

УДК 616.155.194-007.1-08:616.36:576.7:57.083.3-092.9

*Д.В. Грицай,
А.С. Лебединский,
О.В. Оченашко,
Ю.А. Петренко,
А.Ю. Петренко*

ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ АНЕМИЙ КЛЕТКАМИ ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ, ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМИ В МАКРОПОРИСТЫХ АЛЬГИНАТ- ЖЕЛАТИНОВЫХ НОСИТЕЛЯХ

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины Украина
ул. Переяславская, 23, Харьков, 61015, Украина
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of the Ukraine
Pereyaslavskaya str., 23, Kharkov, 61015, Ukraine
e-mail: alexander_petrenko@cryo.org.ua*

Ключевые слова: *клетки фетальной печени, макропористые альгинат-желатиновые носители, иммуноизоляция, анемия, эритропоэз*

Key words: *fetal liver cells, macroporous alginate-gelatin scaffold, immune-isolation, transplantation, anemia, erythropoiesis*

Реферат. *Перспективи лікування анемії клітинами фетальної печінки, іммобілізованими в макропористих альгинат-желатинових носіях. Грицай Д.В., Лебединський А.С., Оченашко О.В., Петренко Ю.О., Петренко О.Ю. Метою роботи було вивчення можливості стимулювання еритропоєзу шляхом імплантації щурям з постгеморагічною анемією, індукованою 70%-ою гепатектомією, клітин фетальної печінки, заселених в макропористі носії. Клітини фетальної печінки (КФП) виділяли з плодів щурів 15 діб гестації та кріоконсервували. Деконсервовані КФП заселяли у макропористі носії - альгинат-желатинові губки, які покривали оболонкою з альгінату та імплантували у сальник щурів з моделлю печінкової недостатності. Показано, що клітини фетальної печінки, іммобілізовані у макропористі носії, справляють позитивний ефект на вміст еритроцитів та гемоглобіну периферичної крові щурів, що свідчить про перспективність розвитку цього підходу при розробці нових методів лікування анемії різного тенеу.*

Abstract. *Perspectives of treatment of anemias with cells of fetal liver, immobilized in macroporous alginate-gelatin carriers. Gritsay D.V., Lebedinsky A.S., Ochenashko O.V., Petrenko Yu.A., Petrenko A.Yu. Aim of the work was to study possibility of erythropoiesis stimulation by transplantation of fetal liver cells, seeded into macroporous carriers to the rats with post-hemorrhagic anemia, induced by 70% hepatectomy. Fetal liver cells (FLC) were isolated from fetuses of rats with 15 days' gestation and were cryopreserved. Decryopreserved FLC were seeded into macroporous spongy alginate-gelatin scaffolds, which were covered by alginate capsule and implanted into omentum of rats with modeled liver insufficiency. It was shown that fetal liver cells, immobilized in macroporous scaffolds after implantation have positive effect on red blood count and hemoglobin content, indicating that this approach is promising for the development of new methods of anemia treatment.*

Анемия является одним из наиболее распространенных синдромов, встречающихся в практике врачей различных специальностей. В последнее время частота заболеваемости анемиями возросла в результате действия таких факторов, как ухудшение качества питания, снижение общей реактивности организма, учащение нервных стрессов, экзогенной и эндогенной интоксикации [2].

Социально-экономическая важность анемий состоит в значительном ухудшении качества жизни пациентов и снижении работоспособности.

С нашей точки зрения, наряду с традиционным применением рекомбинантного эритропоэтина, альтернативным методом лечения неко-

торых видов анемий может быть клеточная терапия. Перспективными источниками для клеточной терапии являются фетальные ткани. Клетки фетального происхождения являются гетерогенной смесью клеток, которая преимущественно состоит из прогениторных и мультипотентных стволовых клеток. В частности, в фетальной печени присутствуют клетки гемопоэтического, гепатического, эндотелиального и стромального ростков. При этом в первом триместре развития гемопоэтические клетки представляют собой наиболее многочисленную клеточную популяцию, а около 90% гемопоэтических клеток представлены предшественниками эритроидного ряда [1]. В связи с этим клетки фетальной печени (КФП) могут рассматриваться

в качестве источника эритроцитов при их дефиците.

