

© Н.Монтсеррат, Е.Гаррета, Х.К.И.Бельмонте, 2016
УДК 616.61- 003.93

Н. Монтсеррат^{1,2}, Е. Гаррета¹, Х.К.И. Бельмонте³

РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ СТРАТЕГИИ РЕКОНСТРУИРОВАНИЯ ПОЧКИ

¹Программы по плюрипотентным стволовым клеткам и активации эндогенной ткани для регенерации органов (PR Lab), Институт Биоинжиниринга Каталонии (IBEC), г. Барселона, Испания; ²Сетевой биомедицинский исследовательский центр биоинжиниринга, биоматериалов и наномедицины (CIBER-BBN), г. Мадрид, Испания; ³лаборатория экспрессии гена, Институт биологических исследований Солка, г. Ла-Холья, Калифорния, США

N. Montserrat^{1,2}, E. Garreta¹, J.C.I. Belmonte³

REGENERATIVE STRATEGIES FOR KIDNEY ENGINEERING

¹Pluripotent Stem Cells and Activation of Endogenous Tissue Programs for Organ Regeneration (PR Lab), Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona, Spain, ²Networking Biomedical Research Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain, ³Gene Expression Laboratory, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA

РЕФЕРАТ

Почка является важнейшим органом водного гомеостаза и экскреции токсических субстанций. Она выполняет несколько важных физиологических функций для обеспечения гомеостаза: удаляет циркулирующие продукты метаболизма, регулирует баланс жидкости в организме и действует как иммунный регулятор, а также модулятор нормального функционирования сердечно-сосудистой системы. В самое последнее время появились и активно развиваются модели почечных заболеваний *in vitro* с плюрипотентными стволовыми клетками (как стволовыми клетками человеческого эмбриона, так и индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками), а также разрабатываются надежные протоколы по получению *in vitro* клеток, подобных специфичным ренальным, из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента. В данном обзоре мы приводим главные открытия в области регенерации почки с основным фокусом на развитие пошаговых протоколов по созданию почечных клеток из человеческих плюрипотентных стволовых клеток и самые последние достижения в области биоинжиниринга почки (т.е. децеллюляризованного почечного остова и биопринтинга). Возможность создания трехмерной структуры, подобной почке, с последующим наполнением ее индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками почечного происхождения может открыть новые перспективы для создания функционирующего по требованию почечного трансплантата.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, заболевания почек, реконструкция почек, плюрипотентные стволовые клетки, почечно-клеточная дифференциация.

ABSTRACT

The kidney is the most important organ for water homeostasis and waste excretion. It performs several important physiological functions for homeostasis: it filters the metabolic waste out of circulation, regulates body fluid balances, and acts as an immune regulator and modulator of cardiovascular physiology. The development of *in vitro* renal disease models with pluripotent stem cells (both human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells) and the generation of robust protocols for *in vitro* derivation of renal-specific-like cells from patient induced pluripotent stem cells have just emerged. Here we review major findings in the field of kidney regeneration with a major focus on the development of stepwise protocols for kidney cell production from human pluripotent stem cells and the latest advances in kidney bioengineering (i.e. decellularized kidney scaffolds and bioprinting). The possibility of generating renal-like three-dimensional structures to be recellularized with renal-derived induced pluripotent stem cells may offer new avenues to develop functional kidney grafts on-demand.

Key words: induced pluripotent stem cells; kidney disease; kidney engineering; pluripotent stem cells; renal differentiation.

Список сокращений

BMP4, (bone morphogenetic protein 4) – костный морфогенетический белок 4
CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами
FGF, (fibroblast growth factor) – фактор роста фибробластов
GDNF (glial-cell-derived neurotrophic factor) – глиальный нейротрофический фактор
OSR-1 (Odd-skipped related 1) – транскрипционный фактор OSR1

иПСК – индуцированная плюрипотентная стволовая клетка
МЗ – мочеточниковый зачаток
ММ – метанефральная мезенхима
ПМ – промежуточная мезодерма,
ПСК – плюрипотентная стволовая клетка
СКПН – стволовая клетка-предшественник нефрона
ТПН – терминальная почечная недостаточность
ХБП – хроническая болезнь почек
чиПСК – человеческая индуцированная плюрипотентная стволовая клетка
чПСК – человеческая плюрипотентная стволовая клетка
чЭСК – человеческая эмбриональная стволовая клетка
ЭСК – эмбриональная стволовая клетка
ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

N. Montserrat, Pluripotent Stem Cells and Activation of Endogenous Tissue Programs for Organ Regeneration (PR Lab), Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), c/Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 402 02 84, Tel: +34 93 403 13 91, E-mail: nmontserrat@ibecbarcelona.eu

ВВЕДЕНИЕ

Болезни почек представляют собой одну из основных проблем здравоохранения в современном обществе. Хроническая болезнь почек (ХБП) является ведущей причиной смертности и заболеваемости в западных странах, где её распространенность составляет до 11% взрослого населения. ХБП может прогрессировать до неизлечимой стадии терминальной почечной недостаточности (ТПН), требующей проведения диализа или трансплантации почки, что предпочтительно. К слову, затраты только на диализ составляют около 2% от национальных бюджетов здравоохранения, и в течение нескольких лет этот параметр удвоится. Если эта тенденция продолжится, национальные правительства будут вынуждены тратить от 3 до 5% своего годового бюджета здравоохранения на заместительную почечную терапию, без учета огромной стоимости дополнительных медицинских расходов.

В настоящее время в США 122 403 человека ожидают жизнесохраняющую органную трансплантацию, из которых 101 189 ожидают трансплантацию почки [1, 2]. Среднее время ожидания первого почечного трансплантата составляет 3,6 года и может варьировать в зависимости от различных параметров, таких как коморбидность, совместимость и доступность органа [2]. Заслуживает внимания то, что в 2014 году в США было выполнено 17 105 трансплантаций почки. Из них 11 570 были трупные и 5535 – от живого донора [1, 2]. Отдел здравоохранения и служба обеспечения органами и планирования трансплантаций США установил, что более 3000 новых пациентов ежемесячно добавляются в лист ожидания почечного трансплантата, и что в 2014 году 4270 пациентов умерли, ожидая пересадку. Таким образом, существует серьезная потребность развития новых терапевтических стратегий, которые позволили бы преодолеть данные проблемы.

Прогресс, достигнутый за последнее время в методологических подходах, основанных на стволовых клетках и достижениях тканевого инжиниринга, привел к появлению новой стратегии регенеративной медицины с целью лечения болезней почек.

Во-первых, возможность имитировать важные этапы развития почки в культивирующей среде показывает, что при некоторых условиях человеческие плюрипотентные стволовые клетки (чПСК) могут дифференцироваться *in vitro* в основные типы почечных клеток, повреждающихся при патологии почек (например, подоциты

и тубулярные клетки, и др.) [3, 4]. Во-вторых, появляющиеся технологии, включающие децеллюляризацию/рецеллюляризацию и биопринтинг, стали революционными в области тканевого инжиниринга, открывая возможность создания такого комплексного трехмерного (3D) органа, как почка [5, 6].

В данном обзоре мы освещаем текущие достижения в стратегии регенеративной медицины по воссозданию почечной функции с основным фокусом на (а) направленную дифференцировку чПСК в клетки, подобные почечным, которые можно использовать для инжиниринга почки и (б) применение децеллюляризации/рецеллюляризации и технологии биопринтинга. Видится, что все эти методики являются многообещающими стратегиями тканевого конструирования для биоинжиниринга почки, и здесь мы обсуждаем основные проблемы будущего осуществления этих многообещающих технологий в клинической практике (рисунок).

ЛЕЧЕНИЕ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЧКИ: ПРОБЛЕМЫ И ТЕКУЩЕЕ ПОЛОЖЕНИЕ ДЕЛ

Болезни почек являются значимой проблемой здравоохранения во всем мире [7–9]. Распространенность и плохой прогноз болезней почек и ассоциированных патологий показывают срочную необходимость не только развития терапевтических подходов, но и расширения нашего понимания потенциала почки к развитию и восстановлению, особенно, генерации нефрона, его дифференцировки и способности к самовосстановлению. Интересно, что почка взрослого млекопитающего имеет способность после повреждения восстанавливать некоторые типы клеток, включая клеточные элементы тубулярных и эпителиальных клеток, но не структуры клубочка [10–12]. Вероятно, это происходит путем пролиферации резидентных клеток при отсутствии популяции предшественников или вновь сформировавшихся мультилинейных структур – процесс, называемый «клеточной регенерацией» [13]. До сих пор клеточную регенерацию традиционно оценивают путем проследования точного клеточного происхождения этих пролиферирующих клеток [12–14], в то время как популяция клеток-предшественников может быть идентифицирована по способности предполагаемых клеток-кандидатов дифференцироваться во многих направлениях [15].

