

DOI: 10.15825/1995-1191-2018-1-70-78

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА В ПЕРФУЗИОННОМ БИОРЕАКТОРЕ

Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, Н.П. Шмерко,
Х.М. Хизроев, В.И. Севастьянов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель. Культивирование клеток печени человека и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в перфузионном биореакторе. **Материалы и методы.** В перфузионном биореакторе проведены эксперименты по культивированию клеточно-инженерной конструкции (КИК), состоящей из биополимерного микроструктурированного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ), клеток печени человека, мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) и культуральной среды William's E. **Результаты.** В ходе эксперимента установлено, что на 7-е сутки в культуральных камерах биореактора присутствовали крупные клетки с характерной для гепатоцитов морфологией – полигональной формой и центрально расположенным круглым ядром. Метаболическая активность гепатоцитов в исследуемой КИК подтверждалась присутствием мочевины в культуральной среде на седьмые сутки культивирования в биореакторе и резорбцией БМКГ.

Ключевые слова: проточный биореактор, клеточно-инженерная конструкция, клетки печени человека, биополимерный матрикс, мезенхимальные стромальные клетки.

CULTIVATION OF HUMAN LIVER CELLS AND ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN PERFUSION BIOREACTOR

Yu.B. Basok, A.M. Grigoryev, L.A. Kirsanova, N.P. Shmerko, K.M. Khizroev, V.I. Sevastianov
V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Aim: to show the progress of the experiment of cultivation of human liver cells and adipose-derived mesenchymal stromal cells in perfusion bioreactor. **Materials and methods.** The cultivation of a cell-engineered construct, consisting of a biopolymer microstructured collagen-containing hydrogel, human liver cells, adipose-derived mesenchymal stromal cells, and William's E Medium, was performed in a perfusion bioreactor. **Results.** On the 7th day large cells with hepatocyte morphology – of a polygonal shape and a centrally located round nucleus, – were present in the culture chambers of the bioreactor. The metabolic activity of hepatocytes in cell-engineered constructs was confirmed by the presence of urea in the culture medium on the seventh day of cultivation in the bioreactor and by the resorption of a biopolymer microstructured collagen-containing hydrogel.

Key words: perfusion bioreactor, cell-engineered construct, human liver cells, biopolymer matrix, mesenchymal stromal cells.

ВВЕДЕНИЕ

Золотым стандартом в лечении конечной стадии печеночной недостаточности служит пересадка печени. Однако нехватка донорских органов является серьезной проблемой. В связи с этим необходима разработка альтернативных вариантов для замещения или восстановления поврежденной ткани

печени, среди которых одним из привлекательных направлений являются технологии тканевой инженерии, позволяющие восстанавливать утраченные функции органов [1].

В литературе описаны основные требования к конструкции биореакторов, применяемых для культивирования клеток печени. Реактор должен

Для корреспонденции: Басок Юлия Борисовна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (916) 637-88-63. E-mail: bjb2005@mail.ru

For correspondence: Basok Yulia Borisovna. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (916) 637-88-63. E-mail: bjb2005@mail.ru

поддерживать аналогичный физиологическому уровень питательных веществ, цитокинов и газов. Известно, что гепатоцит потребляет кислород со скоростью 0,3–0,9 нмоль/с/10⁶ клеток [2], в то время как средняя скорость использования кислорода большинством клеток организма составляет около 2–40 пмоль/с/10⁶ клеток [3]. Следовательно, лимитирующим фактором для жизнеспособности гепатоцитов является доставка кислорода, и биореактор должен обеспечивать *in vitro* условия, в которых клетки печени не окажутся в состоянии гипоксии. Также схема устройства должна предусматривать возможность регулярного отбора проб для измерения необходимых параметров без ущерба для стерильности.

Отметим, что перфузионный биореактор наиболее эффективно имитирует физиологические условия *in vitro*, обеспечивая питание клеток, транспорт к ним газов и выведение продуктов обмена за счет постоянной замены культуральной среды. Особенно большое значение имеет оптимизация скорости потока культуральной среды, так как ограничение потока необходимо для поддержания морфологии и функции гепатоцитов, а чрезмерное снижение потока жидкости уменьшит поступление кислорода к клеткам.

Основной проблемой при культивировании гепатоцитов в биореакторе является быстрая потеря их многочисленных функций в условиях *in vitro*. В связи с этим для поддержания их функциональной активности используют сокультивирование гепатоцитов с другими клетками: звездчатыми клетками печени, мезенхимальными стромальными клетками [4, 5]. Установлено, что в отличие от монокультивирования гепатоциты в присутствии стволовых клеток в биореакторе сохраняют большинство своих функций, что подтверждалось определением гепатоспецифических маркеров [5, 6].

Ранее в отделе биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России был разработан малогабаритный биореактор с четырьмя ячейками для создания тканеинженерных конструкций, позволяющий проводить долговременные эксперименты в условиях потока и стерильности при заданных параметрах влажности и температуры культуральной и газовой сред. Функциональная эффективность разработанного биореактора была продемонстрирована на примере хондрогенной дифференцировки клеток в клеточно-инженерной конструкции (КИК), состоящей из биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ), клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) и дифференцировочной хондрогенной среды [7, 8].

