

УДК 602.7

Тканевая инженерия опухолей с использованием биореакторных технологий

А. Е. Гуллер^{1-4*}, П. Н. Гребенюк^{5*}, А. Б. Шехтер³, А. В. Звягин¹⁻⁴, С. М. Деев^{4,6,7}

¹Macquarie University, Sydney, 2109, New South Wales, Australia

²ARC Centre of Excellence for Nanoscale BioPhotonics, Macquarie University, Sydney, 2109, New South Wales, Australia

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Институт регенеративной медицины, 119992, Москва, ул. Трубецкая, 8, Россия

⁴Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23, Россия

⁵Inetex LTD, Plaut St. no. 10, Rehovot, 76706, Israel

⁶Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Россия

⁷Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30, Россия

*E-mail: anna.guller@mq.edu.au

*Авторы, внесшие равный вклад в представленную работу.

Поступила в редакцию 09.06.2016

РЕФЕРАТ Обзор посвящен проблеме моделирования злокачественных опухолей с использованием технологий тканевой инженерии. Тканевая инженерия опухолей (ТИО) – новый метод трехмерного (3D) моделирования злокачественных новообразований, основанный на создании комплексных тканеинженерных конструкций (ТИК), включающих в себя малигнизированные клетки, клеточные носители-скаффолды, играющие роль внеклеточного матрикса, а также другие компоненты опухолевого микроокружения. В ряде случаев ТИК могут трансплантироваться в организм лабораторных животных, однако специфической задачей ТИО является максимально реалистичное воспроизведение и длительное поддержание свойств моделируемой опухоли *in vitro*, прежде всего, с целью изучения биологии рака и разработки новых методов терапии и диагностики неоплазий. Успех реализации этой трудной задачи во многом зависит от технологического прогресса в области создания биореакторов – устройств, обеспечивающих оптимизацию условий культивирования и управление развитием опухолевых ТИК. В обзоре рассмотрены возможности использования основных типов биореакторов в ТИО.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биореакторы, моделирование, рак, тканевая инженерия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 2D – двумерный – культура клеток и тканей в монослое (двумерная культура); 3D – трехмерный; БР – биореактор; ДЦЛ – децеллюляризация; ДЦЛ-матрикс, ДЦЛ-ткань, ДЦЛ-орган – децеллюляризованный матрикс, децеллюляризованная ткань и децеллюляризованный орган соответственно; РЦЛ – рецеллюляризация; ТИ – тканевая инженерия; ТИК – тканеинженерная конструкция; ТИО – тканевая инженерия опухолей; ТМО – тканеинженерная модель опухоли; SCID – лабораторные мыши с врожденным тяжелым комбинированным иммунодефицитом (severe combined immunodeficiency mice).

Аббревиатуры, используемые в англоязычной литературе для обозначения роторных биореакторов различных типов: RWV – rotating-wall vessels, rotating-wall bioreactors (биореакторы с вращающимися стенками); RCCS – rotary cell culture systems (роторные системы для культивирования клеток); HARV – high aspect reactor vessels (биореактор с высоким соотношением линейных размеров, вертикальный цилиндрический роторный биореактор); STLV – slow turning lateral vessels (роторные биореакторы с медленно вращающимися стенками); RWPV – rotating-wall perfusion vessels (роторно-перфузионный биореактор); NASA bioreactor – общее название роторных биореакторов, разработанных NASA, как правило, RWV, HARV или STLV.

ВВЕДЕНИЕ

Метод культуры клеток и тканей *in vitro* является традиционным инструментом исследований в области биологии рака и создания новых методов профилактики, диагностики и лечения этого класса заболеваний. Первичные и линейные клетки опухолей человека и животных представляют собой чрезвычайно удобный объект для изучения молекулярных и клеточных механизмов злокачественного роста и оценки эффектов лекарств. Однако около 95% препаратов, проявивших хороший противоопухолевый эффект в экспериментах на клеточных культурах и лабораторных животных, во время клинических испытаний обнаруживают недостаточную эффективность или неприемлемую токсичность [1]. Возможным и правдоподобным объяснением является недостаточная релевантность существующих *in vitro* и *in vivo* моделей рака по отношению к сложным по структуре, гетерогенным по клеточному составу и постоянно изменяющимся во времени реальным опухолям человека [1–3].

К числу важнейших факторов, сопровождающих эксперименты на традиционных культурах клеток в монослое (2D), относятся селекция специфического, адаптированного к росту на культуральном пластике фенотипа клеток из первоначально крайне гетерогенной опухолевой клеточной популяции, аномальная поляризация клеток, связанная с ограниченной экспозицией поверхности клеток к культуральной среде, резкое сокращение клеточно-клеточных контактов, отсутствие клеточно-матриксных взаимодействий и метаболических градиентов [4–6]. В совокупности это приводит к невозможности воспроизведения в 2D-культуре таких критически значимых в биологии рака явлений [7], как гетерогенность клеточных популяций, формирующих опухоль, взаимодействие опухоли с ее микроокружением и организмом в целом (рис. 1).

Модели рака на лабораторных животных также не лишены недостатков. Так, при использовании одного из наиболее популярных подходов – моделировании человеческих опухолей на мышцах путем имплантации клеточных аллографтов – гистологические особенности неоплазий человека воспроизводятся не вполне точно или не могут быть воспроизведены вообще (рис. 2А–Г). Кроме того, срок жизни лабораторных животных, как правило, меньше периода возникновения метастазов [8]. Относительно приближенной к реальности моделью опухолей человека являются ксенографты, полученные из опухолевой ткани пациентов и трансплантируемые мышцам с подавленной иммунной системой (*nude*, *SCID*) [10, 11]. Такие модели относительно адекватно отражают структуру и функционирование опухоли человека

на тканевом уровне (рис. 2Д,Е), а организм-носитель выполняет такую же роль, которая отводится питательной среде в культурах *in vitro*. В то же время физиология бестимусных или *SCID* мышей значительно отличается от человеческой, а значительная стоимость и низкая воспроизводимость моделей ограничивают возможности их применения.

Стремление более точно воссоздать гистологическое строение и поведение опухолей привело к разработке технологий сокультивирования клеток различных типов и созданию трехмерных (3D) моделей опухолей. К числу последних относятся многоклеточные сфероиды, а также культуры раковых клеток на матрицах различного состава и строения (гелевых, волокнистых и др.). Один из наиболее перспективных подходов – тканевая инженерия опухолей (ТИО) – новый метод 3D-моделирования злокачественных новообразований, основанный на создании комплексных конструкций, включающих в себя малигнизированные клетки, плотные пористые или волокнистые клеточные носители-скаффолды, играющие роль внеклеточного матрикса, а также другие компоненты опухолевого микроокружения. Тканеинженерные модели опухолей (ТМО) предназначены для изучения биологии рака и разработки методов диагностики и терапии злокачественных новообразований. Основные принципы ТИО, ее преимущества, ограничения и реализованные модели подробно обсуждаются в нескольких обзорах [8, 13–19].

Как следует из приведенного выше определения, ТИО базируется на принципах тканевой инженерии (ТИ) нормальных тканей в части комбинирования определенных клеток и скаффолдов с последующим управлением ходом развития полученных тканеинженерных конструкций (ТИК) [20], но служит для решения не лечебных, а исследовательских задач. В общем случае тканеинженерная модель *здоровой ткани* представляет собой 3D-культуру *нормальных клеток* на скаффолде – ТИК, которая «собирается» и «созревает» *in vitro* и затем имплантируется в организм пациента для замещения поврежденных или утраченных тканей или органов. После этого должно произойти приживание реконструированной структуры, обеспечивающее ее жизнеспособное состояние и выполнение поставленной функциональной задачи. Очень часто ТИК, применяемые в регенеративной медицине, представляют собой временные функциональные тканевые или органые протезы, которые впоследствии должны подвергаться биорезорбции и полному замещению собственными тканями организма. Раковые ТИК, напротив, должны включать, в первую очередь, *малигнизированные клетки*, длительно существовать и обладать струк-