В отличие от других организмов, таких как аквариумная рыбка Данио рерио и насекомые, у

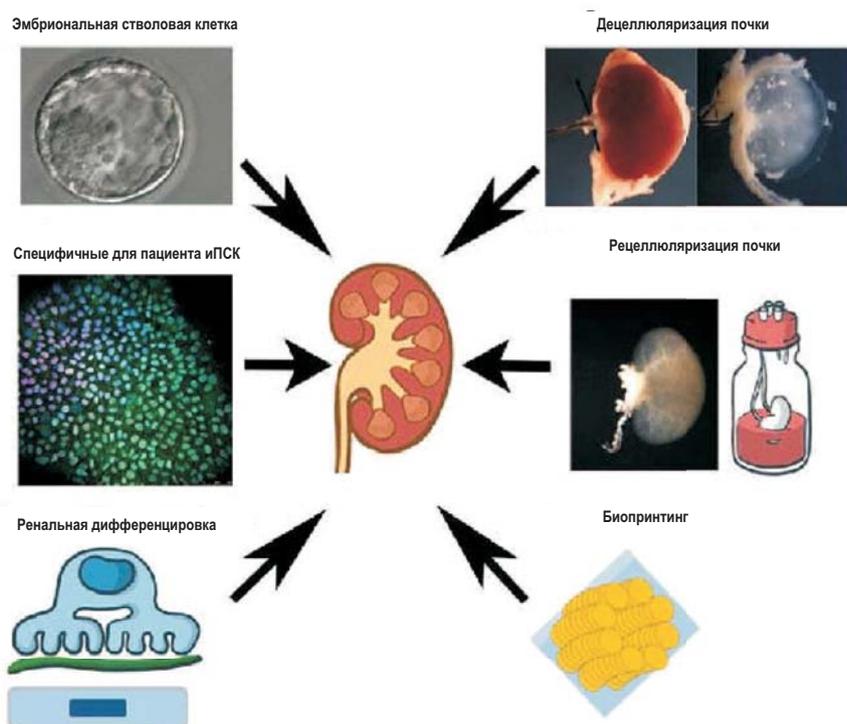


Рисунок. Применение ПСК (как ЭСК, так и iPСК) открывает перспективы для точной оценки необходимых условий, обеспечивающих существование почечных клеток взрослого для клеточной терапии. Также биоинжиниринг почки преследует цель использовать почечный остов как биологическую основу для дальнейшей рецеллюляризации, а появление биопринтинга в последнее время обеспечило реализацию главной стратегии по созданию орган-подобных структур в трехмерном разрешении. ПСК – плюрипотентная стволовая клетка; ЭСК – эмбриональная стволовая клетка; iPСК – индуцированная плюрипотентная стволовая клетка.

которых формирование новых нефронов возникает за счет регенерации поврежденных, у млекопитающих формирование новых нефронов ограничено эмбриогенезом и заканчивается к моменту рождения [16].

ПЛУРИПОТЕНТНЫЕ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ (ПСК): ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Уже в 1998 году было продемонстрировано, что плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) могут происходить из внутренней клеточной массы бластоциста эмбриона, превращаясь в эмбриональную стволовую клетку (ЭСК) [17]. Человеческие ЭСК (чЭСК) стали новым объектом для изучения тканевого развития и моделирования заболеваний *in vitro*. С этого момента интенсивные исследования были посвящены разработке надежного протокола по дифференцировке чПСК с целью создания функционирующих клеток, способных восстанавливать утраченную в результате прогрессирования дегенеративных болезней функцию. Тем не менее, молекулярные механизмы, вовлеченные в ограничение линий дифференцировки чПСК при формировании специализированных типов клеток, до сих пор находятся на стадии исследования. Важно, что самым критичным препятствием для использования чПСК в клинической практике являются потребность в человеческих эмбрионах, что затрагивает этические вопросы, и отторжение тканей после трансплантации.

Существуют другие методы создания ПСК (чПСК) из соматических донорских клеток. Они включают различные способы клеточного репрограммирования, в том числе перенос ядра соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку [18], слияние с ПСК [19], воздействие низкомолекулярных химических веществ [20] и трансдукция факторов репрограммирования [21]. В случаях переноса ядра соматической клетки и репрограммирования, опосредованного слиянием клеток, ядра соматических клеток помещают в тотипотентное или плюрипотентное окружение, соответственно [22].

С другой стороны – трансдукция факторов репрограммирования POU5F1 (POU домен класс 5 фактор транскрипции 1; также известный как октамер-связывающий протеин 3 или октамер-связывающий протеин 4, OCT3/4), SRY (sex determining region Y, определяющий пол, регион хромосомы Y), box 2 (SOX2), Круппель (Kruppel)-подобный фактор 4 (KLF4) и онкоген миеломатоза (с-MYC) [вместе относящиеся к OSKM (по первым буквам в названии факторов) или факторам Яманака] приводит к генерации ауто-совместимых индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iПСК), которые совмещают потенциальные способности к самовосстановлению и дифференцировке при сравнении с чЭСК. Большинство первоначальных исследований по созданию iPСК пациента были основаны на использовании интегративных систем, чрезмерно

экспрессирующих *c-MYC* и *KLF4*, два хорошо известных онкогена [23, 24].

Для решения этих проблем разные лаборатории, включая нашу, проводили поиски различных типов клеток, которые могли бы быть репрограммированы при отсутствии двух онкогенных факторов, но при использовании преимуществ внутренних свойств выбранных донорских клеток (например, клетки, экспрессирующие относительно высокий уровень любого из факторов Яманака, могут быть репрограммированы при отсутствии этих специальных генов, так, например, невральные стволовые клетки при отсутствии *SOX2*). Исходя из этого, иПСК были успешно генерированы при отсутствии *KLF4* и/или *c-MYC* из кератиноцитов [24], стволовых клеток пуповины [25] и даже невральных стволовых клеток [26]. Хотя эти открытия показали возможность сокращения числа факторов для генерации иПСК, они по-прежнему были основаны на применении интегративных систем, приводящих к нежелательным эффектам, касающимся случайной трансгенной инсерции (например, риск трансгенной индукции после дифференцировки, неполное репрограммирование и др.). Очень быстро разные лаборатории по всему миру разработали новые методы для создания свободных от трансгенов иПСК [27–32], также внесли важные изменения в клеточные культуры (например матрицы/среды) для получения фидер-независимых человеческих иПСК (чиПСК) [33–35] и идентифицировали растворимые вещества, замещающие факторы Яманака для создания иПСК [20].

Вместе с этими важными трудностями в области получения иПСК были опубликованы результаты интенсивных исследований по созданию специфичных для пациента иПСК с последующей дифференцировкой в определенные виды ткани, поврежденные в результате прогрессирования болезни, обеспечивая уникальный сценарий для моделирования болезни [36–41] и даже для подбора специфичных для пациента лекарств [42, 43].

Еще одна область, привлекающая большой интерес, это коррекция генетических заболеваний в пациент-специфичных иПСК в аспекте персонализированной медицины.

ПСК могут быть источником для исправления генома, так как они могут быть подвержены обширному спектру манипуляций с тканевой культурой (например выбор лекарства и экспансия клонов) с сохранением их плюрипотентности и стабильности генома [44]. Разными исследовательскими группами продемонстрированы гене-

рирование и коррекция пациент-специфичных чиПСК [38, 39, 45–49]. Эти исследования показали функциональную коррекцию болезнью-ассоциированного фенотипа при дифференцировке пациент-специфичных чиПСК и даже открыли перспективы для скрининга элементов, восстанавливающих фенотип болезни [49, 50] – достижение, которое, как представляется, является первым применением потенциала чиПСК в регенеративной медицине и здравоохранении [51].

ГЕНЕРИРОВАНИЕ ПОЧЕЧНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПСК: МЕТОДОЛОГИИ, ОСНОВАННЫЕ НА ПСК, МОДЕЛИРУЮТ РАЗВИТИЕ ПОЧКИ И ЕЁ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Почка состоит из тысяч нефронов, образующихся в ходе развития в результате реципрокного индуктивного взаимодействия между двумя разными клеточными типами: клетками метанефральной мезенхимы (ММ) и мочеточникового зачатка (МЗ) [16]. ММ дифференцируется в различные типы эпителиальных клеток почки (от клубочка до сегмента собирательных трубочек), а МЗ генерирует систему чашечек.

За последние несколько десятилетий во многих работах определены условия культивирования для изоляции и распространения *in vitro* этих клеточных популяций, правда, с ограниченным успехом (обзор в [13, 14, 52]). Альтернативной методологией для создания неограниченного количества клеток почечного типа является дифференцировка ПСК. В последние несколько лет независимые исследовательские группы, включая нашу, впервые описали возможность создания различных почечных популяций из ПСК. Song и соавт. были первыми, кто сообщил о получении предшественников подоцитов из чиПСК, которые были функциональными и эффективно интегрированы в ткань мышечного метанефрия. Однако вопрос о том, какие из эмбриональных клеток-предшественников в ходе развития эквивалентны иПСК-незрелым подоцитам Song'a, остается открытым [3].

Позднее в 2013 г. S.I. Mae и соавт. впервые дифференцировали монослой чЭСК в промежуточную мезодерму (ПМ), эмбриональную ткань, которая дает происхождение как ММ, так и МЗ [53]. С этой целью авторы создали разные репортерные линии чиПСК, в которых GFP был направлен в ген *OSR-1* (*Odd-skipped related 1* – ген, транзиторно экспрессируемый в промежуточной мезодерме в ходе эмбриогенеза). При специальных условиях клеточной культуры иПСК, дифференцированные из ПМ, показали свойства других типов зрелых

почечных клеток и ограниченных канальцевых структур. Интересно, что те же авторы добились получения химически определенной среды для получения иПСК из ПМ и недавно описали идентификацию двух ретиноид-подобных молекул, индуцирующих образование ПМ из иПСК. Именно в этих опытах авторы продемонстрировали, что в результате полученные из ПМ иПСК проявляли способность дифференцироваться во множество типов почечных клеток, также образуя 3D-структуру, подобную почечным канальцам в образцах органных культур *ex vivo* [54].

