

## Разновидности бесклеточных каркасов в тканевой инженерии и способы их получения

А.Ю. Пульвер<sup>1</sup>, Б.Е. Лейбович<sup>1,3</sup>, Р.А. Полтавцева<sup>2</sup>, А.Н. Шевцов<sup>1</sup>, Н.А. Пульвер<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НПО ООО «Институт биологии старения», Воронеж, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup> Негосударственное учреждение здравоохранения «Дорожная клиническая больница на станции Воронеж-1 ОАО «РЖД»», Воронеж, Россия

*Актуальность:* создание рассматриваемых в статье основных разновидностей биоинженерных бесклеточных каркасов (внеклеточных матриц, ВКМ) стало признанным методом в бурно развивающейся области регенеративной медицины.

*Цель исследования:* анализ источников литературы, рассматривающих проблемы создания искусственных трехмерных каркасов, имитирующих состав и функции ВКМ, для обеспечения микроокружения, близкого к естественному, в дискурсе сравнения преимуществ использования различных нативных ВКМ, взятых из тканей и органов, а также синтезированных *in vitro* клеточными культурами.

*Материалы и методы:* обзор источников литературы.

*Результаты:* рассмотрены свойства ВКМ *in vivo* и *in vitro*, а также основные разновидности современных методов децеллюляризации, с упором на органо- и тканеспецифичные разновидности ВКМ.

*Выводы:* проведено развернутое сравнение преимуществ и недостатков различных типов бесклеточных каркасов.

**Ключевые слова:** 3D клеточные культуры, внеклеточный матрикс, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, тканевая инженерия

**Для корреспонденции:** Борис Ефимович Лейбович. E-mail: bel.46@mail.ru

**Для цитирования:** А.Ю. Пульвер, Б.Е. Лейбович, Р.А. Полтавцева, А.Н. Шевцов, Н.А. Пульвер. Разновидности бесклеточных каркасов в тканевой инженерии и способы их получения. Клини. эксп. морфология. 2019;8(3): 21-27. DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.21-27

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 31.07.2019. Получена после рецензирования 22.08.2019. Принята в печать 18.09.2019.

## Tissue engineering scaffold subtypes and methods for the production thereof

A.Yu. Pulver<sup>1</sup>, B.E. Leibovich<sup>1,3</sup>, R.A. Poltavtseva<sup>2</sup>, A.N. Shevtsov<sup>1</sup>, N.A. Pulver<sup>1</sup>

<sup>1</sup> R&B «Institute of Biology of Aging», LLC, Voronezh, Russia

<sup>2</sup> VI Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Non-state health care facility «Road Clinical Hospital at the station Voronezh-1 of JSC «Russian Railways» (RZhD CST)», Voronezh, Russia

*Relevance:* the production of the main tissue-engineered acellular scaffolds (extracellular matrixes, ECM) described in this article has become a recognized method in the rapidly developing field of regenerative medicine.

*The aim of the study* was to review current literature that analyzes problems of creating artificial three-dimensional scaffolds mimicking natural ECM composition and functions and to compare the advantages of using different native ECMs obtained from tissues and organs, as well as synthesized *in vitro* are compared.

*Materials and methods:* literature review.

*Results:* in this work the ECM characteristics *in vivo* and *in vitro*, as well as the varieties of modern techniques of decellularization, with an emphasis on organ- and tissue-specific ECMs, were analyzed.

*Conclusions:* a detailed comparison of the advantages and disadvantages of various types of acellular scaffolds was carried out.

**Key words:** 3D cell cultures, extracellular matrix, mesenchymal multipotent stromal cells, tissue engineering

**Corresponding author:** Boris E. Leibovich. E-mail: bel.46@mail.ru

**For citation:** A. Yu. Pulver, B.E. Leibovich, R.A. Poltavtseva, A.N. Shevtsov, N.A. Pulver. Tissue engineering scaffold subtypes and methods for the production thereof. Clin. exp. morphology. 2019;8(3):21-27. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.21-27

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** Received in revised forms Accepted:

Тканевая инженерия, соединяющая воедино клетки, биологически совместимый материал клеточных каркасов и биологически активные молекулы, зарекомендовала себя в качестве многообещающего терапевтического подхода при лечении ряда заболеваний и травм, что особенно важно, учитывая разнообразие медицинских проблем, не поддающихся доступным на сегодняшний день методам лечения [1, 2].

