

ОБЗОРЫ

DOI: 10.23868/201811028

ОРГАНОИДЫ ТКАНЕЙ ПИЩЕВОДА: ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ И ПОТЕНЦИАЛ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

З.Е. Гилазиева, С.С. Архипова, М.Н. Журавлева

*Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, Россия***ESOPHAGEAL ORGANOID: POSSIBILITY OF CREATING AND POTENTIAL IMPLICATIONS FOR TISSUE ENGINEERING**

Z.E. Gilazieva, S.S. Arkhipova, M.N. Zhuravleva

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

e-mail: gilazievazarema@mail.ru

Рак пищевода, врожденные аномалии, травматические повреждения и протяженные деформации пищевода, зачастую, требуют радикального оперативного лечения с последующей многоэтапной реконструкцией органа. Такие операции травматичны, а использование донорского пищевода связано с необходимостью длительной иммуносупрессии. Для замещения поврежденных отделов этого органа могут быть применены тканеинженерные конструкции, изготовленные путем совмещения малодифференцированных или специализированных клеток и натуральных либо синтетических матрикс-носителей, которые способны имитировать структуру и функции нативного органа. Такие конструкции не только перспективны для клинической практики, но также могут быть успешно использованы в качестве так называемых «органовидов» для изучения развития органов, патогенеза заболеваний и доклинического тестирования лекарственных препаратов.

В настоящем обзоре описываются возможности применения органоидов пищевода, систематизируются литературные данные по созданию органоидов и тканеинженерных прототипов пищевода и их трансплантации *in vivo*.

Ключевые слова: пищевод, органоид, тканеинженерные прототипы, каркас, тканевая инженерия.

Введение

В России ежегодно увеличивается распространённость заболеваний органов пищеварения, среди которых отмечается превалирование патологии верхних отделов желудочно-кишечного тракта, в частности, пищевода. При этом ряд заболеваний пищевода требует проведения радикальных операций с одномоментной или последующей реконструкцией. Среди таких заболеваний наиболее распространён рак пищевода — по частоте возникновения он занимает восьмое место среди всех онкологических заболеваний и третье место среди опухолей пищеварительного тракта [1]. В России только в 2016 г. было зарегистрировано 8060 случаев рака пищевода, при этом прирост за десятилетний период составил 9,25% [2]. Реконструктивных операций требуют также врожденные аномалии развития пищевода, такие как атрезия, которая встречается у 1 из 2500 новорожденных [3, 4]. С гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью в России в различные периоды своей жизни сталкивается 18–46% населения [5]. Ахалазия кардии, хроническое нервно-мышечное заболевание, приводящее к застою пищи в пищеводе, встречается в 10 случаях на 100 000 человек населения и достигает пика в возрастной группе 30–60 лет. Данные заболевания ведут к развитию эзофагита, который, в свою очередь, способствует формированию стриктур пищевода и онкологической патологии [6, 7]. Доброкачественные стриктуры пищевода чаще всего бывают вызваны гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и в 80–90% случаев успешно поддаются лечению эндоскопической дилатацией [8]. Однако в случае

Esophageal cancer, congenital anomalies, traumatic injuries and prolonged deformities of the esophagus often require radical surgical treatment followed by multi-stage organ reconstruction. Such operations are traumatic for the patient, and the use of the donor esophagus is associated with the need for prolonged immunosuppression. To replace a damaged tissue of the esophagus tissue-engineering structures can be applied. These tissue-engineering structures are based on the use of the association of differentiated or stem cells and natural or synthetic scaffolds, to create an artificial organ *in vitro* that can mimic an organ. Such formulations can be successfully used to study the development of organs, pathogenesis of diseases and preclinical studies of drugs as so-called “organoids”, and may also have a prospect for clinical use as tissue-engineered prototypes of the esophagus.

This review describes the possibilities of using esophageal organoids, systematizes the literature data on studies on the creation of organoids and tissue-engineered prototypes and their effect on the experimental model in transplantation.

Keywords: esophagus, organoid, tissue-engineered prototype, scaffold, tissue engineering.

намеренного или случайного проглатывания разъедающих веществ чаще образуются множественные протяженные кольцевые стриктуры и глубокие некрозы тканей верхних отделов пищеварительного тракта, требующие реконструктивных операций [9].

Реконструктивные операции на пищеводе, обычно подразумевающие замещение органа или его части фрагментом желудка либо кишки, весьма травматичны и, зачастую, проводятся в несколько этапов, что сопряжено с высоким риском осложнений, ростом интра- и послеоперационной заболеваемости и смертности [10]. Трансплантация донорского пищевода не представляется оптимальным подходом не только ввиду необходимости длительной иммуносупрессии, но и вследствие технической сложности формирования сосудистых анастомозов для кровоснабжения органа мелкими сосудами из различных бассейнов [11]. В литературе приводятся данные о высокой частоте фиброобразования и отсутствии сократительной способности аллотрансплантата, что также ограничивает применение метода [12]. Альтернативным подходом является замещение ткани пищевода синтетическими материалами, однако используемые на данный момент изделия не обладают оптимальными биосовместимостью и биомеханическими свойствами, поэтому их применение сопряжено с высоким риском развития серьезных осложнений, таких как несостоятельность анастомоза, перфорация, отторжение имплантата [10–13]. Исследования биосовместимых материалов важны в разработке биодеградируемых и нерезорбируемых стентов для лечения стриктур пищевода, пришедших на смену ранее применявшимся

голометаллическим стентам, которые вызывали большое количество осложнений, включая гиперпластический рестеноз, являющийся следствием реакции тканей на неоптимальный материал стента [14]. Новое направление в реконструктивной хирургии основано на применении тканеинженерных конструкций, представляющих собой совмещение собственных или донорских клеток и бесклеточного матрикса-носителя натурального или синтетического происхождения, с помощью которых создается искусственный прототип органа *in vitro*.

Еще одним новым направлением в тканевой инженерии является создание «органOIDов» — миниатюрных трехмерных (3D) структур, имитирующих орган *in vitro* [15–17]. ОрганOIDы пищевода чрезвычайно перспективны для изучения патогенеза различных заболеваний и оценки действия разрабатываемых лекарственных препаратов *in vitro*. Однако также представляет интерес и моделирование полноразмерных органов на основе технологии органOIDов для их применения в трансплантологии и реконструктивной хирургии.

Прототипы тканей, созданные *in vitro*, могут быть получены из собственных клеток пациента. В отличие от трансплантации донорских органов, созданные по принципу органOIDов аутогенные ткани не будут вызывать реакции отторжения и требовать иммуносупрессии. Таким образом, настоящий обзор посвящен изготовлению тканеинженерных прототипов пищевода на основе технологии органOIDов. Необходимо отметить, что данное направление тканевой инженерии только начинает развиваться и предстоит решить еще много задач, относящихся к созданию полноразмерных органов.

