, остаточная ДНК, цитотоксичность, перфузия

Для цитирования. Получение цельноорганного скаффолда печени крысы / А. Д. Дубко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 4. – С. 448–455. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-4-448-455>

Andrei D. Dubko¹, Mariya Yu. Yurkevich¹, Marina V. Labai¹, Alesia V. Svirskaya¹, Nikita G. Yukhanov²,
Tatiana V. Savitskaya², Daria B. Nizheharodava¹, Marina M. Zafranskaya¹

¹International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Republic of Belarus

ENGINEERING A WHOLE RAT LIVER SCAFFOLD

(Communicated by Corresponding Member Aleksandr V. Vorobei)

Abstract. Engineering a three-dimensional scaffold opens up great prospects for creation of manufacturing biological artificial organs. The article presents a method of perfusion decellularization of a rat liver, with the main problems and options for their solution being analyzed. Perfusion of a donor liver with 0.1 % a sodium dodecyl sulfate (SDS) solution allows obtaining a high-quality cell-free matrix characterized by preserved hepatic architectonics, patent vascular bed, residual DNA of less than 1 %, no signs of collagen fibers destruction and tissue edema. The obtained scaffold can be used for recellularization by allogeneic cell cultures when creating volumetric tissue-engineered designs.

Keywords: decellularization, liver scaffold, residual DNA, cytotoxicity, perfusion

For citation. Dubko A. D., Yurkevich M. Yu., Labai M. V., Svirskaya A. V., Yukhanov N. G., Savitskaya T. V., Nizheharodava D. B., Zafranskaya M. M. Engineering a whole rat liver scaffold. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 4, pp. 448–455 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-4-448-455>

Введение. Аллогенная трансплантация печени является общепринятым и единственным эффективным методом лечения пациентов с терминальной стадией печеночной недостаточности [1; 2]. Интерес к поиску новых подходов лечения патологии печени в терминальной стадии продиктован неуклонным ростом частоты заболеваемости, эффективностью трансплантации в 60–65 % случаев, необходимостью исключения пожизненной иммуносупрессирующей терапии, возрастающего дефицита донорского материала [1–5].

Активное развитие регенеративной медицины и ее отраслей, в первую очередь, тканевой инженерии, позволяет надеяться на получение в ближайшем будущем практически значимых результатов по разработке альтернативных методов терапии на основе тканеинженерных конструкций (ТИК) и биоискусственных органов [6; 7].

Для возможности сборки ТИК и биоискусственных органов необходим каркас для внесения клеточного материала, обеспечивающий возможность формирования трехмерной структуры органа, максимально идентичной естественному [8; 9]. Несмотря на то что в арсенале тканевой инженерии имеется широкий сектор биосовместимых материалов и технологий, проблема получения внеклеточных каркасов не является до конца решенной [10]. На данном этапе развития науки и технологий наибольший интерес представляют естественные скаффолды, полученные путем децеллюляризации.

Децеллюляризация целого органа позволяет получить соединительнотканый каркас с сохраненной архитектоникой печеночного матрикса и проходимостью сосудистого русла [11; 12]. На сегодняшний день разработано большое количество протоколов децеллюляризации нативной печени физическими и химическими методами [13; 14]. Наиболее часто применяется подход, основанный на перфузии через сосудистое русло органа растворов SDS, Triton-X100 или их комбинаций в различных концентрациях [8; 11–14]. Эффективность процесса децеллюляризации печени зависит от целого ряда факторов, основными из которых являются: техника забора органа, временная точка и концентрация вводимого антикоагулянта, полное или частичное удаление крови из сосудистого русла, применяемый детергент и его концентрация, скорость и направление подачи раствора детергента, среда в которой расположен орган, сопротивление сосудистого русла. Все вышеперечисленные факторы необходимо учитывать при разработке системы подачи раствора детергента, поскольку они способны приводить к возникновению осложнений, и, как следствие, вызывать повреждения внеклеточного матрикса, в последующем затрудняющие процесс рецеллюляризации [15].

Целью данной работы являлась разработка методологии и оптимального протокола получения цельноорганный децеллюляризованный скаффолд печени перфузионным способом.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на половозрелых беспородных лабораторных крысах обоих полов массой 220–280 г ($n = 24$) с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в научных целях (Страсбург, 1991 г.).