Все трехмерные клеточные культуры по сути своей являются «органотипическими», в той или иной мере имитируют состав и функции внеклеточного матрикса (ВКМ), или бесклеточного каркаса определенной ткани. ВКМ не только представляют собой формообразующий фактор, но и контролируют функции клеток и стимулируют образование новых тканей [3]. Каркасы являются субстратом для засеянных на них клеток и обеспечивают физические и биологические сигналы, необходимые для адгезии и миграции клеток «на свои места», пролиферации и дифференцировки. С течением времени каркасы постепенно резорбируются, полностью замещаясь «родными» элементами ВКМ, синтезированными клетками. Для этого трехмерные каркасы должны быть биосовместимыми, биодеградируемыми, при этом регулировать клеточную пролиферацию, морфогенез и дифференцировку, подобно нативным ВКМ [4, 5]. Другие важные направления тканевой инженерии – двухмерные плоские подложки, которые используются для пассажа *in vitro* культур соматических и стволовых клеток, а также их трехмерные производные. Подобные подложки должны обладать способностью обеспечивать максимальный рост числа клеток, не влияя на их фенотип и генотип.

Наряду с этим ВКМ способны модулировать сигнальную трансдукцию, осуществляемую различными биологически активными молекулами, такими как факторы роста и цитокины [6]. Молекулярный состав и трехмерная структура ВКМ в каждой конкретной ткани и органе индивидуальны, постоянно динамично меняются и перестраиваются. В идеале каркасы и подложки, используемые в тканевой инженерии, должны обеспечивать для культивируемых клеток микроокружение, близкое к естественному. Естественные же ВКМ имеют очень сложную структуру, так что, несмотря на многочисленные исследования в этой области [7], до сих пор не установлено строение целого ряда входящих в их состав белков и гликопротеинов. Помимо трудности имитации со-

става ВКМ столь же трудно воссоздать его сложную микроструктуру и архитектуру молекулярных сетей. Из-за перечисленных проблем в ближайшем будущем у тканевой инженерии нет иных перспектив, кроме использования уже готовых ВКМ – либо из натуральных тканей и органов, либо синтезированных *in vitro* клеточными культурами.

### Роль ВКМ *in vivo*

ВКМ различных тканей представляют собой сложные комплексы, состоящие из множества разнообразных полисахаридов, белков, гликопротеидов и протеогликанов. Адгезия клеток к ВКМ осуществляется с помощью специализированных рецепторов (интегринов), благодаря чему *in vivo* поддерживается тканевая архитектура. ВКМ способны не только поддерживать тканевую архитектуру, но и регулировать функции клеток несколькими способами [5]. Взаимосвязь между молекулами ВКМ и специфическими клеточными рецепторами напрямую активирует внутриклеточные сигнальные пути. Например, при отслойке клеток от матрикса сигнальная трансдукция, вызванная интегринными, запускает апоптоз [8]. Интегрины непосредственно активируют различные протеинкиназы [9] и даже Rho-киназу, тем самым вызывая сборку актиновых волокон [10]. Кроме прямой активации сигнальных путей ВКМ могут также активировать клеточные функции непрямыми способами. В настоящее время известно два таких способа: модуляция активности цитокинов путем их депонирования и связывания [11, 12], а также трансдукция механических сигналов [13].

Свойства ВКМ (состав, микроструктура и эластичность) меняются в зависимости от типа ткани и определяют тканеспецифичные функции клеток [7]. Более того, состав и морфология ВКМ различаются в зависимости от стадий развития и при разнообразных патологических состояниях, таких как фиброз, даже в пределах одной и той же ткани [14, 15].

### Виды бесклеточных матриксов и методы децеллюризации

Для получения бесклеточных каркасов, имитирующих естественные ВКМ, из тканей селективно удаляются все клетки путем разрушения межклеточных связей, клеточных мембран и высвобождения клеточного содержимого, которое затем вымывается. Методы децеллюризации многочисленны и разнообразны [16–21]:

**Физические методы:**

- встряхивание;
- разрушение ультразвуком;
- механическое растирание;
- высокое гидростатическое давление (более 2500 атмосфер);
- замораживание/оттаивание.

**Методы ферментативного воздействия:**

- использование протеаз;
- использование нуклеаз.

**Химические методы:**

- обработка щелочами;
- обработка кислотами;
- обработка детергентами;
- обработка органическими растворителями;
- обработка хелатирующими реагентами;
- обработка гипо- или гипертоническими растворами.