Также известно, что необходимым фактором для эритропоэза является эритропоэтин (ЭПО), в отсутствие которого биогенез эритроцитов не реализуется. Если у взрослого человека ЭПО в основном образуется в почках, то в процессе внутриутробного развития главным местом его продукции являются стромальные клетки печени [10]. Поэтому можно предположить, что при трансплантации клетки фетальной печени в условиях дефицита эритроцитов могут выполнять стимулирующую роль, продуцируя ЭПО и другие ростовые факторы, усиливающие гемопоз.

В качестве экспериментальной модели была выбрана частичная гепатэктомия (ЧГЭ), которая сопровождается значительной кровопотерей. Для выявления длительного эффекта трансплантированных КФП пролиферацию гепатоцитов реципиента блокировали введением гепатотоксина 2-ацетиламинуфлуорена (ААФ) перед проведением ЧГЭ [13, 14]. Сочетание потери клеточной массы при проведении ЧГЭ и ингибирования пролиферации гепатоцитов гепатотоксином создает выгодные условия для раскрытия терапевтического потенциала трансплантируемых клеток.

При введении в русло крови сингенных или иммунодефицитных животных КФП легко приживляются и длительное время функционируют в организме реципиента [7]. В то же время при трансплантации в аллогенный или ксеногенный организм с нормальным иммунным статусом введенные клетки быстро распознаются и удаляются иммунной системой хозяина. Для иммуноизоляции может быть использована инкапсуляция клеток в альгинатные микросферы [11].

Благодаря своей структуре альгинатные гидрогели позволяют диффундировать кислороду, питательным веществам, сигнальным молекулам, что дает возможность инкапсулированным клеткам сохранять жизнеспособность и функциональную активность [8]. При этом альгинатный гидрогель обладает барьерными функциями по отношению к иммуноглобулинам и молекулам с весом свыше 100 кДа, что позволяет использовать этот биоматериал для иммуноизоляции клеток [11].

С другой стороны, альгинат характеризуется слабыми адгезивными свойствами. В частности, нами было показано, что при инкапсуляции в альгинатные микросферы клетки характеризуются сферической формой и не пролиферируют в ходе культивирования [4]. Вместе с тем, для прояв-

ления функциональных свойств и секреции специфических факторов стромальные клетки печени должны адгезировать на подложке и находиться в распластанном состоянии. Такое состояние достигается путем их заселения в макропористые полимерные матрицы [9] или децеллюляризированные фрагменты тканей [5].

Недавно нами был описан новый широкопористый носитель на основе альгината и желатина [6]. Было установлено, что модификация альгинатной матрицы путем ковалентного прикрепления желатина (в качестве якорного сайта) к поверхности стенок пор способствовало эффективной адгезии и пролиферации мезенхимальных стромальных клеток костного мозга взрослого человека в составе носителя. Клетки пролиферировали внутри носителя и были способны к направленной дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях *in vitro*. Вопрос о способности данного носителя (скаффолда) поддерживать рост гепатических клеток до настоящего времени остается невыясненным. Кроме того, макропористые губчатые носители, имеющие диаметр пор более 100 мкм, не обеспечивают иммуноизоляцию введенных в них клеток. В настоящей работе было предположено, что заселение клеток в макропористые носители и их последующее покрытие оболочкой из альгинатного геля способно обеспечить распластывание клеток и их иммуноизоляцию при имплантации.