Для получения печени выполняли продольную лапаротомию, рассекали связочный аппарат, перевязывали и рассекали *vv. phrenicae inferiores, v. renale dextra, v. pancreaticoduodenales, v. gastrolialialis*. Катетеризировали (катетер G18) *v. portae (VP)* и *v. cava inferior (VCI)*. Для удаления крови из сосудистого русла органа проводили перфузию 250–500 мл физиологического раствора с добавлением 500 ЕД гепарината натрия (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь). По окончании обескровливания перевязывали надпеченочную часть *VCI*, рассекали *VP* и *VCI*, удаляли остатки связочного аппарата.

Далее печень взвешивали, рассчитывали объемные, весовые параметры и подключали к системам подачи раствора через катетеризированные сосуды. Перфузию растворов проводили при начальной скорости подачи 25 мл/мин через *VP*. В качестве децеллюляризирующего агента применяли 0,1 %-ный раствор додецилсульфата натрия (SDS, Sigma, Германия). Для удаления детергента скаффолд промывали 2000 мл дистиллированной воды (подготовленная по требованиям ГОСТ 67092–72).

По окончании децеллюляризации скаффолд печени переносили в емкость, заполненную физиологическим раствором (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), и помещали в среду с 5 %-ным содержанием CO_2 при 37 °C на 24 ч для экстракции SDS. Процентное содержание остаточного SDS определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом по изменению окраски в реакции с метиленовым голубым при длине волны 620 нм.

Выделение остаточной ДНК проводили фенол-хлороформовым методом, для чего образцы децеллюляризованного скаффолда лизировали в 1 мл буфера (100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) в течение 16–18 ч при 37 °C в условиях постоянного помешивания. Для экстракции ДНК из образцов добавляли 1 мл фенол-хлороформовой смеси (фенол-хлороформ-изоамиловый спирт в соотношениях 25 : 24 : 1, pH = 7,5–8,5) с последующим интенсивным перемешиванием и центрифугированием (1 мин, 3000 об/мин). Высаливание белка проводили в 7 М растворе ацетата аммония, преципитацию и отмывку ДНК – в изопропанол и 70 %-ном раство-

ре этилового спирта соответственно. Измерение концентрации остаточной ДНК осуществляли на спектрофотометре NanoDrop 2000C. Остаточную ДНК в образцах скаффолда рассчитывали как отношение массы, выделенной ДНК из 100 мг интактной печени, к массе ДНК, выделенной из 100 мг образцов скаффолда, умноженное на поправочный коэффициент изменения массы в процессе децеллюляризации.

Гистологическое исследование парафинизированных срезов скаффолда толщиной 3 мкм, окрашенных гематоксилин эозином, железным гематоксилином Вейгерта и красителем Ван-Гизона, проводили на микроскопе Olympus BH-2 (Япония) с цифровой видеокамерой TourCam (разрешающая способность 5,1 Мп) при помощи программы для анализа и обработки изображений TourView версии 3.7.

Для оценки цитотоксичности срезы децеллюляризованного скаффолда размером 10×5 мм помещали в лунки 24-луночного планшета и вносили суспензию спленоцитов (5×10^5 клеток/лунку), полученных путем центрифугирования гомогената селезенки на градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,083$ г/см³, Sigma, Германия). Культивирование осуществлялось 13 дней в условиях 37 °С и 5 %-ной CO₂ в питательной среде DMEM «Gibco», США, содержащей 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия), 2 mM L-глутамин (Lonza, США) и 1 % смеси антибиотиков – антимикотика (Lonza, США).

Данные анализировались с использованием стандартного пакета прикладных программ Statistica 10.0 и представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей. Для оценки различий между двумя группами использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни с уровнем значимости (*p*) 0,05.

Результаты и их обсуждение. В рамках данного исследования проведено 24 децеллюляризации печени с различной эффективностью.

На этапе гепатэктомии для последующей эффективной децеллюляризации критическими моментами являлись адекватная наркотизация и медикаментозная поддержка, техника и скорость проведения хирургических манипуляций, катетеризация и легирование сосудов, полнота обескровливания печени, скорость подачи раствора при обескровливании. Так, неправильный расчет дозы наркоза и нарушение техники введения приводили к ранней гибели животного и активации свертывающей системы, что проявлялось в виде снижения эффективности удаления крови из сосудистого русла органа вследствие тромбоза, нарушения равномерности децеллюляризации, размытия и разрывов матрикса (рис. 1).