У всех перечисленных методов имеется множество недостатков. С их помощью эффективно удаляются клеточные компоненты, но одновременно на состав, биологическую активность и биомеханические свойства остающегося в результате внеклеточного матрикса оказывается ряд неблагоприятных воздействий. Как правило, используется комбинация различных методов, чтобы усилить суммарный децеллюляризирующий эффект, одновременно ослабив возможное нежелательное воздействие на ВКМ. Считается, что для каждого органа и ткани методы децеллюляризации должны быть своими.

В настоящее время в тканевой инженерии применяются бесклеточные ВКМ-каркасы из большого числа разных тканей:

- сердца [22];
- сердечных клапанов [23];
- кровеносных сосудов [24, 20];
- подслизистой оболочки тонкой кишки [3];
- легких [25, 26];
- трахеи [27];
- кожи [28];
- нервов [29, 30];
- роговицы [31];
- пищевода [17, 32];
- печени [33, 34];
- почек [35];
- мочевого пузыря [17, 36];
- хрящевой ткани [37];
- связок [21];
- жировой ткани [38, 39];
- амниотической оболочки [40].

Производство некоторых из упомянутых каркасов было поставлено на промышленную основу для применения в терапевтических целях. Из числа коммерчески доступных бесклеточных ВКМ-каркасов наиболее широко используются продукты из подслизистой оболочки кишечника и из производных кожной ткани.

**Культуральные ВКМ**

При культивировании клеток *in vitro* молекулы ВКМ секретируются клетками на подложку в месте их прикрепления, благодаря чему образование, подобное ВКМ, может формироваться *in vitro* [41, 42]. После предварительной децеллюляризации такие матриксы могут быть использованы в качестве субстрата для новой культуры клеток. Особенно перспективен этот метод в сочетании с различными искусственными биосовместимыми материалами, начиная от шелка и заканчивая трехмерными полимерными наносетками сложной структуры.

Сформированные культивируемыми клетками ВКМ описываются начиная с 1970-х годов [43]. В настоящее время существует множество их разновидностей. Создан аналог базальной мембраны, образованный клетками легочного эпителия [44, 45], выращиваемыми на пластинах из высушенного коллагена с живыми фибробластами, или на так называемом матрикеле – коллагеновых пластинках, обогащенных белками базальной мембраны, продуцированными культурой клеток саркомы. Под слоем клеток в культуре образовывалась четко выраженная (электронно-микроскопически определяемая) базальная мембрана. Полученный субстрат в дальнейшем использовали для культивирования гепатоцитов. При этом на такой модели базальной мембраны первичные гепатоциты поддерживали жизнеспособность дольше, а уровень синтеза альбумина и экспрессии гена цитохрома P450 был существенно выше, чем при других условиях культивирования [45].

Матриксы, формируемые клетками, могут использоваться для модификации поверхностей биологически инертных материалов, например титана, сплавы которого не являются остеокондуктивными и имеют низкое сродство к клеткам. Для модификации титановых поверхностей на них культивировались остеобластоподобные клетки линии SAOS-2 [46]. После образования слоя белков ВКМ на металле клетки удаляли. Адгезия клеток к титану, покрытому бесклеточным матриксом, и рост культуры были существенно выше, чем при использовании чистых титановых и покрытых RGD-пептидом или фибронектином поверхностей.

**Тканеспецифичные ВКМ**

Для исследования первичных культур подавляющего большинства разновидностей клеток *in vitro* требуются по крайней мере аналоги тканеспецифичных ВКМ. Например, синусоидальные клетки эндотелия, обладая тропностью к ВКМ-каркасам из тканей печени, не заселяют матриксы, полученные из подслизистой оболочки тонкой кишки или базальной мембраны мочевого пузыря [47]. Первичные гепатоциты в неподходящем микроокружении (в первую очередь при культивировании *in vitro*) теряют способность к синтезу альбумина и метаболизму лекарственных препаратов. Потеря их специфических функций является

одной из главных проблем инженерии ткани печени. Первой успешной попыткой сохранения у первичных гепатоцитов специфических для клеток печени функций при культивировании был первичный матрикс из ткани печени, подвергнутой гомогенизации. К такому бесклеточному матриксу первичные гепатоциты могут прикрепляться, сохраняя при этом способность синтезировать альбумин в течение приблизительно 3 месяцев [33].

### Органные ВКМ

Бесклеточные ВКМ целых органов получают, децеллюляризируя целые органы растворами (в том числе сверхкритическими), в частности флюидом CO<sub>2</sub> [48, 49] веществ-децеллюляризаторов, после чего пытаются «восстанавливать» их, заселяя различными типами клеток [26, 50].

