

**ЖАРАТЫЛЫСТАНУ ЖӘНЕ ГЕОГРАФИЯ ҒЫЛЫМДАРЫНЫҢ ӨЗЕКТІ МӘСЕЛЕЛЕРІ  
АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЕСТЕСТВЕННЫХ И ГЕОГРАФИЧЕСКИХ НАУК  
ACTUAL PROBLEMS OF NATURAL AND GEOGRAPHICAL SCIENCES**

**ӨОЖ 10.34660/INF.2021.51.69.009  
FTAMP 34.19.21**

<https://doi.org/10.51889/1728-8975.2022.74.4.012>

*З.Б. Тұңғышбаева<sup>1</sup>, А.К. Джумагалиева<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті  
Алматы қ., Қазақстан*

*<sup>2</sup>Қазақстан-Ресей медициналық университеті,  
Алматы қ., Қазақстан*

**ӨСІРУ БАРЫСЫНДАҒЫ ОҚШАУЛАНҒАН ГЕПАТОЦИТТЕР  
ЦИТОПЛАЗМАСЫНДАҒЫ ЕРЕКШЕЛІКТЕР**

*Андатпа*

Біздің зерттеу жұмысымыздың өзектілігі гепатоциттерді өсіру барысында дәрілік препараттарды тест арқылы сынап, тұқым қуалайтын немесе терминалдык бауыр ауруларын трансплантациялық әдіспен емдеу мүмкіндігін анықтау үшін пайдаланып, оңтайлы емдеу тәсілін ұсыну қажет болғандықтан туындаған. Стандартты қоректік ортада бастапқы өсірілген гепатоциттердің өсу динамикасына, ағынды цитофлуориметриямен, жарық микроскопымен, электронды микроскоппен және иммунофлуоресцентті талдау әдістерімен сипаттама берілді. Гепатоциттердің өсуі G0/G1 сатылардан кейін жасушалық циклдің 24 сағатында тоқтауы және олардың апоптоз сатысындағы жасушалардың пайызын арттырмай эксперименттің 48 сағаттыңда тіршілігін сақтап қалғаны анықталды. Жасушалардың абсолюттік көлемінің кемуі мен ядролық-цитоплазмалық арақатынастың артуы анықталды, бұл жағдай гепатоциттердегі цитоплазма үлесінің өсу барысында төмендегенін көрсетті. Гликоген мен митохондриялардың көлемдік тығыздығының төмендеуі және жасушалар цитоплазмасындағы базальды аутофагияның өсуі – гликогенофагия мен митофагияның басым болуы көрсетілген. Сонымен, аутофагия оқшауланған гепатоциттердің жасушалық гомеостазын қамтамасыз ететін тетігі болып табылады.

Мақсаты: оқшауланған гепатоциттердің цитоплазмасындағы базальды аутофагияны оларды өсіру динамикасында анықтау.

**Түйін сөздер:** оқшауланған гепатоциттер, жасушалық цикл, базальды аутофагия

*Тунгушбаева З.Б.<sup>1</sup>, Джумагалиева А.К.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Казахский национальный педагогический университет имени Абая,  
г. Алматы, Казахстан*

*<sup>2</sup>Казахстанско-Российский медицинский университет,  
г. Алматы, Казахстан*

**ОСОБЕННОСТИ ЦИТОПЛАЗМЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ  
ГЕПАТОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

*Аннотация.*

Актуальность нашей исследовательской работы обусловлена тем, что в процессе культивирования гепатоцитов необходимо тестировать лекарственные препараты и предлагать оптимальный подход к лечению, используя его для определения возможности