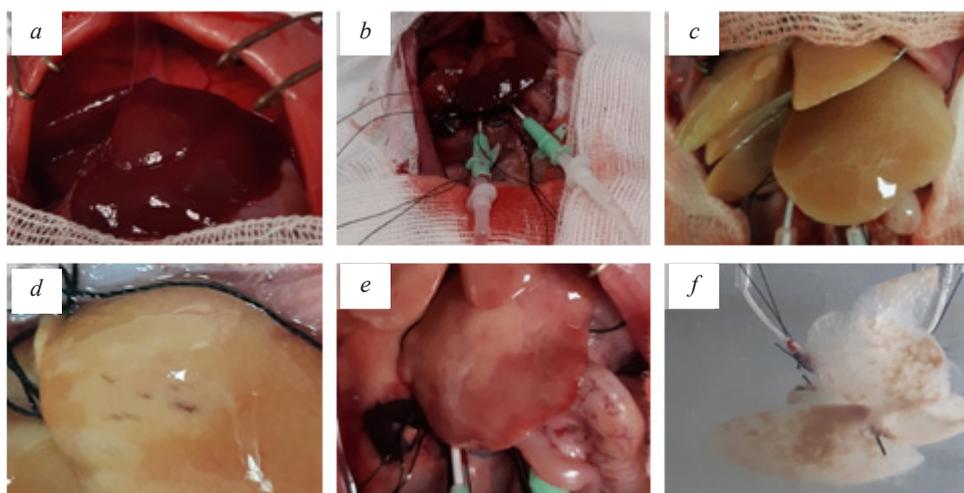


Рис. 1. Критические моменты и основные проблемы гепатэктомии: *a* – интактная печень; *b* – печень, подключенная к перфузионной системе для удаления крови; *c* – обескровленная печень; *d* – разрывы тканей печени вследствие избыточного давления в сосудистой системе; *e* – неравномерно обескровленная печень; *f* – неравномерная децеллюляризация

Fig. 1. Critical moments and main problems of hepatectomy: *a* – intact liver; *b* – liver connected to a perfusion system to remove blood; *c* – exsanguinated liver; *d* – ruptures of liver tissue due to excessive pressure in the vascular system; *e* – unevenly exsanguinated liver; *f* – uneven decellularization

Также на этапе гепатэктомии важным является вопрос введения антикоагулянтов, в частности гепарината натрия. Большинство авторов предлагают введение препарата до начала проведения хирургической части [13; 14]. Основными недостатками данной тактики являются обильная кровопотеря, затрудняющая выполнение манипуляций по катетеризации и легированию сосудов, рассечение связочного аппарата. Поэтому вводился раствор гепарина в более высоких дозах (до 1000 МЕ) непосредственно перед процедурой удаления крови из сосудистого русла печени, что позволяло сократить время на проведение гепатэктомии. Полностью обескровленную печень (рис. 1, *c*) удавалось получить после 200–250 мл перфузии физиологического раствора через систему воротной вены на скорости 25 мл/мин.

Для устранения проблемы, возникающей в случае нарушения оттока раствора через систему отведения и увеличения размеров органа, значительно превышающих естественные показатели (вследствие тромбоза), эффективным являлось трехкратное кратковременное изменение скорости подачи раствора в диапазоне от 15 до 30 мл/мин.

В процессе подключения обескровленной печени к системам подачи и отведения децеллюляризирующего раствора основной проблемой являлась воздушная эмболия сосудистого русла, которая приводила к локальному нарушению децеллюляризации, образованию разрывов и полостей размытия матрикса, отслоению капсулы (рис. 1, *d–f*; рис. 2, *b–d, h–i*). Избежать образования