Создание органOIDов пищевода и их применение

Применение 3D клеточных культур в исследованиях направлено на устранение ограничений, существующих в 2D клеточных модельных системах, основу которых составляют иммортализованные или трансформированные клеточные линии. На сегодняшний день известен целый ряд технологий 3D клеточных культур, среди которых можно назвать органные культуры (эксплантаты), сфероиды, органOIDы, органотипические культуры на гидрогелях и твердых носителях, биочипы и структуры, создаваемые методом 3D биопечати [18]. Все они имеют свои преимущества и недостатки.

Органные культуры были одними из первых известных культур клеток. Основным их преимуществом является сохранение естественной тканевой архитектоники *in vitro*, наличие и взаимодействие всех видов клеток, характерных для органа. Однако органная культура неизбежно более сложна, чем любая другая 3D клеточная культура, она не поддается пересеву и генетическим манипуляциям, а пролиферация различных видов клеток *in vitro* отличается от таковой *in vivo*. Для получения сфероидов существуют отработанные методики, отличающиеся хорошей воспроизводимостью и поэтому подходящие для скрининговых исследований. Однако морфологическая организация сфероидов весьма примитивна и далека от органной структуры [15–17]. Органотипические культуры на гидрогелях и твердых носителях также являются весьма упрощенными моделями органов. 3D биопринтинг может обеспечить более точное воссоздание структуры органов и тканей, что перспективно для применения в персонализированной регенеративной медицине, однако требует тщательного подбора биочернил, отвечающих требованиям биосовместимости с культивируемыми клетками и одновременно обеспечивающих адекватные биомеханические свойства моделируемой ткани. Проблема васкуляризации и иннервации в целом характерна для всех вышеперечисленных

3D клеточных культур. Пожалуй, лишь в биочипах вопрос васкуляризации решается за счет применения микропотоковых систем, обеспечивающих постоянную контролируемую доставку питательных веществ и отведение продуктов клеточного метаболизма с возможностью их последующего анализа. Однако технология микрочипов сложна, и, зачастую, требует разработки нового устройства под каждый конкретный моделируемый объект.

ОрганOIDы также являются одной из разновидностей 3D клеточных культур. Они представляют собой агрегаты различных типов клеток, которые способны к самообновлению, самоорганизации и проявлению функциональности того органа, который они имитируют. ОрганOIDы имеют клеточный состав и строение, характерное для ткани, из которой они происходят, при этом различные типы клеток занимают свои ниши, что обеспечивает их взаимодействие, напоминающее физиологическое. Также органOIDы содержат небольшое количество самообновляющихся стволовых клеток, которые могут дифференцироваться в клетки всех основных клеточных линий с частотой, аналогичной в физиологическому состоянию, создавая модель органогенеза, подобие процессов регенерации и одновременно стабильную систему, пригодную для длительного культивирования [15–17].

В целом, органOIDы пищеварительного тракта и пищевода, в частности, можно классифицировать следующим образом: органOIDы, получаемые на основе первичных культур клеток (только эпителиальные органOIDы, эпителиально-соединительнотканые и эпителиально-мышечные органOIDы) и получаемые путем *de novo* дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток [19].

Эпителиальные органOIDы

Отличительной особенностью эпителиальных клеток является их природная способность к самоорганизации в тканеподобные структуры — органOIDы [20]. Например, I. Tait с соавт. (1994) показали, что клеточная суспензия из кишечного эпителия крыс при подкожном введении способна самоорганизовываться в трехмерную трубчатую структуру, морфологически схожую с нормальным эпителием тонкой кишки, имеющим крипты, ворсинки, бокаловидные клетки, и просветом, заполненным слизистым секретом [21]*.

Эпителий пищевода не имеет четко определенной ниши стволовых клеток. A. DeWart с соавт. (2014) обнаружили, что базальные клетки пищевода мыши — гетерогенная популяция, именно они являются источником обновления эпителия пищевода [22]. Авторы продемонстрировали способность $Itgb4^+$, $CD73^+$ -стволовых клеток базального слоя пищевода под воздействием питательной среды, содержащей B27, N-ацетил-L-цистеин, гастрин, никотинамид, эпидермальный фактор роста, ноггин и Wnt3A, образовывать трехмерные органOIDы, морфологически сходные с нативной тканью пищевода, имеющие крипты, и состоящие из трех слоев — базального, контактирующего с внеклеточным матриксом, промежуточного слоя с шиповатыми клетками и центрального — с плоскими покровными клетками. В этой работе иммуноцитохимическим методом было выявлено наличие пролиферирующих $CK14^+$, $p63^+$, $CK13^+$ -клеток в полученных структурах [22]. Таким образом, органOIDы пищевода, полученные *in vitro*, отражают

* Примечание редакции: основные закономерности преобразования тканей после подобных манипуляций были изучены в первой половине XX века Ф.М. Лазаенко и его сотрудниками. Их данные были обобщены в посмертной монографии Ф.М. Лазаренко, Закономерности роста и превращения тканей и органов в условиях культивирования (имплантации) их в организме, М., 1959.

архитектонику ткани *in vivo* и содержат субпопуляции клеток, дифференцирующихся в различных направлениях.

Важную роль для правильного формирования пищевода играют сигнальные пути *Wnt* и *Sox2*, которые контролируют нишу стволовых клеток в органоидах *in vitro* [23, 24]. Исследование проводилось на суспензии клеток в матрикеле при добавлении среды, лишенной агонистов *Wnt* (*Wnt3a/R-Spondin 2*). Органоиды генерировались с одинаковой эффективностью как в экспериментальной, так и в контрольной группах, где использовалась полная среда. Однако после диссоциации органоидов на отдельные клетки и попытки их репликации было обнаружено, что для самообновления клеток необходимы экзогенные *Wnt*-агонисты. Для определения влияния сигнального пути *Sox2* были выделены эпителиальные клетки пищевода мыши, из которых методом проточной цитофлуориметрии отобраны *EpCam⁺/Sox2⁺* и *EpCam⁺/Sox2⁻* клетки, после культивирования которых было найдено, что только *Sox2⁺*-клетки могут образовывать органоиды. Было доказано, что для клеток, экспрессирующих маркеры базальных клеток — интегрин *b1* (*Itgb1*, *CD29*) и *p75*, характерен фенотип *Sox2⁺* [25]. Таким образом, были охарактеризованы стволовые клетки пищевода и обнаружено, что их источником служат базальные клетки, имеющие фенотип *Itgb1⁺/CD29⁺/p75⁺/Sox2⁺*.

V. Giroux с соавт. (2017) на модели органоидов пищевода показали, что активность промотора *Krt15* является маркером долгоживущей субпопуляции базальных клеток в пищеводе, способных к генерации всех линий клеток плоского эпителия пищевода [26]. Также к маркерам базальных прогениторных клеток пищевода относят рецепторы нейротрофина *p75NTR*, интегрин $\beta 4$ и $\alpha 6$, продукт гена *ABCG2* [27].