Целью работы являлось культивирование в биореакторе КИК, состоящей из клеток печени человека, МСК ЖТч и БМКГ в среде William's E, и

исследование полученных КИК с помощью гистохимических и биохимических методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения экспериментов по культивированию клеток печени в динамических условиях использовали модифицированный вариант перфузионного биореактора [7], схема которого представлена на рис. 1. Был оптимизирован расход культуральной среды за счет подключения четырех культуральных камер в систему циркуляции к одному резервуару со средой. При этом каждый перистальтический насос обеспечивал движение жидкости через две культуральные камеры. Общая длина шлангов (Saint-Gobain Performance Plastics, Франция) для перфузии пары культуральных камер составляла 2,6 м.

Культуральные камеры, емкость для циркулирующей среды, шланги и соединительные элементы из полипропилена и полиалломера стерилизовали путем автоклавирования в течение 45 мин при температуре 121 °С. Окончательную сборку и заполнение системы культуральной средой производили в стерильных условиях.

Ввиду отсутствия возможности прямых методов оценки состояния КИК внутри биореактора в систему был добавлен блок отбора проб для мониторинга состава культуральной среды, расположенный за культуральной камерой по направлению потока жидкости. Пробы объемом 5 мл отбирали шприцем, используя стерильный фильтр, через 1, 3, 7 и 10 суток после запуска биореактора. В полученных образцах исследовали рН и концентрации глюкозы и мочевины.

Одним из перспективных направлений в тканевой инженерии и регенеративной медицине является

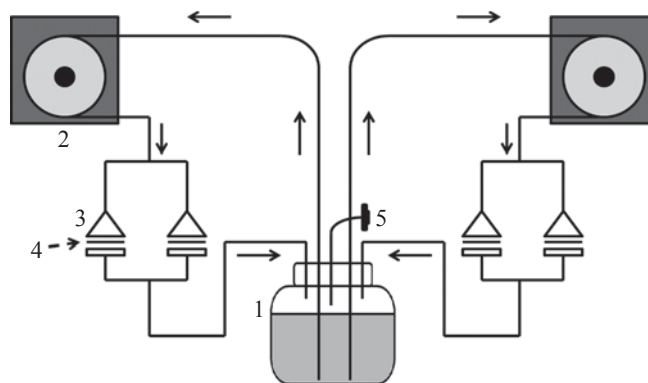


Рис. 1. Схема биореактора: 1 – резервуар с культуральной средой; 2 – перистальтический насос; 3 – культуральная камера; 4 – мембрана, удерживающая КИК; 5 – стерильный фильтр

Fig. 1. Bioreactor set-up: 1 – reservoir with medium; 2 – peristaltic pump; 3 – culture chamber; 4 – membrane holding the cell-engineered construct; 5 – sterile filter

ся воссоздание (имитация) нативного микроокружения, нарушенного при патологическом процессе, с использованием так называемых биомиметиков внеклеточного матрикса (ВКМ) – биоинженерных резорбируемых гидрогелей, обеспечивающих сходные с внеклеточным матриксом условия для жизнедеятельности клеток [9].

В качестве такого биологического матрикса (биоматрикса) для КИК, относящегося к классу биомиметиков внеклеточного матрикса (ВКМ), был выбран биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) [10, 11] из линейного ряда композиции имплантируемого гетерогенного геля *Сфера*@ГЕЛЬ (производитель АО «Биомир сервис», г. Краснознаменск). Биоматрикс *Сфера*@ГЕЛЬ практически полностью имитирует состав ВКМ, что обеспечивает сходную с ВКМ микросреду (нишу), способствующую пролиферации и дифференцировки клеток с сохранением имидеальных, цитогенетических и иммунофенотипических характеристик [11].

Основные характеристические свойства БМКГ: средний размер микрочастиц – $145,79 \pm 0,09$ мкм; модуль упругости – 1170 ± 12 Па; модуль вязкости – $62,9 \pm 7,9$ Па; набухаемость – не ниже 86,6 ± 3,0 масс.%; время биорезорбции БМКГ – до 9 месяцев.

МСК ЖТч и клетки печени были получены из фрагментов подкожной жировой клетчатки и печени от здоровых доноров в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России. Клетки выделяли из жировой ткани по стандартной методике [12]. Фрагмент ткани печени отмывали раствором Хэнкса, измельчали с помощью скальпеля и помещали в пробирку с ферментирующим раствором. Пробирку инкубировали в термостате при 37 °С. Затем содержимое переносили в новую пробирку через сито с диаметром пор 100 мкм, обильно промывая свежими порциями охлажденной до +4 °С ростовой среды для клеток печени, содержащей культуральную среду William's E («Thermo Fisher scientific», США), эмбриональную телячью сыворотку (HyClone®, HyClone UK Ltd) – 10%; HEPES («Thermo Fisher scientific», США) – 1%, антибиотик-антимикотик («Thermo Fisher scientific», США) – 1%; Cell Maintenance Supplement («Thermo Fisher scientific», США). Полученную суспензию клеток центрифугировали при 180 g в течение 2 мин при температуре 20 °С. Далее надосадочную жидкость сливали, а полученный клеточный ступок ресуспензировали свежей средой. После повторного центрифугирования в полученной клеточной суспензии определяли количество жизнеспособных клеток. Далее из исходной суспензии получали рабочую с заданной плотностью живых клеток для последующих экспериментов.