Цель – изучение возможности стимулировать эритропоэз путем имплантации крысам с постгеморрагической анемией, индуцированной 70%-ой резекцией печени, клетками фетальной печени, заселенными в макропористые альгинат-желатиновые носители, покрытые альгинатной оболочкой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клетки печени из плодов крыс 15 дней гестации (выявление спермиев в мазках после подсадки самок к самцам считали первым днем беременности) выделяли в стерильных условиях комбинированным энзиматико-механическим методом [15]. Полученную клеточную суспензию криоконсервировали с использованием программного замораживателя ЗП-10 (производства СКТЬ с ОП ИПКиК НАНУ) по трехэтапной программе [1]. Хранение клеток осуществляли при – 196° С в условиях низкотемпературного банка ИПКиК НАНУ в течение 2-3 месяцев. Клетки отогревали перед использованием в эксперименте.

Показатель жизнеспособности (тест по исключению красителя трипанового синего)

криоконсервированных КФП составлял $70 \pm 5\%$. Отогретые КФП заселяли в макропористые альгинат-желатиновые губки диаметром 5 мм и толщиной 2 мм, полученные методом криотропного гелирования [6]. Заселенные клетками носители покрывали оболочкой из альгината путем двукратного повторения цикла последовательного переноса в 1,2 % раствор альгината натрия, приготовленный на физиологическом растворе (0,15 М NaCl, 25 мМ HEPES, pH 7,4), с последующей полимеризацией в течение 5 мин. в этом же растворе, содержащем 100 мМ CaCl₂.

КФП в составе макропористых альгинат-желатиновых носителей культивировали в среде α -MEM (Sigma, США), дополненной 10% эмбриональной сывороткой крови крупного рогатого скота (РАА, Австрия), 2 мМ L-глутамин, 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина при 37° С, 5 % CO₂ и 95 % влажности с заменой среды каждые 3 суток. Для визуализации КФП в составе носителя клетки окрашивали флуоресцеиндиацетатом (ФДА).

Исследования проводились на белых беспородных крысах-самцах массой 250-300 г. Эксперименты были проведены в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», одобренными IV Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2010 г.) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.).

Было сформировано 3 группы экспериментальных животных. Группу 1, контрольную, составили животные, которые не подвергались никаким воздействиям – одновозрастная норма, 5 особей. Животные оставшихся двух групп подверглись формированию ААФ/ЧГЭ модели печеночной недостаточности, по 10 животных в каждой группе. Для формирования модели ААФ вводился из расчета 30 мг/кг массы тела в течение 5 суток интрагастрально в виде масляного раствора. На пятые сутки проводилась частичная гепатэктомия (ЧГЭ) по Хиггинсу. Одновременно с проведением частичной гепатэктомии в большой сальник имплантировали макропористые альгинат-желатиновые носители. Животным группы 2 имплантировали носители без клеток, а животным группы 3 – носители с иммобилизованными в них КФП.

Период наблюдения за животными после формирования модели и имплантации макропористых губок составил 4 недели. На 7, 14, 21 и 28 сутки проводился забор крови у животных. Количество эритроцитов подсчитывали в камере

Горяева по унифицированному методу при помощи светового микроскопа. Кровь предварительно разводили с целью уменьшения числа клеток, подлежащих подсчету. В химические пробирки отмеряли пипеткой по 4 мл 3%-ного раствора хлорида натрия с последующим добавлением в него 0,02 мл крови. Взвесь тщательно перемешивали и затем заполняли камеру. Покровное стекло притирали к камере так, чтобы появились радужные кольца. Каплю разведенной крови вносили пипеткой под притертое покровное стекло камеры. После заполнения камеру оставляли на 1-2 минуты в покое для оседания форменных элементов крови, затем приступали к подсчету при малом увеличении микроскопа в затемненном поле зрения.

Эритроциты считали в 5 больших квадратах, расположенных по диагонали. Количество эритроцитов в 1 мл крови рассчитывали по формуле: $(a * 4000 * 200) / 80$,

где a – число подсчитанных эритроцитов,
4000 – приведение к объему 1 мкл крови,
200 – степень разведения,
80 – количество малых квадратов.

Содержание гемоглобина определяли по методу [17] с использованием стандартных наборов Lachema.