Аналогично наша группа впервые сообщила о возможности создания предшественников МЗ из клеток ПМ из чПСК и чиПСК, полученных от пациентов с поликистозной болезнью почек. Спустя 4 дня предшественники МЗ экспрессировали *HOXB7*, *RET* и *GFRA1* в большей степени, чем маркеры ММ. Более того, когда МЗ-подобные чиПСК-клетки были культивированы совместно с диссоциированными клетками мышинового метанефрия E11-5, образованные клетки включались только в цитокератин 8 позитивные (+) МЗ-подобные структуры, предполагая индукцию коммитированных ПМ клеток МЗ линии *ex vivo* [55].

С другой стороны – группа Little'a разработала протокол по созданию хорошо изученных предшественников почечных клеток как из чПСК, так и чиПСК в ПМ через заднюю первичную полосу, из которой ПМ образуется в ходе развития. Авторы использовали собственную линию чПСК для мониторинга экспрессии *MIXL1* (гена, транзиторно экспрессируемого в первичной полоске в ходе эмбриогенеза) путем включения GFP в локус *MIXL1*. Группа Little'a создала два разных протокола: один – для одновременной генерации дериватов ММ и МЗ и другой – для МЗ-клеток только из ПСК. Примечательно, что в этой работе использовали повторную агрегацию проб для определения потенциала дифференцировки почечно-подобных генерированных клеток, показывая, что повторно агрегированные дифференцированные ПСК могут одни организовать и генерировать нефрон-подобные структуры [56].

Ранее Lam и соавт. опубликовали быстрый и эффективный протокол дифференцировки для получения *PAX2+LHX1+* ПМ-клеток из чПСК, которые спонтанно формировали каналец-подобные структуры. Интересно, что Lam удалось показать, что *PAX2+LHX1+* ПМ-клетки из чПСК интегрировались в мышиную культуру метанефрия и дифференцировались в мультипотентные стволовые клетки-предшественники нефрона (СКПН)

мезенхимы, экспрессируя маркеры *SIX2*, *SALL1* и *WT1* [57]. Таким же образом Taguchi и соавт. также показали, что возможно получать СКПН, которые обладают потенциалом реконструирования 3D-нефрон-подобной структуры, содержащей как гломеруло-, так и тубуло-подобные структуры при совместном культивировании *in vitro* с эмбриональным спинным мозгом из мышинных ЭСК и чиПСК [58]. В этой же работе Taguchi и соавт. использовали модели мышинных линий *in vivo* и изучали разные стадии развития СКПН у мышей с геном-репортером *OSR-1-GFP* и выявили, что популяция *OSR-1-GFP-Integrin+PDGFRa* имеет самый высокий потенциал формирования нефронов *in vitro*. Таким образом, авторы пересмотрели пространственную и временную локализацию предшественников нефрона метанефрия *in vivo*, демонстрируя, что ПМ содержит, по крайней мере, две субпопуляции предшественников метанефрия – передний и задний домены, и что ПМ, расположенный сзади, дает рост линиям ММ [58]. Интересно, что эта последняя работа продемонстрировала, в какой момент времени зарождающаяся мезодерма становится ПМ и как она становится специфичной для ММ- и МЗ-линий [58].

Интересно, что Imberti и соавт. получили почечные клетки-предшественники из чиПСК, следуя двухэтапному протоколу, где сначала чиПСК подвергают воздействию ретиноевой кислотой, ингибиторами в *RhpA* и *PI3K* и активинном А, индуцируя развитие ПМ. Далее чиПСК, полученные из ПМ, в течение следующих 13 дней были подвергнуты воздействию *FGF2*, *BMP7* и глиального нейротрофического фактора (*GDNF*) для создания чиПСК из ММ. Хотя другие авторы уже продемонстрировали возможность генерации чПСК из ММ, в этой работе Imberti и соавт. впервые показали, что чиПСК – предшественники почечных клеток – надежно внедряются в поврежденные канальцы, восстанавливая почечную функцию [59].

Недавно Morizane и соавт. показали возможность развития СКПН из чПСК. Работа Morizane элегантно демонстрирует, что возможно воспроизвести ММ почку *in vitro* и генерировать *SIX2+ SALL1+WT1+PAX2+* СКПН с 90% эффективностью через 9 дней. Более важно, что авторы доказали, что СКПН формируют почечный органоид как в 2D-, так и в 3D-образцах после 21–28 дней, содержащий эпителиальные нефрон-подобные структуры, экспрессирующие маркеры подоцитов (*PODXL*, *NPHS1*), проксимальных канальцев (*CDH2*, *LTL*), петли Генле (*CDH1*, *UMOD*) и дистальных канальцев (*CDH1*, *BRN1*), копи-

руя развитие нефрона. Важно, что для изучения механизмов токсичности проксимальных и/или дистальных канальцев при воздействии на почечный органоид химических агентов, рутинно применяемым на животных моделях *in vivo*, была использована система культуры органоидов [60]. Подобным же образом Fredman и соавт. показали, что почечные стволовые клетки, полученные из чПСК- сфероидов, легко могут произвести почечные органоиды, воспроизводя ткань-специфичную эпителиальную физиологию. В частности, авторы смогли выключить гены подокаликсина, PKD1 (полицистин-1) или PKD2 (полицистин-2) с помощью технологии коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)/CAS9 с направляющей РНК CRISPR/Cas9, впервые доказав осуществимость создания 3D-почечной структуры для моделирования болезней почек человека [61]. Совсем недавно Takasato и соавт. [62] сделали еще один шаг для создания почечного органоида, содержащего индивидуальные нефроны, далее разделяющиеся на дистальные и проксимальные канальцы, начальную петлю Генле и клубочки, содержащие подоциты с развивающимися ножковыми отростками и проходящие васкуляризацию. Также как Freedman и соавт. [61], Takasato и соавт. показали, что проксимальные канальцы аккумулялировали декстран и дифференцированно подвергались апоптозу в ответ на цисплатину [62].

Хотя эти работы показали возможность создания различных почечных популяций из чПСК, они до сих пор различаются в отношении применяемых реагентов, их концентраций и времени выдерживания (табл. 1). Важно отметить, что разные данные по дифференцировке ПСК в клетки почечных линий демонстрируют, что мы еще далеки от выделения генов маркеров или поверхностных протеинов, определяющих разные ПМ популяции, выявленные у мышей [58].

ТЕХНОЛОГИИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Зв последнее время появились как потенциальные средства для редактирования генома в чПСК пациента вместе с CRISPR/Cas9, разные платформы по редактированию гена для увеличения гомологичной рекомбинантной эффективности, в частности ДНК-нуклеазы (цинк-содержащие нуклеазы, TAL эффекторные нуклеазы и мегануклеазы) [44]. В общем, ДНК-нуклеазы и CRISPR/Cas9-технологии позволяют выполнять различные манипуляции с геномом сайт-специфичным способом, например, активацию /инактивацию

гена, удаление последовательности, замену элементов и хромосомную перестройку [44, 63]. В контексте моделирования заболеваний почек CRISPR/Cas9-технология была использована для получения 3D-почечных структур из чПСК для выключения генов PKD1 (полицистин-1) и PKD2 (полицистин-2), приводя к возможности моделирования поликистозной болезни почек в 3D-образце, похожей на компартмент почечного эпителия [61].

Помимо огромного влияния на моделирование заболеваний человека платформ геномного редактирования, недавно исследованы другие аспекты, включая использование таких технологий для генерации ПСК репортерных клеточных линий [64–67]. Недавно группа Little'a разработала новый протокол по созданию самоорганизующихся почечных органоидов из чПСК, эквивалентных почкам человеческого плода в течение первого триместра гестации [62]. Эти результаты выявили, что мы, с одной стороны, до сих пор далеки от развития зрелых почечных клеток, имеющих терапевтический потенциал, подразумевая, что новые стратегии должны быть приняты во внимание для развития зрелых почечных клеток для клинического применения (например, использование кондиционированной культуры меди из почечных эмбриональных клеток, использование систем агрегации совмещенных культур с клетками плода человека и пр.). С другой стороны – профиль экспрессии мРНК в работе Little и соавт. происходит из различных клеточных типов, самоорганизующихся в почечную 3D-структуру, затрудняя анализ молекулярных путей, обеспечивающих почечную дифференцировку из различных индивидуальных клеточных типов, составляющих почечный органоид. С этой точки зрения технологии редактирования генома, в частности система CRISPR/Cas, могут помочь создать линии человеческих репортерных ПСК для детального выявления молекулярных сигналов почечной дифференцировки и, таким образом, пригодных для выявления зрелости генерированных клеток в сравнении с их двойниками *in vitro* из развивающихся эмбрионов.