Выбор оптимальной скорости потока в биореакторе при совместном культивировании клеток печени и МСК ЖТч был сделан по величине создаваемого давления в описываемой системе, заполненной модельным раствором. Для этого в систему циркуляции биореактора перед культуральной камерой, содержащей 1,0 мл БМКГ, устанавливали подключенный к контроллеру датчик давления с сенсором PendoTECH Pressure Sensor Polycarbonate («PendoTECH», США).

В многосуточном эксперименте аликвоты рабочих суспензий, содержащих $7,5 \times 10^5$ клеток печени и $1,5 \times 10^5$ МСК ЖТч, послойно смешивали с 1,0 мл гидрогелевого матрикса, переносили на нейлоновую подложку (Millipore, Ирландия), на ней помещали в культуральную камеру биореактора и инкубировали в среде William's E в течение суток без потока. Затем четыре заполненные культуральные камеры подключали к системе циркуляции биореактора и инкубировали в условиях потока при скорости и объеме циркулирующей среды 0,02 мл/мин и 110 мл соответственно. На 3, 5, 7 и 10-е сутки по одной культуральной камере изымали из биореактора, фиксировали образец 10% раствором формалина и проводили гистологическое исследование. Замену культуральной среды проводили через неделю культивирования.

Применимость культуральной среды William's E для роста МСК ЖТч оценивали в предварительном эксперименте с использованием автоматизированного интерактивного микроскопа «IncuCyte ZOOM» («Essen Bioscience Inc.» США) путем непрерывного наблюдения и фотосъемки в режиме реального времени.

Концентрацию глюкозы и мочевины определяли на биохимическом анализаторе Konelab Prime 60i (Thermo Fisher Scientific, Финляндия), принцип действия которого основан на измерении значений оптической плотности жидкой биологической пробы.

Значения pH среды измеряли потенциометрическим методом на стационарном pH-метре HI 2211 (Hanna Instruments, Венгрия).

Гистологический анализ образцов проводили путем окрашивания гематоксилином и эозином согласно стандартной методике. Образцы, фиксированные в 10% забуференном растворе формалина, промывали в течение 15 мин в проточной воде и обезживали в спиртах восходящих концентраций (в двух порциях 70%, 80%, 96% этанола; по 5 мин в каждой смене спиртового раствора), выдерживали по 5–7 мин в смеси этанола и хлороформа, в хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные с помощью микротомы Leica RM3255, депарафинировали, регидратировали и окрашивали. Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon

Eclipse («Nikon Corporation», Япония), оснащенный цифровой фотокамерой.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При скоростях потока 2; 1; 0,5 мл/мин давление в системе составило $3,0 \pm 0,2$; $1,7 \pm 0,4$; $0,4 \pm 0,1$ мм рт. ст. соответственно. Как видно на рис. 2, избыточное давление при скорости потока 0,02 мл/мин не превышало фонового значения. Аналогичную картину наблюдали при скорости потока 0,01 мл/мин.

Учитывая, что функцией биореактора является эффективное обеспечение клеток питанием и оксигенация при минимальном повреждении КИК, для эксперимента по совместному культивированию клеток печени и МСК ЖТч была выбрана скорость 0,02 мл/мин.

Отметим, что описанные в литературе скорости потока культуральной среды значительно различаются в зависимости от типа биореактора. Наиболее высокие скорости потока устанавливали в системах, предназначенных для использования в качестве экстракорпоральной искусственной печени, и при рецеллюляризации целой децеллюляризованной печени [13–15]. Также в коммерчески доступных многокамерных биореакторах производства

Stem cell systems GmbH (Германия), основанных на полых волокнах, при культивировании клеток печени использовали скорости потока от 7 до 10 мл/мин [16, 17]. Столь высокие скорости потока объясняются наличием в конструкции структур, защищающих клетки от силы сдвига, что в организме обеспечивается эндотелием. Отметим, что в трех описанных в литературе системах с прямым воздействием потока на клетки скорости потока были низкими: 0,06; 0,03 и 0,00014 мл/мин, что подтверждает наш выбор величины скорости потока 0,02 мл/мин [5, 18, 19].

В предварительных экспериментах с использованием фотосъемки в режиме реального времени была проведена оценка пригодности культуральной среды William's E для роста МСК ЖТч. Было показано, что МСК ЖТч на этой среде демонстрируют устойчивый рост, сохраняя на протяжении пассажа характерный фенотип (рис. 3).

Измерения содержания глюкозы и pH в пробах культуральной среды из биореактора продемонстрировали постоянство в течение 10 суток и не выходили за пределы допустимых значений. Таким образом, их изменение не оказывало влияния на условия сокультивирования клеток печени и МСК ЖТч (рис. 4).