лечения наследственных или терминальных заболеваний печени трансплантационным методом. Дана характеристика динамики роста первично культивируемых гепатоцитов в стандартной питательной среде с проточной цитофлуориметрией, световым микроскопом, электронным микроскопом и методами иммунофлуоресцентного анализа. Было обнаружено, что рост гепатоцитов прекращается через 24 часа клеточного цикла после стадий G0/G1 и что они выживают в течение 48 часов эксперимента без увеличения процента клеток на стадии апоптоза. Выявлено уменьшение абсолютного объема клеток и увеличение ядерно–цитоплазматического соотношения, что свидетельствует о снижении доли цитоплазмы в гепатоцитах в процессе роста. Показано снижение объемной плотности гликогена и митохондрий и рост базальной аутофагии в цитоплазме клеток – преобладание гликогенофагии и митофагии. Таким образом, аутофагия является механизмом, обеспечивающим клеточный гомеостаз изолированных гепатоцитов.

Цель: выявить базальную аутофагию в цитоплазме изолированных гепатоцитов в динамике их культивирования.

**Ключевые слова:** изолированные гепатоциты, клеточный цикл, базальная аутофагия

*Tungushbayeva Z.B.<sup>1</sup>, Dzhumagaliyeva A.K.<sup>2</sup>  
Abai Kazakh National Pedagogical University,  
Almaty, Kazakhstan  
<sup>2</sup>Kazakh-Russian Medical University,  
Almaty, Kazakhstan*

## **FEATURES OF THE CYTOPLASM OF ISOLATED HEPATOCTES DURING CULTIVATION**

### *Annotation*

The relevance of our research work is due to the fact that in the process of hepatocyte cultivation, it is necessary to test drugs and propose an optimal approach to treatment, using it to determine the possibility of treating hereditary or terminal liver diseases by transplantation. The characteristics of the growth dynamics of primary cultured hepatocytes in a standard nutrient medium with flow cytofluorimetry, light microscope, electron microscope and immunofluorescence analysis methods are given. It was found that the growth of hepatocytes stops after 24 hours of the cell cycle after the G0/G1 stages and that they survive for 48 hours of the experiment without increasing the percentage of cells at the apoptosis stage. A decrease in the absolute volume of cells and an increase in the nuclear–cytoplasmic ratio were revealed, which indicates a decrease in the proportion of cytoplasm in hepatocytes during growth. A decrease in the volume density of glycogen and mitochondria and the growth of basal autophagy in the cytoplasm of cells – the predominance of glycogenophagy and mitophagy – were shown. Thus, autophagy is a mechanism that provides cellular homeostasis of isolated hepatocytes.

Objective: to identify basal autophagy in the cytoplasm of isolated hepatocytes in the dynamics of their cultivation.

**Keywords:** isolated hepatocytes, cell cycle, basal autophagy

**Кіріспе.** Бауыр – тіршілікке маңызды мүше, ағзадағы гомеостазды сақтауға бағытталған әртүрлі маңызды функцияларды атқарады. Бауырдың айрықша ерекшелігіне – оның регенерацияға жоғары қабілетті болғаны жатады. Бауырдағы көптеген функцияларды паренхималық гепатоцит жасушалары атқарады [1]. Гепатоциттер күрделі құрылымды, энергетикалық қарқынды, поляризацияланған эпителий жасушалары болып табылады және

регенерация кезінде олар бауырдың маңызды функцияларын сақтай отырып, ағзаның тіршілігін қамтамасыз ету үшін, 1000-нан астам генді экспрессиялайды [2,3].

Бауыр метаболизм мен детоксикацияның орталық органы болып табылады, оқшауланған гепатоциттер дәрілік препараттардың фармакологиялық және токсикологиялық реакцияларын анықтау үшін үлгі ретінде пайдаланылады [4]. Гепатоциттердің бастапқы культураның модельдері бауырдың метаболизмін, секрециясын және регенерациясын зерттеу үшін қолданылады [5]. Сонымен қатар, бастапқы гепатоциттерді өсірудің оңтайлы әдіснамасы мен тиімділігін анықтау проблемалары сақталуда [6]. Аутофагия барлық эукариоттық жасушаларда базальды деңгейде болады және белгілі бір субклеткалық бөлімге бағытталған селективті немесе селективті емес болуы мүмкін [8]. Аутофагия механизмі жасушадан тыс микроортадағы метаболизмдік өзгерістерге өте сезімтал және стресстік жағдайларды жеңу үшін адаптивті аутофагиялық жауап беру маңызды [9].