До сих пор почечные линии репортерных ПСК генерировали путем искусственной бактериальной векторной хромосомы [53] и лентивируса [56]. Эти плодотворные исследования открыли пригодность линий репортерных клеток для идентификации и размножения требуемых типов почечных клеток (т.е. ПМ-клетки и клетки примитивной полоски) в ходе начала дифференциров-

Последние литературные данные по ренальной дифференцировке из человеческих плюрипотентных стволовых клеток*

Авторы и год	Происхождение плюрипотентных стволовых клеток	Протокол ренальной дифференцировки	Гломерулярные подоциты (последовательная культура, 8 дней): 10 нг/мл ⁻¹ активин А; 15 нг/мл ⁻¹ BMP7, 0,1 мкг/мл ⁻¹ ретиноидной кислоты	Промежуточный мезодерм (7 дней): 10 нг/мл ⁻¹ TGFβ1
Song et al. (2012) [3]	Человеческие iPСК (мезангиальные клетки)	Формирование тела эмбриоида (3 дня): 10 нг/мл ⁻¹ активин А; 15 нг/мл ⁻¹ BMP7, 0,1 мкг/мл ⁻¹ ретиноидной кислоты	Клетки проксимальных канальцев (20 дней): 10 нг/мл ⁻¹ BMP2; 2,5 нг/мл ⁻¹ BMP7; 10 нг/мл ⁻¹ активин А; 0,1 моль/мл ⁻¹ ретиноидной кислоты	Ранний промежуточный мезодерм (8 дней): 100 нг/мл ⁻¹ BMP7; 3 мкг CHIR99021
Narayanan et al. (2013) [4]	Человеческие эПСК	Мезендодерма (2 дня): 100 нг/мл ⁻¹ активин А; 3 мкг CHIR99021, 10 мкг Y27632	Клетки проксимальных канальцев (20 дней): 10 нг/мл ⁻¹ BMP2; 2,5 нг/мл ⁻¹ BMP7; 10 нг/мл ⁻¹ активин А; 0,1 моль/мл ⁻¹ ретиноидной кислоты	Промежуточный мезодерм (3 дня): 1 мкг TTPB
Mae et al. (2013) [53]	Человеческие ЭСК (H9, khes1 и khes3), человеческие iPСК (201B6, 201B7, 253G1 и 253G4)	Ранний промежуточный мезодерм (2 дня): 100 нг/мл ⁻¹ BMP7; 3 мкг CHIR99021; 1 мкг 4-[(E)-2-(5,6,7,8-тетрагидро-5,8,8-тетраметил-2-нафталил)-1-пропенил]бензойная кислота (TTPB)	Мезендодерма (2 дня): 100 нг/мл ⁻¹ активин А; 3 мкг CHIR99021, 10 мкг Y27632	Промежуточный мезодерм (3 дня): 1 мкг TTPB
Araoka et al. (2014) [54]	Человеческие ЭСК, человеческие iPСК (дермальные фибробласты)	Мезодермальные предшественники (2 дня): 30 нг/мл ⁻¹ BMP4; 50 нг/мл ⁻¹ FRF2; 17,5 мкг/мл ⁻¹ инсулин	Ранний промежуточный мезодерм (2 дня): 100 нг/мл ⁻¹ BMP7; 3 мкг CHIR99021; 1 мкг 4-[(E)-2-(5,6,7,8-тетрагидро-5,8,8-тетраметил-2-нафталил)-1-пропенил]бензойная кислота (TTPB)	Клетки, подобные предшественникам уретрального зачатка промежуточной мезодермы (2 дня): 0,1 мкг ретиноидной кислоты; 10 нг/мл ⁻¹ активин А; 100 нг/мл ⁻¹ BMP2
Xia et al. (2013) [55]	Человеческие iPСК (дермальные фибробласты)	Задняя примитивная полоска: (а) 2 дня, 30 нг/мл ⁻¹ BMP4; 10 нг/мл ⁻¹ активин А; (б) 2 дня, 8 мкг CHIR99021	Мезодермальные предшественники (2 дня): 30 нг/мл ⁻¹ BMP4; 50 нг/мл ⁻¹ FRF2; 17,5 мкг/мл ⁻¹ инсулин	Предшественники метанефральной мезенхимы и уретрального зачатка: (а) 11 дней, 200 нг/мл ⁻¹ FRF9; 50 нг/мл ⁻¹ BMP7; 0,1 мкг ретиноидной кислоты; 1 мкг/мл ⁻¹ гепарин; (б) 6 дней, без факторов
Takasato et al. (2014) [56]	Человеческие ЭСК	Мезендодермий (2 дня): 5 мкг CHIR99021	Задняя примитивная полоска: (а) 2 дня, 30 нг/мл ⁻¹ BMP4; 10 нг/мл ⁻¹ активин А; (б) 2 дня, 8 мкг CHIR99021	Сар-мезенхима (3 дня): 100 нг/мл ⁻¹ FRF9; 10 нг/мл ⁻¹ активин А
Lam et al. (2013) [57]	Человеческие ЭСК; человеческие iPСК (дермальные фибробласты)	EB-формация (1 день): 0,5 нг/мл ⁻¹ BMP4; 10 мкг Y27632	Мезендодермий (2 дня): 5 мкг CHIR99021	Задняя образующая мезодерма (6 дней): 1 нг/мл ⁻¹ BMP4; 10 мкг CHIR99021
Taguchi et al. (2014) [58]	Мышиные и человеческие iPСК	Мезендодермий (2 дня): 5 мкг CHIR99021	EB-формация (1 день): 0,5 нг/мл ⁻¹ BMP4; 10 мкг Y27632	Задняя, промежуточная, мезодерма (2 дня): 10 нг/мл ⁻¹ активин А; 3 нг/мл ⁻¹ BMP4; 3 мкг CHIR99021; 0,1 мкг ретиноидной кислоты; 10 мкг Y27632

*Эта таблица представляет обзор нескольких последних публикаций, в которых человеческие плюрипотентные клетки были дифференцированы в почечные клеточные линии. Детально перечислены факторы роста и цитокины, использованные в процессе дифференцировки.

Продолжение табл. 1

Imberti et al. (2015) [59]	Человеческие iPСК (SC101A-1)	Промежуточная мезодерма (6 дней): 0,1 μM ретиноидной кислоты; 1 μM CCG1423; 5 μM LY294002; 10 μM ретиноидной кислоты добавлено на 2 дня начиная со второго дня	Метанефральная мезенхима (13 дней): 50 нг/мл ⁻¹ BMP7; 10 нг/мл ⁻¹ ФРФ2; 15 нг/мл ⁻¹ GDNF		
Morizane et al. (2015) [60]	H9 человеческие ЭСК, человеческие iPСК (дермальные фибробласты)	Поздняя примитивная полоска (4 дня): 8 μM CHIR99021 для ЭСК и 10 μM CHIR99021; 5 нг/мл ⁻¹ ноггин для iPСК	Задняя промежуточная мезодерма (3 дня): 10 нг/мл ⁻¹ активин А	Метанефральная мезенхима (2 дня): 10 нг/мл ⁻¹ ФРФ9	Претубулярный агрегат (2 дня): 3 μM CHIR99021; 10 нг/мл ⁻¹ ФРФ9
Freedman et al. (2015) [61]	Человеческие ЭСК (H9/WA09), человеческие iPСК (фибробласты крайней плоти и дермальные фибробласты)	Сфероидные колонии-сандвичи (3 дня): 10 μM Y27632, матригель	Канальцевая органоидная дифференцировка, содержащая проксимальные каналы, эндотелиальные клетки и подоциты (13 дней): 13 μM CHIR99021 на 36 ч, затем восстановлено; затем замещение меди каждые три дня		
Takasato et al. (2015) [62]	Человеческие iPСК (CRL1502, клон C32)	Промежуточный мезодерм (7 дней) (передний и/или задний в зависимости от времени экспозиции CHIR): 8 μM CHIR99021 (2–5 дней), затем 200 нг/мл ⁻¹ ФРФ9; 1 $\mu\text{g}/\text{мл}^{-1}$ гепарин (2–5 дней)	Почечный органоид, содержащий нефроны, связанные с сетью собирающих трубочек, окруженной почечным интерстицием и эндотелиальными клетками (11–18 дней): 5 μM CHIR99021 на 1 ч, затем 200 нг/мл ⁻¹ ФРФ9 и 1 $\mu\text{g}/\text{мл}^{-1}$ гепарин (5 дней); затем без цитокинов (9–13 дней)		

ки. Важно отметить, что группа Osafune сделала дальнейший шаг в применении OSR-1-GFP ген-репортерных клеточных линий и выявила два агониста рецептора ретиноевой кислоты, а именно AM580 и TTNPB, которые вместе с CHIR99021 индуцировали дифференцировку ПМ-клеток путем активации экспрессии КМП4 [54]. Интересно, что новый метод дифференцировки, использующий малые составляющие, обеспечил менее дорогой и более совместимый метод генерации ПМ-клеток по сравнению с методом применения фактора роста, описанный этой же группой ранее [53]. Поскольку идентификация и размножение тканеспецифичных почечных стволовых клеток/клеток-предшественников с нефрогенным потенциалом являются критичным шагом в развитии клеточной терапии для заболеваний почек, применение почечного репортера ПСК может привести к разработке условий клеточного культивирования для получения 3D-почечной структуры из чПСК.

НОВЫЕ СТРАТЕГИИ БИОИНЖИНИРИНГА ПОЧКИ

В области тканевого инжиниринга применяют принципы биологии и инжиниринга для разработки функционального замещения поврежденной ткани [68]. Десятилетиями исследователи напряженно работали для создания техник и методик для разработки биоостова, используя натуральные или синтетические биоматериалы [69, 70]. Общее мнение в данной области таково, что для успешного применения в тканевом инжиниринге такой остов должен обладать несколькими ключевыми характеристиками с целью поддержания правильного формирования ткани и функции: (а) быть биосовместимым; (б) обладать достаточной механической силой; (в) быть биоактивным для изменения 3D-клеточного микроокружения и (г) обеспечивать диффузию питательных веществ и очищение от токсичных продуктов. В этой области произошли значительные достижения, включая успешное создание трансплантатов таких тканей, как кожа [71], хрящ [72, 73], кость [74], мочевого пузыря [75], сосуды

[76] и трахея [77]. Однако в наше время исследователи стоят лицом к лицу с новой проблемой, относящейся к биоинжинирингу более сложных 3D-органов: легкие, печень, сердце и почки.