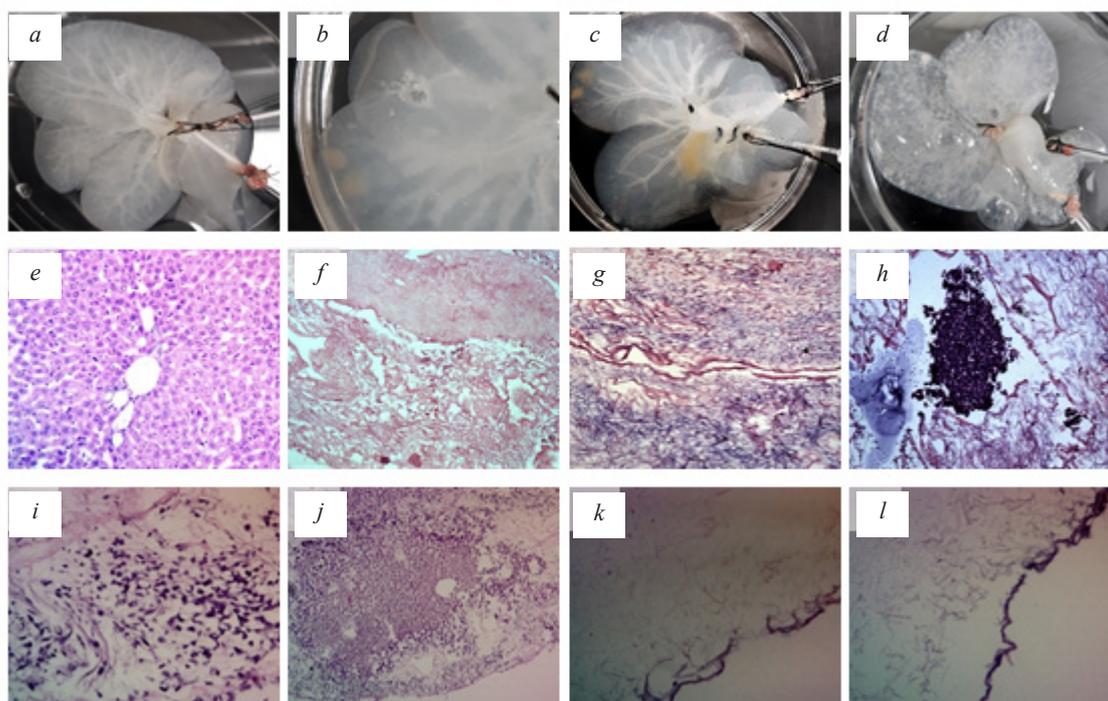


Рис. 2. Проблемы, возникающие на этапах подключения к перистальтической системе и перфузии: *a* – децеллюляризованная печень; *b* – образование полости; *c* – очаги клеток; *d* – диффузно распространенное скопление воздуха; *e* – интактная печень, окраска гематоксилином эозином, ув. $\times 100$; *f* – децеллюляризованная печень, окраска гематоксилином эозином, ув. $\times 100$; *g* – децеллюляризованная печень, окраска по Ван-Гизону, ув. $\times 100$; *h* – скопление клеточного дебриса в полости сосуда, окраска по Ван-Гизону, ув. $\times 400$; *i* – скопление клеточных ядер на периферии органа, окраска гематоксилином эозином, ув. $\times 400$; *j* – очаг не полной децеллюляризации, окраска гематоксилином эозином, ув. $\times 10$; *k* – микроразрыв капсулы Глиссона, окраска гематоксилином эозином, ув. $\times 100$; *l* – отслоение капсулы Глиссона, окраска гематоксилином эозином, ув. $\times 100$

Fig. 2. Problems arising at the stages of connection to the peristaltic system and perfusion: *a* – decellularized liver; *b* – cavity formation; *c* – foci of cells; *d* – diffusely widespread accumulation of air; *e* – intact liver, staining with hematoxylin eosin, magn. $\times 100$; *f* – decellularized liver, staining with hematoxylin eosin, magn. $\times 100$; *g* – decellularized liver, Van Gieson stain, magn. $\times 100$; *h* – accumulation of cellular debris in the vessel cavity, staining according to Van Gieson, magn. $\times 400$; *i* – accumulation of cell nuclei at the periphery of the organ, staining with hematoxylin eosin, magn. $\times 400$; *j* – focus of incomplete decellularization, staining with hematoxylin eosin, magn. $\times 10$; *k* – micro-rupture of the Glisson capsule, staining with hematoxylin eosin, magn. $\times 100$; *l* – detachment of the Glisson capsule, staining with hematoxylin eosin, magn. $\times 100$

воздушных эмболов в сосудистом русле возможно при выполнении всех манипуляций в жидкой среде при включенной системе подачи раствора.