Препараты для гистологического исследования готовили по общепринятой методике. После фиксации препараты промывали, обезжировали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4-5 мкм анализировали с помощью светового микроскопа после окрашивания гематоксилином Эрлиха и эозином по общепринятой методике.

Полученные результаты обрабатывали статистически. Данные представлены как $M \pm m$. Достоверность различий оценивали, используя непараметрический метод Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлен гистологический срез альгинат-желатиновой макропористой губки, использованной в данном исследовании. Видно, что нити альгината с химически присоединенными к ним молекулами желатина образуют сеть с большими взаимосвязанными порами диаметром 150-200 мкм. Наличие пор такого размера дает возможность клеткам свободно проникать, распределяться, расти и мигрировать внутри скаффолда. Вместе с тем очевидно, что через поры таких больших размеров способны проникать и клетки хозяина, и таким образом, макропористые губки не выполняют

роль иммуноизолятора. Для предотвращения проникновения в альгинат-желатиновые губки клеток хозяина их покрывали оболочкой из альгинатного геля. Для этого в широкопористые губки помещали КФП, а затем организовывали оболочку путем кратковременной экспозиции в растворе альгината натрия с последующей полимеризацией в кальций-содержащей среде.

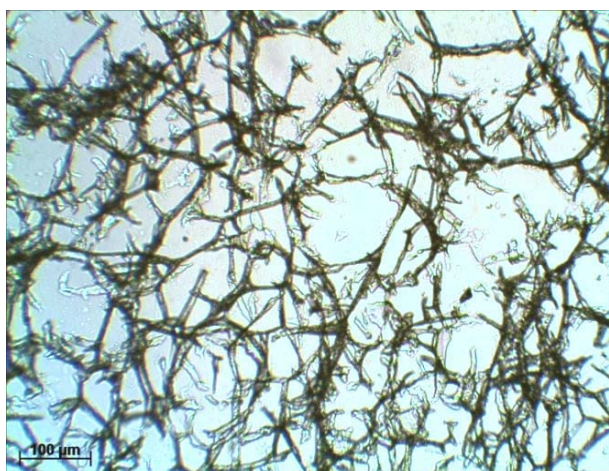


Рис.1. Структура альгинат-желатиновой макропористой губки. Серийный парафиновый срез, толщина 10 мкм, Ув. X 100

Рисунок 2. показывает, что через 28 суток после введения в сальник животных таких модифицированных альгинат-желатиновых губок альгинатная оболочка сохраняется, препятствуя проникновению клеток хозяина, которые образуют вокруг губки капсулу. В то же время внутри губок обнаруживаются КФП, которые имеют фибробластоподобную морфологию и заполняют пространство между наружными и внутренними поверхностями пор. О жизнеспособности и функциональной активности КФП в составе широкопористых губок можно судить по синтезированному ими экстраклеточному матриксу, частично заполняющему пространство пор. В препаратах присутствуют также клетки эритроидного ростка, образующиеся в результате дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников фетальной печени.

Определение лабораторных показателей крови показало, что на 7-е сутки после проведения ЧГЭ количество эритроцитов у животных 2 группы снижалось в 1,46 раза ($6,49 \pm 0,5$ млн/мкл, $p \leq 0,01$) по сравнению с интактной группой ($9,83 \pm 0,27$ млн/мкл) и оставалось достоверно ниже на протяжении всего периода наблюдения (рис. 3, А). У животных, которым вводили КФП (группа 3), данный показатель существенно не

отличался от значений группы 2 в течение 7-14 суток наблюдения, однако на 21-е сутки содержание эритроцитов увеличивалось на 37 % ($8,47 \pm 0,5$, $p < 0,05$).

Концентрация гемоглобина (рис. 3, Б) у животных 2 группы снижалась на 7 сут. после ЧГЭ на 22% ($189,4 \pm 6,2$ г/л, $p < 0,05$) по сравнению с интактными одновозрастными животными ($243 \pm 10,8$ г/л) и оставалась достоверно сниженной в течение всего периода наблюдения. У животных, которым вводили КФП (группа 3), показатель достоверно повышался по сравнению с группой 2 на 14 сутки эксперимента на 15,1% ($215,7 \pm 6$ г/л, $p < 0,05$), а на более поздних сроках наблюдения (21-28 сут) нормализовался.