На первые сутки культивирования КИК в биореакторе согласно данным гистологического исследования наблюдали многочисленные фрагменты

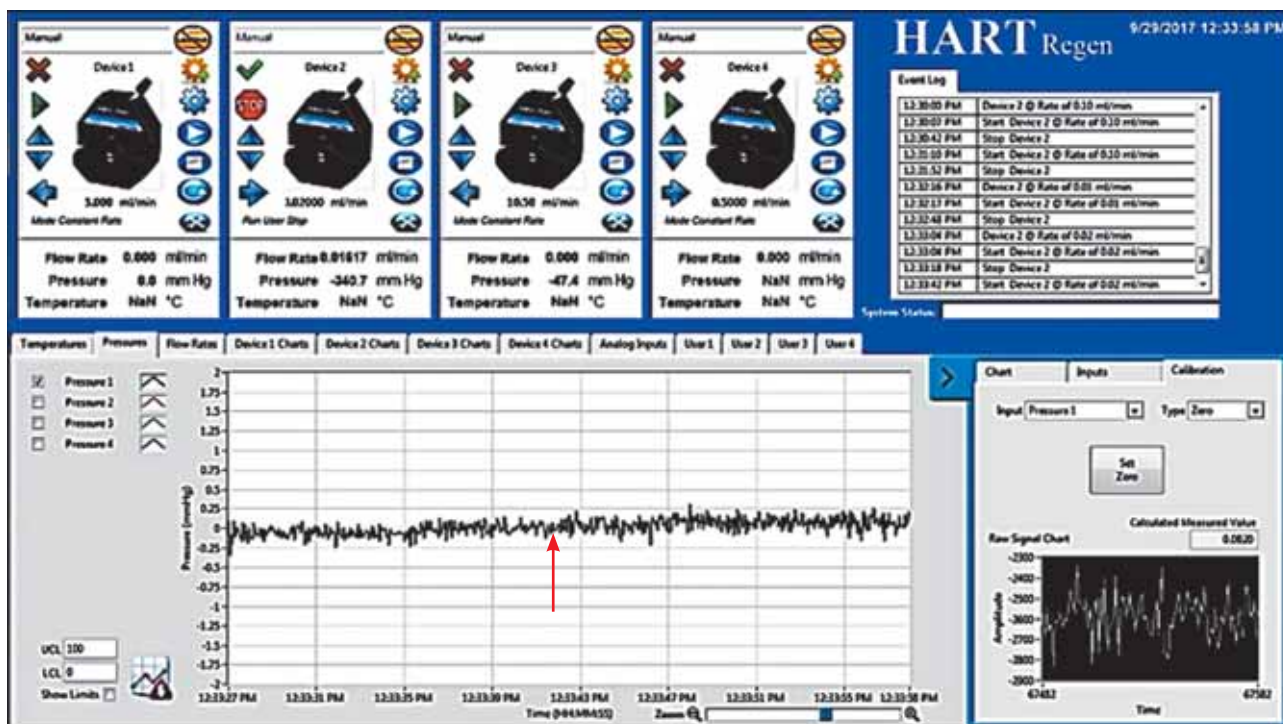


Рис. 2. Давление в системе биореактора при скорости потока 0,02 мл/мин. Стрелкой обозначен момент включения перистальтического насоса

Fig. 2. The bioreactor system pressure at a flow rate of 0.02 ml/min. The arrow indicates the moment of activation of the peristaltic pump

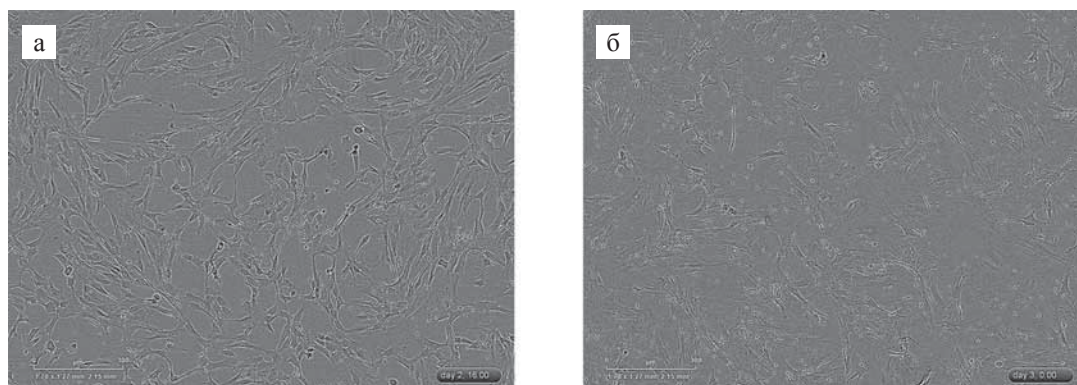


Рис. 3. Клетки МСК ЖТч при культивировании на ростовой среде для МСК (а) и среде Williams E (б). Размер масштабной линейки 300 мкм

Fig. 3. Cultivation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells (hADSC) on growth medium for stem cells (a) and on William's E Medium (b). Scale 300 µm

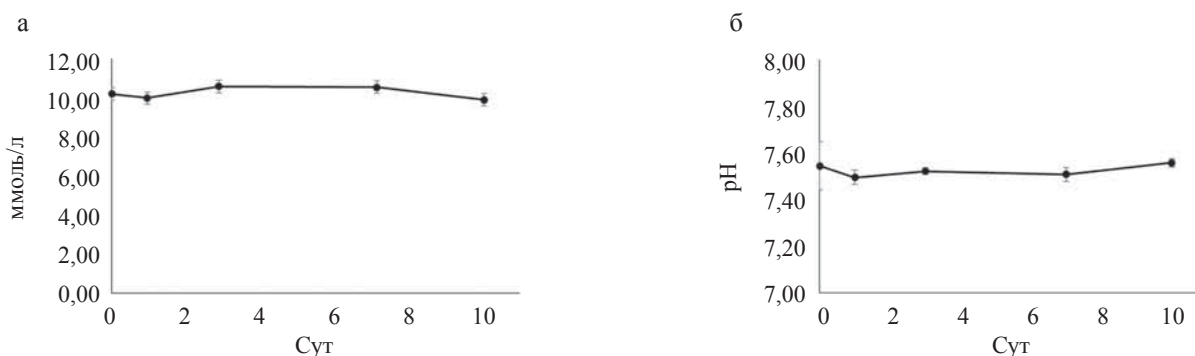


Рис. 4. Уровень глюкозы (а) и pH (б) в пробах культуральной среды при сокультивировании клеток печени и МСК ЖТч в биореакторе