Сложные органы требуют интактной сосудистой сети, которая далее могла бы быть включена в систему циркуляции после трансплантации реципиенту для обеспечения адекватного питания и кислородной поддержки всему органу. Более того, такие органы обычно обладают высокоорганизованными орган-специфичными многоклеточными структурами, ответственными за выполнение основных функций. Почка представляет собой один из наиболее сложных органов в отношении развития, пространственной организации и клеточной специализации. Почка человека состоит из более чем 30 разных типов клеток и тысяч сложных и функционально разделенных эпителиальных структур, называемых нефронами, которые являются функциональной единицей почки. Каждый нефрон дифференцируется из разных регионов, главным образом из капсулы Боумена, которая окружает клубочек, и почечных канальцев, каждый из которых имеет различные анатомические характеристики и физиологическую роль [16]. Такая сложная органная структура не может быть воспроизведена при использовании традиционных методик тканевого инжиниринга остова.

Недавнее получение остова орган-специфичного экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) путем децеллюляризации/рецеллюляризации и возможность точного расположения клеток и материалов путем технологии 3D-биопринтинга представляются двумя наиболее обещающими достижениями органного биоинжиниринга.

СОЗДАНИЕ ОРГАНЫХ ОСТОВОВ ПУТЕМ ТЕХНОЛОГИИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ/РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ

Децеллюляризация целого органа открывает новые перспективы в тканевом инжиниринге [78]. Несколькими лабораториями было сообщено о создании почечного остова от грызунов [79–85], свиней [86–88], макак-резус [89] и человеческих почек [5, 90, 91] (табл. 2).

Описано много протоколов децеллюляризации (см. [92–94]), которые обычно включают антеградную перфузию очищающих веществ (детергентов), ферментов и других разрушающих клетки растворов через сосудистую систему органа для удаления клеточных компонентов, в то же время сохраняя 3D-архитектонику и биохимический состав нативного ЭЦМ.

После децеллюляризации почечный остов сохраняет гломерулярную и тубулярную архитектонику и сосудистую сеть. Интересно, что некоторые исследования открыли важную роль почечного ЭЦМ в управлении поведением клетки. Nakayama и соавт. показали, что чЭСК, подсаженные в ЭЦМ децеллюляризованной почки макак-резус, формировали канальцы и экспрессировали ряд специфичных для почки маркеров, но эти события не происходили, когда использовали ЭЦМ легкого, показывая определенную специфичность функций почечного ЭЦМ [95]. Действительно, в недавней публикации O'Neill и соавт. [96] было описано, что полученные из сосочка почечные стволовые клетки регулируются по-разному при культивировании в контакте с разными регионами ЭЦМ почки, предполагая регион-специфичный эффект ЭЦМ почки на поведение стволовых клеток. Более того, в недавнем исследовании Yu и соавт. [97] бесклеточный ЭЦМ почечного остова крысы был пересажен в частично нефрэктомизированные почки крысы и показал некоторое возобновление роста удаленной области спустя 4 нед после трансплантации. Интересно, что микроскопический анализ показал миграцию нестипозитивных клеток из поврежденной почки в трансплантированный бесклеточный остов, демонстрируя, что интактный бесклеточный почечный остов сохраняет биоактивные сигналы. Однако ни одного значимого восстановления почечной функции показано не было. В общем, эти работы поддерживают идею, что бесклеточный почечный ЭЦМ сохраняет ренальные специфичные биохимические и биофизические сигналы, которые способны регулировать клеточную пролиферацию и дифференцировку. Хотя лежащие в основе механизмы еще должны быть изучены, эти данные предполагают, что ЭЦМ остова органа, полученный путем децеллюляризации, мог бы быть идеальной системой для обеспечения клеткам необходимого орган-специфичного микроокружения для создания функционирующих почек.

Несмотря на эти впечатляющие данные, количество исследований, продемонстрировавших успешную трансплантацию целиком рецеллюляризованных почек, ограничено [80, 83–85, 87]. Одно из главных препятствий до настоящего времени – это необходимость эффективно рендотелизировать сосудистую сеть созданной почки перед имплантацией для того, чтобы избежать массивных тромбозов при соединении с сосудистой системой реципиента. Orlando и соавт. [87] имплантировали децеллюляризованный

почечный остов свиньи в животное-реципиента, поддерживая достаточное кровяное давление в течение операции; однако в отсроченном периоде, составившем 2 нед, авторы доложили о массивных тромбозах, подчеркнув факт того, что эндотелизация сосудистой системы остова является решающим требованием для проведения успешной пересадки и длительной жизни трансплантата. Re-losa и соавт. [84] также наблюдали ту же проблему формирования тромбов при имплантации децеллюляризованного почечного остова крысам. Примечательно, что в исследовании, проведенном Ott [80], целиком бесклеточные почки крыс были рецеллюляризованы почечными клетками новорожденной крысы и клетками эндотелия пупочной вены человека и далее имплантированы ортотопически, что привело к некоторому восстановлению почечной фильтрации и реабсорбции. В этой важной концептуальной работе не было выявлено признаков кровотечения или образования тромба в течение процесса имплантации, доказывая важность реэндотелизации сосудистой сети бесклеточного остова. Все эти работы подтверждают, что ортотопическая трансплантация почечного остова в наши дни технически возможна, и что надлежащая рецеллюляризация таких остовов необходима для последующего достижения эффективной трансплантации и функционирования органа.

Оптимальный источник клеток для внедрения в бесклеточный почечный остов – это другой нерешенный вопрос. В настоящее время исследователи стараются рецеллюляризовать почечный остов с помощью различных клеточных источников, включая почечные клетки новорожденных [80], эндотелиальные клетки пупочной вены человека [80], мышинные ЭСК [82, 85], эндотелиальные клетки из чиПСК [83], иммортализованные клетки почечного кортикального эпителия человека [83], линию клеток карциномы поджелудочной железы человека [84] и первичные почечные клетки свиньи [98]. Учитывая последние достижения в технологиях ИПСК и генного редактирования, а также самый последний прогресс в разработке протоколов для ренальной дифференцировки ПСК в надлежащие типы почечных клеток, представляется, что ПСК-почечные клетки будут идеальным источником для создания целого органа (что обсуждается выше в разделе терапия стволовыми клетками для регенерации почки). Считается, что предшественники почечных клеток из ПСК-клеток будут подходить для биоинжиниринга почки в большей степени, чем зрелые фенотипы

почечных. Тем не менее, большой объем работы еще предстоит выполнить, чтобы точно охарактеризовать и признать пригодными популяции клеток из ПСК в отношении клеточной идентичности, дифференцировки и финального созревания для обеспечения надлежащей репопуляции различных почечных отделов, а также выполнения необходимых физиологических функции почки.

В текущих работах обычно используют почечную артерию [79–82, 99] или мочеточник [79, 80] в качестве пути доставки клеток в почечный остов. Однако выбор пути для клеточного осеменения должен быть изучен в большей степени, учитывая, что различные биохимические и биофизические сигналы от различных отделов ЭЦМ могут влиять на клеточную пролиферацию, дифференцировку и дальнейшее созревание, как предполагается некоторыми исследованиями [95, 96]. В настоящий момент для доставки клеток в почечный остов и обеспечения стандартной доставки питательных веществ и кислорода в рецеллюляризованный почечный остов используют самодельные биореакторы. Song и соавт. [80] разработали биореактор, который позволяет осуществлять перфузию как через почечную артерию, так и мочеточник, включая порт для забора воздуха для генерирования среды отрицательного давления и создания трансрэнального градиента давления, который улучшает прохождение клеток через мочеточник. Однако, до сих пор главной проблемой остается неравномерное распределение клеток, обычно наблюдаемое после осеменения, с неспособностью клеток в ряде случаев достичь клубочка и, как правило, неэффективность формирования клеточной плотности, сравнимой с нативным органом. Поэтому дальнейшая оптимизация систем биореактора будет необходима для достижения полной рецеллюляризации и созревания органа перед имплантацией [100].