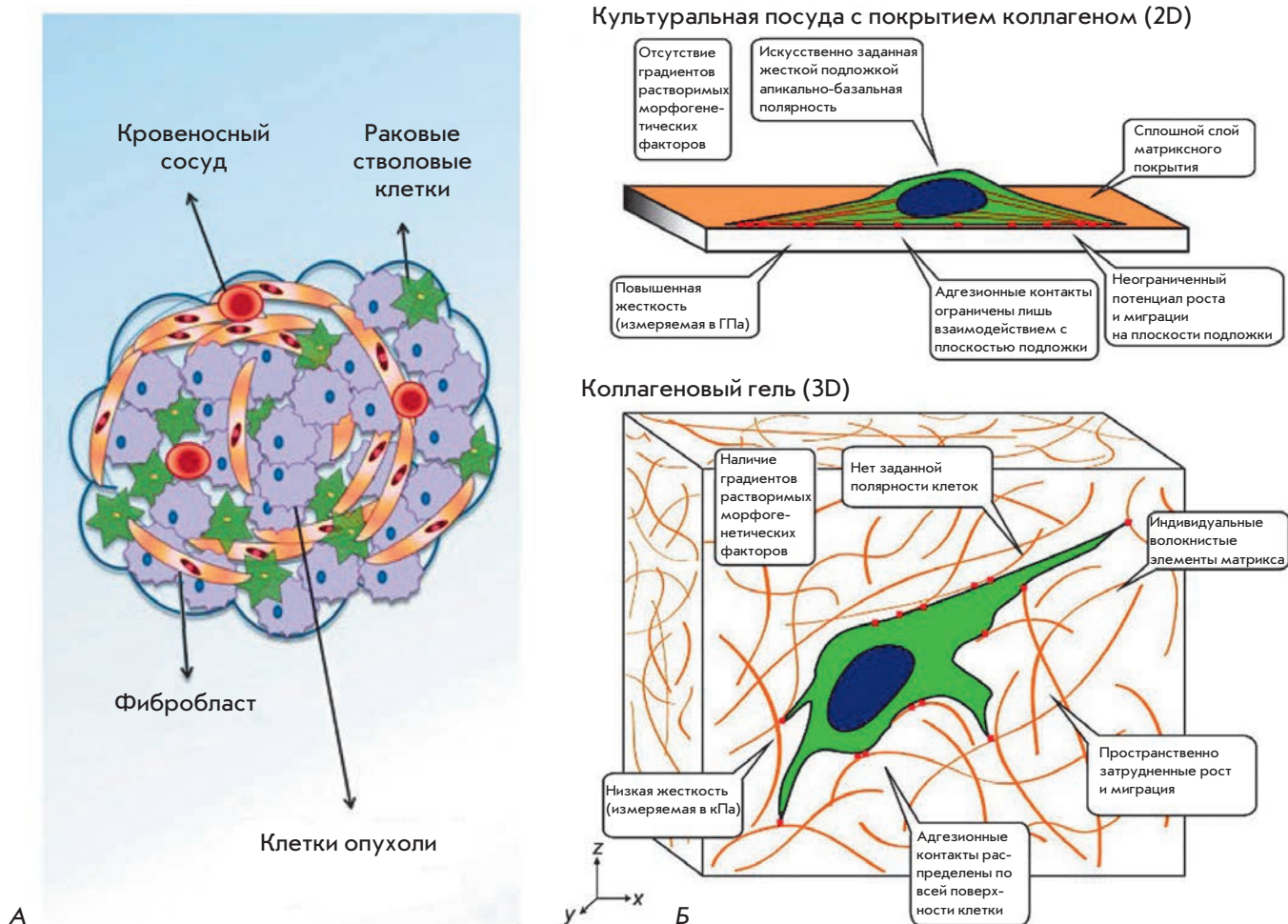


Рис. 1. Схема строения злокачественной опухоли человека (А) и изменения, происходящие при 2D- и 3D-культивировании клеток *in vitro* (Б). А – опухоль является объемным образованием, внутри которого в силу местных особенностей кровообращения, механических условий и иннервации формируются метаболические градиенты, в свою очередь, усиливающие генетическую нестабильность малигнизированных клеток, преимущественную селекцию определенных фенотипов, а также обуславливающие динамические ответы пула раковых стволовых клеток. В состав опухоли входят также резидентные клетки пораженного органа и клетки воспалительного инфильтрата (в основном, макрофаги и лимфоциты, в ряде случаев, нейтрофилы, эозинофильные и плазматические клетки). Внеклеточный матрикс, сосуды и участки соединительной ткани составляют второй обязательный компонент – строму опухоли. Степень развития стромы в различных видах злокачественных новообразований варьирует и существенно влияет на динамику развития заболевания и лекарственную устойчивость. В структуре опухоли могут присутствовать одновременно как участки с активным ростом, так и зоны некроза, участки геморрагий и гнойного расплавления тканей [8]. Б – изменения, вызванные культивированием в 2D-условиях, обусловлены селекцией специфических клеточных фенотипов и искажением взаимоотношений клеток с микро- и макроокружением [9]

турным и функциональным сходством с моделируемыми опухолями уже в условиях *in vitro*, поскольку именно на этом этапе они могут быть использованы в качестве объектов исследований. Опухолевые ТИК также могут быть имплантированы в организм лабораторных животных, например, с целью изучения ангиогенного, инвазивного и метастатического

потенциала, однако, использование подобных биологических тканей *in vitro* представляется наиболее привлекательным с точки зрения возможности улучшения воспроизводимости результатов, создания высокопроизводительных тест-систем для фармакологических тестов, а также сокращения объема экспериментов на животных.

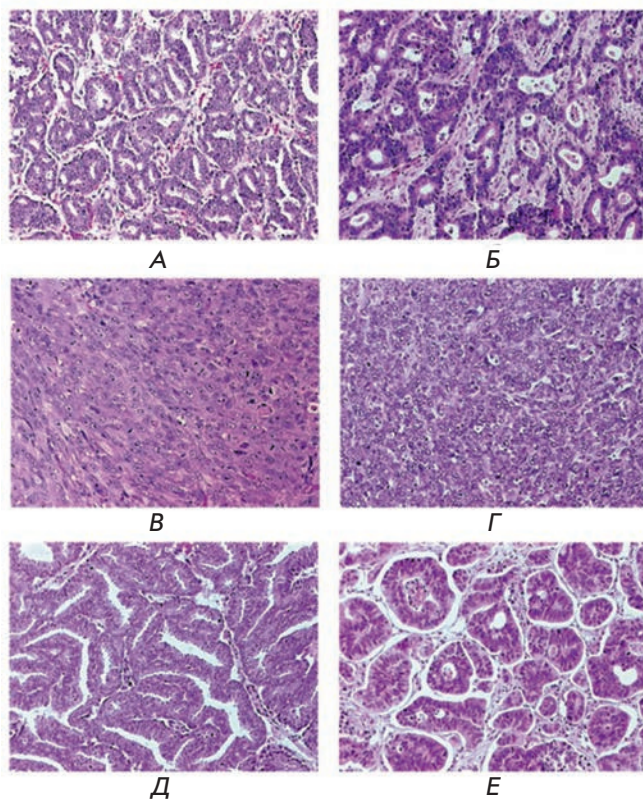


Рис. 2. Сравнение гистологического строения рака предстательной железы (А, В, Д) и толстого кишечника (Б, Г, Е) в биоптатах первичных опухолей человека (А, Б) со структурой моделей этих же опухолей, воспроизводимых на мышах (В–Е). Модели, полученные путем культивирования *in vitro* и последующей имплантации мышам аллографтов из линейных клеток РС-3М (В) и Colo205 (Г), имеют гомогенную организацию, в которой утрачены патогномичные glandularные элементы из клеток опухоли, а стромальный компонент практически отсутствует. При подкожной имплантации мышам SCID ксенографтов, полученных из фрагментов интраоперационных биоптатов соответствующих первичных опухолей человека, наблюдаются выраженные искажения опухолево-стромальных соотношений (Д, Е). По материалам [12]

Различия в скорости роста, дифференцировке и обмене веществ между нормальными и раковыми клетками позволяют обойти типичную для регенеративной медицины проблему наращивания клеточной популяции в составе ТИК (например, в ходе управляемой дифференцировки стволовых клеток). С другой стороны, эти обстоятельства обуславливают необходимость создания новых методов и систем 3D-культивирования, позволяющих формировать и поддерживать объемные, метаболически активные тканевые структуры вне организма, а значит, в от-

сутствие нормальных систем гомеостаза. Подобная по сложности задача в определенной мере решается в современных системах временного хранения и жизнеобеспечения донорских органов.

В тканевой инженерии для выращивания ТИК и их поддержания в жизнеспособном состоянии до имплантации используются биореакторы (БР) [21] – инженерные системы, предназначенные для автоматизации процессов культивирования клеток и тканей *in vitro* и обеспечивающие оптимальные для развития ТИК физико-химические условия. Задачей настоящего обзора является анализ современного состояния тканеинженерного моделирования злокачественных опухолей с использованием биореакторных технологий.

КОМПОНЕНТЫ ОПУХОЛЕВЫХ ТИК

Главными компонентами ТИК являются клетки и скаффолды (рис. 3). Клетки могут быть представлены одним или несколькими типами одновременно (например, гепатоцитами и фибробластами при моделировании печени), однако, тканевую специфичность ТИК определяет наиболее многочисленная клеточная популяция. В частности, основу клеточного компонента опухолевых ТИК могут составлять как первичные клетки, выделенные из биопсийных фрагментов опухоли (из исходного или метастатического очага), так и линейные раковые клетки, полученные путем специальных процедур селекции и культивирования. Могут подбираться клетки различной степени дифференцировки, а также с различным метастатическим потенциалом. Помимо опухолевых клеточных популяций, в состав ТМО также могут включаться стромальные элементы (фибробласты, перициты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки), основные клетки резидентного органа (например, гепатоциты при моделировании опухолевого поражения печени или остеобласты и клетки костного мозга при исследовании неопластических процессов в костях), клетки воспалительного инфильтрата (макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы, плазматические клетки, эозинофилы) [22].

Скаффолды, представляющие собой биоактивные матрицы, выполняющие роль внеклеточного матрикса, не только служат механической опорой для клеток, но также влияют на их адгезию и подвижность (что включает серию сигнальных путей, чувствительных к организации цитоскелета), обеспечивают механическую и биохимическую интеграцию конструкции, стимулируют необходимую дифференцировку (в ТИК нормальных тканей) или поддерживают заданный фенотип и функциональную активность клеток. Архитектура скаффолдов обеспечивает формирование градиентов сигнальных молекул и кис-

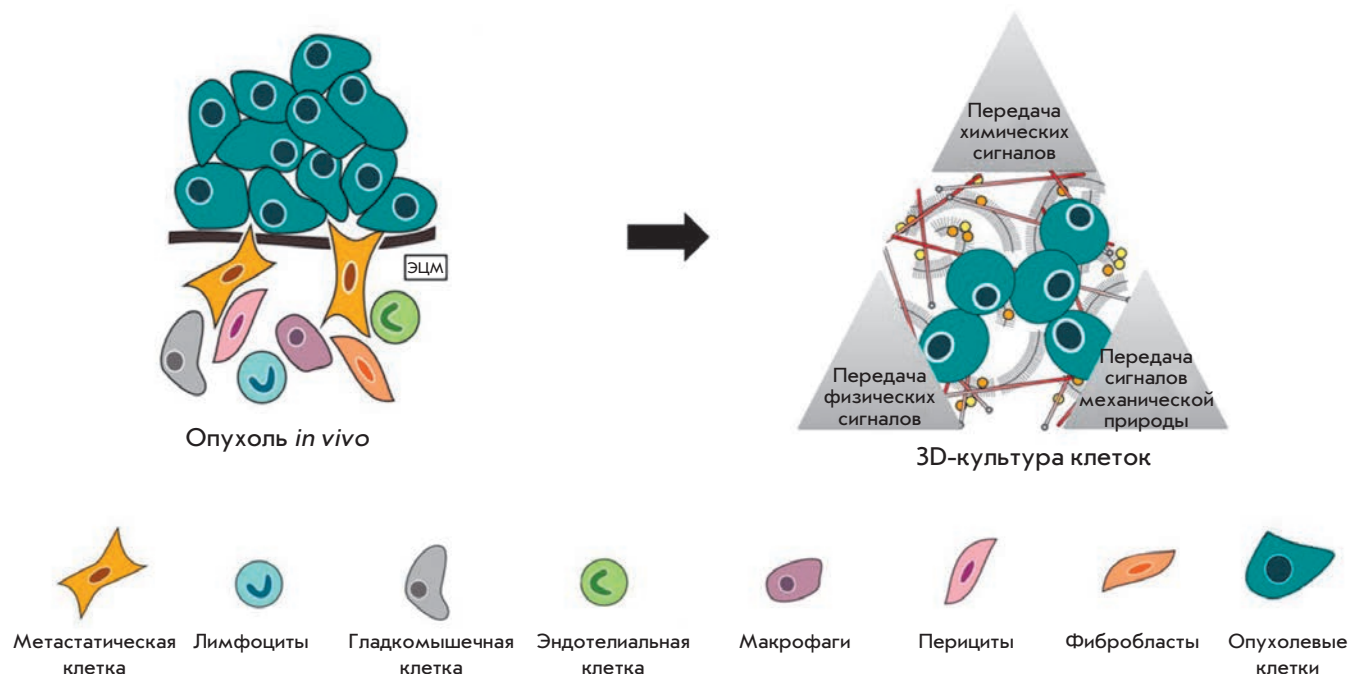


Рис. 3. Принципы создания опухолевых ТИК. Для создания биомиметических опухолевых ТИК требуется включение в состав конструкции ключевых компонентов опухоли (как минимум, опухолевых клеток и скаффолда, представляющего внеклеточный матрикс (ЭЦМ)), а также воспроизведение условий их существования (включение значимых физических и химических сигнальных факторов). Адаптировано из [23]

лорода в ТИК, дает возможность изучения роли клеточно-матриксных взаимодействий в регуляции канцерогенеза с учетом взаимного влияния механических факторов, нанорельефа, геометрии матрикса и адгезии клеток [24].