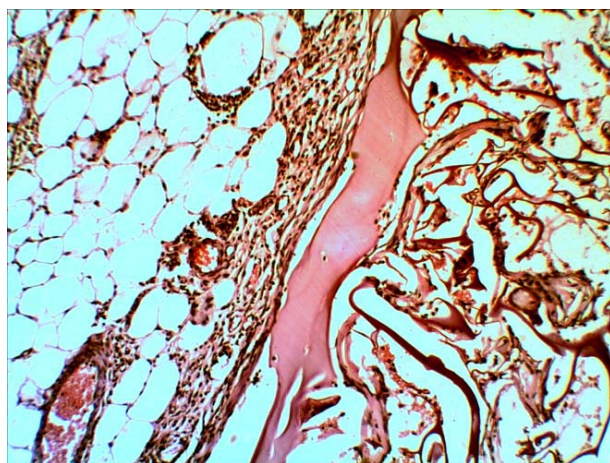


Рис. 2. Альгинат-желатиновая макропористая губка, заселенная клетками фетальной печени и покрытая оболочкой из альгината через 28 суток после подсадки в сальник крыс со сформированной моделью ААФ/ЧГЭ. Окрасивание гематоксилином и эозином. Ув. X 100

Поскольку печень является одним из основных депо крови, ЧГЭ сопровождается значительной кровопотерей и, как следствие, снижением содержания эритроцитов и гемоглобина в крови. Предварительная обработка животных гепатотоксином ААФ препятствовала быстрой регенерации печени и, соответственно, восстановлению гемодинамики. Действительно, после проведения частичной гепатэктомии в сочетании с ААФ (группа 2) содержание эритроцитов и гемоглобина в крови крыс снижалось и оставалось значительно ниже контрольных значений на протяжении всего периода наблюдения (28 суток). При введении крысам одновременно с ЧГЭ клеток фетальной печени (группа 3) уровни эритроцитов и гемоглобина крови в первые 2 недели эксперимента не отличались от значений

группы 2, однако через 3 недели наблюдалось достоверное повышение этих показателей, а через 4 недели – содержание гемоглобина норма-

лизовалось, а уровень эритроцитов хоть и не достигал нормы, но был достоверно выше значений, полученных в отсутствие клеток.