Fig. 4. The level of glucose (a) and pH (б) in samples of culture medium from co-cultivation of liver cells and hADSC in the bioreactor

гидрогеля. Среди них обнаружили группы клеток, не прикрепившихся к матриксу (рис. 5). Непосредственно на поверхности БМКГ располагались группы морфологически не измененных печеночных клеток и небольшие пласты клеточного монослоя. Причем в относительно крупных фрагментах монослоя, не прикрепившихся к гидрогелю, наблюдали разобщение клеток в пласте с разрывом клеточных контактов. Отметим, что в этих клетках визуализировались гиперхромные ядра и большинство из них утратили сферическую форму, что характерно для процесса паранекроза (рис. 5).

Интересно отметить, что часть клеток, прикрепившаяся к ровной поверхности гидрогеля, образует клеточные пласты. Клетки, непосредственно связанные с поверхностью гидрогеля, выглядели более жизнеспособными, морфологических признаков деструкции в них не обнаруживали. Уже на столь раннем сроке наблюдения была заметна частичная резорбция БМКГ (рис. 6, а). При большем увеличении (рис. 6, б) на препарате были заметны характерные видимые признаки интактных гепато-

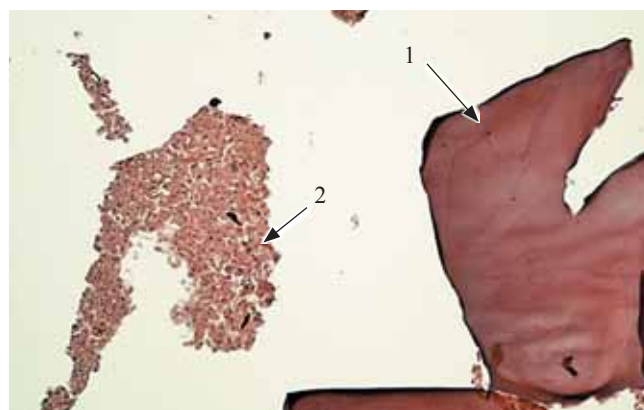


Рис. 5. Гистологическая картина КИК через 24 часа культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин. Морфология клеточных пластов, не прикрепившихся к БМКГ. Окрашивание гематоксилином и эозином. ×100. 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток

Fig. 5. A histologic pattern of cell-engineered construct cultivating for 24 hours at a flow rate of 0.02 ml/min. The morphology of cell layers not attached to the surface of a biopolymer microstructured collagen-containing hydrogel (BMCH). Hematoxylin and eosin staining. ×100. 1 – BMCH; 2 – cells

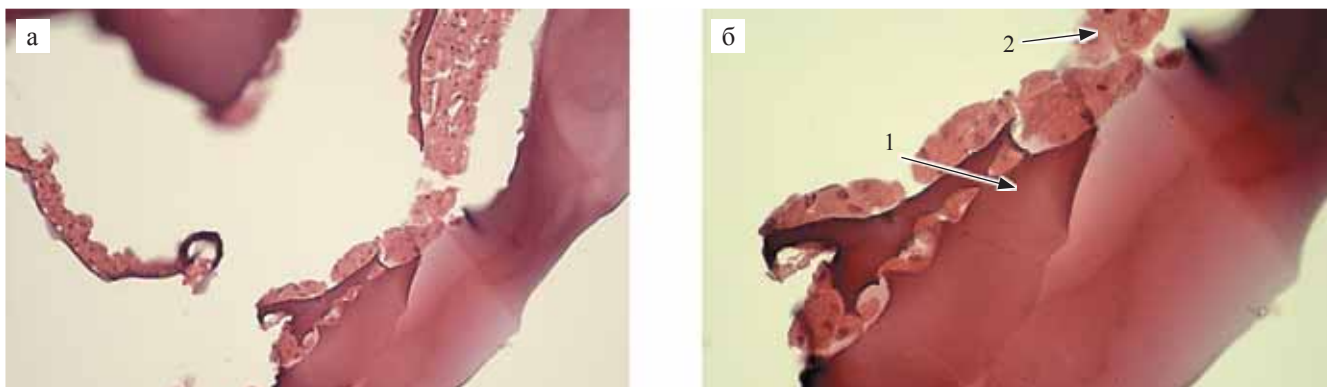


Рис. 6. Гистологическая картина КИК через 24 часа культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин. Формирование клеточных пластов на поверхности БМКГ клетками печени: 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином; а – $\times 100$; б – $\times 400$

Fig. 6. A histologic pattern of cell-engineered construct cultivating for 24 hours at a flow rate of 0.02 ml/min. The formation of human liver cell layers on the surface of BMCH: 1 – BMCH; 2 – cells. Hematoxylin and eosin staining: а – $\times 100$; б – $\times 400$.