Для создания скаффолдов используются волокнистые и пористые материалы, изготовленные из синтетических полимеров (например, полилактата, поликапролактона, полилактогликолида) или материалов натурального происхождения (коллагена, хитозана, гиалуроновой кислоты) [17], а также специальным образом обработанные натуральные ткани и органы [25, 26]. Важнейшим преимуществом синтетических скаффолдов, создаваемых с помощью инженерных методов, таких, как электроспиннинг, 3D-печать и т.п., является высокая степень определенности химического состава и возможность тонкого контроля пространственной организации и механических свойств, что позволяет изучать влияние единичных сигнальных факторов на морфогенез ткани. Однако зачастую подобные скаффолды без дополнительной модификации не поддерживают в необходимой степени адгезию и продолжительную пролиферацию клеток. Кроме того, они обладают лишь отдаленным сходством с оригинальной моделируе-

мой тканью и, в сущности, являются, пусть и существенно улучшенным, 3D-аналогом культуральных емкостей. Скаффолды, изготавливаемые из полимеров натурального происхождения, характеризуются высокой биосовместимостью, но при этом возможности точного контроля их состава, управления их геометрией и биомеханическими свойствами лимитированы [17].

Альтернативный подход предполагает обработку натуральных тканей или органов с удалением всех клеточных элементов и максимальным сохранением состава и структуры внеклеточного матрикса. Этот процесс называется децеллюляризацией (ДЦЛ), а получаемые скаффолды – децеллюляризованными тканями, или бесклеточными матриксами, тканями или органами (ДЦЛ-матрикс, ДЦЛ-ткань, ДЦЛ-орган) [26, 27]. Таким образом, ДЦЛ обеспечивает получение скаффолдов, весьма близко к реальности воспроизводящих естественное микроокружение клеток в составе ткани или органа. Современные методы ДЦЛ позволяют создавать скаффолды, содержащие не только компоненты внеклеточного матрикса, такие, как, например, коллагеновые и эластические волокна, но также и поддерживать целостность базальных мембран кровеносных со-

судов, что обеспечивает формирование единой сети «протососудов» (децеллюляризованных стенок кровеносных сосудов различного калибра), которые позднее могут быть использованы для питания создаваемой биоинженерной ткани. Эта возможность принципиально важна, поскольку проблема питания внутренних областей ТИК является одной из наиболее сложных в тканевой инженерии в целом и критически значимой для ТИО.

ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ «СБОРКИ» И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ, ТРЕБУЮЩИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОРЕАКТОРОВ

Биореакторы – это замкнутые системы, в которых биологические процессы протекают при строго контролируемых условиях [28]. Эта концепция не является чем-то принципиально новым и не ограничивается тканевой инженерией. Биотехнологи давно используют БР (хемостаты, ферментеры) для выращивания культур микроорганизмов и получения различных клеточных продуктов. Типичная биореакторная система включает в себя емкость, изолированную от влияния внешней среды (колбу, сосуд, камеру), исполнительные устройства (насосы, двигатели и т.д.), датчики, а также, очень часто, специальные контроллеры и программное обеспечение для управления биотехнологическим процессом или слежения за его ходом. В БР, предназначенных для ТИ, выращивают клетки и ТИК, а также исследуют влияние биохимических и биомеханических факторов на развитие клеток и тканей. В процессе «сборки» опухолевых ТИК и их дальнейшего культивирования *in vitro* можно выделить несколько ключевых проблем, оптимальное решение которых требует использования биореакторных технологий.

Наращивание клеточных популяций

Размеры ТМО могут варьировать от нескольких кубических миллиметров до масштаба целого органа человека или животного, но в любом случае число необходимых клеток всегда многократно превышает объем типовых клеточных культур в монослое. Поэтому первым шагом при создании опухолевой ТИК является наращивание необходимого количества клеток заданных типов, что требует значительной площади поверхности, на которой они могут расти. Для сокультивирования нескольких типов клеток часто необходима их одновременная экспансия в разных условиях. В ряде случаев клеточные популяции для создания ТИК выращиваются в форме многоклеточных сфероидов, что также требует специальных условий культивирования. Роль БР при решении этих задач состоит в автоматизации и улучшенном контроле процесса культивирования клеток.

Рецеллюляризация скаффолдов

Второй шаг в создании ТИК состоит в заселении 3D-скаффолдов клетками – рецеллюляризации (РЦЛ) [29, 30]. Базовая методика статического культивирования предполагает нанесение клеток на скаффолд с помощью пипеток («раскапывание»), после чего клеточная популяция распределяется в матрице под действием силы тяжести, а также в результате самостоятельного движения клеток. Однако для создания сложных тканей и конструкций большого объема этот метод малоэффективен: он не позволяет добиться равномерного распределения клеток по объемной структуре, а значит, однородного и контролируемого развития ткани.

Обеспечение питания и метаболизма ТИК

Третий шаг – доставка веществ, необходимых для роста и функционирования клеток, и удаление продуктов метаболизма. Именно обеспечение контролируемого и оптимального по характеру воздействия на ткань массопереноса является самой важной целью биореакторных технологий [28]. В статической культуре *in vitro* это достигается периодической заменой питательной среды, но данный способ подходит лишь для экспериментов с небольшими по объему объектами культивирования (клетками в монослое или суспензии, тонкими срезами тканей). Известно, что диффузионный предел для кислорода в тканях организма человека составляет примерно 100–200 мкм [31]. При формировании ТИК без постоянного перемешивания или «прокачивания» среда достигает клеток лишь путем диффузии, а потому центральная часть конструкции получает недостаточно кислорода и питательных веществ, а удаление продуктов метаболизма происходит слишком медленно, что приводит к гипоксии, ацидозу и гибели клеток. Улучшают массоперенос конвекционные потоки жидкости, поэтому предпочтение должно быть отдано динамическим системам. Однако слишком активная динамика питательной среды может вызвать повреждение клеток и скаффолда вследствие сдвигового напряжения [32] из-за неравномерной динамики разных слоев жидкости. Соответственно важно соблюдать баланс между диффузионным и конвекционным транспортом, с одной стороны, и биомеханическими свойствами и метаболическими потребностями выращиваемых структур, с другой. Перспективным подходом к решению задачи транспорта кислорода в ТИК представляется использование БР со встроенными системами перфузии. Учитывая сложность работы с ТМО, процесс постоянной подачи свежей культуральной среды к ТИК и удаления продуктов метаболизма желательно автоматизировать и, в идеальном случае, контролиро-

вать в масштабе реального времени с помощью контуров обратной связи по биохимическим параметрам культуральной среды.

Контроль параметров состояния содержимого культуральной камеры БР

Длительное поддержание стерильности критически важно для ТИО. Поскольку созревание модельной ткани может продолжаться в течение нескольких месяцев, контаминация ТИК практически однозначно означает потерю результатов длительной работы. Кроме того, материалы культуральной камеры БР должны быть биосовместимыми и биоинертными, т.е. не воздействовать на культивируемую ткань. В то же время эти материалы должны быть рассчитаны на применение во влажной среде при температуре 37°C, а при необходимости повторного использования выдерживать стерилизацию путем автоклавирования, радиационной или химической обработки. Изготовление камеры БР из прозрачного материала обеспечивает возможность визуального контроля и использования оптического имиджинга ТИК [21, 33, 34].

Контроль над физико-химическими параметрами среды, формирующейся в культуральной камере, и управление ими важны, с одной стороны, для поддержания жизнеспособности ТИК, а, с другой, для моделирования условий, характерных для внутренней среды опухолей, таких, как ацидоз, гипоксия и повышенное тканевое давление [35, 36]. Для исследовательских целей может возникнуть необходимость в регуляции температуры, рН и газового состава среды в культуральной камере, могут потребоваться внесение/удаление тех или иных сигнальных молекул, дозируемое механическое воздействие на формирующиеся ткани (давление, растяжение, изгиб и др.), создание особой электромагнитной среды или электрической стимуляции ТИК и др. [37].

ТИПЫ БИОРЕАКТОРОВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ В ТИО

Большинство БР влияют на ТИК через воздействие на культуральную среду. Выделяют шесть типов БР (табл. 1): 1) БР со статическими системами культивирования, 2) перемешивающие, 3) роторные, 4) пористо-волоконные, 5) перфузионные или 6) микрофлюидные БР. Кроме того, имеется особый класс БР, воздействующих на компоненты ТИК непосредственно – механически, с помощью электромагнитных и иных стимулов (они рассмотрены ниже в соответствующем разделе).

Ниже рассмотрены примеры использования различных типов БР в ТИО. Мы сочли необходимым в качестве дополнительных ключевых слов привести англоязычные названия типов биореакторов и их

конструктивных элементов из-за отсутствия соответствующих общепринятых терминов в русском языке.

СТАТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ТИО

Первыми в тканевой инженерии начали использовать статические БР – обычные чашки Петри, флаконы и планшеты, в которых объекты культивирования и культуральная среда находятся в неподвижном состоянии. Культуральные емкости могут быть дополнены пористыми и волокнистыми скаффолдами, а также специальными сетчатыми вставками с определенным размером пор, что позволяет изучать эффекты сигнальных факторов с заданным размером молекул/носителей, миграционную и инвазионную активность клеток. В планшетах со специальными низкоадгезивными покрытиями или «гравитационными ловушками» можно получать многоклеточные сфероиды. Однако общей чертой статических систем культивирования является то, что массообмен в них происходит исключительно под действием силы тяжести и диффузии. Существенное преимущество статических БР – их коммерческая доступность и простота использования. Такие комплексы особенно востребованы при проведении высокопроизводительного скрининга фармакологических композиций.