#### *Материал және әдістер*

**Гепатоциттерді оқшаулау және өсіру.** Салмағы 180200 г Вистар саласындағы аталық егеуқұйрықтардан алынған гепатоциттер 0,03% коллагеназа ерітіндісін ("ICN Biomedicals, Inc", АҚШ) пайдаланып рециркуляциялық ферментативті перфузия әдісімен оқшауланған және дифференциалды центрифугалау арқылы паренхималық емес жасушалардан бөліп алынды. Жасушалар тіршілігінің сақталғанын бағалау, трипан көгін ("Серва", Германия) алып тастау әдісімен анықталды. Экспериментке 90% кем емес тіршілігін сақтап қалған жасушалар алынды. Алынған жасушалар коллагенмен қапталған 6 ұяшықты планшеттерге отырғызылды (Corning), концентрациясы бір ұяшыққа/10-104 жасуша. Гепатоциттер RPMI-1640 (Gibco, АҚШ) өсірілетін қоректік ортаның рН 7,4, оның құрамында сиыр эмбрионының сарысуы 10% (Gibco, АҚШ), пенициллиннің 100 бірлігі/мл, гентамицин 50 мкг/мл стандартты жағдайларда (5% CO<sub>2</sub>, 37°C температурада және 95% ылғалдылық).

**Өсірілген гепатоциттердің жасушалық циклін бағалау.** Өсірілген гепатоциттердің жасушалық циклын талдау үшін, ағынды цитофлуориметрия әдісімен бірге, ДНҚ-ның интеркалирлеуші флуоресцентті бояғышының Пропидий йодиді (PI) қолданылды. Жасушалар 1, 24 және 48 сағат ішінде өсірілді. Пластмассадан жасушаларды алу үшін Triple реагенті (GIBCO, АҚШ) пайдаланылды, жасушалар центрифугалау арқылы тұндырылды, фосфат-тұз буферімен (PBS) жуылды және мұздатылған 70% этанолмен бекітілді. Буфермен инкубациялаудан кейін ДНҚ экстракциясын алу үшін жасушалар қайта центрифугалаудан өткізіліп, PBS жуылды. Пропидий йодидімен боялған жасушалар ағынды цитофлуориметрде талданды CytoFlexS (Beckman Coulter, США).