Ott et al. первыми получили бесклеточные матриксы целых крысиных сердец [22] путем децеллюляции методом перфузии. После заселения матриксов неонатальными кардиомиоцитами уже через 4 недели невооруженным глазом наблюдались видимые сокращения, а еще через 8 дней появилась даже насосная функция (правда, не более 1% от производительности живого сердца). Подобным же способом (длительная перфузия раствором с повышающейся концентрацией детергентов после замораживания/оттаивания) были получены бесклеточные матриксы, приготовленные из целой печени крысы [34]. После заселения гепатоцитами и эндотелиальными клетками получившиеся «органы» демонстрировали характерные для печени функции: продукцию альбумина, синтез мочевины и детоксикацию; будучи гетеротопически подсажены крысам, успешно «работали» в течение 8 часов. В 2010 году три группы исследователей одновременно получили «восстановленное» легкое крысы из децеллюляризованного матрикса [25, 26, 50]. Для децеллюляции был также использован перфузионный метод. Полученные бесклеточные матриксы легких обладали относительно интактными структурами сосудистой сети, дыхательных путей и альвеол. После заселения (рецеллюляризации) клетками легочного эпителия и эндотелиальными клетками матриксы культивировали в биореакторе, имитирующем физиологические условия окружающей среды живого легкого. При ортотопической трансплантации «восстановленные легкие» нормально кровоснабжались и поддерживали внешнее дыхание и газообмен в течение нескольких часов. В 2009 году китайскими [51] и в 2010 году японскими исследователями [35] были получены бесклеточные матриксы почек макака-резуса. «Восстанавливать» почки эти специалисты, впрочем, не пытались: первые просто показали возможность получения ВКМ перфузионным методом, а вторые выращивали на секциях полученного матрикса фетальные почечные эксплантаты, наблюдая хорошее прикрепление, миграцию и рост клеток на матриксе.

### Медицинские перспективы применения ВКМ

Методик, пригодных для клинического применения, то есть с достаточной массой живых клеток «восстановленных псевдоорганов» больших размеров из обезьяньего, человеческого, свиного и коровьего трупного материала, в настоящее время не существует. Самые крупные рецеллюляризованные органы ВКМ – почки макака-резуса [52] и печень крыс [53, 54]. Сердца и легкие крыс также не требуют значительного количества кислорода и питательных веществ, особенно с учетом того, что клеточная плотность «восстанавливаемых тканей» намного меньше, чем у здоровых органов, – все занимаются проверкой потенциальной применимости метода, а ни о каком практическом использовании речи идти не может. Тем не менее уже на этом уровне начинают проявляться лимитирующие свойства недостаточного содержания кислорода в культуральных средах, что порой заставляло исследователей включать в состав перфузата эритроциты.

К сожалению, пока адекватной перфузионной среды с газотранспортной функцией не существует [55]. Недавно, однако, претензию на создание такой среды выдвинула французская биотехнологическая компания HemaGina S.A, разработавшая ряд препаратов на основе внеклеточного дыхательного пигмента морских полихет *Arenicola marina* [56, 57]: кислородопереносящую биодобавку к биотехнологическим средам HEMOXCell®/HEMUP-Stream®, аддитив для растворов консервации органов HEMO2life®, универсальный кислородопереносящий кровезаменитель HEMOXYCarrier® и даже «оксигенирующий» перевязочный материал HEMHealing® (как они его называют, «новое терапевтическое решение для язв диабетической стопы и пролежней»).

Помимо отсутствия адекватной газотранспортной перфузионной среды [55] также имеются проблемы с доставкой клеточных элементов при попытках рецеллюляции ВКМ; к тому же способность к миграции присуща только некоторым специализированным клеточным типам, а не стволовым клеткам (последние к тому же обладают размерами, существенно превышающими просвет капилляров, зачастую вызывая эмболии при системном внутрисосудистом введении), которые наиболее перспективны с точки зрения будущего медицинского применения [58], и потому рецеллюляция производится при помощи банальных игольных инъекций в толщу скаффолда [22, 34, 35] с соответствующими повреждениями его структур, что негативно сказывается на конечных результатах.

Именно этими двумя причинами, на наш взгляд, и обусловлено отсутствие попыток клинического применения рецеллюляризованных органных ВКМ крупных животных, несмотря на уже 30-летний стаж тканевой инженерии как науки.