С помощью статических БР созданы тканеинженерные модели рака молочной железы, легких и кишечника, саркомы Юинга, метастатического рака предстательной железы и ряда других неоплазий (табл. 2). Однако в отсутствие активного движения культуральной среды обычно удается поддерживать ТИК только на мембраноподобных скаффолдах толщиной до 1 мм. В более толстых матрицах рост клеток происходит преимущественно на поверхности скаффолда. Например, мы наблюдали такой эффект при статическом культивировании опухолевых клеток и нормального эпителия на срезах ДЦЛ-органа (почки) кролика [39] толщиной 3–4 мм, а также при РЦЛ трубчатой бесклеточной сосудистой матрицы [40] и гибридных скаффолдов [41] клетками буккального эпителия.

Преодолеть многие ограничения, характерные для статических схем культивирования, позволяют БР, в которых культуральная среда находится в движении (динамические культуральные методики).

ПЕРЕМЕШИВАЮЩИЕ БИОРЕАКТОРЫ

Перемешивающие БР (spinner-flask bioreactor, spinner vessel, stirred tank) обеспечили качественный скачок в улучшении массообмена между клетками и культуральной средой. БР такого типа чаще всего представляет собой емкость со встроенным вращающимся элементом – спиннером (длинной ло-

Таблица 1. Сравнительная характеристика биореакторов с воздействием на ТИК, опосредованным через культуральную среду*

Типы БР	Условия применения	Механизм массообмена	Сдвиговое напряжение	Специализация применительно к задачам опухолевой тканевой инженерии	Дискуссионные вопросы
Статические системы культивирования (традиционные культуральные емкости – планшеты, флаконы и т.п.)	Порционная замена культуральной среды	Диффузия	Очень слабое	Наращивание клеточной массы, получение многоклеточных сфероидов	Преодоление ограничений массообмена (создание гибридных конструкций типа перфузионных планшетов); автоматизация операций
Перемешивающие	Перемешивание среды при помощи специальных мешалок; встряхивание или вращение культуральных емкостей	Конвекция (высокая)	Высокое	ДЦЛ тканей и органов, получение сфероидов, РЦЛ ТИК	Баланс между массообменом и сдвиговым напряжением
Роторные	Перемешивание среды за счет движения стенок культуральной камеры, уменьшение сдвигового стресса путем создания микрогравитации, оксигенация среды через специальную мембрану	Конвекция (высокая)	Слабое	Получение сфероидов, 3D-культур клеток на микроносителях	Рабочие режимы (в том числе скорость вращения), особенно, при выращивании ТИК большого объема
БР на пористых волокнах	Поток среды по искусственным пористым полупроницаемым волокнам, имитирующим сосуды и пронизывающим ТИК, оксигенация среды через специальную мембрану	Конвекция (средняя) и диффузия (высокая)	Очень слабое	Наращивание клеток, имеющих высокие метаболические потребности	Неразрушающий контроль и извлечение ТИК из БР
Перфузионные	Поток среды вокруг или сквозь ТИК, в том числе по естественным или моделируемым сосудистым сетям; оксигенация среды с помощью специального устройства	Диффузия (высокая) и конвекция (средняя)	Среднее	ДЦЛ тканей и органов, РЦЛ плотных скаффолдов, поддержание 3D-культур на плотных скаффолдах, создание специфических условий культивирования в соответствии с задачами эксперимента	Оптимизация параметров перфузии, равномерность РЦЛ, засеивание скаффолдов клетками и клеточная адгезия
Микрофлюидные	Статическая культура или строго ламинарный поток среды, непосредственно через клеточную массу или ТИК, или взаимодействие клеток со средой через полупроницаемые барьеры/мембраны	Диффузия (высокая) и конвекция (средняя)	Регулируемое	3D-культуры на гидрогелевых матриксах, моделирование ангиогенеза, инвазии опухолевых клеток, сокультивирование разных типов клеток, исследование эффектов движения потоков жидкости через ткань; получение сфероидов; высокопроизводительный скрининг фармпрепаратов	Оптимизация дизайна микрофлюидных чипов и биологическая валидность моделей

*По материалам [38] с изменениями.

Таблица 2. Тканеинженерные модели опухолей, полученные с использованием статических биореакторов

Вид опухоли	Скаффолд	Клетки	Результат	Ссылка
Рак молочной железы (РМЖ)	ДЦЛ-матрикс жировой ткани человека	MCF-7, BT-474, SKBR3	Фенотипическое сходство с биопсийными образцами РМЖ в 3D-культуре на ДЦЛ-матриксе выше, чем при культивировании на «Матригеле»	[42]
	Фиброин шелка	MDA-MB-231	Чувствительность к противоопухолевым препаратам в 3D-модели рака снижена по сравнению с 2D	[43]
Рак легких, РМЖ, рак кишечника, рак поджелудочной железы, тератоканцинома яичника, фиброзно-кистозная мастопатия	ДЦЛ-матрикс, синтезированный <i>in vitro</i> эмбриональными фибробластами мыши (линия NIH3T3)	NCI-H460; PA-1; PA-1/E6; HCT116; HCT116/p53-; SW620; COLO 205; PANC-1; MCF7; HS 578T; MCF10A	Исследовали роль и механизмы интегрин-опосредованных сигнальных каскадов в клеточной резистентности к действию противоопухолевых средств (таксола). Указано на перспективность использования клеточно-синтезированных ДЦЛ-скаффолдов для тестирования лекарственных препаратов	[44]
Рак легких, метастазы РМЖ, рака прямой кишки и плоскоклеточного рака пищевода в легкое	ДЦЛ-матрикс рака легких человека, синтезированный <i>in vivo</i> клетками рака легких A549 (клеточный ксенорафт, имплантированный мышам)	A549; MCF-7; SW-480; KYSE-510	Влияние способа ДЦЛ, механических свойств и пористости полученного матрикса на скорость роста клеток, их жизнеспособность, прорастание в толщу матрикса и секрецию факторов роста	[45]
Метастазы рака легких в кишечник	ДЦЛ-матрикс слизистой оболочки тонкого кишечника свиньи (в форме растянутой мембраны)	HCC827; A549	Только поверхностное проникновение клеток в скаффолд. Показано влияние 3D-матрикса на пролиферацию, апоптоз, инвазию в сравнении с культурой в 2D. Распределение белков и морфология клеток в 3D-культуре были сходны с реальными опухолями. Разная чувствительность клеток к gefитинибу в зависимости от наличия рецепторов фактора роста эпителия EGFR (не проявляется в 2D-культуре). На модели показана ранняя стадия инвазии	[46]
Саркома Юинга	Пористо-волоконный скаффолд из поликапролактона	TC-71	Повышение лекарственной резистентности опухолевых клеток на 3D-матриксе по сравнению с культурой в монослое. Существенные различия между 3D- и 2D-культурами в экспрессии инсулиноподобного фактора роста 1 (IGFR-1, мишень рапамицина)	[47]
	ДЦЛ-кость, заселенная мезенхимальными стволовыми клетками человека	HTB-10, HTB-166	На ДЦЛ-матриксе клетки, утратившие специфический фенотип в 2D-культуре, восстанавливают профиль геной экспрессии. Выделены гены, которые могут быть таргетными для терапии	[48]
Метастазы рака предстательной железы в кость	Тканеинженерная кость: поликапролактоновый скаффолд, «завернутый» в клеточный пласт остеобластов	PC-3; LNCaP	Повышенный уровень матриксных металлопротеиназ и других маркеров активации метастатического фенотипа	[49]
		LNCaP (в PEG-геле)	Остеобласты вызывают паракринные эффекты, которые могут способствовать развитию остеомимикрии опухолевых клеток и модулировать экспрессию отвечающих на андрогены генов в клетках LNCaP	[50]

паточкой), создающим вихревые потоки жидкости, обеспечивая динамическое перемешивание среды и массообмен между ней и тканью или скаффолдом. К перемешивающим БР можно отнести и системы, в которых перемещение среды вокруг скаффолда, ткани или ТИК создается движением самих культуральных емкостей. Примером могут служить роллерные флаконы (roller bottles) и классические культуральные сосуды, помещенные на качающиеся, встряхиваемые или вращающиеся автоматические платформы (шейкеры). В перемешивающих БР клеточные слои, фрагменты тканей, скаффолды или ТИК размещаются либо на специальных иглах, либо непосредственно на внутренних поверхностях культуральных сосудов. При этом ткани/скаффолды могут быть полностью погружены в жидкость, находиться на границе раздела жидкой и газовой фаз или попеременно погружаться в культуральную среду и газовую фазу.

Сейчас перемешивающие БР используются преимущественно для наращивания клеточной массы (гораздо более эффективного, чем в монослое [51]), в том числе в форме культур на микроносителях и в виде многоклеточных сфероидов. За счет лучшего питания клеток можно получить крупные сфероиды [52]. Интересны также работы по получению гетеросфероидов – сокультур опухолевых и нормальных клеток. Так, с помощью перемешивающего БР получены гетеросфероиды, состоящие из клеток плоскоклеточного рака головы и шеи и мононуклеарных клеток периферической крови [53]. Исследование фармакологических эффектов Катумаксомаба на моделях в форме сфероидов адекватно отражает свойства микрометастазов этих опухолей. Сфероиды, полученные из клеток опухолей мозга человека, глиомы и астроцитомы, высевали на пористо-волоконистые скаффолды из полимолочной кислоты и культивировали в планшетах на орбитальном шейкере в условиях гипоксии [54]. Оказалось, что в 3D-среде клетки приобретают повышенную устойчивость к проапоптотическим факторам. Гипоксия способствовала усилению резистентности к действию цитостатиков и в монослойных культурах, но молекулярные противоапоптотические механизмы в 2D- и 3D-культурах были различными. С помощью гибридной системы «планшет-на-шейкере» удалось обнаружить активацию сигнальных путей регуляции ангиогенеза и уменьшение чувствительности клеток к химиотерапевтическим противоопухолевым препаратам в 3D-культурах, помещенных в комплексный скаффолд из полилактогликолевой кислоты и матригеля [55]. Использование перемешивающего БР в эксперименте с клетками остеосаркомы позволило получить убедительные доказательства пре-

имуществ сложных ТМО на плотных скаффолдах (fibrous-bed) перед культурами опухолевых клеток на микроносителях, по-видимому, из-за уменьшения эффектов сдвигового напряжения [56]. ТИК из клеток остеосаркомы и пористо-волоконистого носителя были стабильными в культуре более 1 месяца. На 4-е сутки деление клеток останавливалось, но доля апоптотических клеток не превышала 15%.