цитов – полигональная форма, центрально расположенные круглые ядра.

Однако местами наблюдали разрыхление клеточного пласта (рис. 7). При этом клетки на описываемых участках теряли межклеточные контакты, в некоторых клетках ядра не визуализировались, что свидетельствовало об их гибели. В этих же зонах выявляли клетки с пикнотичными ядрами, что является признаком некробиоза – необратимых патологических изменений в клетке. МСК ЖТч на данном сроке наблюдения не выявлялись.

На 3-и сутки культивирования наблюдали активную резорбцию БМКГ в местах контакта матрикса с адгезированными клетками печени (рис. 8, а, б), что может косвенно свидетельствовать о метаболической активности гепатоцитов.

В толще БМКГ формировались ниши и лакуны, заполненные клетками (рис. 9).

Часть клеток демонстрировала морфологию, характерную для гепатоцитов, но оставшиеся перешли



Рис. 7. Гистологическая картина КИК через 24 часа культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин. Разрыхление клеточного пласта и гибель клеток на поверхности БМКГ: 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином; $\times 100$

Fig. 7. A histologic pattern of cell-engineered construct cultivating for 24 hours at a flow rate of 0.02 ml/min. The decondensation of cell layer and cell death on the surface of BMCH: 1 – BMCH; 2 – cells. Hematoxylin and eosin staining; $\times 100$

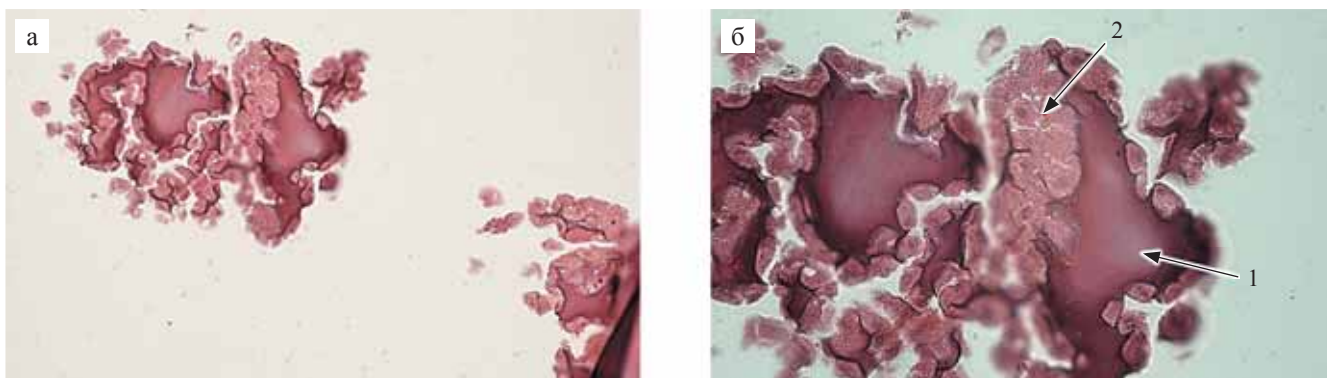


Рис. 8. Гистологическая картина КИК на третьи сутки культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин. Биорезорбция фрагментов БМКГ клетками печени: 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином; а – $\times 200$; б – $\times 400$

Fig. 8. A histologic pattern of cell-engineered construct cultivating for 3 days at a flow rate of 0.02 ml/min. The bioresorption of BMCH fragments: 1 – BMCH; 2 – cells. Hematoxylin and eosin staining; а – $\times 200$; б – $\times 400$

в стадию деструкции – нарушилась целостность клеточных мембран, ядра не визуализировались. Отметим, что клетки в скоплениях, не прикрепившихся к поверхности гидрогеля, разрушались, ядра в них не определялись; скопления были представле-

ны в основном массой грубого клеточного детрита (рис. 10).

На 7-е сутки культивирования на поверхности гидрогеля обнаруживалось значительно меньшее количество клеток, чем на предыдущем сроке на-

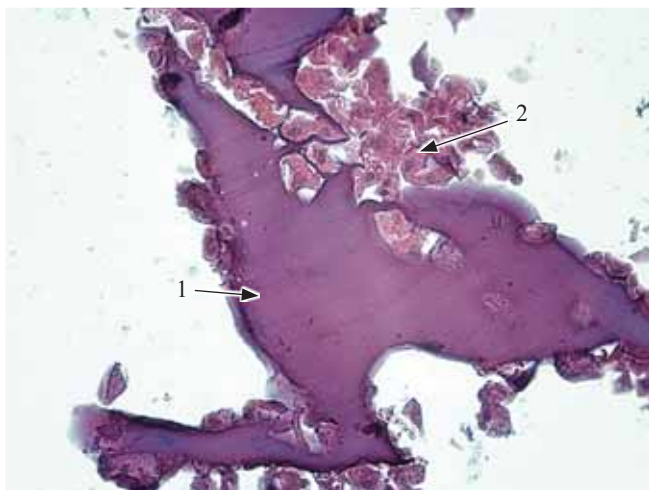


Рис. 9. Гистологическая картина КИК на третьи сутки культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин. Формирование ниш и лакун в БМКГ и заполнение их клетками: 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином; ×400