В целом возможность совмещения бесклеточного почечного ЭЦМ остова с почечными клетками из чиПСК является уникальной технологической платформой для инжиниринга почки [101]. В нескольких статьях уже показана возможность применения технологии децеллюляризации к почкам человека [5, 90, 91], хотя ни в одном из этих исследований не изучали рецеллюляризацию. Будущие направления потребуют определения оптимальных условий рецеллюляризации (клеточная плотность, путь доставки клеток и методика осеменения) с целью улучшения клеточной плотности, распределения и задержки в различных областях бесклеточного почечного остова. Более того, расширение тех-

Таблица 2

Последние литературные данные по стратегиям децеллюляризации/рецеллюляризации почки*

Автор и год	Вид	Децеллюляризация	Рецеллюляризация			Имплантация	Основные исходы
			Засеянные клетки	Метод засеивания	Метод культивирования остова		
Ross et al. (2009) [79], (2012) [99]	Крыса линии Спрег-Доули	Гравитационная перфузия (при 100 мм рт. ст.) через почечную артерию и мочеточник с (а) 3% Тритоном X-100, (б) деоксирибонуклеазой, (в) 3% Тритоном X-100, (г) 4% додецилсульфатом натрия (ДСН)	Мышинные ЭСК	Инъекция через артерию и мочеточник вручную	Автоматизированная перфузионная система, разработанная для поддержания давления на уровне 120/80 мм рт. ст.	Нет	Клетки, введенные в артерию, сначала попали в клубочки, но потом мигрировали в сосудистую сеть в процессе культивирования. Клетки, введенные в мочеточник, распределились неравномерно
Song et al. (2013) [80]	Крыса линии Спрег-Доули	Перфузия почечной артерии при постоянном давлении 40 мм рт. ст. 1% ДСН 12 ч, 1% Тритоном X-100 30 мин	Клетки почки новорожденной крысы и эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES)	Засеивание HUVES при артериальном кровотоке 1 мл/мин ⁻¹ с последующей статической инкубацией в течение ночи. Клетки почки новорожденной крысы засеивались через мочеточник при отрицательном градиенте давления, достигнутом в камере биореактора	Культура, перфузируемая артериально со скоростью 1,5 мл/мин ⁻¹ в биореакторе	Ортопедическая имплантация крысы	Частичное восстановление почечной фильтрации и реабсорбции электролитов. Рецеллюляризация 70% клубочков. Тромбообразование или кровотечения во время имплантации не было
Bonandrini et al. (2014) [82]	Крыса линии Спрег-Доули	Перфузия почечной артерии со скоростью 0,4 мл/мин ⁻¹ при давлении 62–107 мм рт. ст. с 1% ДСН 17 ч	R1 мышинные ЭСК	Динамическое засеивание через почечную артерию 0,2 мл/мин ⁻¹	Культура, перфузируемая в биореакторе	Нет	Снижение экспрессии OCT4 и увеличение NCAM, Tie-2 и CD31
Sullivan et al. (2012) [86]	Йорк-ширская свинья	Перфузия почечной артерии с 0,5% ДСН и деоксирибонуклеазой в течение ночи	Первичные кортикальные почечные клетки человека	5 × 7 мм биопсии коры были засеяны статически	Статическое культивирование 3–4 дня	Нет	Клеточная пролиферация. Лучшее действие ДСН при сравнении с Тритоном X-100
Nakayama et al. (2010) [89], (2013) [95]	Макак-резус	Срезы почки: 1% ДСН 7–10 дней	WA09 человеческие ЭСК	Срезы почки 8 мм в диаметре были статически засеяны клетками	Статическое культивирование в течение 8 дней	Нет	Увеличение экспрессии генных маркеров почечных канальцев
O'Neill et al. (2013) [96]	Йорк-ширская свинья	0,02% трипсин 2 ч, 3% Твин (Твееп) 2 ч, 4% деоксихолат натрия 2 ч	Мышинные почечные стволочные клетки и мышинные мезенхимальные стволочные клетки	Клетки помещались на срезы децеллюляризованного остова, ЭСК-гидрогель и растворимый ЭЦМ	Статическое культивирование до 7 дней	Нет	Сосочковый ЭЦМ ингибировал пролиферацию и увеличивал мезенхимальную активность почечных стволочных клеток
Caralt et al. (2014) [83]	Крыса линии Спрег-Доули	Три метода: (а) 1% Тритон X-100; (б) 1% Тритон X-100 и 0,1% ДСН; (в) 0,05% EDTA с 0,02% трипсином и 1% Тритоном X-100	Человеческие ИПСК-эндотелиальные клетки и оживленные эпителиальные клетки кортикальных почечных канальцев человека (RCTEs)	Вручную инъецированы или инфузирваны через антеградную перфузию биореактора в почечную артерию со скоростью 25 мл/мин ⁻¹ на 15 мин	Статическое культивирование в течение 36 ч и культивирование при перфузии в биореакторе при скорости 4 мл/мин ⁻¹ до 7 дней	Нет	Эндотелиальные клетки обнаружены в сосудистом русле, а RCTEs образовали структуры канальцев. Доступ кислорода был ограничен в некоторых участках

*Эта таблица представляет обзор нескольких недавних публикаций, в которых описаны децеллюляризация и рецеллюляризация целой почки *in vitro* при использовании различных типов клеток. Также подробно описаны видовая принадлежность децеллюляризации почки, главные условия децеллюляризации, засеянные типы клеток, метод засеивания, методика культивирования почечного остова и основные результаты.

Продолжение табл. 2

Peloso et al. (2015) [84]	Крыса Льюис	Аортальная антеградная пульсовая перфузия с Тритоном X-100 1% при скорости 70 мл/мин ⁻¹ (1 ч 25 мин), затем PBS со скоростью 50 мл/мин ⁻¹ (1 ч), после ДСН 1% при скорости 70 мл/мин ⁻¹ (1 ч 25 мин)	Клетки карциномы поджелудочной железы человека (MIA PaCa-2)	Инъецирование в ручную через сосудистое русло почечной артерии	Орган перфузировался в биореакторе со специфичным способом 24 ч со скоростью потока 1 мл/мин ⁻¹	Ортотопическая имплантация крысе	Гомогенное распределение клеток в почечном матриксе и отсутствие токсичности остова. Отсутствие эндотелия сосудистой сети после трансплантации обеспечивает прямой контакт между кровью и ЭЦМ, что приводит к интенсивной активации каскада коагуляции и формированию сгустков
Guan et al. (2015) [85]	Крыса Вистар	Перфузия почечной артерии 2 мл/мин ⁻¹ с 0,01 м PBS 15 мин, 0,5% ДСН 4 ч и затем PBS 24 ч для удаления ДСН	Мышьиные ЭСК	Засеяны в ручную через почечную артерию и мочеточник	Клетки могли прижиться в течение ночи, после чего перфузия возобновлялась при скорости 1 мл/мин ⁻¹	Ортотопическая имплантация крысе	Увеличение репопуляции клеток почечного остова при контролируемых условиях перфузии. ЭСК прикрепились к ЭЦМ и пролиферовали. Сосудистое дерево полностью было окклюзировано тромбами
Guan et al. (2015) [88]	Обычная свинья	Перфузия почечной артерии: дистиллированная вода 10 мл/мин ⁻¹ 2 ч, 1% ДСН 10 мл/мин ⁻¹ 28 ч и 1% Тритон X-100 2 ч, финальная отмывка PBS 10 мл/мин ⁻¹ 4 дня	Мышьиные ЭСК	Множественное пункционное засеивание инжектором 28G	Клетки могли прижиться в течение 4 ч, затем почечный остов соединяли с системой биореактора и перфузировали при скорости 2 мл/мин ⁻¹ 7 дней	Нет	Примененный протокол децеллюляризации значительно снижал содержание ДНК, поддерживая при этом основные структурные особенности и задерживая цитокины
Orlando et al. (2013) [90]	Удаленные человеческие почки	Дистиллированная вода 12 мл/мин ⁻¹ 12 ч, 0,5% ДСН 12 мл/мин ⁻¹ 48 ч как в почечной артерии, так и в мочеточнике, финальная отмывка PBS 6 мл/мин ⁻¹ 5 дней	-	-	-	Нет	Оптимизирование децеллюляризации путем перфузии через артерию и также мочеточник ретроградно в собирательную систему. Продемонстрирована способность к ангиогенезу ЭЦМ остова.
Peloso et al. (2015) [91]	Удаленные человеческие почки	PBS при скорости 12 мл/мин ⁻¹ 12 ч, 0,5% ДСН 12 мл/мин ⁻¹ 48 ч как в почечной артерии, так и в мочеточнике, финальная отмывка деоксирибонуклеазой 6 ч при скорости 6 мл/мин ⁻¹ и затем PBS 6 мл/мин ⁻¹ 5 дня	-	-	-	Нет	Морфология и пространственность бесклеточного клубочка и его сосудистая сеть были относительно хорошо сохранены после децеллюляризации и сравнимы с клеточным двойником. Сосудистая сеть сохранила свою нативную эластичность. Цитокины остались внутри матрикса после децеллюляризации в значительной концентрации
Abolbashari et al. (2016) [98]	Йоркширская свинья	Перфузия почечной артерии 0,5% ДСН 36 ч и деоксирибонуклеазой в течение ночи	Первичные почечные клетки свиньи	Множественные клеточные инъекции в кортикальный регион почечного остова. Оптимизированный метод инъекции клеток, способный восстановить популяцию 50% верхнего полюса почки	Перфузия в биореакторе при скорости 10 мл/мин ⁻¹ направляю в почку через почечную артерию	Нет	Клеточная организация в надлежащую структуру почечных канальцев без вовлечения в засеивание сосудистой сети. Уровень активности гидролаз был сравним с нормальной почкой. Продукция эритропоэтина восстановленными почечными клетками все время увеличивалась при культивировании в биореакторе, показывая на клинически важную функциональную продукцию

нологии рецеллюляризации почечного остова человека потребует улучшения протоколов по точной дифференцировке, стратегий эффективной доставки клеток и инновационных систем биореакторов с физиологически необходимыми условиями клеточных культур (объем, давление, скорость потока и механические стимулы) с целью создания функционирующей человеческой почки [100, 102].