Y. Kasagi с соавт. (2018) получили органоиды пищевода мыши и органоиды на основе клеток *EPC2-hTERT* человека, используя модифицированный протокол A. DeWart с соавт. (2014) [22] и изучили влияние сигнального пути *Notch* на их организацию [28]. Авторы доказали, что ингибирование *Notch*-сигнализации увеличивает содержание базальных клеток в органоидах пищевода и влияет на градиент дифференцировки. При этом нарушается процесс дифференцировки эпителиальных клеток, что приводит к накоплению недифференцированных базальных клеток и гиперплазии. Также было обнаружено, что уровень Ca^{2+} в питательной среде является ключевым для поддержания оптимального соотношения процессов пролиферации и дифференцировки пищевода *ex vivo* за счет улучшения формирования межклеточных контактов посредством молекул адгезии, таких как E-кадгерин. Кроме того, было выявлено, что для разных видов млекопитающих (мышь и человек) условия, необходимые для получения и культивирования 3D органоидов пищевода, различны [28].

Анализируя перечисленные работы, можно заключить, что органоиды, в отличие от обычных 2D клеточных культур, обладают рядом важных свойств, сближающих их с нативными органами, вследствие чего проведение экспериментов на органоидах больше соответствует исследованиям *in vivo*. Процессы органогенеза, воздействие потенциальных лекарственных/токсических веществ на целостные ткани и органы обычно изучаются на животных, что не лишено недостатков, связанных с возможным влиянием других систем организма на процессы в конкретной ткани или органе. Органоиды же более удобны для манипуляций благодаря тому, что являются изолированными модельными системами, обладающими определенной тканеспецифической архитектурой и регенеративным потенциалом за счет способности к самообновлению [29]. Также данные клеточные эквиваленты могут быть подвергнуты

криоконсервации и практически неограниченно размножены за счет самообновления, способности стволовых клеток дифференцироваться и самоорганизовываться. Таким образом, органоидные 3D системы могут стать важным переходным звеном между исследованиями *in vitro* и *in vivo*, играя большую роль в моделировании развития органов, патогенеза заболеваний, а также в *in vitro* тестировании новых лекарственных препаратов.

Эпителиальные органоиды пищевода могут служить моделью для изучения фундаментальных процессов онкологической трансформации и метастазии (например, при пищеводе Барретта) посредством воздействия на процессы пролиферации и дифференцировки в этой системе, а также использоваться в персонализированной медицине при подборе противоопухолевой терапии с целью достижения лучших результатов при минимизации побочных эффектов [30].

Для успешного проектирования 3D структур пищевода имеют значение все виды клеток данного органа, так как только их взаимодействие может обеспечить функции пищевода: эпителиальные клетки пищевода выполняют барьерную функцию, фибробласты участвуют в синтезе внеклеточного матрикса и сохраняют механические свойства ткани, мышечные клетки необходимы для перистальтики [31]. Данный аспект приводит к необходимости генерации органоидов пищевода, имеющих не только эпителиальный компонент, а к созданию эпителиально-соединительнотканых и эпителиально-мышечных органоидов. Ввиду особенностей организации соединительной и мышечной тканей такие образования морфологически более сходны с так называемыми органотипическими культурами, нежели с органоидами, получаемыми на основе только эпителиальных клеток. Органотипические культуры, в свою очередь, по организации близки к тканеинженерным прототипам пищевода. Как для первых, так и для вторых необходимы клетки и каркасный материал — их носитель, имитирующий внеклеточный матрикс. Компоненты внеклеточного матрикса отвечают не только за механические свойства ткани, но и чрезвычайно важны для самоорганизации и функционирования эпителиальных клеток. В условиях *in vitro* на примере культуры клеток эпителия молочной железы было продемонстрировано, что при добавлении компонентов внеклеточного матрикса клетки приобретали нормальную поляризованность и секретировали белок молока [32]. Существенные отличия между органотипическими культурами и тканеинженерными прототипами органов заключаются в размерах готового изделия и в требованиях к свойствам материала каркаса. Таким образом, многие тканеинженерные прототипы пищевода могут являться органотипическими культурами на этапе их исследования *in vitro*.

Эпителиально-соединительнотканые органоиды (органотипические культуры)

H. Miki с соавт. (1999) обнаружили, что совместное культивирование эпителиальных клеток и фибробластов способствует увеличению количества эпителиальных слоев [33]. В работе J. Kalabis с соавт. (2012) описывается процесс создания эпителиально-соединительнотканых 3D структур пищевода *in vitro* на основе коллагена, покрытого слоем фибробластов, смешанных с коллагеном I типа и матрикелем, и образующих через 7 сут. культивирования подобие мезенхимы пищевода, и эпителиальных клеток различного происхождения — из пищевода мыши и человека, иммортализованных эпителиальных клеток пищевода человека и клеток рака пищевода [34]. Среда для трехмерной культуры клеток включала в себя бычью сыворотку, L-глутамин,

гидрокортизон, IТES (инсулин, трансферрин, этаноламин и селен), О-фосфорил-этанолламин, прогестерон и триодтиронин. С 1 по 10 сут. культивирования 3D структуру полностью заливали питательной средой. На 11 сут. для создания жидкостно-воздушного взаимодействия только часть 3D культуры покрывали средой и не покрытый эпителий подвергался воздействию воздуха. Изменяющиеся условия культивирования способствовали возникновению эпителиальной многослойности и дифференцировке клеток. Гистологический анализ полученной 3D культуры выявил зрелый многослойный эпителий с подлежащими фибробластами, эпителиальный слой содержал СК4⁺ и СК13⁺ клетки, базальный слой — Ki-67⁺ клетки. Следует отметить, что в 3D культуре с эпителиальными клетками мышцы образовывалось меньшее количество слоев, чем в 3D культуре, включавшей клетки человека, а при использовании для создания 3D культуры трансформированных эпителиальных клеток и клеток раковой линии возникала дисплазия эпителия и наблюдался инвазивный рост [34].

К. Whelan с соавт. (2018) [27] использовали многие линии клеток пищевода в органотипических культурах, однако иммортализованные эпителиальные клетки пищевода и фетальные фибробласты пищевода человека при совместном культивировании лучше других продемонстрировали правильное формирование всех слоев эпителия пищевода по протоколу, детально описанному в работе J. Kalabis с соавт. (2012) [34]. Таким образом, правильное формирование эпителиального слоя пищевода существенно зависит от его взаимодействия с подлежащими структурами, в частности, фибробластами, так как они производят компоненты базальной мембраны, такие как коллаген IV, ламинин, гликопротеины [35].