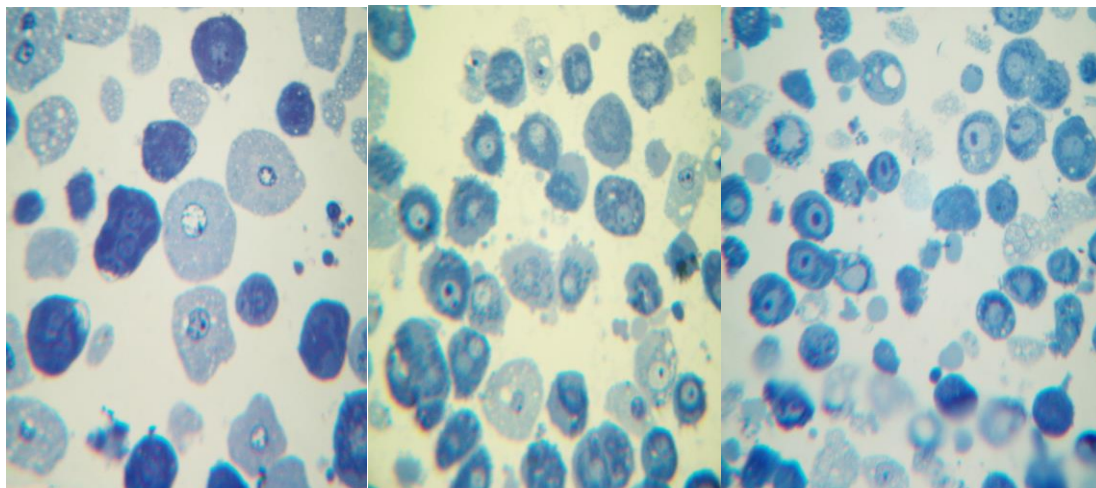
**Трансмиссиялық электронды микроскопия.** Гепатоциттердің ультрақұрылымдық ұйымдасуын зерттеу үшін жасушалардың суспензиясы Хенкс ортасында дайындалған параформальдегидтің 4% ерітіндісінде бекітілді, фосфат буферінде (рН=7,4) 1% OsO<sub>4</sub> ерітіндісінде 1 сағат барысында толық бекітілу жүргізілді, этил спиртінің жоғарылай беретін концентрациясында сусыздандырылып, эпонмен (Serva, Германия) қапталды. Leica EM uc7 (Leica Microsystems, Германия) ультрамикротомында қалыңдығы 1 мкм жартылай жұқа кесінділер алынды, толудиинді көкпен боялып, "Leica DME" жарық микроскопымен зерттелді (Leica Microsystems, Германия). Қалыңдығы 70-100 нм ультра жұқа кесінділер уранилацетат пен қорғасын цитратының қаныққан сулы ерітіндісінде қарама-қарсы ерекшеліктері анықталып, JEM 1010 электронды микроскопымен зерттелді (JEOL, Жапония).

**Морфометрия және статистикалық мәліметтерді өңдеу.** ImageJ (Wayne Rasband, АҚШ) компьютерлік бағдарламаның көмегімен морфометриялық талдау жасалды. Әр жасушалардағы ядролар мен цитоплазмалардың диаметрлері, ядролары мен цитоплазмаларының көлемі және ядро-цитоплазмалық арақатынастық мөлшері де анықталды. 500 нүктеден тұратын жабық тест жүйесін пайдалана отырып, жасуша ішіндегі органеллалардың концентрациясын x30000 ұлғайтылған кезде бағаланды және морфометрия әдісімен

сипатталды. Осы көрсеткіштердің орташа мәні (M) және стандартты ауытқуын (SD) Microsoft Excel (Microsoft, АҚШ) бағдарламасын пайдалану арқылы есептеу жүргізілді. Зерттелген көрсеткіштердің арасындағы айырмашылықтар зерттеу барысында анықталды. Осы көрсеткіштің сенімді деңгейге сәйкес келетінін 95% ( $P < 0,05$ ) Statistica 6.0 (StatSoft, АҚШ) бағдарламасының көмегімен Манн-Уитнидің U – критеріінің көрсеткіштерін қолдану арқылы дәлелденді.

*Зерттеу нәтижесі және талдау*

Зерттеу барысында жасушалардың абсолютті көлемінің бірте-бірте төмендеуі 48 сағат бойы өсіру кезінде оқшауланған гепатоциттерден байқалды. Яғни, өсіруден кейінгі 1 сағат өткендегі гепатоциттердің көлемімен салыстырғанда, зерттелген жасушалар көлемі 24 сағат өткенде 57%, ал 48 сағат өткеннен кейін 76% төмендеген. Бұл жағдайда гепатоциттер ядроларының абсолютті көлемі сенімді түрде өзгерген жоқ. Ядролық–цитоплазмалық ара қатынас 24 сағаттан кейін 2 есе, 48 сағаттан кейін 6 есе өскен (сурет. 1 А-В). Демек, өсіру процесінде гепатоциттер көлемінің төмендеуі жасуша цитоплазмасының көлемдік үлесінің төмендеуіне тікелей байланысты болғаны көрініс берді.