Перемешивающие БР также применяются для ДЦЛ и РЦЛ. Как правило, в БР данного типа осуществляется ДЦЛ небольших тканевых фрагментов. В нашей недавней работе [39] мы показали, что системы типа «флакон-на-шейкере» также могут применяться и для ДЦЛ целых органов лабораторных животных. Эффективность перемешивающих БР в отношении заселения и питания клеток выше, чем у статических, но по-прежнему недостаточна для ТИК значительного объема. Кроме того, культуральная среда все же не очень хорошо проникает внутрь конструкции, поэтому, вследствие диффузионных ограничений, клетки в основном распределяются по периферии скаффолда. Возможность увеличения вклада конвекции за счет скорости вращения спиннера или самого культурального сосуда ограничена, поскольку это приводит к повреждениям тканей при росте сдвиговых напряжений (> 15 дин/см²) [51, 57].

Потенциал применения перемешивающих БР в тканевой инженерии опухолей пока не реализован в полной мере, хотя эти системы имеют ряд важных преимуществ. Среди них – вариабельность объема культуры, работа с разными типами моделей, наличие гидродинамических расчетных моделей [34], возможность взятия проб культуральной среды и наблюдения за состоянием ТИК.

РОТОРНЫЕ БИОРЕАКТОРЫ

Роторные БР (rotating-wall bioreactors, NASA bioreactors; RWV; RCCSTM; HARV; STLV; RWPV), первоначально разработанные NASA для экспериментов в космосе, представляют собой полностью заполненные культуральной средой цилиндрические емкости с вращающимися стенками. Горизонтальный (RWV) [58] и вертикальный (HARV) [59] роторные БР вращаются вокруг горизонтальной или вертикальной центральной оси, тогда как кислород подается через неподвижную осевую мембрану или аналогичную мембрану в основании цилиндра соответственно. В этих реакторах питательная среда заменяется вручную через технологические отверстия. В роторном БР с перфузией (RWPV или STLV) культуральная среда циркулирует в замкнутом контуре и заменяется непрерывно, что позволяет на протяжении многих месяцев автоматически поддерживать необ-

ходимый уровень кислорода, кислотности и температуры. RWPV состоит из двух цилиндров, причем внутренний, одновременно представляющий собой газообменную мембрану, также может вращаться. Питательная среда и ТИК находятся в кольцевом пространстве между цилиндрами [60].

В роторных БР скаффолды или ТИК свободно перемещаются в культуральной камере, полностью заполненной питательной средой. Скорость вращения цилиндров (примерно 15–40 об/мин) подобрана так, чтобы обеспечить баланс между гравитацией и силой гидродинамического сопротивления, действующими на скаффолды/ТИК, благодаря чему последние постоянно находятся в состоянии свободного падения. Динамическое ламинарное (а не турбулентное, как в перемешивающих БР) течение культуральной среды позволяет эффективно обходить диффузионные ограничения на доставку питательных веществ и удаление отходов. Роторные системы обеспечивают более однородное распределение клеток, чем статическая культура, и лучший обмен веществ, чем перемешивающий БР. Для компенсации массы растущей ткани скорость вращения постепенно увеличивают, чтобы уравновесить силу гравитации и гарантировать пребывание ТИК в «подвешенном» состоянии.

С помощью роторного БР обнаружили глобальные различия в воздействии 2D- и 3D-микроокружения на экспрессию генов гепатоцеллюлярной карциномы. В многоклеточных сфероидедах, достигавших за 72 ч диаметра 100 мкм, а при длительном культивировании выраставших до 1 мм, клетки линии HepG2 демонстрировали усиление экспрессии метаболических и синтетических генов, тогда как в 2D наблюдалась активация генов, кодирующих белки внеклеточного матрикса, цитоскелета и молекул клеточной адгезии. Кроме того, в сфероидедах клетки рака печени долго сохраняли высокую активность цитохрома P450 и продуцировали альбумин, а в монослойной культуре эти признаки быстро деградировали [61].

Интересные результаты получены при работе с сокультурами опухолевых и нормальных клеток с использованием роторного БР. Так, клетки аденокарциномы кишечника (линии HT29 и HT29KM) в монокультуре формировали сфероиды, а в присутствии нормальных фибробластов конкурировали с ними за субстрат прикрепления, и их рост сначала ограничивался. Затем клетки опухоли начинали усиленно делиться и формировали объемные тканевые массы размером до 1.5 см, по строению напоминающие крипты здорового кишечника. Слой клеток, непосредственно контактирующих с поверхностью микроносителя, был образован юными мезенхимальными клетками. Некротические изменения в таких 3D-культурах практически не отсутствовали [62]. При сокульту-

вировании в роторном БР клеток рака молочной железы (линии UACC-893, BT-20 и MDA-MB-453) с фибробластами наблюдалось формирование гистидов – многоклеточных сфероидов из фибробластов с инвазивным вращением раковых клеток [63]. Особо крупные гетеросфероиды (диаметром до 1 см) удалось получить в роторном БР HARV из иммортализованных нормальных кератиноцитов кожи человека HaCaT и клеток разных линий меланомы (B16-F10 мыши и SKMEL-5 человека) [64]. На этой биомиметической 3D-модели меланомы продемонстрирована техника трансфекции клеток плазмидами, кодирующими GFP и IL-15, обеспечивающая высокую воспроизводимость результатов доставки генов. С помощью ротационного БР изучали также взаимодействие клеток рака предстательной железы, остеоцитов и стромы костной ткани в 3D-модели [65].

Эксперимент по получению с использованием роторного БР сфероидов из клеток рака предстательной железы разной степени зрелости позволил выявить значительные различия в их пространственной организации и пролиферативной активности в зависимости от количественного соотношения данных клеточных типов [66]. Это, как полагают авторы, указывает на влияние дифференцировки клеток на плотность упаковки в сфероидедах и, как следствие, на эффективность массопереноса между клеточным агрегатом и культуральной средой.

Потенциальные ограничения использования роторных БР связаны с генерацией потокового сдвигового напряжения (диапазон 0.5–2 дин/см²) [67]. Эффективность и безопасность роторных БР можно повысить, комбинируя их с реакторами, работающими на других принципах [68].

ПЕРФУЗИОННЫЕ (ПРОТОЧНЫЕ) БИОРЕАКТОРЫ

Перфузионные БР (perfusion bioreactors) позволяют наиболее точно воссоздавать процессы массопереноса в живом организме. Типичный перфузионный БР состоит из насоса и инкубационной камеры, соединенных гибкими трубками в систему с открытым или закрытым контуром. Насос создает небольшое избыточное давление, обеспечивая постоянный ток жидкой среды через ткани и скаффолды. Перфузионные БР могут использоваться как для ДЦЛ, так и для РЦЛ. При перфузионной ДЦЛ растворы детергентов или других веществ, способствующих отделению, разрушению и удалению собственных клеток ткани, поступают через естественные кровеносные сосуды, которые подключаются к проточному контуру.

В ходе РЦЛ клеточная суспензия подается через децеллюляризованные сосудистые сети обрабатываемой ткани/ТИК или через иные пустоты скафф-

фолда. При этом достигаются более гомогенное распределение клеток в матрице и лучший транспорт жидкостей, чем с использованием перемешивающих и роторных устройств [69–72], что позволяет создавать и длительно поддерживать более крупные ТИК [72, 73]. Выживаемость клеток на скаффолдах, перфузируемых с помощью БР данного типа, существенно выше, чем в статической культуре или перемешивающем БР [74]. Изменение скорости тока среды в БР позволяет контролировать как сдвиговые напряжения, связанные с движением жидкости, так и локальное распределение кислорода в ТИК [75]. В то же время, хотя перфузионные БР контролируют массообмен лучше прочих, проблема неоднородной доставки необходимых веществ до конца не решена. Это особенно характерно для скаффолдов с порами, размер которых варьирует в широком диапазоне, а также для тканей с неравномерной скоростью роста, в результате чего некоторые участки получают недостаточное питание, а другие избыточное [70].

Перфузионные БР критически важны для целоорганной тканевой инженерии – создания ТИК в масштабе целых органов [30, 76] путем последовательных процессов ДЦЛ и РЦЛ. К таким реакторам предъявляются особенно строгие требования по обеспечению контроля над параметрами тока культуральной среды/клеточной суспензии, стерильности, температурного режима и возможности мониторинга обработки органа и формирования органной ТИК [76–80].

Перфузионные БР активно используются для реконструкции нормальных тканей и органов, но создание с их помощью ТМО только начинается. Так, предложена модель колоректального рака, полученная с помощью коммерчески доступного перфузионного БР [81]. Клетки линии HT-29 культивировали традиционным способом в монослое либо высевали на коллагеновые губки и поддерживали в статической 3D-культуре или перфузионном БР. Дополнительный контроль обеспечивали опухолевые ксенографты, полученные на бестимусных мышцах с использованием той же линии клеток. В перфузионной культуре клетки характеризовались гораздо более высокой скоростью пролиферации и значительно более однородным распределением, чем в статической объемной культуре. Морфологически и фенотипически получаемые ТИК были подобны опухолям, развившимся из имплантированных клеток. Сильная корреляция между перфузионными 3D-культурами и опухолевыми ксенографтами наблюдалась и в профилях экспрессии генов, регулирующих апоптоз и ответ на гипоксию. Сравнение эффектов 5-фторурацила и АВТ-199, ингибитора антиапоптотического гена *BCL-2*, показало принци-

пальное различие клеточных ответов в 2D и 3D ТИК. В той же статье описано получение ТИК на коллагеновых скаффолдах с использованием клеток рака прямой кишки (SW480 и DLD-1), предстательной железы (PC-3), немелкоклеточного рака легкого A549 и рака молочной железы (BT-474).

Сложная ТИ-модель шванномы (нейрофибросаркомы) была создана немецкими учеными с применением специально сконструированного БР [82]. Выделенный фрагмент кишечника свиньи подвергали чередующейся перфузионной ДЦЛ через брыжечную артерию и просвет кишки и иммерсионной ДЦЛ на качающейся платформе, а затем полученный матрикс стерилизовали гамма-излучением. Потом ДЦЛ-матрикс фрагмента кишечника разрезали вдоль длинной оси, а полученную мембрану натягивали между двумя металлическими кольцами и помещали в камеру перфузионного БР. На скаффолд высевали первичные кожные фибробласты и линейные опухолевые клетки шванномы S462 (на апикальную поверхность) и эндотелиальные клетки микрососудов (на базолатеральную поверхность кишечного сегмента). ТИК в перфузионной культуре поддерживали около 2 недель при постоянном или пульсирующем токе культуральной среды.