Эпителиально-мышечные органоиды (органотипические культуры)

Y. Nakase с соавт. (2008) создали многослойный тканеинженерный прототип пищевода, состоящий из слоев эпителиальных клеток и фибробластов, культивируемых на амниотической мембране человека, и гладкомышечных клеток, культивируемых на носителе из полигликолевой кислоты, обернутых вокруг полимерной трубки для предотвращения деформации конструкции [36]. Такую трубчатую структуру трансплантировали в брюшную полость собакам, оборачивая фрагментом большого сальника. Через 3 нед. после трансплантации конструкция имела просвет, покрытый плоским эпителием, и толстый мышечноподобный слой. Полученный тканеинженерный прототип пищевода подшивали собакам на место частично резецированного пищевода. В течение 420 сут. наблюдения за животными трансплантированный прототип пищевода нормально проводил пищу, имел мышечный и эпителиальный слои, толщина которых была эквивалентна таковой для нативного пищевода, а также перистальтировал, чего не наблюдалось изначально после трансплантации в большой сальник. В исследовании также изучалась конструкция, основанная только на слое мышечных клеток, без слоев эпителия и фибробластов, однако трансплантация такого тканеинженерного прототипа приводила к формированию стриктур в течение 3 нед. [36]. Авторы предположили, что для уменьшения межклеточных пространств в слое поверхностных клеток и осуществления эпителием пищевода барьерной функции при трансплантации в большой сальник может оказаться эффективным воздействие воздуха на внутреннюю поверхность такой конструкции посредством введения сетчатого стента, соединенного трубкой с внешней средой [36]. Эта работа показывает

важность комбинированного применения различных видов клеточных популяций пищевода для создания тканеинженерных прототипов, а также зависимость процесса перистальтики от функциональной нагрузки. Примечательно, что с помощью предварительной трансплантации конструкции в большой сальник, авторы решили одну из сложнейших задач тканевой инженерии — обеспечение васкуляризации, которая является ключевым фактором выживания трансплантата.

В работе Т. Jensen с соавт. (2015) были выделены эпителиальные и гладкомышечные клетки из пищевода крыс, их культивировали на синтетических матриксах-носителях из поли(молочной-ко-гликолевой) кислоты и поликапролактон/поли(молочной-ко-гликолевой) кислоты, полученных методом электроспиннинга, в био-реакторе и через 14 сут. обнаружили эпителиальные, гладкомышечные и глиальные клеточные фенотипы. Таким образом, 3D культуры являлись тканеинженерными прототипами пищевода, они были ортотопически трансплантированы крысам, интегрировали в нативную ткань, поддерживали функцию проведения пищи в течение 2 нед. и сохраняли все три клеточных фенотипа [37]. Этот пример демонстрирует возможность успешного применения синтетических каркасов, имеющих хорошую биосовместимость как с клетками *in vitro*, так и с тканями ортотопического ложа *in vivo*. Также в рамках персонализированного подхода эпителиальные и гладкомышечные клетки могут быть получены из аутопищевода, что обеспечит их идеальную иммунологическую совместимость с реципиентом при дальнейшей трансплантации.

В целом, органотипические культуры служат для исследования т.н. эпителиально-мезенхимального взаимодействия, взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом, процессов инвазивного роста, а также для изучения тканеинженерных прототипов пищевода *in vitro*.

Тканеинженерные прототипы пищевода и особенности матрикс-носителей

Далеко не любая органотипическая культура может стать тканеинженерным прототипом органа, что связано прежде всего с требованиями к материалу матрикса-носителя. Если речь идет лишь об органотипической культуре, то основные требования к носителям клеток — это обеспечение механической поддержки и адгезии клеток, их интеграции и взаимодействия разных видов клеток, отсутствие цитотоксичности, проницаемость для нутриентов и продуктов метаболизма. Матрикс-носитель тканеинженерных прототипов органов, помимо вышеуказанного, не должен являться иммуногенным, канцерогенным или тератогенным [38], однако, в первую очередь, он должен имитировать биомеханические свойства природной ткани [39].

Такие матрикс-носители могут быть натуральными и синтетическими, как биodeградируемыми, так и нерезорбируемыми (табл.) [40]. К натуральным относят децеллюляризованную ткань, когда из исходного материала удаляются клеточные и генетические элементы и остается только внеклеточный матрикс, а также изделия на основе натуральных белков, в основном компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген, эластин, фибронектин, фибрин.

А. Saxena с соавт. (2009) показали формирование морфологически зрелого эпителия пищевода после 14 сут. культивирования эпителиальных клеток пищевода крыс на 3D-коллагеновых матриксах [41] и после 18 сут. культивирования эпителиальных клеток пищевода овец [42], при этом пластиы клеток крыс сохраняли жизнеспособность в культуре до 8 нед.

A. Vhrany с соавт. (2006) создали тканеинженерный прототип пищевода крыс на основе внеклеточного матрикса пищевода, подвергнутого гипотоническому лизису, многократной децеллюляризации и расщеплению нуклеиновых кислот [43]. Полученный матрикс *in vitro* засеивали эпителиальными клетками пищевода крыс, которые хорошо пролиферировали и через 11 сут. образовывали многослойную структуру, характерную для пищевода. При подкожной трансплантации через 30 сут. наблюдали васкуляризацию матрикса и минимальный воспалительный ответ. Недостатком этого матрикса являлась пониженная механическая прочность на разрыв [43].

V. Beckstead с соавт. (2005) успешно культивировали эпителиальные клетки пищевода на коммерческом матриксе из трупной дермы (AlloDerm). Через 18 сут. был обнаружен пролиферирующий базальный слой из 5–6 слоев шиповатых клеток эпителия. В исследовании было выявлено, что натуральный матрикс обеспечивал лучшие условия для культивирования клеток по сравнению с синтетическими матриксами на основе поли(L-молочной), поли(молочной-ко-гликолевой) и поликапролактон/поли(L-молочной) кислот [44].

Матрикс-носители на основе децеллюляризованных тканей имеют полное сходство по архитектонике с соединительнотканым «каркасом» замещаемого органа, под действием клеточных ферментов постепенно биодеградируют и замещаются тканями реципиента, а также могут высвобождать факторы роста и пептиды, стимулирующие ремоделирование тканей и ангиогенез [45, 46]. Однако такие материалы имеют и ряд недостатков, в том числе потребность в донорском материале [47], длительность процедур обработки тканей, вероятность инфекционных, иммунных осложнений и ухудшения механических свойств в процессе изготовления [48].

Синтетические каркасы могут быть хорошей альтернативой натуральным, потому что их можно заранее изготовить в достаточных количествах, смоделировать необходимую пористость, биомеханические свойства и параметры поверхности для обеспечения клеточной адгезии. Синтетические матрикс-носители для тканевой инженерии чаще всего получают из различных полимеров, таких как поли-L-молочная кислота, поливинилиденфторид, полиамид, поликапролактон и др. [49] методами электроспиннинга, фазовой сепарации или методом замораживания-высушивания.

Считается, что для целей тканевой инженерии материал матрикса-носителя должен быть способен к биодеградации и постепенно замещаться вновь образованными тканями реципиента. В идеале пустоты в каркасе должны увеличиваться с такой же скоростью, с какой делятся клетки и заполняют каркас новыми тканями, то есть скорость биодеградации материала должна соответствовать темпам пролиферации клеток в ходе процессов регенерации, причем образующиеся продукты распада должны быть нетоксичными, метаболизироваться и выводиться из организма [50].

H. Makadia с соавт. (2011) создали тканеинженерные прототипы пищевода на основе синтетических матрикс-носителей из поли(молочной-ко-гликолевой) и поликапролактон/поли(молочной-ко-гликолевой) кислот, полученных методом электроспиннинга [51]. Поли(молочной-ко-гликолевая) кислота — биодеградирующий полимер, на скорость разрушения которого влияют его молекулярная масса, кислотность среды, присутствие воды и ферментов [51], вследствие чего скорость его биорезорбции в условиях функциональной нагрузки, характерной для пищевода, может быть труднопредсказуема.