А

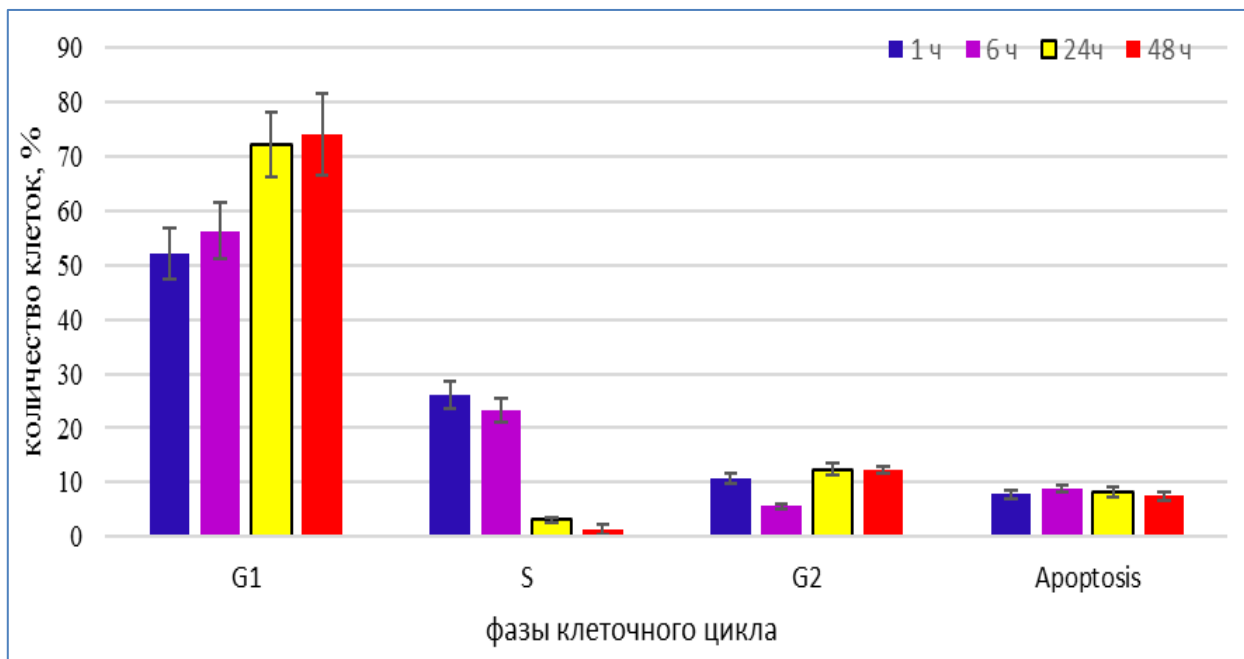
Б

В

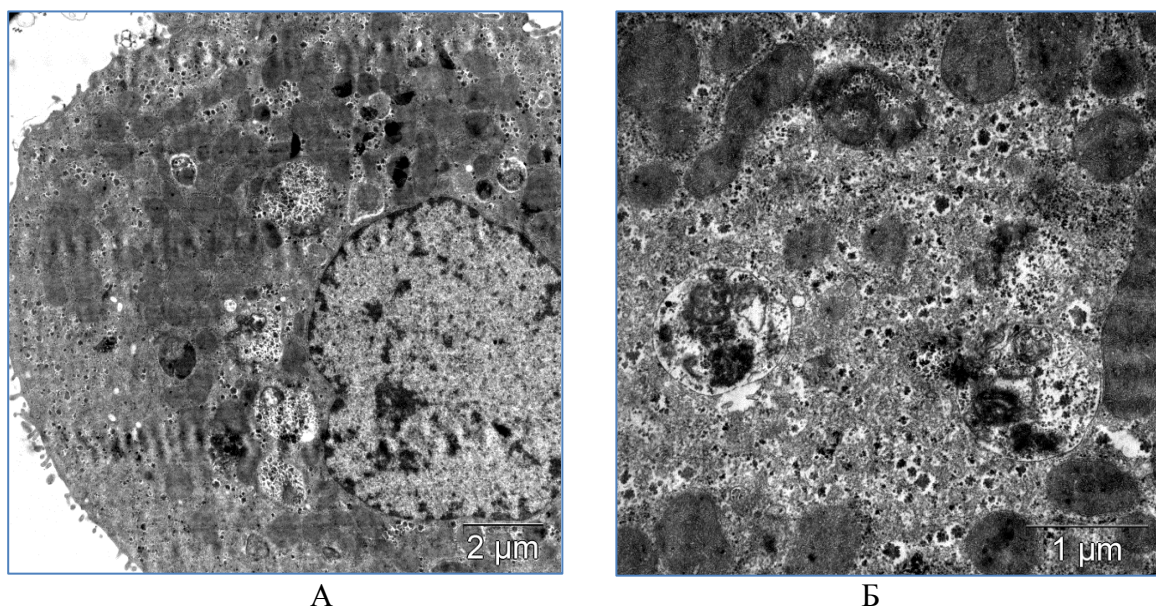
*Сурет 1. Өсіру динамикасы барысындағы оқшауланған гепатоциттердің морфологиясы А, Б, В – өсулеріне сәйкес гепатоциттердің 1, 24 және 48 сағат өткен соң. Толуидинді көкпен боялған. Ұлғайтылуы x400.*