Fig. 9. A histologic pattern of cell-engineered construct cultivating for 3 days at a flow rate of 0.02 ml/min. The formation of niches and lacunas in BMCH subsequently filled with cells: 1 – BMCH; 2 – cells. Hematoxylin and eosin staining; ×400



Рис. 10. Частичная деструкция клеток на гидрогелевом матриксе. Третьи сутки культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин: 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином; ×400

Fig. 10. The partial destruction of cells on a hydrogel matrix. 3-day cultivation at a flow rate of 0.02 ml/min: 1 – BMCH; 2 – cells. Hematoxylin and eosin staining; ×400

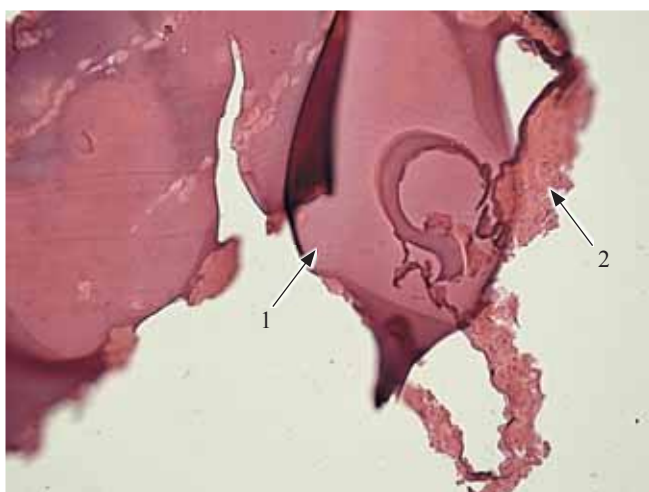


Рис. 11. Разрушение клеточного пласта и его слущивание с поверхности гидрогеля. Седьмые сутки культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин: 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином; ×200

Fig. 11. The destruction of cell layer and its detachment from the surface of hydrogel. 7-day cultivation at a flow rate of 0.02 ml/min: 1 – BMCH; 2 – cells. Hematoxylin and eosin staining; ×200

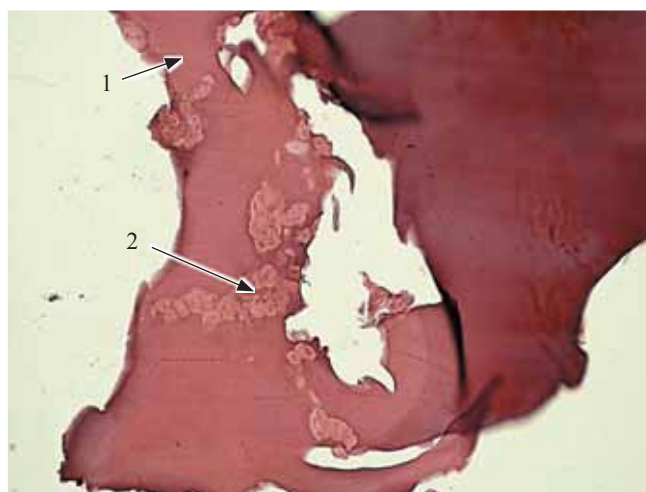


Рис. 12. Морфологически не измененные клетки в толще гидрогеля. Седьмые сутки культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин: 1 – БМКГ; 2 – скопление клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином; ×200

Fig. 12. Morphologically unaltered cells inside the hydrogel. 7-day cultivation at a flow rate of 0.02 ml/min: 1 – BMCH; 2 – cells. Hematoxylin and eosin staining; ×200



Рис. 13. Лакуна в гидрогеле с клеточным детритом. Седьмые сутки культивирования в условиях потока при скорости 0,02 мл/мин. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 13. Lacuna in hydrogel with cell detritus. 7-day cultivation at a flow rate of 0.02 ml/min. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$

блюдения. Происходило смещение клеточных пластов с поверхности гидрогеля и гибель клеток (рис. 11).

Отметим, что через неделю культивирования в условиях потока морфологически не измененные клетки сохранялись в толще гидрогеля (рис. 12).

Однако и в этом случае наблюдается гибель клеток в скоплениях, расположенных в лакунах в толще гидрогеля (рис. 13).

К 10-м суткам культивирования основная масса клеток была представлена детритом, клеточные пласты находились в состоянии деструкции. Жизнеспособных клеток печени не наблюдали.

Биохимический анализ проб культуральной среды из биореактора на первые и третьи сутки эксперимента не выявил в образцах мочевины на уровне, превышающем предел обнаружения 1,1 ммоль/л. Однако к седьмым суткам содержание мочевины в культуральной среде составило $2,1 \pm 0,14$ ммоль/л, что свидетельствует не только о присутствии в биореакторе морфологически не измененных гепатоцитов, но и об их метаболической активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что в биореакторе при скорости потока 0,02 мл/мин на седьмые сутки эксперимента культивирования КИК, состоящей из клеток печени, МСК ЖТч, БМКГ и среды Williams E, в культуральных камерах присутствовали крупные клетки с характерной для гепатоцитов морфологией – полигональной формой и центрально расположен-

ным круглым ядром. Метаболическая активность гепатоцитов в исследуемой КИК подтверждалась присутствием мочевины в культуральной среде на седьмые сутки культивирования в биореакторе и резорбцией БМКГ. Гибель гепатоцитов на более поздних сроках свидетельствует о необходимости оптимизации состава культуральной среды, общего количества клеток в БМКГ матриксе и соотношения гепатоцитов и МСК ЖТч.