Недавно с помощью технологий перфузионной ДЦЛ-РЦЛ органов была получена ТИ-модель рака легких [83]. Разные виды линейных клеток рака легких (A549, H460, H1299) высевали путем перфузии клеточной суспензии на децеллюляризованный целоорганый скаффолд, полученный из легких мыши. Целоорганые ТИК перфузировали оксигенированной культуральной средой и поддерживали *ex vivo* до 2 недель. Показано формирование макроскопических опухолевых узлов, имеющих собственную кровеносную сеть, развитие типичных клеточно-клеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, формирование типичной структуры и динамику роста опухоли, сходные с реальными фрагментами ткани рака легкого человека.

БИОРЕАКТОРЫ НА ПОРИСТЫХ ВОЛОКНАХ

БР на пористых волокнах (hollow-fiber bioreactor) – это замкнутый сосуд, заполненный клеточной суспензией в культуральной среде, проницаемыми для среды скаффолдом или комплексной ТИК, в которых располагается пучок взаимно параллельных полупроницаемых полых волокон, имитирующих кровеносные сосуды и обеспечивающих доставку к клеткам питательных веществ и удаление отходов. Основное преимущество таких БР – возможность доставки питательных веществ в толщу растущих тканей. Сейчас они успешно применяются в экспериментах по культивированию очень чувствительных

типов клеток с высоким уровнем метаболизма, таких, как гепатоциты [84], но попытки использовать подобную систему для создания 3D-конструкций пока не увенчались успехом. Выяснилось, что при больших плотностях клеток или твердых матриц массообмен и диффузия кислорода в ней весьма затруднены. Это приводит к гибели клеток, находящихся на большом расстоянии от волокон, и к утрате структурной однородности ткани [85]. Для решения задачи была предложена коаксиальная схема БР на полых вставленных друг в друга волокнах, образующих независимые компартменты для выращивания клеток [84, 86]. Коаксиальная схема значительно улучшала массообмен, но еще одним серьезным недостатком данных систем является невозможность извлечения ТИК из БР для последующего использования без разрушения сформированной ткани.

В экспериментальной онкологии БР на пористых волокнах применяли для наращивания массы клеток, получения специфических клеточных продуктов и мониторинга метаболизма опухолевых тканей. Например, культивировали Т-лимфоциты, выделенные из воспалительного инфильтрата операционных биопсий рака яичников [87]. В коммерчески доступном БР получали сфероиды из клеток рака молочной железы (MCF-7) и изучали эффекты разных концентраций δ -токоферола [88]. Предложена методика мониторинга клеточной плотности и концентрации кислорода в сфероидах с использованием контрастно-усиленной МРТ [88]. Также с помощью МРТ и БР на пористых волокнах выявлен механизм изменения кажущегося коэффициента диффузии воды (важного диагностического признака) в ишемизированной ткани мозга, моделью которой служила 3D-культура клеток глиомы крыс [89, 90].

МИКРОФЛЮИДНЫЕ БИОРЕАКТОРЫ

Микрофлюидные платформы (microfluidic chips, microfluidic bioreactors) можно считать особой разновидностью перфузионной схемы конструирования и изучения биологических объектов с количеством клеток порядка 10^2 – 10^3 . На стеклянную основу по многостадийной технологии наносится слой биосовместимого кремнийорганического вещества (полидиметилсилоксана), организованный в форме микроканалов и микроемкостей. Преимущество этого полимера перед традиционным для культуральных работ полистиролом – сочетание высокой проницаемости для кислорода и других газов с практически полной непроницаемостью воды [91]. В микрофлюидных БР массообмен с клетками, растущими в микроемкостях, заполненными гидрогелем или непосредственно в элементах чипа, осуществляется за счет перфузии культуральной среды через микроканалы.

Вариативность и адаптируемость микрофлюидных систем к решению самых разных задач обуславливают активное развитие технологий «орган-на-чипе», «система органов-на-чипе» и «лаборатория-на-чипе» (“organ-on-a-chip”, “lab-on-a-chip”). Важное преимущество таких БР – точный контроль над параметрами потоков питательных сред и возможность оптического имиджинга *in situ* в реальном времени [92]. Микрофлюидные системы применяют для изучения реакций клеток на действие сигнальных молекул, метаболических и физических градиентов, роли интерстициальных потоков жидкости в жизнедеятельности ткани, в том числе опухолевой, а также для прецизионной количественной оценки проницаемости ТИК для лекарственных препаратов и наночастиц [28, 93–96]. Кроме того, можно моделировать кинетику клеточных популяций, прогрессию, ангиогенез, инвазию и разные этапы метастазирования [97–103].

БИОРЕАКТОРЫ С НЕПОСРЕДСТВЕННЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА СКАФФОЛД/ТИК

Конструкция БР может предусматривать дозированное воздействие физических факторов на скаффолд или ТИК. Например, объект ТИ может подвергаться действию механических сил, электрических импульсов или разным видам облучения. Наибольшее развитие получили биореакторные технологии, связанные с биомеханическими исследованиями.

КОМПРЕССИОННЫЕ БИОРЕАКТОРЫ

Компрессионные БР (compression bioreactors) широко используются в тканевой инженерии, особенно при изготовлении хрящевых структур. Такие БР состоят из двигателя, системы, обеспечивающей линейное смещение, и механизма управления. Нагрузка обычно передается на засеянные клетками скаффолд посредством плоских валиков [104] и обеспечивает специфическую механическую нагрузку на клетки и усиление тока жидкости через ТИК. В ТИО компрессионные БР могут быть востребованы для моделирования механизмов формирования костной метастатической ниши. В настоящее время практически не известно, как отвечает метастатическая раковая ткань на механическую нагрузку [105]. При исследовании на 3D-культурах клеток рака молочной железы (MDA-MB-231) и глиобластомы (U87, HGL21) в компрессионном БР показано усиление экспрессии генов, ответственных за ферментативный лизис белков внеклеточного матрикса, адгезию и миграцию в ответ на повышенную статическую компрессию, что соответствует росту метастатического потенциала [106].

БИОРЕАКТОРЫ С МЕХАНИЧЕСКИМ НАТЯЖЕНИЕМ

БР с контролируемым механическим натяжением (strain bioreactors) конструктивно похожи на компрессионные и отличаются от них лишь способом передачи силы на образец. Скаффолды/ТИК закрепляют так, чтобы к ним можно было применить силу натяжения, например, размещают их на резиновой мембране с последующей ее деформацией [107]. В ТИО недавно предложена модель изучения роли механического напряжения внеклеточного матрикса в индукции инвазии 3D-органOIDов, полученных путем культивирования трансформированных эпителиальных клеток в коллагеновом геле разных концентраций. Гель с включенными в него клеточными агрегатами, ковалентно связанный с полидиметилсилоксановой основой, помещали в микрофлюидный чип с устройством для натяжения этого участка культуральной камеры. Выявлена положительная корреляция между инвазивностью клеток и жесткостью геля, установлено влияние концентрации путем изменения среднего размера пор [108].

БИОРЕАКТОРЫ С ГИДРОСТАТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ

В БР с гидростатическим давлением (hydrostatic pressure bioreactors) механическое сжатие скаффолдов или ТИК опосредовано периодическим сокращением объема культуральной камеры при постоянстве объема культуральной среды [109]. Использование БР данного типа пока не получило развития в ТИО, однако, это направление видится нам чрезвычайно перспективным для модерирования важнейшей особенности физиологии солидных опухолей – повышенного интерстициального давления [36].

БИОРЕАКТОРЫ ДЛЯ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

БР для электрической стимуляции (electrical stimulation bioreactors), как правило, используются для моделирования возбудимых тканей. По нашим данным, массового использования таких БР для создания 3D-моделей рака пока не было, но появились единичные сообщения о культивировании опухолевых клеток в гидрогеле в условиях воздействия слабыми электрическими полями (при интенсивности 1.1 В/см и переменной частоте 150 и 200 кГц) в гибридном устройстве, созданном на основе микрофлюидного чипа [110]. Наблюдали изменение морфологических характеристик клеток рака легкого (линия А549) и рака молочной железы (линия МДА-МВ-231), уменьшение скорости пролиферации обеих линий опухолевых клеток и признаки снижения метастатического потенциала клеток А549, тогда как активность нормальных эндотелиальных клеток

человека (HUVEC) под действием электрических стимулов не изменялась.

КОМБИНИРОВАННЫЕ БИОРЕАКТОРЫ

Созданы многочисленные комбинации БР, позволяющие выращивать ткани в лабораторных условиях, как можно более точно соответствующих природным. В большинстве случаев эти комбинации заключаются в добавлении разных методов механического воздействия на ткани в стандартный БР перфузионного цикла или роторный БР. Так, объединение БР с контролируемым механическим натяжением, БР с гидростатическим давлением или компрессионного БР с перфузионным или роторным позволяет сочетать преимущества улучшенного обмена при перфузии или ротации и механическую стимуляцию ТИК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ применения биореакторных технологий при создании биомиметических моделей злокачественных опухолей показывает, что в настоящее время в ТИО по-прежнему чаще всего используются статические системы и перемешивающие БР на основе традиционных культуральных сосудов, помещенных на шейкеры. Однако эта область активно развивается. Все большее внимание привлекают микрофлюидные системы. По-видимому, для максимально правдоподобной реконструкции раковых опухолей потребуется применение не одного типа БР, а последовательной комбинации устройств, действующих на основе различных механизмов, или же создание универсальных комбайнов, обеспечивающих автоматизацию операций, контроль и стандартизацию условий культивирования.