## Литература/References

1. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002;295(5557):1009–14.
2. Langer R. Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Mater.* 2009;21(32–33):3235–6.
3. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* 2009;5(1):1–13.
4. Adachi E, Hopkinson I, Hayashi T. Basement-membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *Int Rev Cytol.* 1997;173:73–156.
5. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285(5430):1028–32.
6. Rahman S, Patel Y, Murray J, Patel KV, Sumathipala R, Sobel M et al. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC Cell Biol.* 2005;6(1):8.
7. Manabe R, Tsutsui K, Yamada T, Kimura M, Nakano I, Shimono C et al. Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(35):12849–54.
8. Grossmann J. Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis--Anoikis”. *Apoptosis.* 2002;7(3):247–60.
9. Gu J, Fujibayashi A, Yamada KM, Sekiguchi K. Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19922–8.
10. Gu J, Sumida Y, Sanzen N, Sekiguchi K. Laminin-10/11 and fibronectin differentially regulate integrin-dependent Rho and Rac activation via p130(Cas)-CrkII-DOCK180 pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(29):27090–7.
11. Gutierrez J, Osses N, Brandan E. Changes in secreted and cell associated proteoglycan synthesis during conversion of myoblasts to osteoblasts in response to bone morphogenetic protein-2: role of decorin in cell response to BMP-2. *J Cell Physiol.* 2006;206(1):58–67.
12. Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Arikawa-Hirasawa E et al. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells.* 2007;25(9):2146–57.
13. Alcaraz J, Xu R, Mori H, Nelson CM, Mroue R, Spencer VA et al. Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *EMBO J.* 2008;27(21):2829–38.
14. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol.* 2003;200(4):504–15.
15. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 3):255–64.
16. Jackson DW, Grood ES, Cohn BT, Arnoczky SP, Simon TM, Cummings JF. The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73(2):201–13.
17. Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology.* 1998;51(2):221–5.
18. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology.* 1999;54(3):407–10.
19. McFetridge PS, Bodamyali T, Horrocks M, Chaudhuri JB. Endothelial and smooth muscle cell seeding onto processed ex vivo arterial scaffolds using 3D vascular bioreactors. *ASAIO J.* 2004;50(6):591–600.
20. McFetridge PS, Daniel JW, Bodamyali T, Horrocks M, Chaudhuri JB. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2004;70(2):224–34.
21. Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials.* 2005;26(35):7339–49.
22. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2004;14(2):213–21.
23. Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pautletto P et al. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO Project (Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingenioso Obtenibitur). *Ann Thorac Surg.* 2003;75(4):1274–82.
24. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res.* 1989;47(1):74–80.
25. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C., Pomerantseva I, Ikonomou L et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med.* 2010;16(8):927–33.
26. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science.* 2010;329(5991):538–41.
27. Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, Bellini S, Martorell J, Calore C et al. Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138(3):586–93.
28. Wainwright D, Madden M, Luteran A, Hunt J, Monafu W, Heimbach D et al. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil.* 1996;17(2):124–36.
29. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004;10(9–10):1346–58.
30. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004;10(11–12):1641–51.
31. Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S et al. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vis.* 2009;15:2022–8.
32. Ozeki M, Narita Y, Kagami H, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y et al. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for