Перфузия децеллюляризирующего агента является главным этапом в процессе получения цельноорганного матрикса печени, ее эффективность напрямую зависит от предыдущих этапов и адекватной стратегии ведения процесса. Для получения воспроизводимых результатов по децеллюляризации необходима стандартизация протокола перфузии с учетом индивидуальной вариабельности объемно-весовых показателей образцов печени, полученных от разных особей.

Стандартизация объема используемого детергента проводилась с учетом весовых показателей обескровленной печени. Объем детергента, проходящий через сосудистое русло, рассчитывали по формуле $V = 180m$ (где V – общий объем 0,1 %-ного раствора SDS, m – масса обескровленной печени). Для увеличения эффективности удаления клеток весь объем детергента разделяли на два равных этапа перфузии, между которыми проводили отмывку печени от клеточного дебриса стерильной дистиллированной водой в объеме 500 мл.

Скорость подачи раствора выбрана 25 мл/мин и, в последующем, ее изменение вследствие сопротивления сосудистой сети печени служило индикатором возникновения осложнений в процессе децеллюляризации.

На этапе перфузии растворов, как и на этапе подключения к перфузионной системе наиболее частым осложнением являлась воздушная эмболия. Кроме того, обнаруживались тромбоз сосудистого русла клеточным дебрисом, разрыв капсулы Глиссона, локальные нарушения перфузии и разрывы матрикса, неполное или неравномерное удаление клеточного материала (рис. 2).

Возникновение осложнений было сопряжено с изменениями динамики процесса децеллюляризации (рис. 3) и варьированием показателей скорости фактического расхода раствора детергента более чем на 20 % по сравнению с расчетными показателями. Избежать возникновения осложнений удавалось при четком соблюдении техники выполнения манипуляций и заполнении камеры для органа водной средой.

После полного удаления клеток (по визуальной оценке) проводили перфузию скаффолда раствором стерильной дистиллированной воды для удаления остатков детергента с последующей постановкой качественной реакции на SDS в отработанном растворе. Отрицательная реакция на детергент в образцах промывочного раствора не означает его полного отсутствия в скаффолде и может создавать проблемы при последующей рецеллюляризации. Поэтому по окончании отмывки скаффолд заполнялся физиологическим раствором и инкубировали в течение 24 ч для экстракции. В полученных образцах, в которых по результатам гистологической оценки выявлялось скопление клеточного дебриса в полостях крупных сосудов, удавалось выявить остаточную концентрацию SDS в 3,0 % (2,8–3,3 %).

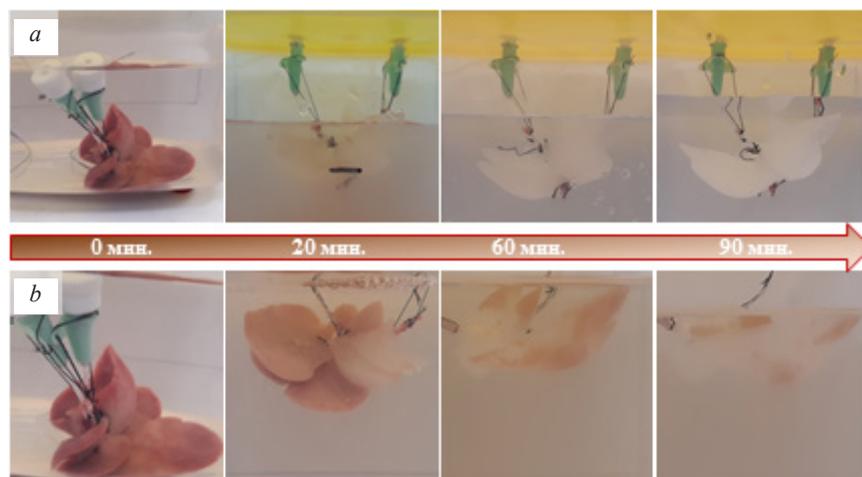


Рис. 3. Изменение ткани печени в процессе децеллюляризации: *a* – без возникновения осложнений, *b* – при множественном тромбозе