Данный полимер обеспечивает хорошую адгезию клеток, однако и адгезия микроорганизмов, обитающих в полости рта, достаточно высока, что может способствовать инфицированию тканеинженерной конструкции [52]. P. Kirraп с соавт. (2014) методом электроспиннинга получили нановолокнистые носители на основе поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) и культивировали на них эпителиальные клетки пищевода, которые нормально функционировали [53]. Поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерат) представляет собой полимер, подвергающийся деградации под действием ферментов бактерий, и, к сожалению, служащий источником энергии для микроорганизмов, что делает его потенциально опасным с точки зрения инфекционных осложнений при использовании в качестве материала для тканеинженерных прототипов пищевода. Кроме того, он обладает недостаточной механической прочностью, являясь хрупким и не эластичным [54]. L. Hou с соавт. (2015) методом термической фазовой сепарации создали трубчатый пористый каркас пищевода на основе поли(L-лактид-ко-капролактона), покрытый фибрином для улучшения адгезии клеток, и продемонстрировали его биосовместимость с первичной культурой эпителиальных клеток *in vitro* [55].

Кроме полностью синтетических или натуральных, описывается применение комбинированных каркасов, состоящих из синтетических полимеров и натуральных компонентов [56]. Например, M. Fan с соавт. (2014) получили тканеинженерный прототип пищевода на основе подслизистой оболочки тонкой кишки в сочетании с поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксигексаноатом) и поли(молочной-ко-гликолевой) кислотой и доказали его биосовместимость с мезенхимальными стромальными клетками костного мозга. Поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксигексаноат) — биодеградируемый полимер, который разлагается микроорганизмами, подобно поли(гидроксibuтират-ко-гидроксивалерату), однако обладает лучшими механическими свойствами. Недостатком поли(3-гидроксibuтират-ко-3-гидроксигексаноата) является довольно сложный и дорогостоящий метод изготовления [57].

Существует альтернативное мнение, что для длительной трансплантации тканеинженерных конструкций в областях, которые подвержены интенсивному механическому [58], химическому и ферментативному воздействию [59], предпочтительно использовать небioresорбируемые материалы. Например, J. Lупep с соавт. (2004) показали, что матрикс-носители на основе сетки из поливинилиденфторида способствовали локальной регенерации тканей пищевода, в то время как при имплантации биодеградируемой сетки из полилактина 910 наблюдалась высокая частота несостоятельности анастомоза [60]. Небиодеградируемый материал полиамид-6 обладает хорошей механической прочностью, гибкостью, устойчивостью к химическим веществам и давно используется для производства медицинских изделий, например, протезов сосудов. Zhuravleva M. с соавт. (2016) методом электроспиннинга получили матрикс из полиамида-6, обнаружили, что они биосовместимы при имплантации приматам в область дефекта пищевода, и наблюдали восстановление эпителиального слоя и отсутствие нарушения функции пищевода [61].

При разработке синтетических матриксов для тканевой инженерии важно учитывать размер волокон. Микроволоконная структура обеспечивает хорошие механические свойства и высокую проницаемость для питательных веществ, однако обладает слабой адгезивностью для клеток. В тканевой инженерии пищевода

Таблица. Разновидность матриц-носителей и способы их получения

	Матрицы-носители	Способ получения
Натуральные	Децеллюляризованные (экстрацеллюлярный матрикс) [43] На основе белковых компонентов: коллаген, эластин, фибронектин, фиброин шелка, гиалуроновая кислота, хитозан, альгинаты и т. д. [41]	Электроспиннинг [51–53] Фазовая сепарация [55] 3D биопечать (стереолитография, лазерная печать, струйная печать и т. д.) [67] Децеллюляризация [43]
Синтетические	Биодеградируемые [57]: поли(L-молочная кислота), полиэтиленгликоль, полилактид 910, поли(капролактон). Небиодеградируемые: поливинилиденфторид, полиамид-6 [61]	ДНК-программирование [68] Сверхкритическая флюидная пластификация полимеров [82] Ультрадиспергирование [82] Гель-сублимация [82] Гальванизация [82]
Комбинированные	Содержат искусственные и натуральные компоненты: совмещение подслизистой оболочки тонкой кишки с поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксигексаноатом) и поли(молочной-ко-глицеролевой) кислотой [55]	Выщелачивание [82] Селективное лазерное спекание [83]

существенную проблему представляет формирование функционирующего эпителиального слоя, предотвращающего попадание микроорганизмов и жидкости в подлежащие ткани. У нановолокнистой поверхности адгезивность для эпителиальных и эндотелиальных клеток выше по сравнению с микроволокнистой структурой каркаса [62]. В связи с этим Н. Уооп с соавт. (2010) разработали комбинированные микро-нановолокнистые матрицы, сочетающие эти свойства [63].

Другой проблемой синтетических матриц, ограничивающей взаимодействие с ними клеток, является отсутствие на их поверхности биологически активных молекул — центров связывания с клеточными молекулами адгезии. Для решения этой проблемы и улучшения биосовместимости синтетических материалов возможно использовать различные покрытия, наиболее популярными из которых являются коллаген [64] и фибронектин. Так, например, Y. Zhu с соавт. (2007) продемонстрировали, что эпителиальные клетки пищевода свиньи пролиферировали на покрытых фибронектином поли-L-лактид-капролактоновых каркасах и синтезировали коллаген IV типа — компонент базальной мембраны [65]. Каркасы также могут быть дополнительно обогащены различными факторами роста для улучшения пролиферации и (или) дифференцировки клеток [45, 46]. Т. Тенчурин с соавт. (2017) разработали методику функционализации волоконных матриц путем введения в структуру волокон эпидермального фактора роста. Было показано, что данный модифицированный матрикс стимулировал пролиферацию клеточной линии MCF7 [66].

Организационная гетерогенность натуральных тканей оказалась особенно сложной для имитации в условиях *in vitro*. Большинство методов культивирования и со-культивирования позволяют получить лишь весьма упрощенную многослойную структуру. Различные методы конструирования материалов-носителей разрешают создавать материал с относительно однородными или неоднородными по размеру и расположению порами и волокнами, но без четко заданного расположения отдельных элементов [67]. Данная проблема может быть частично решена методами 3D-биопечати. Так, С. Чуа с соавт. (2017) использовали метод 3D биопечати при создании тканеинженерного прототипа пищевода для нанесения внутреннего эпителиального слоя на внутреннюю поверхность поли(L-лактид-ко-ε-капролактоновых) носителей, покрытых мышечными

клетками [68]. Однако многие компоненты внеклеточного матрикса не подходят для биопринтинга в их естественном виде и требуют существенной модификации либо применения других материалов. Также методом биопринтинга сложно создавать ткани с высокой плотностью клеток. Основным недостатком экструзионного биопринтера является низкая разрешающая способность печати, весьма далекая от размеров одиночной клетки. В этом отношении перспективным представляется исследование M. Todhunter с соавт. (2015), в котором для воссоздания трехмерной структуры эпителиальных и стромальных тканей различных участков пищеварительной трубки *in vitro* из клеточной суспензии успешно использовали метод ДНК-программирования клеток, позволяющий с высокой точностью задавать пространственную ориентацию клеток. Метод ДНК-программирования клеток основан на включении химически функционализированной деградируемой олигонуклеотидной последовательности в диссоциированные клетки, что позволяет обеспечивать специфичную и обратимую клеточную адгезию к другим поверхностям, покрытым комплементарными последовательностями ДНК. С помощью поэтапной ДНК-запрограммированной сборки авторы создали 3D-массивы тканей длиной несколько сантиметров [69], однако на сегодняшний день получение полноразмерного тканеинженерного прототипа пищевода на основе данной методики представляется весьма отдаленной перспективой.