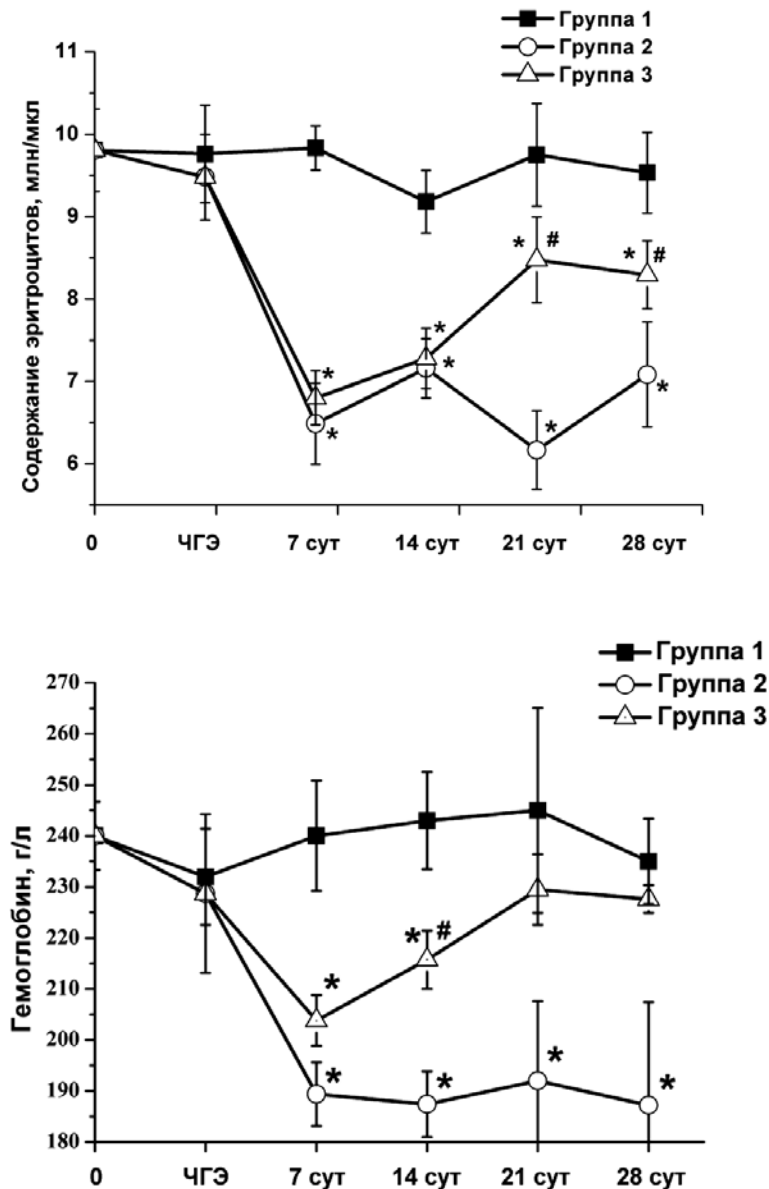


Рис. 3. Содержание эритроцитов (А) и концентрация гемоглобина (Б) в крови крыс с моделью ААФ/ЧГЭ после имплантации в сальник криоконсервированных клеток фетальной печени, иммобилизованных в макропористых альгинатных губках

* – $p \leq 0,05$ относительно группы 1,
– $p \leq 0,05$ относительно группы 2.

Выявить позитивный терапевтический эффект КФП в отдаленные сроки после развития постгеморрагической анемии удалось благодаря комплексному подходу, включающему выбор адекватной экспериментальной модели, трансплантата и условий, которые обеспечивают его длительную жизнеспособность в организме жи-

вотного-реципиента. Действительно, модель ААФ/ЧГЭ, которая формируется достаточно быстро (в течение 5 дней), позволяет обеспечить стабильные низкие показатели уровней гемоглобина и эритроцитов в течение, по крайней мере, 4 недель. Следует отметить, что аналогичная картина наблюдается и при определении

других показателей печеночной недостаточности, таких как уровень билирубина, альбумина, трансфераз и др. [3].

Для выполнения специфической функции необходимо обеспечить жизнеспособность введенных клеток, их снабжение кислородом, питательными веществами и трофическими факторами. Эти условия достигаются трансплантацией в места, прилегающие к кровеносным сосудам. В настоящей работе клетки трансплантировали в сальник, который по мнению ряда авторов служит одним из лучших сайтов гетеротопической трансплантации [12, 16].

Для исключения распознавания трансплантированных КФП и, соответственно, элиминации их иммунной системой хозяина, клетки помещали в макропористые губки, которые затем покрывали полупроницаемой альгинатной капсулой. При этом альгинатная капсула обеспечивала иммуноизоляцию, не препятствуя снабжению клеток биологически активными веществами [11], а широкие взаимопересекающиеся поры альгинатных губок, стенки которых покрыты молекулами желатина, обеспечивали пространственное распределение клеток в носи-