Стандартты қоректік ортада өскен гепатоциттердің жасушалық циклін 24 сағаттан кейін бағалау G0/G1 фазасында тоқтайтынын көрсетті. 48 сағат ішінде зерттелген гепатоциттерде апоптоз сатысындағы жасушалар пайызы артқан жоқ, тіршіліктерін сақтап қалған (сурет 2).

Жасушалардың ультрақұрылымын зерттеу гепатоциттердегі аутофагияның дамуын анықтады. Цитоплазмада, фрагменттері мен гликоген розеткалары бар аутофагосомалар және ішінара тозған материалы бар аутолизосомалар байқалды (сурет 3).



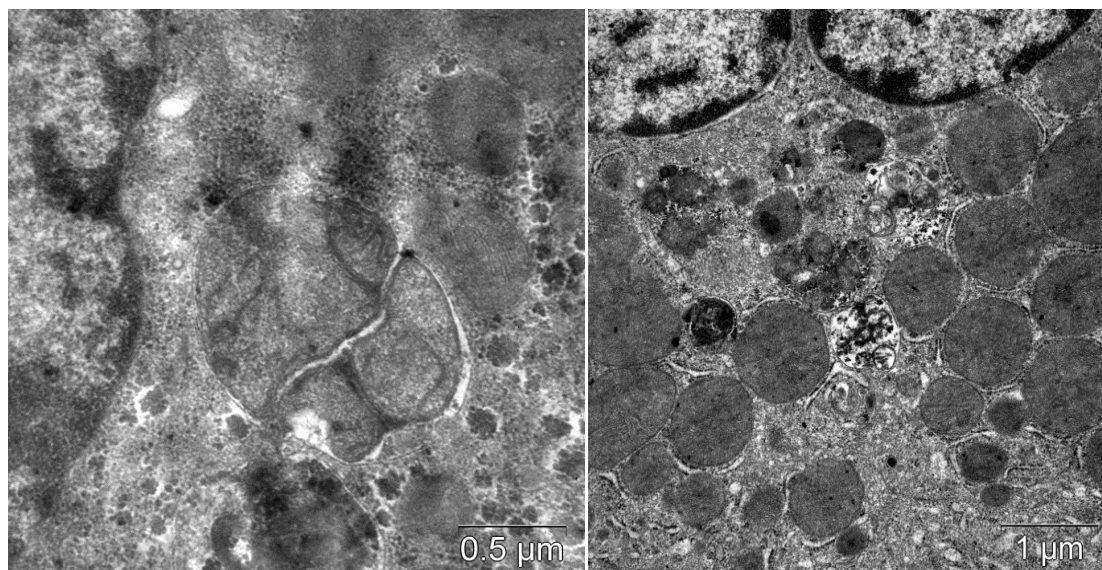
Сурет 2. Стандартты өсіру ортасында гепатоциттердің жасушалық цикл фазалары бойынша таралуы



Сурет 3. Гепатоциттердің 24 сағат өсуден кейін ультрақұрылымдық ұйымдасуы.  
 А – цитоплазма фрагменттері мен гликоген розеткалары бар аутофагосомалар  
 Б – ішінара деградацияланған материалы бар аутолизосомалар .