Адекватное кровоснабжение — один из ключевых факторов выживания тканеинженерных конструкций. Внутри организма большинство клеток находятся на расстоянии не более чем 100–200 мкм от ближайшего капилляра, что обеспечивает необходимую диффузию кислорода, питательных веществ и продуктов метаболизма для поддержания жизнеспособности клеток. Когда ткани, выращенные в лаборатории, трансплантируются в организм, это ограничение диффузии позволяет выжить только тем клеткам, которые располагаются в пределах 100–200 мкм от ближайшего капилляра. Наиболее распространенным способом обеспечения кровоснабжения таких конструкций представляется стимуляция роста сосудов посредством внесения в их состав факторов роста, которые активизируют миграцию предшественников эндотелиальных клеток и их дифференцировку. Наиболее изученным из таких

биологически активных веществ является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) [70]. Для адгезии и пролиферации эндотелиальных клеток большую роль играют белки внеклеточного матрикса, поэтому покрытие матриксов-носителей или включение в их состав таких веществ как коллаген, фибронектин, фибрин, желатин, гиалуроновая кислота или минимальных пептидных последовательностей, необходимых для связывания с интегринами, может способствовать васкуляризации *in vivo*. Проектировать расположение сосудов в матриксе возможно посредством методов фотолитографии, микроконтактной печати, микромолдинга и лазерной фотолитографии, которые позволяют контролировать размещение ангиогенных биомолекул [71].

Теоретические, тканеинженерные трансплантаты можно применять для замещения тканей пищевода как в ходе открытого оперативного вмешательства, так и при малоинвазивной эндоскопической реконструкции участков поврежденной слизистой оболочки органа. Использование тканеинженерных трансплантатов, изготовленных из различных материалов и видов клеток для трансплантации как мелким, так и крупным животным, приводило к положительным исходам в виде восстановления нормальной структуры и функции пищевода [72–75]. Так, T. Ohki с соавт. (2012) описывают наложение клеточных слоев, полученных при культивировании клеток слизистой оболочки щетки, на область язвенного дефекта пищевода с полной эпителизацией в течение 3–5 нед. без формирования стриктур [74]. A. Nieponice с соавт. (2009) использовали трубчатые каркасы из децеллюляризованного мочевого пузыря свиньи в модели циркулярной резекции слизистой пищевода собаки с адекватным ремоделированием пищевода без формирования стриктур до 8 нед. [75].

Мы не обнаружили работ, посвященных трансплантации непосредственно эпителиальных органоидов пищевода с целью его замещения, однако проведен ряд успешных трансплантаций органоидов разных отделов пищеварительного тракта животным в область повреждения.

V. Agoripian с соавт. (2009) трансплантировали органоиды из эмбриональных тканей слизистой оболочки кишки на носителе из полигликолевой кислоты в подвздошную кишку собак. Через 4 нед. гистологическими методами было подтверждено восстановление нормальной строения слизистой оболочки кишки [76].

Схожие результаты были продемонстрированы в работе S. Yui с соавт. (2012), которые трансплантировали GFP-меченные органоиды из Lgr5⁺ клеток толстой кишки в область поверхностного дефекта толстой кишки мыши. Через 4 нед. в области трансплантации гистологически выявляли однослойный эпителий, формирующий характерные крипты. Трансплантаты показали хорошую приживаемость и существовали более 6 мес. [77]. J. Avansino с соавт. (2006) получили функционирующую слизистую оболочку тонкой кишки при трансплантации органоидов из эпителиальных клеток слизистой подвздошной кишки в область дефекта слизистой тонкой кишки. При этом новая слизистая оболочка содержала 4 вида клеток: клетки Паннета, каемчатые, бокаловидные и энтероэндокринные клетки [78].

R. Choi с соавт. (1997) методом ферментативной дезагрегации тонкой кишки создали эпителиально-соединительнотканые органоиды на матриксах-носителях из полигликолевой кислоты на основе так называемых органоидных единиц — структур, весьма далеких от классических, описанных выше органоидов,

и представляющих собой фрагменты эпителия и подлежащей соединительной ткани. Они трансплантировали полученные структуры в сальник крыс и через 8 нед. наблюдали образование бокаловидных клеток и структур, напоминающих ворсинки кишечника [79]. Аналогично, R. Spurrier с соавт. (2015) трансплантировали в сальник мышам органоидные единицы пищевода на носителях из полигликолевой кислоты/поли-L-молочной кислоты, покрытых коллагеном. Такой тканеинженерный прототип пищевода имел эпителиальный слой с дифференцированными эпителиальными и пролиферирующими базальными клетками, нервные клетки и подлежащий мышечный слой, который демонстрировал спонтанную перистальтику в культуре [80].

Учитывая сходное строение пищевода и других отделов пищеварительного тракта, можно предположить, что органоиды пищевода также могут быть использованы для замещения поверхностных дефектов слизистой оболочки пищевода и для создания функционирующего эпителия в полнослойных тканеинженерных прототипах пищевода по аналогии с созданием тканеинженерных конструкций других отделов пищеварительного тракта.

Заключение

Несмотря на ряд преимуществ органоидов по сравнению с традиционными клеточными линиями, они все же представляют собой весьма упрощенные структуры: хотя органоиды и содержат несколько видов клеток, в них не хватает клеток, присутствующих в *in vivo* системах (например, нейронов, эндотелиальных клеток или клеток иммунной системы), которые, однако, могут быть внесены в процессе культивирования.

Органоиды могут иметь различия в зависимости от методики и источников их получения, что значительно влияет на воспроизводимость результатов. Данная проблема может быть минимизирована путем создания органоидов из стволовых клеток, так как для этих целей используются хорошо изученные популяции клеток и стандартизированные протоколы дифференцировки.

Моделирование полноразмерных прототипов органов пищеварительного тракта, в целом, и пищевода, в частности, на основе технологии органоидов на сегодняшний день носит экспериментальный характер, а практическое применение таких подходов является весьма отдаленной перспективой, что связано с рядом трудностей. Например, использование органоидов в персонализированной медицине и тканевой инженерии представляется ограниченным в связи с тем, что поддержание культур органоидов является затратным, так как требует дорогостоящих факторов роста для достижения значительной биомассы материала. Кроме того, необходимо поддерживать массу живой ткани в трехмерном пространстве, которая зависит от ангиогенеза, а поскольку формирование полноценных сосудов — процесс сложный и длительный, толщина новых конструкций не превышает 1 см [81].