теле, их адгезию и форму, необходимую для функциональной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе показано, что клетки фетальной печени, иммобилизованные в широкопористых носителях, после трансплантации в сальник крыс с модельной геморрагической анемией оказывали позитивный эффект на содержание эритроцитов и гемоглобина. Механизм выявленного терапевтического эффекта трансплантированных клеток требует дальнейшего изучения. Одним из таких механизмов следует рассматривать синтез клетками эритропоэтина и/или других цитокинов и ростовых факторов, способных стимулировать эритропоэз. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности разработки новых методов лечения анемий, индуцированных хроническими инфекциями, апластической анемии, анемии при беременности, при хронической почечной недостаточности, при синдроме приобретенного иммунодефицита, основанных на принципах регенеративной медицины и тканевой инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние криоконсервирования на иммунологическую активность и фенотипический состав лимфоидных клеток эмбриональной печени человека / Ю.А. Петренко, А.И. Тарасов, В.И. Грищенко, А.Ю. Петренко // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 4. – С. 76-79.
2. Гусева С.А. Анемии / С.А. Гусева, Я.П. Гончаров. – К.: Логос, 2004.-408 с.
3. Криоконсервированные клетки фетальной печени, заключенные в макропористые носители, способствуют восстановлению функций печени после поражения 2-ацетиламинофлуореном / Д.В. Грищай, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко, А.Ю. Петренко // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, № 1. – С. 88-96.
4. Свойства мезенхимальных стромальных клеток при инкапсуляции в альгинатные микросферы / А.И. Правдок, Ю.А. Петренко, Н.А. Волкова, А.Ю. Петренко // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, №2.- С. 62-70.
5. Decellularized Liver Matrix as a Carrier for Transplantation of Human Fetal and Primary Hepatocytes in Mice / Ping Zhou, N. Lessa, D.C Estrada. [et al.] // Liver Transpl. – 2011 – Vol. 17, N 4. – P. 418-427.
6. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells / Yu.A. Petrenko, R.V. Ivanov, A.Yu. Petrenko [et al.] // J. Mater. Sci., Mater. Med. – 2011. – Vol. 22, N 6. – P. 1529-1540.
7. Engraftment kinetics of human cord blood and murine fetal liver stem cells following in utero transplantation into immunodeficient mice / A. Schoeberlein, S. Schatt, C. Troeger [et al.] // Stem. Cells. Dev. – 2004. – Vol. 13, N 6. – P. 677-684.
8. Ghidoni I. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine / I. Ghidoni, T. Chlapanidas, M. Bucco // Cytotechnology. — 2008. — Vol. 58, N 1. — P. 49-56.
9. Hepatocyte Behavior Within Three-Dimensional Porous Alginate Scaffolds / R. Glicklis, L. Shapiro, R. Agbaria [et al.] // Biotechnology Bioengineering. – 2000. – Vol. 67, N 3. – P.344-353.
10. Human fetal liver stromal cells expressing erythropoietin promote hematopoietic development from human embryonic stem cells / C. Yang, L. Ji, W. Yue [et al.] // Cell Reprogram. – 2012. – Vol. 14, N 1. – P. 88-97.
11. Lim F. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas / F. Lim, A. M. Sun // Science. — 1980. — Vol. 210, N 4472. — P. 908-910.
12. Ohashi K. Liver tissue engineering: the future of liver therapeutics / K. Ohashi // Hepatol. Res. – 2008. – Vol. 38. – S76-S87.
13. Park D.Y. Transforming Growth Factor- β 1 Protein, Proliferation and Apoptosis of Oval Cells in Acetylaminofluorene-Induced Rat Liver Regeneration / D.Y. Park, K.S. Suh // J. Korean Med. Sci. – 1999. – Vol. 14. – P. 531-538.
14. Participation of liver progenitor cells in liver regeneration: lack of evidence in the AAF/PH rat model / A.C. Dusabineza, N.K. Van Hul, J Abarca-Quinones, P Starkel [et al.]. // Lab. Invest. – 2011. – Sep 12. doi: 10.1038/labinvest.2011.136.

15. Petrenko A.Yu. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration / A.Yu. Petrenko, A.N. Sukach // *Analytical Biochem.* – 1991. – Vol. 194, N 2. – P. 326-329.