Fig. 3. Changes in liver tissue during the process decellularization: *a* – without complications, *b* – with multiple thrombosis

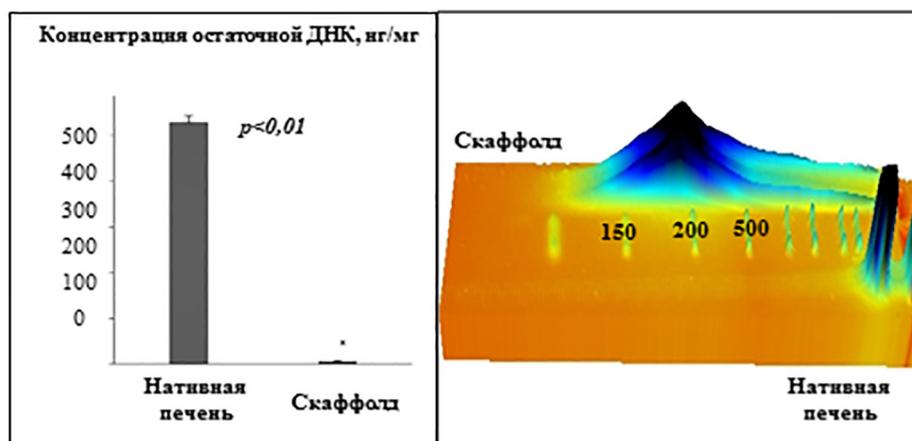


Рис. 4. Анализ остаточной ДНК

Fig. 4. Residual DNA analysis

На основании полученных данных скорректирован протокол, позволивший устранить основные проблемы, возникающие в процессе децеллюляризации. Полученные данным методом 12 образцов скаффолда по результатам визуальной оценки характеризовались прозрачностью и однородностью с визуализирующимися контурами сосудов и сохранной капсулой Глиссона (рис. 2, а).

Гистологическая оценка скаффолда подтвердила отсутствие клеток, сохранность специфической печеночной архитектоники. Взаимная ориентация волокон внеклеточного матрикса в децеллюляризованной ткани не отличалась от нативных органов, обнаруживались лишь единичные разрывы, отсутствовали патологические изменения соединительной ткани, признаки деградации коллагеновых волокон и тканевого отека (рис. 2, f, g).

Концентрация остаточной ДНК в скаффолдах не превышала 1 % от содержания в нативной печени, и в разных долях варьировала незначительно, что подтверждает равномерность децеллюляризации. Анализ длины фрагментов остаточной ДНК свидетельствует о практически полном удалении из печеночных скаффолдов ДНК при использовании перфузионного детергентного метода децеллюляризации. Электрофорез в 2 %-ном агарозном геле позволил установить, что длина основного количества фрагментов не превышала 200 пар нуклеотидов (рис. 4).

Децеллюляризованная ткань не обладала цитотоксичностью в отношении аллогенных спленоцитов. Так, на 4 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 (1,3 (0,5–1,5) % и 8,9 (6,3–11,2) % соответственно, $p > 0,05$).

Заключение. Метод перфузионной децеллюляризации печени 0,1 %-ным раствором SDS позволяет получить качественный бесклеточный матрикс, характеризующийся сохранностью печеночной архитектоники, проходимость сосудистого русла, остаточной ДНК менее 1 %, отсутствием цитотоксичности по отношению к аллогенным культурам и признаков деструкции коллагеновых волокон.

Образцы цельноорганного децеллюляризованного скаффолда печени, полученные описанным методом, соответствуют требованиям, предъявляемым к клеточным носителям, что позволяет использовать их в тканевой инженерии для создания многоклеточных тканеинженерных конструкций.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант M19Арм-016).