Подводя итог, необходимо отметить, что тканевая инженерия пищевода является перспективным направлением, однако предстоит решить множество задач на пути к клинической трансляции результатов.

Благодарности

Обзор подготовлен при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-45-00018). Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

Профессору Паоло Маккиарини за ценные советы и содействие.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2013; 19(34): 5598–606.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., редакторы. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Россия: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018.
3. Tröbs R.V., Finke W., Bahr M. et al. Isolated tracheoesophageal fistula versus esophageal atresia — Early morbidity and short-term outcome. A single institution series. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2017; 94: 104–11.
4. Буверов А.О., Лапина Т.Л., Охлобыстин А.В. Ахалазия кардии. В: Ивашкин В.Т., редактор. Гастроэнтерология: Клинические рекомендации. 2-изд. Россия: ГЭОТАР-Медиа; 2009. С. 1–12.
5. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Трухманов А.С. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Рос. Журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол.* 2017; 27(4): 75–95.
6. Сторонова О., Джаяха Н., Трухманов А. Роль защитных факторов слизистой оболочки пищевода в лечении гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Клин. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии* 2014; 5: 37–42.
7. Khan M., Santana J., Donnellan C. et al. Medical treatments in the short-term management of reflux oesophagitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007; 2: CD003244.
8. Van Boeckel P., Siersema P.D. Refractory esophageal strictures: what to do when dilation fails. *Current Treatment Options in Gastroenterology* 2015; 13(1): 47–58.
9. Harlak A., Yigit T., Coskun K. et al. Surgical treatment of caustic esophageal strictures in adults. *Int. J. Surg.* 2013; 11(2): 164–8.
10. Gossot D., Lefebvre J.F. Ischaemic atrophy of the cervical portion of a substernal colic transplant: successful reconstruction using a synthetic resorbable tube. *Br. J. Surg.* 1988; 75: 801–2.
11. Freud E., Efrati I., Kidron D. et al. Comparative experimental study of esophageal wall regeneration after prosthetic replacement. *Biomed. Mater. Res.* 1999; 45(2): 84–91.
12. Macchiarini P., Mazmanian G.M., de Montpréville V. et al. Experimental tracheal and tracheoesophageal allotransplantation. *Paris-Sud University Lung Transplantation Group. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1995; 110: 1037–46.
13. Freud E., Efrati I., Kidron D. et al. Comparative experimental study of esophageal wall regeneration after prosthetic replacement. *Biomed. Mater. Res.* 1999; 45(2): 84–91.
14. Hirdes M.M., Vleggaar F.P., Siersema P.D. Stent placement for esophageal strictures: an update. *Expert Rev. Med. Devices* 2011; 8(6): 733–55.
15. Saxena A.K. Esophagus tissue engineering: designing and crafting the components for the “hybrid construct” approach. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 2014; 24(3): 246–62.
16. Nadkarni R.R., Abed S., Draper J.S. Organoids as a model system for studying human lung development and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016; 473(3): 675–82.
17. Hynds R.E., Giangreco A. Concise review: the relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. *Stem Cells* 2013; 31(3): 417–22.
18. Fang Y., Eglan R.M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLM Discovery* 2017; 22(5): 456–72.
19. Dedhia P.H., Bertaux-Skeirik N., Zavros Y. et al. Organoid Models of Human Gastrointestinal Development and Disease. *Gastroenterology* 2016; 150: 1098–112.
20. Chanson L., Brownfield D., Garbe J.C. et al. Self-organization is a dynamic and lineage-intrinsic property of mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(8): 3264–9.
21. Tait I.S., Flint N., Campbell F.C. et al. Generation of neomucosa in vivo by transplantation of dissociated rat postnatal small intestinal epithelium. *Differentiation* 1994; 56: 91–100.
22. DeWard A.D., Cramer J., Lagasse E. Cellular heterogeneity in the mouse esophagus implicates the presence of a nonquiescent epithelial stem cell population. *Cell Rep.* 2014; 9(2): 701–11.
23. Sato T., Vries R.G., Snippert H.J. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459: 262–5.
24. Ootani A., Li X., Sangiorgi E. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat. Med.* 2009; 15: 701–6.
25. Doupe D.P. A single progenitor population switches behavior to maintain and repair esophageal epithelium. *Science* 2012; 337: 1091–3.
26. Giroux V., Lento A.A., Islam M. et al. Long-lived keratin 15+ esophageal progenitor cells contribute to homeostasis and regeneration. *J. Clin. Invest.* 2017; 127(6): 2378–91.
27. Whelan K. Esophageal 3D culture systems as modeling tools in esophageal epithelial pathobiology and personalized medicine. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2018; 5: 461–78.
28. Kasagi Y., Chandramouleeswaran P.M., Whelan K.A. et al. The esophageal organoid system reveals functional interplay between Notch and cytokines in reactive epithelial changes. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2018; 5: 333–52.
29. Дергилев К.В., Макаревич П.И., Меньшиков М.Ю. и др. Применение тканеинженерных конструкций на основе пластов клеток для восстановления тканей и органов. *Гены и клетки* 2016; 11(3): 23–32.
30. Ameen A., Xingnan L., Cantrell M. et al. Gastrointestinal organoid cultures for functional evaluation of oncogenic loci. *Journal of Clinical Oncology* 2015; 33: 85–95.
31. Spurrier R.G., Speer A.L., Hou X. et al. Murine and human tissue-engineered esophagus form from sufficient stem/progenitor cells and do not require microdesigned biomaterials. *Tissue Eng. Part A* 2015; 21: 906–15.
32. Streuli C.H., Bailey N., Bissell M.J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *Cell Biol.* 1991; 115: 1383–95.
33. Miki H., Ando N., Ozawa S. et al. An artificial esophagus constructed of cultured human esophageal epithelial cells, fibroblasts, polyglycolic acid mesh, and collagen. *ASAIO* 1999; 45: 502–8.
34. Kalabis J., Wong G.S., Vega M.E. et al. Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3 organotypic culture. *Nat. Protoc.* 2012; 7(2): 235–46.
35. Vrana N.E., Lavalle P., Dokmeci M.R. et al. Engineering functional epithelium for regenerative medicine and in vitro organ models: a review. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2013; 19(6): 529–43.
36. Nakase Y., Nakamura T., Kin S. et al. Intrathoracic esophageal replacement by in situ tissue-engineered esophagus. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008; 136: 850–9.
37. Jensen T., Blanchette A., Vadasz S. et al. Biomimetic and synthetic esophageal tissue engineering. *Biomaterials* 2015; 57: 133–41.
38. Jungebluth P., Bader A., Baiguera S. et al. The concept of in vivo airway tissue engineering. *Biomaterials* 2012; 33(17): 4319–26.
39. Kim B.S., Mooney D.J. Scaffolds for engineering smooth muscle under cyclic mechanical strain conditions. *Biomech. Eng.* 2000; 122(3): 210–5.
40. Dhandayuthapani B., Krishnan U.M., Sethuraman S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2010; 94(1): 264–72.
41. Saxena A.K., Ainoedhofer H., Höllwarth M.E. Esophagus tissue engineering: in vitro generation of esophageal epithelial cell sheets and viability on scaffold. *Pediatr. Surg.* 2009; 44: 896–901.
42. Saxena A.K., Ainoedhofer H., Höllwarth M.E. Culture of ovine esophageal epithelial cells and in vitro esophagus tissue engineering. *Tissue Eng. Part C: Methods* 2010; 16: 109–14.
43. Bhrany A.D., Beckstead B.L., Lang T.C. et al. Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. *Tissue Eng.* 2006; 12: 319–28.
44. Beckstead B.L., Pan S., Bhrany A.D. et al. Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 6217–28.
45. Jungebluth P., Bader A., Baiguera S. et al. The concept of in vivo airway tissue engineering. *Biomaterials* 2012; 33(17): 4319–26.
46. Thorrez L., Shansky J., Wang L. Growth, differentiation, transplantation and survival of human skeletal myofibers on biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29(1): 75–84.
47. Mattei G., Magliaro C., Pirone A. et al. Decellularized human liver is too heterogeneous for designing a generic extracellular matrix mimic hepatic scaffold. *Artif. Organs* 2017; 41(12): 347–55.
48. Hwang J., San B.H., Turner N.J. et al. Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide. *Acta Biomater.* 2017; 53: 268–78.
49. Hynds R.E., Giangreco A. Concise review: the relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. *Stem Cells* 2013; 31(3): 417–22.
50. Velasco M.A., Narváez-Tovar C.A., Garzón-Alvarado D.A. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 729076.
51. Makadia H.K., Siegel S.J. Poly Lactic-co-Glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 2011; 3(3): 1377–97.
52. Al-Ahmad A., Schubert C., Carvalho C. et al. Comparison of bacterial adhesion and cellular proliferation on newly developed three-dimensional scaffolds manufactured by rapid prototyping technology. *Biomed. Mater. Res. Part A* 2011; 98(2): 303–11.
53. Kuppam P., Sethuraman S., Krishnan M. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-based nanofibrous scaffolds to support functional esophageal epithelial cells towards engineering the esophagus. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2014; 25(6): 574–93.
54. Srikanth P., editor. Handbook of bioplastics and biocomposites engineering applications. USA: John Wiley & Sons; 2011.
55. Hou L., Jin J., Lv J. et al. Constitution and in vivo test of micro-porous tubular scaffold for esophageal tissue engineering. *Biomater. Appl.* 2015; 30(5): 568–78.
56. Chen F.M., Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* 2016; 53: 86–168.
57. Fan M.R., Gong M., Da L.C. et al. Tissue engineered esophagus scaffold constructed with porcine small intestinal submucosa and synthetic polymers, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24457267>.
58. Patel M., Fisher J.P. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. *Pediatr. Res.* 2008; 63(5): 497–501.