16. Toward engineering of vascularized three-dimensional liver tissue equivalents possessing a clinically

significant mass / Y. Sakai, H. Huang, S. Hanada, T Niino // *Biochem. Engl. J.* – 2010. – Vol. 48. – P. 348-361.

17. Van Kampen E.J. Standardisation of haemoglobinometry. 2: The hemiglobincyanide method / E.J. Van Kampen, W.G. Zijlstra // *Clin. Chim. Acta.* -1961. - N 6. -P.538–544.

REFERENCES

1. Petrenko YuA, Tarasov AI, Grishchenko VI, Petrenko AYu. [Cryopreservation effect on immunologic activity and phenotypic composition of human embryonic liver lymphoid cells. *Problemy kriobiologii*]. 2002;4:76-79. Russian.

2. Guseva SA, Goncharov YaP. [Anemia] Kiev: Logos. 2004;408. Russian.

3. Gritsay DV, Lebedinskiy AS, Ochenashko OV, Petrenko AYu. [Cryopreserved fetal liver cells immobilized in macroporous carriers promote liver recovery after injury with 2-acetylaminofluorene]. *Problemy kriobiologii*. 2012;22(1):88-96. Russian.

4. Pravdyuk AI, Petrenko YuA, Volkova NA, Petrenko AYu. [Properties of mesenchymal stromal human cells encapsulated in alginate microbeads]. *Biotekhnologiya*. 2010;3(2):62-70. Russian.

5. Ping Zhou, Lessa N, Estrada DC. Decellularized Liver Matrix as a Carrier for Transplantation of Human Fetal and Primary Hepatocytes in Mice. *Liver Transpl.* 2011;17(4):418–27.

6. Petrenko YuA, Ivanov RV, Petrenko AYu, Lozinsky VI. [Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells]. *J. Mater. Sci., Mater. in Med.* 2011;22(6):1529-40. Russian.

7. Schoeberlein A, Schatt S, Troeger C, Surbek D, Holzgreve W, Hahn S. Engraftment kinetics of human cord blood and murine fetal liver stem cells following in utero transplantation into immunodeficient mice. *Stem Cells Dev.* 2004;13(6):677-84.

8. Ghidoni I, Chlapanidas T, Bucco M. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. *Cytotechnology*. 2008;58(1):49–56.

9. Glicklis R, Shapiro L, Agbaria R. Hepatocyte Behavior Within Three-Dimensional Porous Alginate Scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000;67(3):344-53.

10. Yang C, Ji L, Yue W, Shi SS, Wang RY, Li YH, Xie XY, Xi JF, He LJ, Nan X, Pei XT. Human fetal liver stromal cells expressing erythropoietin promote hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Cell Reprogram.* 2012;14(1):88-97.

11. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science (New York, N.Y.)*. 1980;210(4472):908–10.

12. Ohashi K. Liver tissue engineering: the future of liver therapeutics. *Hepatology*. 2008;38(1):76-88.

13. Park DY, Suh KS. Transforming Growth Factor- β 1 Protein, Proliferation and Apoptosis of Oval Cells in Acetylaminofluorene-Induced Rat Liver Regeneration. *J Korean Med Sci.* 1999;14:531-8.

14. Dusabineza AC, Van Hul NK, Abarca-Quinones J, Starkel P, Najimi M, Leclercq IA. Participation of liver progenitor cells in liver regeneration: lack of evidence in the AAF/PH rat model. *Lab Invest.* 2011;91:1036-1038.

15. Petrenko AYu, Sukach AN. Isolation of intact mitochondria and hepatocytes using vibration. *Analytical Biochem.* 1991;194(2):326-29.

16. Sakai Y, Huang H, Hanada S, Niino T. Toward engineering of vascularized three-dimensional liver tissue equivalents possessing a clinically significant mass. *Biochem. Eng. J.* 2010;48:348-61.

17. Van Kampen. EJ, WG Zijlstra. Standardisation of haemoglobinometry. 2: The hemiglobincyanide method. *Clin Chim Acta.* 1961;6:538–44.

Стаття надійшла до редакції
13.02.2014