Егер аутофагосомалардың құрамында 24 сағат өсіруден кейін негізінен гликоген түйіршіктері байқалса, онда 48 сағат өсіруден кейін гепатоциттердің ультрақұрылымын зерттеу кезінде цитоплазма фрагменттері мен митохондриялары бар аутофагосомалар анықталды (сурет. 4А). Митохондриялар көбінесе түйіршікті эндоплазмалық ретикулум цистерналарымен қоршалған. Сонымен қатар, кристалдардың құрылымы бұзылған митохондриялар және деградацияның әртүрлі сатысында орналасқан мембраналық құрылымдардың қосындылары бар аутолизосомалардың көбеюі байқалды (сурет. 4Б).





А

Б

Сурет 4. Гепатоциттердің 48 сағат өсуден кейін ультрақұрылымдық ұйымдасуы. А – аутофагосома митохондриялармен; Б – аутолизосомаларда деградацияның әртүрлі сатысындағы мембраналық құрылымдардың қосындылары көбейген.

Гепатоциттерді өсірудің 48 сағатына қарай, олардың ультрақұрылымдық ұйымдасуын морфометриялық зерттеу барысында гликогеннің көлемдік тығыздығы 84% құрса, митохондрияның көлемдік тығыздығы 27% сәйкес болып ( $p < 0,05$ ) төмендегендей көрсеткіштер алынды (1 кесте).

Кесте 1 – Өсіру динамикасындағы гепатоциттердің морфометриялық нәтижелері ( $m \pm SD$ )

Параметрлер	1 сағат	24 сағат	48 сағат
Гепатоциттер, V(мкм <sup>3</sup> )	17089,77±10465,86	7322,782±3682,01*	4154,77±1904,82*
Гепатоциттер ядросы, V (мкм <sup>3</sup> )	423,04±379,21	427,73±278,91	514,83±242,8
ЯЦИ	0,03±0,02	0,07±0,05*	0,18±0,03*
Митохондриялар, V <sub>v</sub> (%)	14,2±2,72	14,7±1,78	10,4±2,38*
ЭПР, V <sub>v</sub> (%)	1,41±0,43	3,92±1,04	2,02±0,56
Аутофагосомалар V <sub>v</sub> (%)	5,87±1,45	21,2±5,13*	8,78±3,56*#
Аутолизосомалар, V <sub>v</sub> (%)	0,94±1,22	2,65±2,51*	6,88±2,21*#
Гликоген, V <sub>v</sub> (%)	5,41±1,14	1,42±1,08*	0,86±0,84*

Ескерту: V<sub>v</sub>–құрылымдардың көлемдік тығыздығы; ЭПР – эндоплазмалық ретикулум; ЯЦИ – ядролық-цитоплазмалық индекс (V<sub>v</sub> ядроның /цитоплазманың V<sub>v</sub>). 1, 24, 48 сағ-гепатоциттерді өсіру уақыты.\* – 1 сағат өсіруден кейінгі сәйкес көрсеткіштерден айырмашылығы,# – 24 сағат өсіруден кейінгі сәйкес көрсеткіштерден айырмашылығы ( $p \leq 0,05$ ).