59. Burkersroda F., Schedl L., Göpferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* 2002; 23(21): 4221–31.
60. Lynen J.P., Klinge U., Anurov M. et al. Surgical mesh as a scaffold for tissue regeneration in the esophagus. *Eur. Surg. Res.* 2004; 36: 104–11.
61. Zhuravleva M., Gilazieva Z., Grigoriev T.E. In vitro assessment of electrospun polyamide-6 scaffolds for esophageal tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018, [Epub ahead of print].
62. Hajicharalambous C.S., Lichter J., Hix W.T. et al. Nano- and sub-micron porous polyelectrolyte multilayer assemblies: biomimetic surfaces for human corneal epithelial cells. *Biomaterials* 2009; 30: 4029–36.
63. Yoon H., Kim G. Micro/nanofibrous scaffolds electrospun from PCL and small intestinal submucosa. *Biomater. Sci., Polym. Ed.* 2010; 21(5): 553–62.
64. He W., Ma Z., Yong T. et al. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials* 2005; 26: 7606–15.
65. Zhu Y., Leong M.F., Ong W.F. et al. Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLLCC) nanofiber scaffold. *Biomaterials* 2007; 28: 861–8.
66. Тенчурин Т.Х., Люндуп А.В., Демченко А.Г. и др. Модификация биодegradируемого волокнистого матрикса эпидермальным фактором роста при эмульсионном электроформовании для стимулирования пролиферации эпителиальных клеток. *Гены и клетки* 2017; 12(4): 47–52.
67. Lu T., Li Y., Chen T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* 2013; 8: 337–50.
68. Chua C.K., Yeong W.Y., An J. Special Issue: 3D Printing for Biomedical Engineering. *Materials Basel* 2017; 10(3): 243–5.
69. Todhunter M.E., Jee N.Y., Hughes A.J. et al. Programmed synthesis of three-dimensional tissues. *Nat. Methods* 2015; 12(10): 975–81.
70. Murphy W.L., Peters M.C., Kohn D.H. et al. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21(24): 2521–7.
71. Moon J.J., West J.L. Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angio-genesis in biomaterials. *Current topics in medicinal chemistry* 2008; 8(4): 300–10.
72. Lopes M.F., Cabrita A., Ilharco J. et al. Esophageal replacement in rat using porcine intestinal submucosa as a patch or a tubeshaped graft. *Dis. Esophagus* 2006; 19: 254–62.
73. Kim B.S., Mooney D.J. Scaffolds for engineering smooth muscle under cyclic mechanical strain conditions. *J. Biomech. Eng.* 2000; 122(3): 210–5.
74. Ohki T., Yamato M., Ota M. et al. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology* 2012; 143: 582–8.
75. Nieponice A., McGrath K., Qureshi I. et al. An extracellular matrix scaffold for esophageal stricture prevention after circumferential EMR. *Gastrointest. Endosc.* 2009; 69(2): 289–96.
76. Agopian V.G., Chen D.C., Avansino J.R. Intestinal stem cell organoid transplantation generates neomucosa in dogs. *Gastrointest. Surg.* 2009; 13: 971–82.
77. Yui S., Nakamura T., Sato T. et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5⁺ stem cell. *Nat. Med.* 2012; 18: 618–23.
78. Avansino J.R., Chen D.C., Hoagland V.D. et al. Orthotopic transplantation of intestinal mucosal organoids in rodents. *Surgery* 2006; 140(3): 423–34.
79. Choi R.S., Vacanti J.P. Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds. *Transplant. Proc.* 1997; 29: 848–51.
80. Spurrier R.G., Speer A.L., Hou X. et al. Murine and Human Tissue-Engineered Esophagus Form from Sufficient Stem/Progenitor Cells and Do Not Require Microdesigned Biomaterials. *Tissue Engineering Part A* 2015; 21(5–6): 906–15.
81. Vacanti J.P. Tissue and organ engineering: can we build intestine and vital organs? *Gastrointest. Surg.* 2003; 7(7): 831–5.
82. Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2014; 16(3): 93–108.
83. Вахрушев И.В., Антонов Е.Н., Суббот А.М. и др. Тканеинженерные конструкции для регенеративной медицины на основе мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба и полимерных матриксов нового поколения. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»* 2017; 2: 106–11.

Поступила: 04.03.2017