Кроме того, осталась невыясненной роль в поддержании жизнедеятельности гепатоцитов МСК ЖТч, которые не обнаруживались в гистологических препаратах.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhang J, Zhao X, Liang L, Li J, Demirci U, Wang S. A decade of progress in liver regenerative medicine. *Bio-materials*. 2018; 157: 161–176. doi: 10.1016.
2. Nahmias Y, Berthiaume F, Yarmush ML. Integration of technologies for hepatic tissue engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007; 103: 309–329.
3. Wagner BA, Venkataraman S, Buetner GR. The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 700–712.
4. Wen F, Chang S, Toh YC, Arooz T, Zhuo L, Teoh SH, Yu H. Development of dual-compartment perfusion bioreactor for serial coculture of hepatocytes and stellate cells in poly(lactic-co-glycolic acid)-collagen scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2008; 87 (1): 154–162. doi: 10.1002.
5. Rebelo SP, Costa R, Silva MM, Marcelino P, Brito C, Alves PM. Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: improved functionality in long-term bioreactor cultures. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017; 11 (7): 2034–2045. doi: 10.1002.
6. Ramachandran SD, Schirmer K, Müntz B, Heinz S, Ghafoory S, Wöfl S et al. In vitro generation of functional liver organoid-like structures using adult human cells. *PLoS ONE*. 2015; 10 (10): A1648. doi: 10.1371.
7. Sevastianov VI, Basok YuB, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Vasilets VN. A Perfusion Bioreactor for Making Tissue-Engineered Constructs. *Biomedical Engineering*. 2017; 51 (3): 162–165.
8. Sevastianov V, Basok Yu, Grigor'ev A, Kirsanova L, Vasilets V. (2017). Formation of Tissue-Engineered Construct of Human Cartilage Tissue in a Flow-Through Bioreactor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 164. doi: 10.1007.
9. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering*. 2014; part A, 20 (5, 6): 895–898.
10. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Композиция гетерогенного имплантируемого геля Сферо®гель для лечения

- заболеваний опорно-двигательного аппарата. *Современная медицина*. 2017; 2: 151–155. Sevast'yanov VI, Perova NV. Kompoziciya geterogenogo implantiruемого gelya Sfero®gel' dlya lecheniya zabolevaniy опорно-dvigatel'nogo apparata. *Sovremennaya medicina*. 2017; 2: 151–155.
11. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биодegradуемый имплантат для заместительной и регенеративной медицины. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 120–126. Sevast'yanov VI, Perova NV. Biopolimernyj geterogenyj gidrogel' Sfero®GEL' – in'ekcionnyj biodegradiruemyj implantat dlya zamestitel'noj i regenerativnoj mediciny. *Prakticheskaya medicina*. 2014; 8 (84): 120–126.
 12. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Skaleckij NN, Sevastianov VI. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (in vitro study). *J. Biomed. Mat. Soc. Part. A*. 2015; 103 (2): 463–470. doi: 10.1002.
 13. Consolo F, Fiore GB, Truscetto S, Caronna M, Morbiducci U, Montevicchi FM et al. A computational model for the optimization of transport phenomena in a rotating hollow-fiber bioreactor for artificial liver. *Tissue Eng. Part. C. Methods*. 2009; 15 (1): 41–55. doi: 10.1089.
 14. Ishii Y, Saito R, Marushima H, Ito R, Sakamoto T, Yanaga K. Hepatic reconstruction from fetal porcine liver cells using a radial flow bioreactor. *World. J. Gastroenterol.* 2008; 14 (17): 2740–2747. PMID: 18461659.
 15. Uzarski JS, Bijonowski BM, Wang B, Ward HH, Wandinger-Ness A, Miller WM et al. Dual-Purpose Bioreactors to Monitor Noninvasive Physical and Biochemical Markers of Kidney and Liver Scaffold Recellularization. *Tissue Eng. Part. C. Methods*. 2015; 21 (10): 1032–1043. doi: 10.1089.
 16. Mueller D, Tascher G, Damm G, Nüssler AK, Heinze E, Noor F. Real-time in situ viability assessment in a 3D bioreactor with liver cells using resazurin assay. *Cyotechnology*. 2013; 65 (2): 297–305. doi: 10.1007.
 17. Freyer N, Knöspel F, Strahl N, Amini L, Schrade P, Bachmann S et al. Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells in a Perfused Three-Dimensional Multicompartment Bioreactor. *Biores. Open Access*. 2016; 5 (1): 235–248. doi: 10.1016.
 18. Hsu MN, Tan GD, Tania M, Birgersson E, Leo HL. Computational fluid model incorporating liver metabolic activities in perfusion bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2014; 111 (5): 885–895. doi: 10.1002.
 19. Sarkar U, Rivera-Burgos D, Large EM, Hughes DJ, Ravindra KC, Dyer RL et al. Metabolite profiling and pharmacokinetic evaluation of hydrocortisone in a perfused three-dimensional human liver bioreactor. *Drug. Metab. Dispos.* 2015; 43 (7): 1091–1099.

Статья поступила в редакцию 29.01.2018 г.
The article was submitted to the journal on 29.01.2018