Acknowledgments. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant M19Арм-016).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies / Z. Heydari [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, N 2. – P. 304. <https://doi.org/10.3390/cells9020304>
2. Concise review: Liver regenerative medicine: From hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts / C. T. Nicolas [et al.] // *Stem Cells*. – 2017. – Vol. 35, N 1. – P. 42–50. <https://doi.org/10.1002/stem.2500>
3. Hamooda, M. Hepatocyte transplantation in children with liver cell failure / M. Hamooda // *Electron Physician*. – 2016. – Vol. 8, N 10. – P. 3096–3101. <https://doi.org/10.19082/3096>
4. Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study / F. Wang [et al.] // *Transplantation Proceeding*. – 2014. – Vol. 46, N 1. – P. 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.10.042>
5. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases / M. Alfaifi [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2018. – Vol. 68, N 6. – P. 1272–1285. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.030>
6. A review of three-dimensional printing in tissue engineering / N. A. Sears [et al.] // *Tissue Eng. B Rev.* – 2016. – Vol. 22, N 4. – P. 298–310. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0464>
7. Современные возможности регенеративной медицины: биофабрикация полых органов / Е. С. Евстратова [и др.] // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 92–103. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-2-92-103>
8. 3D cultivation technique for primary human hepatocytes / A. Bachman [et al.] // *Microarrays*. – 2015. – Vol. 4, N 1. – P. 64–83. <https://doi.org/10.3390/microarrays4010064>
9. Liver tissue engineering: from implantable tissue to whole organ engineering / G. Mazza [et al.] // *Hepatology Communications*. – 2018. – Vol. 2, N 2. – P. 131–141. <https://doi.org/10.1002/hep4.1136>
10. Novel morphological multi-scale evaluation system for quality assessment of decellularized liver scaffolds / V. Moulisová [et al.] // *Journal of Tissue Engineering*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1–14. <https://doi.org/10.1177/2041731420921121>
11. Gilpin, A. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications / A. Gilpin, Yang Y. // *BioMed Research International*. – 2017. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>
12. Decellularization and solubilization of porcine liver for use as a substrate for porcine hepatocyte culture: method optimization and comparison / R. E. Coronado [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2017. – Vol. 26, N 12. – P. 1840–1854. <https://doi.org/10.1177/0963689717742157>
13. Recent advanced in decellularization and recellularization for tissue-engineered liver grafts / Y. Wang [et al.] // *Cell Tissue Organs*. – 2017. – Vol. 204, N 3–4. – P. 125–136. <https://doi.org/10.1159/000479597>
14. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds / U. Mendibil [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 15. – P. 5447. <https://doi.org/10.3390/ijms21155447>
15. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application / K. H. Hussein [et al.] // *Materials Science and Engineering*. – 2016. – N 67. – P. 766–778. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.068>

References

1. Heydari Z., Najimi M., Mirzaei H., Shpichka A., Ruoss M., Farzaneh Z., Montazeri L., Piryaei A., Timashev P., Gramignoli R., Nussler A., Baharvand H., Vosough M. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies. *Cells*, 2020, vol. 9, no. 2, pp. 304. <https://doi.org/10.3390/cells9020304>
2. Nicolas C. T., Hickey R. D., Chen H. S., Mao S. A., Higueta M. L., Wang Y., Nyberg S. L. Concise review: Liver regenerative medicine: From hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts. *Stem Cells*, 2017, vol. 35, no. 1, pp. 42–50. <https://doi.org/10.1002/stem.2500>
3. Hamooda M. Hepatocyte transplantation in children with liver cell failure. *Electron Physician*, 2016, vol. 8, no. 10, pp. 3096–3101. <https://doi.org/10.19082/3096>
4. Wang F., Zhou L., Ma X., Ma W., Wang C., Lu Y., Chen Y., An L., An W., Yang Y. Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplantation Proceeding*, 2014, vol. 46, no. 1, pp. 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.10.042>
5. Alfaifi M., Eom Y. W., Newsome P. N., Baik S. K. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *Journal of Hepatology*, 2018, vol. 68, no. 6, pp. 1272–1285. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.030>
6. Sears N. A., Seshadri D. R., Dhavalikar P. S., Cosgriff-Hernandez E. A review of three-dimensional printing in tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2016, vol. 22, no. 4, pp. 298–310. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0464>
7. Евстратова Е. С., Shegay P. V., Popov S. V., Vorobyev N. V., Ivanov S. A., Kaprin A. D. Modern opportunities of regenerative medicine: biofacturing of hollow organs. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*, 2019, vol. 21, no. 2, pp. 92–103 (in Russian). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-2-92-103>
8. Bachmann A., Moll M., Gottwald E., Nies C., Zantl R., Wagner B., Burkhardt B., Martinez Sanchez J., Ladurner R., Thasler W., Damm G., Nussler A. K. 3D cultivation technique for primary human hepatocytes. *Microarrays*, 2015, vol. 4, no. 1, pp. 64–83. <https://doi.org/10.3390/microarrays4010064>
9. Mazza G., Al-Akkad W., Rombouts K., Pinzani M. Liver tissue engineering: from implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatology Communications*, 2018, vol. 2, no. 2, pp. 131–141. <https://doi.org/10.1002/hep4.1136>
10. Moulisová V., Jiřík M., Schindler C., Červenková L., Pálek R., Rosendorf J., Arlt J., Bolek L., Šušová S., Nietzsche S., Liška V., Dahmen U. Novel morphological multi-scale evaluation system for quality assessment of decellularized liver scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*, 2020, vol. 11, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1177/2041731420921121>