- cultured esophageal epithelial cells. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(4):771–8.
33. *Rojkind M, Gatmaitan Z, Mackensen S, Giambone MA, Ponce P, Reid LM*. Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol*. 1980;87(1):255–63.
  34. *Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C et al*. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010;16(7):814–20.
  35. *Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF*. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue engineering. Part A*. 2010;16(7):2207–16.
  36. *Yang C, Hillas PJ, Baez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J et al*. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2004;18(2):103–19.
  37. *Stapleton TW, Ingram J, Katta J, Knight R, Korossis S, Fisher J et al*. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue engineering. Part A*. 2008;14(4):505–18.
  38. *Abberton KM, Bortolotto SK, Woods AA, Findlay M, Morrison WA, Thompson EW et al*. Myogel, a novel, basement membrane-rich, extracellular matrix derived from skeletal muscle, is highly adipogenic in vivo and in vitro. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(4):347–58.
  39. *Uriel S, Huang JJ, Moya ML, Francis ME, Wang R, Chang SY et al*. The role of adipose protein derived hydrogels in adipogenesis. *Biomaterials*. 2008;29(27):3712–9.
  40. *Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E*. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006;12(8):2117–29.
  41. *Grinnell F, Feld MK*. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem*. 1982;257(9):4888–93.
  42. *Hoshihara T, Cho CS, Murakawa A, Okahata Y, Akaike T*. The effect of natural extracellular matrix deposited on synthetic polymers on cultured primary hepatocytes. *Biomaterials*. 2006;27(26):4519–28.
  43. *Chen LB, Murray A, Segal RA, Bushnell A, Walsh ML*. Studies on intercellular LETS glycoprotein matrices. *Cell*. 1978;14(2):377–91.
  44. *Hosokawa T, Betsuyaku T, Nishimura M, Furuyama A, Katagiri K, Mochitate K*. Differentiation of tracheal basal cells to ciliated cells and tissue reconstruction on the synthesized basement membrane substratum in vitro. *Connect Tissue Res*. 2007;48(1):9–18.
  45. *Takashi H, Katsumi M, Toshihiro A*. Hepatocytes maintain their function on basement membrane formed by epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(1):151–6.
  46. *Pham MT, Reuther H, Maitz MF*. Native extracellular matrix coating on Ti surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66(2):310–6.
  47. *Sellaro TL, Ravindra AK, Stolz DB, Badyrak SF*. Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng*. 2007;13(9):2301–10.
  48. *Guler S, Aslan B, Hosseinian P, Aydin HM*. Supercritical Carbon Dioxide (sc-CO<sub>2</sub>) Assisted Decellularization of Aorta and Cornea. *Tissue engineering. Part C, Methods*. 2017;23(9):540–7.
  49. *Gupta SK, Mishra NC, Dhasmana A*. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. *Methods Mol Biol*. 2018;1577:1–10.
  50. *Price AP, England KA, Matson AM, Blazar BR, Panoskaltsis-Mortari A*. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. *Tissue engineering. Part A*. 2010;16(8):2581–91.
  51. *Liu CX, Liu SR, Xu AB, Kang YZ, Zheng SB, Li H*. Preparation of whole-kidney acellular matrix in rats by perfusion. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009;29(5):979–82.
  52. *Bonvillain RW, Scarritt ME, Pashos NC, Mayeux JP, Meshberger CL, Betancourt AM et al*. Nonhuman primate lung decellularization and recellularization using a specialized large-organ bioreactor. *J Vis Exp*. 2013;(82):e50825.
  53. *Shupe T, Williams M, Brown A, Willenberg B, Petersen BE*. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis*. 2010;6(2):134–6.
  54. *Struecker B, Butter A, Hillebrandt K, Polenz D, Reutzel-Selke A, Tang P et al*. Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(2):531–41.
  55. *Farris AL, Rindone AN, Grayson WL*. Oxygen delivering biomaterials for tissue engineering. *J Mater Chem B*. 2016;4(20):3422–32.
  56. *Le Pape F, Bossard M, Dutheil D, Rousselot M, Polard V, Ferrer C et al*. Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2015;43(3):186–95.
  57. *Le Pape F, Richard G, Porchet E, Sourice S, Dubrana F, Ferrer C et al*. Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human MSCs cultured under perfusion with a marine oxygen carrier on an allogenic bone substitute. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(1):95–107.
  58. *Poltavtseva RA, Poltavsev AV, Lutsenko GV, Svirshchevskaya EV*. Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy. *Cell Tissue Res*. 2019;375(3):563–74.

**Информация об авторах**

Александр Юрьевич Пульвер – генеральный директор, заведующий лабораторией Института биологии старения

Борис Ефимович Лейбович – заведующий отделением, врач-патологоанатом Дорожной клинической больницы на станции Воронеж-1 РЖД; патологоанатом, гистолог, Институт биологии старения

Римма Алексеевна Полтавцева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова

Артем Николаевич Шевцов – старший научный сотрудник, Института биологии старения

Наталья Александровна Пульвер – ассистент, Институт биологии старения

**Author information**

Alexander Yu. Pulver – General Director, Head of the Laboratory, Institute of Biology of Aging

<https://orcid.org/0000-0001-6673-1859>.

Boris Ye. Leibovich – Head of the pathology department, pathologist, Non-state health care facility «Road Clinical Hospital at the station Voronezh-1 of Russian Railways» pathologist, Institute of Biology of Aging

<https://orcid.org/0000-0003-2259-7656>.

Rimma A. Poltavtseva – Cand. Sci. (Biol.) Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, NMRC OGP named after V.I. Kulakov.

<https://orcid.org/0000-0001-8625-9205>.

Artyom N. Shevtsov – Senior Researcher, Institute of Biology of Aging

<https://orcid.org/0000-0001-8641-2847>

Natalya A. Pulver – Assistant, Institute of Biology of Aging

<https://orcid.org/0000-0003-4549-5476>.