Мы полагаем, что создание новых видов БР для ТИО, а также разработка общих принципов их конструирования имеют ключевое значение для углубленного понимания биологии рака. Одновременно с этим эксперименты с использованием БР открывают концептуальные возможности для тестирования перспективных поколений противоопухолевых соединений на основе рекомбинантных молекул [111–118], многофункциональных наноконструкций [119–126], а также для оценки потенциала новых клеточных и тканеинженерных технологий [25, 39–41, 127, 128] и репрограммирования раковых клеток [129, 130]. ●

Авторы благодарят А.З. Винарова, Д.В. Бутнару, А.В. Лузина, А.С. Титова (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова) за поддержку в организации и проведении хирургических экспериментов, Е.В. Петерсен и И.А. Корниенко (Московский физико-технический институт) за помощь в разработке технологии получения бесклеточных

органных скаффолдов. Мы также хотели бы принести наши извинения тем исследователям, чьи оригинальные работы мы не имели возможности процитировать непосредственно, а не через обзорные публикации, ввиду ограниченного объема статьи.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00106). Автор (А.Г.) также выражает благодарность Macquarie University за предоставление исследовательской стипендии iMQRes.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hickman J.A., Graeser R., de Hoogt R., Vidic S., Brito C., Gutekunst M., van der Kuip H., Consortium I.P. // *Biotechnol. J.* 2014. V. 9. № 9. P. 1115–1128.
- Breslin S., O'Driscoll L. // *Drug Discov. Today*. 2013. V. 18. № 5–6. P. 240–249.
- Aggarwal B.B., Danda D., Gupta S., Gehlot P. // *Biochem. Pharmacol.* 2009. V. 78. № 9. P. 1083–1094.
- Yamada K.M., Cukierman E. // *Cell*. 2007. V. 130. № 4. P. 601–610.
- Hutmacher D.W., Loessner D., Rizzi S., Kaplan D.L., Mooney D.J., Clements J.A. // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28. № 3. P. 125–133.
- Носенко М.А., Друцкая М.С., Мойсенович М.М., Недоспасов С.А. // *Acta Naturae*. 2016. T. 8. № 2. С. 51–66.
- Hanahan D., Weinberg R.A. // *Cell*. 2011. V. 144. № 5. P. 646–674.
- Ricci C., Moroni L., Danti S. // *OA Tissue Engineering*. 2013. V. 1. № 1. P. 4. <http://dx.doi.org/10.13172/2052-9643-1-1-607>.
- Baker B.M., Chen C.S. // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. Pt 13. P. 3015–3024.
- Tentler J.J., Tan A.C., Weekes C.D., Jimeno A., Leong S., Pitts T.M., Arcaroli J.J., Messersmith W.A., Eckhardt S.G. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012. V. 9. № 6. P. 338–350.
- Siolas D., Hannon G.J. // *Cancer Res.* 2013. V. 73. № 17. P. 5315–5319.
- Weinberg R.A. *The biology of cancer*. N.Y.: Garland Sci., 2007. 960 p.
- Hutmacher D.W., Horch R.E., Loessner D., Rizzi S., Sieh S., Reichert J.C., Clements J.A., Beier J.P., Arkudas A., Bleiziffer O. // *J. Cell. Mol. Med.* 2009. V. 13. № 8a. P. 1417–1427.
- Burdett E., Kasper F.K., Mikos A.G., Ludwig J.A. // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010. V. 16. № 3. P. 351–359.
- Ghajar C.M., Bissell M.J. // *Tissue Eng. Part A*. 2010. V. 16. № 7. P. 2153–2156.
- Fong E.L., Santoro M., Farach-Carson M.C., Kasper F.K., Mikos A.G. // *Curr. Opin. Chem. Eng.* 2014. V. 3. P. 112–117.
- Gill B.J., West J.L. // *J. Biomech.* 2014. V. 47. № 9. P. 1969–1978.
- Xu W., Hu X., Pan W. // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2014. V. 13. № 2. P. 149–159.
- Seib F.P., Berry J.E., Shiozawa Y., Taichman R.S., Kaplan D.L. // *Biomaterials*. 2015. V. 51. P. 313–319.
- Langer R., Vacanti J.P. // *Science*. 1993. V. 260. № 5110. P. 920–926.
- Martin I., Wendt D., Heberer M. // *Trends Biotechnol.* 2004. V. 22. № 2. P. 80–86.
- Pietras K., Ostman A. // *Exp. Cell Res.* 2010. V. 316. № 8. P. 1324–1331.
- Alemaný-Ribes M., Semino C.E. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014. V. 79–80. P. 40–49.
- Nelson C.M., Bissell M.J. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006. V. 22. P. 287–309.
- Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Бутнару Д.В., Винаров А.З., Захаркина О.Л., Курков А.В., Кантимеров Д.Ф., Антонов Е.Н. и др. // *Архив патологии*. 2015. T. 77. № 6. С. 29–38.
- Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. // *Biomaterials*. 2011. V. 32. № 12. P. 3233–3243.
- Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 19. P. 3675–3683.
- Martin Y., Vermette P. // *Biomaterials*. 2005. V. 26. № 35. P. 7481–7503.
- Fu R.H., Wang Y.C., Liu S.P., Shih T.R., Lin H.L., Chen Y.M., Sung J.H., Lu C.H., Wei J.R., Wang Z.W., et al. // *Cell Transplant.* 2014. V. 23. № 4. P. 621–630.
- Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2011. V. 13. P. 27–53.
- Mehta G., Hsiao A.Y., Ingram M., Luker G.D., Takayama S. // *J. Control Release*. 2012. V. 164. № 2. P. 192–204.
- Korossis S., Bolland F., Kearney J., Fisher J., Ingham E. // *Topics Tissue Eng.* 2005. V. 2. № 8. P. 1–23.
- Wendt D., Riboldi S.A., Cioffi M., Martin I. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2009. V. 112. P. 1–27.
- Hansmann J., Groeber F., Kahlig A., Kleinhans C., Walles H. // *Biotechnol. J.* 2013. V. 8. № 3. P. 298–307.
- Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. // *Cancer Res.* 1989. V. 49. № 23. P. 6449–6465.
- Jain R.K. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. № 12. P. 3039–3051.
- Stylianopoulos T., Martin J.D., Chauhan V.P., Jain S.R., Diop-Frimpong B., Bardeesy N., Smith B.L., Ferrone C.R., Hornicek F.J., Boucher Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 38. P. 15101–15108.
- Salehi-Nik N., Amoabediny G., Pouran B., Tabesh H., Shokrgozar M.A., Haghhighipour N., Khatibi N., Anisi F., Mottaghy K., Zandieh-Doulabi B. // *Biomed. Res. Int.* 2013. V. 2013. P. 762132.
- Guller A., Trusova I., Petersen E., Shekhter A., Kurkov A., Qian Y., Zvyagin A. // *SPIE Micro+Nano Materials, Devices, and Systems*. 2015. V. 96684G. doi: 10.1117/12.2202473.
- Глыбочко П.В., Аляев Ю.Г., Николенко В.Н., Шехтер А.Б., Винаров А.З., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Абянц Р.К., Ляндуп А.В., Гуллер А.Е. и др. // *Урология*. 2014. № 6. С. 41–46.
- Глыбочко П.В., Аляев Ю.Г., Шехтер А.Б., Винаров А.З., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Абянц Р.К., Ляндуп А.В., Крашенинников М.Е., Гуллер А.Е. и др. // *Урология*. 2015. № 6. С. 5–13.
- Dunne L.W., Huang Z., Meng W., Fan X., Zhang N., Zhang Q., An Z. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 18. P. 4940–4949.
- Talukdar S., Mandal M., Hutmacher D.W., Russell P.J., Soekmadji C., Kundu S.C. // *Biomaterials*. 2011. V. 32. № 8. P. 2149–2159.
- Serebriiskii I., Castello-Cros R., Lamb A., Golemis E.A., Cukierman E. // *Matrix Biol.* 2008. V. 27. № 6. P. 573–585.
- Lü W.-D., Zhang L., Wu C.-L., Liu Z.-G., Lei G.-Y., Liu J., Gao W., Hu Y.-R. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 7. P. e103672.
- Stratmann A.T., Fecher D., Wangorsch G., Göttlich C., Walles T., Walles H., Dandekar T., Dandekar G., Nietzer S.L. // *Mol. Oncol.* 2014. V. 8. № 2. P. 351–365.