11. Gilpin A., Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *BioMed Research International*, 2017, vol. 2017, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>
12. Coronado R. E., Somaraki-Cormier M., Natesan S., Christy R. J., Ong J. L., Half G. A. Decellularization and solubilization of porcine liver for use as a substrate for porcine hepatocyte culture: method optimization and comparison. *Cell Transplantation*, 2017, vol. 26, no. 12, pp. 1840–1854. <https://doi.org/10.1177/0963689717742157>
13. Wang Y., Nicolas C. T., Chen H. S., Ross J. J., De Lorenzo S. B., Nyberg S. L. Recent advanced in decellularization and recellularization for tissue-engineered liver grafts. *Cells Tissues Organs*, 2017, vol. 204, no. 3–4, pp. 125–136. <https://doi.org/10.1159/000479597>
14. Mendibil U., Ruiz-Hernandez R., Retegi-Carrion S., Garcia-Urquia N., Olalde-Graells B., Abarrategi A. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21, no. 15, pp. 5447. <https://doi.org/10.3390/ijms21155447>
15. Hussein K. H., Park K. M., Kang K. S., Woo H. M. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering*, 2016, no. 67, pp. 766–778. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.068>

Информация об авторах

Дубко Андрей Дмитриевич – мл. науч. сотрудник. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dubko.immun@gmail.com.

Юркевич Мария Юрьевна – канд. биол. наук, доцент. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, Минск, Республика Беларусь). E-mail: marija4567@gmail.com.

Лобай Марина Валерьевна – ст. преподаватель. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, Минск, Республика Беларусь). E-mail: marina.lobai@mail.ru.

Свирская Аlesia Валерьевна – студент. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alesjswirskay@mail.ru.

Юханов Никита Геннадьевич – врач-патологоанатом. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, д. 43, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: YkhanovN@yandex.by.

Савицкая Татьяна Владимировна – канд. биол. наук, врач. Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии (ул. Фрунзенская, д. 43, д. Боровляны, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: tat_savitskaya@mail.com.

Нижегородова Дарья Борисовна – канд. биол. наук, доцент. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nzh@tut.by.

Зафранская Марина Михайловна – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой. Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ (ул. Долгобродская, 23/1, 220070, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zaf-ranskaya@gmail.com.

Information about the authors

Dubko Andrei D. – Junior researcher. International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dubko.immun@gmail.com.

Yurkevich Mariya Yu. – Ph. D. (Biology), Associate professor. International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: marija4567@gmail.com.

Labai Marina V. – Senior lecture. International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: marina.lobai@mail.ru.

Svirskaya Alesia V. – Student. International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alesjswirskay@mail.ru.

Yukhanov Nikita G. – Pathologist. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., Borovlyany vill., Minsk district, Republic of Belarus). E-mail: YkhanovN@yandex.by.

Savitskaya Tatiana V. – Ph. D. (Biology), Doctor. Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (43, Frunzenskaya Str., Borovlyany vill., Minsk district, Republic of Belarus). E-mail: tat_savitskaya@mail.com.

Nizheharodava Daria B. – Ph. D. (Biology), Associate professor. International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nzh@tut.by.

Zaf-ranskaya Marina M. – D. Sc. (Medicine), Head of the Department. International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University (23/1, Dolgobrodskaya Str., 220070, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zaf-ranskaya@gmail.com.