3D-БИОПРИНТИНГ

3D-биопринтинг использует последние разработки в прикладных производственных технологиях (также известный как 3D-принтинг) по тщательному депонированию живых клеток или клеточных масс вместе с поддерживающим биоматериалом на основе гидрогеля (вместе называемыми биочернилами) для точной геометрии при построении орган-подобных или тканевых структур в трех измерениях [103, 104]. В последние годы были сделаны новые достижения в разработке различных техник биопринтинга для создания 3D-тканеподобной живой структуры (см. в [6]), включая базирующиеся на инжекторном клеточном принтинге, экструзии, мягкой литографии и лазер-индуцированном переносе. Все они содержат компьютерное устройство, которое транслирует в трех измерениях сложную геометрию с целью повторения специфических биологических признаков ткани или даже целого органа.

Несмотря на огромный потенциал этой технологии в области тканевого инжиниринга, одним из главных препятствий, требующих решения в первую очередь, остается недостаток адекватного биоматериала для успешного биопринтинга живых структур.

Много исследований проводятся в этой области для разработки новых классов биочернил, что полноценно освещено в других источниках [105–107]. Интересно, что в недавней работе Pati и соавт. [108] были изготовлены биочернила из децеллюляризованных жировой, хрящевой и сердечной тканей и использованы для принтинга нагруженных клетками конструкции с регулируемой пористостью. Авторы продемонстрировали возможность создания тканевых аналогов *in vitro* как с адипогенным, так и хондрогенным потенциалом, показав стволовые клетки из человеческой жировой ткани и мезенхимальные стволовые клетки из ткани нижней носовой раковины человека, напечатанные при использовании ЭЦМ-биочернил, полученных из жировой ткани и хрящевой ткани соответственно. В контексте регенерации почки успешное создание функцио-

нального почечного остова путем биопринтинга будет ограничено возможностью повторения ренального ЭЦМ в отношении композиции и пространственной организации, как и депонирования различных популяций почечных клеток организованным образом. В связи с этим биочернила, полученные из бесклеточного почечного ЭЦМ, станут привлекательным материалом, так как это может обеспечить реноспецифичные внутриструктурные сигналы для напечатанных клеток.

Хотя технология 3D-биопринтинга пока только в самом раннем периоде развития, уже показан ее потенциал в создании органов. Группа Atala смогла смоделировать напечатанный мочевой пузырь, используя модифицированную технологию инжекторного биопринтинга [109], показав, что возможно печатать различные типы клеток в организованной 3D-структуре. Эта оригинальная работа открыла новые перспективы в 3D-принтинге органа в целом. Такие достижения, как использование тканевых сфероидов в качестве строительных блоков, продемонстрировали большой успех в создании микротканей, например, сосудистой сети [110, 111], которые в дальнейшем могут быть объединены в организованную макроткань.

Хотя большой объем работы еще должен быть проделан перед тем как полностью функционирующая почка сможет быть напечатана, предварительным шагом будет создание мелких органоидов или функциональных единиц, таких как нефрон, которые будут полезны для применения при лекарственном скрининге и моделировании заболеваний. Уже некоторые работы исследуют применение чПСК в биопринтинге [112, 113] для изучения возможных эффектов параметров процесса биопринтинга на жизнеспособность клетки и потенциал дифференцировки.

В отношении инжиниринга целого органа несколько проблем должны быть приняты во внимание для реализации этой техники [103, 104]: а) разработка новых биочернил (т.е. ткань специфичных биочернил); б) улучшение устройств биопринтинга с достаточным пространственным разрешением для копирования иерархичной структуры сложного органа и сложности клеток органа; в) необходимость васкуляризации; г) разработка адаптированной перфузии биореакторов, подходящих для биопринтинга и дальнейшего созревания органа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние три года оказались впечатляющими в области инжиниринга почечной ткани.

Недавние работы демонстрируют осуществимость не только создания почечных клеток из пациент-специфичных иПСК, но и понимание сигналов, управляющих их образованием *in vitro*. Обнаруженные различия в данных указывают, что образованные почечные 3D-структуры при комбинации почечных дифференцированных клеток из чПСК имеют различную степень функционального потенциала. Таким образом, предполагается, что необходимо развивать в дальнейшем методики *in vivo*, доказывающие функциональность созданных из иПСК пациента почечных клеток, например, их трансплантация в нефрэктомически поврежденную почку на мышинных моделях. Кроме того, необходимо понимать, какие молекулярные компоненты определяют почечную идентичность в ходе развития у человека, а создание репортерных ПСК для почечных маркеров являются необходимыми для всестороннего анализа развития почки, приводя к разработке новых протоколов для формирования зрелых и функциональных почечных клеток.

Другая проблема, относящаяся к инжинирингу почки, касается разработки инновационных методов, позволяющих имитировать такую сложную структуру органа. Недавно две разные стратегии привлекли внимание ученых – инжиниринг целого органа путем децеллюляризации/рецеллюляризации и биопринтинг живых орган-подобных структур, что могло бы стать новым источником органного обеспечения.

В заключение, продолжающиеся исследования в области регенеративной медицины будут напрямую способствовать созданию новых стратегий биоинжиниринга почки: от производства биооснова и 3D-живых структур до продукции почечных клеток из иПСК пациента в клинической практике.

Благодарности

Мы хотели бы поблагодарить М. Schwarz, P. Schwarz за административную помощь. N.M. был частично поддержан StG-2014-640525_REGMAMKID, RyC 2014-16242, Fundaci_o Privada La Marat_o de TV3 (121430/31/32) Министерством экономики и конкурентоспособности Испании (SAF2014-59778) и комиссией по университетам и научным исследованиям отдела инноваций, университетов и предприятий генералитета Каталонии (2014 SGR 1442). E.G. был частично поддержан StG-2014-640525_REGMAMKID and La Fundaci_o Privada La Marat_o de TV3, 121430/31/32. J.C.I.B. был поддержан грантами фонда Glenn, благотворительного фонда G.Harold и Leila Y.Mathers и благотворительный фонд.Leona M. and Harry B. Helmsley

Участие авторов

N.M. выполняла эксперименты, анализировала данные, предоставляла реагенты и другие необходимые материалы и писала статью; E.G. выполняла эксперименты, анализировала данные и писала статью; J.I.B. предоставлял реагенты или другие необходимые материалы и писал статью.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. <https://www.kidney.org/news/newsroom/factsheets/Organ-Donation-and-Transplantation-Stats>.
2. <http://optn.transplant.hrsa.gov/3>. Song B, Smink AM, Jones CV, et al. The directed differentiation of human iPS cell into kidney podocytes. *PLoS One* 2012; 7, e46453
3. Narayanan K, Schumacher KM, Tasnim F et al. Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells. *Kidney* 2013; Int 83, 593–603
4. Katari R, Peloso A, Zambon JP et al. Renal bioengineering with scaffolds generated from human kidneys. *Nephron* 2014; *Exp Nephrol* 126, 119–124
5. Mandrycky C, Wang Z, Kim K & Kim DH. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol* 2015; Adv doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.011
6. Montserrat N, Ramirez-Bajo MJ, Xia Y et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human renal proximal tubular cells with only two transcription factors, OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 2012; 287, 24131–24138
7. Baer PC, Geiger H. Human renal cells from the thick ascending limb and early distal tubule: characterization of primary isolated and cultured cells by reverse transcription polymerase chain reaction. *Nephrology* 2008; 13, 316–321
8. Baer PC, Nockher WA, Haase W, Scherberich JE. Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney* 1997; Int 52, 1321–1331
9. Humphreys BD, Czerniak S, DiRocco DP, et al. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108, 9226–9231
10. Song J, Czerniak S, Wang T et al. Characterization and fate of telomerase-expressing epithelia during kidney repair. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22, 2256–2265
11. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell* 2008; 2, 284–291
12. Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G. Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9, 137–146
13. Romagnani P, Anders H-J. What can tubular progenitor cultures teach us about kidney regeneration? *Kidney* 2013; Int 83, 351–353
14. Osafune K, Takasato M, Kispert A, Asashima MNR. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colonyforming assay. *Development* 2006; 133, 151–161
15. Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4, 3
16. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282, 1145–1147
17. Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I et al. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2001; 292, 740–743
18. Tada M, Takahama Y, Abe K et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001; 11, 1553–1558
19. Hou P, Li Y, Zhang X et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by smallmolecule compounds. *Science* 2013; 341, 651–654
20. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131, 861–872
21. Kazutoshi Takahashi SY. A developmental framework for induced pluripotency. *Development* 2015; 142,3274–3285

23. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 2010; 7, 651–655
24. Aasen T, Raya A, Barrero MJ et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26, 1276–1284
25. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 2009; 5, 353–357
26. Kim JB, Greber B, Ara et al. Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 2009; 461, 649–643
27. Gonzalez F, Boue S, Belmonte JCI. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 2011; 12, 231–242
28. Zhou H, Wu S, Joo JY et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4, 381–384
29. Kim D, Kim C-H, Moon J-I et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4, 472–476
30. Okita K, Matsumura Y, Sato Y et al. A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells. *Nat Methods* 2011; 8, 409–412
31. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; 7, 618–630
32. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; 8, 376–388
33. Meng G, Liu S, Rancourt DE. Synergistic effect of medium, matrix, and exogenous factors on the adhesion and growth of human pluripotent stem cells under defined, xeno-free conditions. *Stem Cells Dev* 2012; 21, 2036–2048
34. Sugii S, Kida Y, Kawamura T et al. Human and mouse adiposederived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107, 3558–3563.
35. Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2014; 4, 3594
36. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460, 53–59
37. Ebert AD, Yu J, Rose FF et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457, 277–280
38. Ye L, Chang JC, Lin C et al. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106, 9826–9830
39. Liu G-H, Barkho BZ, Ruiz S et al. Recapitulation of premature aging with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2009; 472, 221–225
40. Itzhaki I, Maizels L, Huber I et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471, 225–229
41. Nguyen HN, Byers B, Cord B et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 2011; 8, 267–280
42. Lee G, Papapetrou EP, Kim H et al. Modeling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient specific iPSCs. *Nature* 2011; 461, 402–406
43. Moretti A, Bellin M, Welling A et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2010; 363, 1397–1409
44. Li M, Suzuki K, Kim NY et al. A cut above the rest: targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 2014; 289, 4594–4599
45. Liu G-H, Suzuki K, Qu J et al. Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell* 2011; 8, 688–694
46. Howden SE, Gore A, Li Z et al. Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108, 6537–6542
47. Papapetrou EP, Lee G, Malani N et al. Genomic safe harbors permit high b-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29, 73–78
48. Li M, Suzuki K, Qu J et al. Efficient correction of hemoglobinopathy-causing mutations by homologous recombination in integration-free patient iPSCs. *Cell Res* 2011; 21, 1740–1744
49. Liu G-H, Qu J, Suzuki K et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature* 2012; 491, 603–607
50. Fattahi F, Steinbeck JA, Kriks S et al. Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. *Nature* 2016; 531, 105–109
51. Tiscornia G, Vivas EL, Izpisua Belmonte JC. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* 2011; 17, 1570–1576
52. Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J, Mundel P. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int* 2007; 72, 26–36
53. Mae S-I, Shono A, Shiota F et al. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2013; 4, 1367
54. Araoka T, Mae S, Kurose Y et al. Efficient and rapid induction of human iPSCs/ESCs into nephrogenic intermediate mesoderm using small molecule-based differentiation methods. *PLoS One* 2014; 9, e84881
55. Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nat Cell Biol* 2013; 15, 1507–1515
56. Takasato M, Er PX, Becroft M et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol* 2014; 16, 118–126
57. Lam AQ, Freedman BS, Morizane R et al. Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers. *J Am Soc Nephrol* 2013; 25, 1211–1225
58. Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T et al. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 14, 53–67
59. Imberti B, Tomasoni S, Ciampi O et al. Renal progenitors derived from human iPSCs engraft and restore function in a mouse model of acute kidney injury. *Sci Rep* 2015; 5, 8826
60. Morizane R, Lam AQ, Freedman BS et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol* 2015; 33, 1193–1200
61. Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ et al. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat Commun* 2015; 6, 8715
62. Takasato M, Er PX, Chiu HS et al. Kidney organoids from human iPSCs contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015; 526, 564–568
63. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K et al. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet* 2015; 52, 289–296
64. Hu J, Lei Y, Wong W-K, Liu S et al. Direct activation of human and mouse Oct4 genes using engineered TALE and Cas9 transcription factors. *Nucleic Acids Res* 2014; 42, 4375–4390
65. Elliott DA, Braam SR, Koutsis K et al. NKX2-5eGFP/w hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. *Nat Methods* 2011; 8, 1037–1040
66. Den Hartogh SC, Schreurs C, Monshouwer-Kloots JJ et al. Dual reporter MESP1 mCherry/w -NKX2-5 eGFP/w hESCs enable studying early human cardiac differentiation. *Stem Cells* 2015; 33, 56–67
67. Krentz NA, Nian CLF. TALEN/CRISPR-mediated eGFP knock-in add-on at the OCT4 locus does not impact differentiation of human embryonic stem cells towards endoderm. *PLoS One* 2014; 9, e114275
68. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260, 920–926
69. Kim TG, Shin H, Lim DW. Biomimetic scaffolds for tissue engineering. *Adv Funct Mater* 2012; 22, 2446–2468
70. Mallick KK, Cox SC. Biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Front Biosci* 2013; 5, 341–360
71. Kamel RA, Ong JF, Eriksson E et al. Tissue engineering of

- skin. *J Am Coll Surg* 2013; 217: 533–555
72. Sittlinger M, Bujia J, Minuth WW et al. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials* 1994; 15, 451–456
73. Liao J, Guo X, Grande-Allen KJ et al. Bioactive polymer/extracellular matrix scaffolds fabricated with a flow perfusion bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31, 8911–8920
74. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 2012; 40, 363–408
75. Atala A. Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull* 2011; 97, 81–104
76. Koike N, Fukumura D, Gralla O et al. Tissue engineering: creation of longlasting blood vessels. *Nature* 2004; 428, 138–139
77. Kojima K, Vacanti CA. Tissue engineering in the trachea. *Anat Rec* 2014; 297, 44–50
78. Tapias LF, Ott HC. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Curr Opin Organ Transplant* 2014; 19, 145–152
79. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T et al. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol* 2014; 20, 2338–2347
80. Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med* 2013; 19, 646–651
81. Burgkart R, Tron A, Prodinge P et al. Decellularized kidney matrix for perfused bone engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 2014; 20, 553–561
82. Bonandrini B, Figliuzzi M, Papadimou E et al. Recellularization of wellpreserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2014; 20, 1486–1498
83. Caralt M, Uzarski JS, Iacob S et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant* 2014; 15, 64–75
84. Peloso A, Ferrario J, Maiga B et al. Creation and implantation of acellular rat renal ECM-based scaffolds. *Organogenesis* 2015; 1, 58–74
85. Guan Y, Liu S, Sun C et al. The effective bioengineering method of implantation decellularized renal extracellular matrix scaffolds. *Oncotarget* 2015; 6, 36126–36138
86. Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials* 2012; 33, 7756–7764
87. Orlando G, Farney AC, Iskandar SS et al. Production and implantation of renal extracellular matrix scaffolds from porcine kidneys as a platform for renal bioengineering investigations. *Ann Surg* 2012; 256, 363–370
88. Guan Y, Liu S, Liu Y et al. Porcine kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 56, 451–456
89. Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2010; 16, 2207–2216
90. Orlando G, Booth C, Wang Z et al. Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies. *Biomaterials* 2013; 34, 5915–5925
91. Peloso A, Petrosyan A, Da Sacco S et al. Renal extracellular matrix scaffolds from discarded kidneys maintain glomerular morphometry and vascular resilience and retains critical growth factors. *Transplantation* 2015; 99, 1807–1816
92. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2012; 32, 3233–3243
93. He M, Callanan A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19, 194–208
94. Keane TJ, Swinehart I, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in-vivo relevance. *Methods* 2015; 84, 25–34
95. Nakayama KH, Lee CCI, Batchelder CA, Tarantal AF. Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. *PLoS One* 2013; 8, e64134
96. O'Neill JD, Freytes DO, Anandappa AJ et al. The regulation of growth and metabolism of kidney stem cells with regional specificity using extracellular matrix derived from kidney. *Biomaterials* 2013; 34, 9830–9841
97. Yu YL, Shao YK, Ding YQ et al. Decellularized kidney scaffold-mediated renal regeneration. *Biomaterials* 2014; 35, 6822–6828
98. Abolbashari M, Agcaoili SM, Lee MK et al. Repopulation of porcine kidney scaffold using porcine primary renal cells. *Acta Biomater* 2016; 29, 52–61
99. Ross EA, Abrahamson DR, St. John P et al. Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes. *Organogenesis* 2012; 8, 49–55
100. Bijonowski BM, Miller WM, Wertheim JA. Bioreactor design for perfusion-based, highly vascularized organ regeneration. *Curr Opin Chem Eng* 2013; 2, 32–40
101. Pollock CA. Toward a bioartificial kidney: will embryonic stem cells be the answer? *Kidney* 2013; Int 83, 543–545
102. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Wholeorgan tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 2011; 13, 27–53
103. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 2014; 32, 773–785
104. Groll J, Boland T, Blunk T et al. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication* 2016; 8, 013001
105. Skardal A, Atala A. Biomaterials for integration with 3-D bioprinting. *Ann Biomed Eng* 2015; 43, 730–746
106. Chung JHY, Naficy S, Yue Z et al. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomater Sci* 2013; 1, 763
107. Ferris CJ, Gilmore KJ, Beirne S et al. Bio-ink for on-demand printing of living cells. *Biomater Sci* 2013; 1, 224
108. Pati F, Jang J, Ha D-H, et al. Printing threedimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun* 2014; 5, 3935
109. Fullhase C, Soler R, Atala A et al. A novel hybrid printing system for the generation of organized bladder tissue. *J Urol* 2009; 181, 282–283
110. Williams SK, Touroo JS, Church KH, Hoying JB. Encapsulation of adipose stromal vascular fraction cells in alginate hydrogel spheroids using a direct-write three-dimensional printing system. *Biores Open Access* 2013; 2, 448–454
111. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V et al. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 2009; 30, 2164–2174
112. Faulkner-Jones A, Greenhough S, King JA et al. Development of a valve-based cell printer for the formation of human embryonic stem cell spheroid aggregates. *Biofabrication* 2013; 5, 015013
113. Faulkner-Jones A, Fyfe C, Cornelissen DJ, Gardner et al. Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of minilivers in 3D. *Biofabrication* 2015; 7, 044102

Статья переведена на русский язык и опубликована согласно условиям лицензии «Creative Commons». Журнал FEBS J. 2016 Sep;283(18):3303–24. doi: 10.1111/febs.13704.

Перевод М.С.Храбровой
Редакция перевода И.И.Трофименко

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 25.05.2016 г.
Принята в печать: 12.09.2016 г.