47. Fong E.L., Lamhamedi-Cherradi S.E., Burdett E., Ramamoorthy V., Lazar A.J., Kasper F.K., Farach-Carson M.C., Vishwamitra D., Demicco E.G., Menegaz B.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 16. P. 6500–6505.
48. Villasante A., Marturano-Kruik A., Vunjak-Novakovic G. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 22. P. 5785–5794.
49. Sieh S., Lubik A.A., Clements J.A., Nelson C.C., Huttmacher D.W. // *Organogenesis*. 2010. V. 6. № 3. P. 181–188.
50. Sieh S., Taubenberger A.V., Lehman M.L., Clements J.A., Nelson C.C., Huttmacher D.W. // *Bone*. 2014. V. 63. P. 121–131.
51. Tandon N., Marolt D., Cimetta E., Vunjak-Novakovic G. // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. № 7. P. 1020–1031.
52. Sutherland R.M., Sordat B., Bamat J., Gabbert H., Bourrat B., Mueller-Klieser W. // *Cancer Res*. 1986. V. 46. № 10. P. 5320–5329.
53. Hirschhaeuser F., Leidig T., Rodday B., Lindemann C., Mueller-Klieser W. // *J. Biomol. Screen*. 2009. V. 14. № 8. P. 980–990.
54. Kim J.W., Ho W.J., Wu B.M. // *Anticancer Res*. 2011. V. 31. № 10. P. 3237–3245.
55. Fischbach C., Chen R., Matsumoto T., Schmelzle T., Brugge J.S., Polverini P.J., Mooney D.J. // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. № 10. P. 855–860.
56. Chen C., Chen K., Yang S.T. // *Biotechnol. Prog.* 2003. V. 19. № 5. P. 1574–1582.
57. Sucusky P., Osorio D.F., Brown J.B., Neitzel G.P. // *Biotechnol. Bioeng*. 2004. V. 85. № 1. P. 34–46.
58. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 4th Ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, 2000. 624 p.
59. Portner R., Nagel-Heyer S., Goepfert C., Adamietz P., Meenen N.M. // *J. Biosci. Bioeng*. 2005. V. 100. № 3. P. 235–245.
60. Schwarz R.P., Wolf D.A., Trinh T.T. Horizontally rotated cell culture system with a coaxial tubular oxygenator. Patent USA US5026650 A, Grant. 1991.
61. Chang T.T., Hughes-Fulford M. // *Tissue Eng. Part A*. 2009. V. 15. № 3. P. 559–567.
62. Goodwin T.J., Jessup J.M., Wolf D.A. // *In Vitro Cell Dev Biol*. 1992. V. 28A. № 1. P. 47–60.
63. Kaur P., Ward B., Saha B., Young L., Groshen S., Tychy G., Lu Y., Atkinson R., Taylor C. R., Ingram M., et al. // *J. Histochem. Cytochem*. 2011. V. 59. № 12. P. 1087–1100.
64. Marrero B., Heller R. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 10. P. 3036–3046.
65. Wang R., Xu J., Juliette L., Castilleja A., Love J., Sung S.Y., Zhau H.E., Goodwin T.J., Chung L.W. // *Semin. Cancer Biol*. 2005. V. 15. № 5. P. 353–364.
66. Song H., David O., Clejan S., Giordano C.L., Pappas-Lebeau H., Xu L., O'Connor K.C. // *Tissue Eng*. 2004. V. 10. № 7–8. P. 1266–1276.
67. Spatz J.M., Wein M.N., Gooi J.H., Qu Y., Garr J.L., Liu S., Barry K.J., Uda Y., Lai F., Dedic C., et al. // *J. Biol. Chem*. 2015. V. 290. № 27. P. 16744–16758.
68. Song K., Yan X., Zhang Y., Song F., Lim M., Fang M., Shi F., Wang L., Liu T. // *Bioprocess Biosyst. Eng*. 2015. V. 38. № 8. P. 1527–1540.
69. Goldstein A.S., Juarez T.M., Helmke C.D., Gustin M.C., Mikos A.G. // *Biomaterials*. 2001. V. 22. № 11. P. 1279–1288.
70. Yu X., Botchwey E.A., Levine E.M., Pollack S.R., Laurencin C.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 31. P. 11203–11208.
71. Насрединов А.С., Анисимов С.В., Вавилов В.Н., Пузанов М.В., Курапеев Д.И. // *Цитология*. 2014. Т. 56. № 12. С. 926–932.
72. Wendt D., Stroebel S., Jakob M., John G., Martin I. // *Biorheology*. 2006. V. 43. № 3–4. P. 481–488.
73. Wendt D., Marsano A., Jakob M., Heberer M., Martin I. // *Biotechnol. Bioeng*. 2003. V. 84. № 2. P. 205–214.
74. Barash Y., Dvir T., Tandeitnik P., Ruvinov E., Guterman H., Cohen S. // *Tissue Eng. Part C Methods*. 2010. V. 16. № 6. P. 1417–1426.
75. Cioffi M., Kuffer J., Strobel S., Dubini G., Martin I., Wendt D. // *J. Biomech*. 2008. V. 41. № 14. P. 2918–2925.
76. Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K., Black L.D., Kren S.M., Netoff T.I., Taylor D.A. // *Nat. Medicine*. 2008. V. 14. № 2. P. 213–221.
77. Soto-Gutierrez A., Zhang L., Medberry C., Fukumitsu K., Faulk D., Jiang H., Reing J., Gramignoli R., Komori J., Ross M., et al. // *Tissue Eng. Part C Methods*. 2011. V. 17. № 6. P. 677–686.
78. Bijonowski B.M., Miller W.M., Wertheim J.A. // *Curr. Opin. Chem. Eng*. 2013. V. 2. № 1. P. 32–40.
79. Price A.P., England K.A., Matson A.M., Blazar B.R., Panoskalsis-Mortari A. // *Tissue Eng Part A*. 2010. V. 16. № 8. P. 2581–2591.
80. Panoskalsis-Mortari A. // *Curr. Transplant. Rep*. 2015. V. 2. № 1. P. 90–97.
81. Hirt C., Papadimitropoulos A., Muraro M.G., Mele V., Panopoulos E., Cremonesi E., Ivanek R., Schultz-Thater E., Droese R.A., Mengus C., et al. // *Biomaterials*. 2015. V. 62. P. 138–146.
82. Moll C., Reboredo J., Schwarz T., Appelt A., Schurlein S., Walles H., Nietzer S. // *J. Vis. Exp*. 2013. № 78. doi: 10.3791/50460.
83. Mishra D.K., Thrall M.J., Baird B.N., Ott H.C., Blackmon S.H., Kurie J.M., Kim M.P. // *Ann. Thorac. Surg*. 2012. V. 93. № 4. P. 1075–1081.
84. Jasmund I., Bader A. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2002. V. 74. P. 99–109.
85. Birla R. // *Introduction to Tissue Engineering*. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons, Inc., 2014. P. 193–236.
86. Piret J.M., Cooney C.L. // *Biotechnol. Bioeng*. 1991. V. 37. № 1. P. 80–92.
87. Freedman R.S., Ioannides C.G., Mathioudakis G., Platsoucas C.D. // *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1992. V. 167. № 5. P. 1470–1478.
88. Bartusik D., Tomanek B., Siluk D., Kaliszan R., Fallone G. // *Anal. Biochem*. 2009. V. 387. № 2. P. 315–317.
89. Trouard T.P., Harkins K.D., Divijak J.L., Gillies R.J., Galons J.P. // *Magn. Reson. Med*. 2008. V. 60. № 2. P. 258–264.
90. Harkins K.D., Galons J.P., Divijak J.L., Trouard T.P. // *Magn. Reson. Med*. 2011. V. 66. № 3. P. 859–867.
91. Berthier E., Young E.W., Beebe D. // *Lab. Chip*. 2012. V. 12. № 7. P. 1224–1237.
92. Lee J., Kohl N., Shanbhang S., Parekkadan B. // *Technology (Singap World Sci)*. 2015. V. 3. № 4. P. 179–188.
93. Ng C.P., Pun S.H. // *Biotechnol. Bioeng*. 2008. V. 99. № 6. P. 1490–1501.
94. Elliott N.T., Yuan F. // *Biotechnol. Bioeng*. 2012. V. 109. № 5. P. 1326–1335.
95. Albanese A., Lam A.K., Sykes E.A., Rocheleau J.V., Chan W.C.W. // *Nature Comm*. 2013. T. 4. P. 2718. doi: 10.1038/ncomms3718.
96. Buchanan C., Rylander M.N. // *Biotechnol. Bioeng*. 2013. V. 110. № 8. P. 2063–2072.
97. Ma H., Xu H., Qin J. // *Biomicrofluidics*. 2013. V. 7. № 1. P. 11501. doi: 10.1063/1.4774070.
98. Song H.H., Park K.M., Gerecht S. // *Adv. Drug. Deliv. Rev*. 2014. V. 79–80. P. 19–29. doi: 10.1016/j.addr.2014.06.002.
99. Kim S., Lee H., Chung M., Jeon N.L., Kim S., Lee H., Chung M., Jeon N.L. // *Lab. Chip*. 2013. V. 13. № 8. P. 1489–1500.
100. Sung K.E., Beebe D.J. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2014. V. 79–80. P. 68–78. doi: 10.1016/j.addr.2014.07.002.

101. Haessler U., Teo J.C., Foretay D., Renaud P., Swartz M.A. // *Integr. Biol. (Camb.)*. 2012. V. 4. № 4. P. 401–409.
102. Bersini S., Jeon J.S., Dubini G., Arrigoni C., Chung S., Charest J.L., Moretti M., Kamm R. D. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 8. P. 2454–2461.
103. Huang C.P., Lu J., Seon H., Lee A.P., Flanagan L.A., Kim H.Y., Putnam A.J., Jeon N.L. // *Lab. Chip*. 2009. V. 9. № 12. P. 1740–1748.
104. Thorpe S.D., Buckley C.T., Vinardell T., O'Brien F.J., Campbell V.A., Kelly D.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 377. № 2. P. 458–462.
105. Lynch M.E., Brooks D., Mohanan S., Lee M.J., Polamraju P., Dent K., Bonassar L.J., van der Meulen M.C., Fischbach C. // *J. Bone Miner. Res.* 2013. V. 28. № 11. P. 2357–2367.
106. Demou Z.N. // *Ann. Biomed. Eng.* 2010. V. 38. № 11. P. 3509–3520.
107. Garvin J., Qi J., Maloney M., Banes A.J. // *Tissue Eng.* 2003. T. 9. № 5. P. 967–979.
108. Cassereau L., Miroshnikova Y.A., Ou G., Lakins J., Weaver V.M. // *J. Biotechnol.* 2015. V. 193. P. 66–69.
109. Darling E.M., Athanasiou K.A. // *Ann. Biomed. Eng.* 2003. V. 31. № 9. P. 1114–1124.
110. Pavesi A., Adriani G., Tay A., Warkiani M.E., Yeap W.H., Wong S.C., Kamm R.D. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 26584. doi: 10.1038/srep26584.
111. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
112. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics*. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
113. Деев С.М., Лебеде́нко Е.Н. // *Acta Naturae*. 2009. V. 1. № 1. P. 32–50.
114. Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
115. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 31. P. 30919–30928.
116. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Biochimie*. 2015. V. 118. P. 116–122.
117. Lebedenko E., Balandin T., Edelweiss E., Georgiev O., Moiseeva E., Petrov R., Deyev S. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007. V. 414. № 1. P. 120–123.
118. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Gene*. 2006. V. 366. № 1. P. 97–103.
119. Liang L., Care A., Zhang R., Lu Y., Packer N.H., Sunna A., Qian Y., Zvyagin A.V. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016. V. 8. № 19. P. 11945–11953.
120. Razali W.A., Sreenivasan V.K., Goldys E.M., Zvyagin A.V. // *Langmuir*. 2014. V. 30. № 50. P. 15091–15101.
121. Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. // *Nat. Nanotechnol.* 2014. V. 9. № 9. P. 716–722.
122. Grebenik E.A., Nadort A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Sreenivasan V.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., et al. // *J. Biomed. Opt.* 2013. V. 18. № 7. P. 76004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004.
123. Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. // *Nanomedicine (Lond.)*. 2011. V. 6. № 2. P. 195–209.
124. Generalova A.N., Kochneva I.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Guller A.E., Nechaev A.V., Shekhter A.B., Zubov V.P., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *Nanoscale*. 2015. V. 7. № 5. P. 1709–1717.
125. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brilkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *J. Biophotonics*. 2012. V. 5. № 11–12. P. 860–867.
126. Nadort A., Liang L., Grebenik E., Guller A., Lu Y., Qian Y., Goldys E., Zvyagin A. // *SPIE Micro+Nano Materials, Devices, and Systems*. 2015. V. 96683Y. doi:10.1117/12.2202449.
127. Петерсен Е., Трусова И., Зурина И., Кошелева Н., Горкун А., Гуллер А., Пулин А., Сабурин И., Репин В., Шехтер А. // *Пластическая хирургия и косметология*. 2012. № 4. С. 615–625.
128. Shekhter A.B., Rudenko T.G., Istranov L.P., Guller A.E., Borodulin R.R., Vanin A.F. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015. V. 78. P. 8–18.
129. Trosko J.E. // *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2014. V. 297. № 1. P. 161–173.
130. Ingber D.E. // *Semin. Cancer Biol.* 2008. V. 18. № 5. P. 356–364.