Алынған деректерді талқылау

Аутофагия – жасушалық гомеостазды сақтау үшін макромолекулалық ақуыз агрегаттарын, қосалқы қоректік заттардың (гликоген және липидтер) жасушалық органеллаларын жоюға және ыдыратуға бағытталған катаболизмдік бағдарлама және стресс жағдайында белсендіігі артады. Лизосомаларда аутофагия арқылы түзілетін метаболиттер макромолекулаларды синтездеу үшін энергия көзі немесе құрылыс материалы ретінде қайта пайдаланылады [10].

Гепатоциттер энергия ресурсы – гликогенді сақтау мен қалыптастыруда негізгі және шешуші қызмет атқаратыны белгілі болып, әдебиеттегі көрсеткіштермен сәйкескелді [5]. Әдебиетте берілген мәліметтерде аутофагия мен көмірсулар алмасуының өзара әрекеттесуі және аутофагия мен жасушалық энергия балансы арасындағы динамикалық кері байланыстың болуын көрсеткен [10]. Гликогенді аутофагосомалар танып, сіңіре алады, содан кейін ыдырау үшін лизосомаларға тасымалданады. Бұл процесс "гликофагия" деп аталған [11]. Біздің зерттеулерімізде гепатоциттерді өсіру барысының 24 сағатынан кейін, негізінен гликогенді аутофагосомалар байқалды, ал 48 сағаттан кейін митохондриялық аутофагосомалар пайда болды. Осы кезеңде жасуша циклінің S фазасындағы жасушалардың саны ең аз болғаны байқалса, G0/G1 сатысында жасушалардың жоғары пайызда болуы байқалды. Аминқышқылдарының жетіспеушілігі жағдайында ақуыз синтезі мен митоз тоқтайтыны белгілі. Ал, аутофагиялық сигнал беру жолы аминқышқылдарының тіршілікке маңызды ақуыздарды синтездеу үшін қол жетімділігін сақтау үшін, ақуыздарды ыдырату арқылы аминқышқылдарын босатып, белсенділігін арттырған.

Гепатоциттердің жасушалық өскіндерін медицинада қолдануды шектейтін мәселелердің бірі – өсіру кезінде жасушалардың митоздық белсенділігінің жоғалуы [12]. Жасуша циклінің тоқтауы біздің зерттеуімізде де көрсетілген. Сонымен қатар, 48 сағат ішінде гепатоциттердің базальды аутофагиясының деңгейі өсті және апоптоз жағдайындағы жасушалар саны артқан жоқ. Бұл жағдайда аутофагия гепатоциттердің дифференциация деңгейін сақтаған сияқты және жасушалық гомеостазды сақтаудың тиімді әдісі болды деп ойлаймыз.

Біздің алған нәтижелерімізде теңдестірілген қоректік ортада оқшауланған гепатоциттерді өсіру, жасуша цитоплазмасында базальды аутофагияның жоғарылағанын көрсетті. Эксперимент барысындағы 24 сағат өсуден кейін гликофагия дамыды, өйткені аутофагосомалардағы гликоген түйіршіктері негізінен жасуша үшін энергия көзі болып табылатын материал болып есептеледі. Гликофагияға қосымша, 48 сағаттан кейін митофагия дамыды, бұл жасушаларға аминқышқылдарының жетіспеушілігін және ақуыз кешендерінің деградацияға ұшырауына байланысты көрініс берген. Алынған нәтижелер аутофагияның бастапқы гепатоцит өскіндерінің тіршілік ету процесіне қосқан үлесін көрсетеді және өсіру жағдайларының сәйкестігінің көрсеткіші ретінде пайдаланылуы мүмкін.

Сонымен, жасуша цитоплазмасында базальды аутофагияның жоғарылауы – гликофагия мен митофагияның артуына алып келеді. Бұл процесс гепатоциттердің өсу процесі барысында жасушалық гомеостазды сақтау механизмі болып табылатын сияқты.

#### *Пайдаланған әдебиеттер тізімі:*

- 1. Пашков А.Н., Кошелев П.И., Сапин К.А. Культивирование гепатоцитов на твердом носителе // Материалы международной конференции хирургов гепатологов. – М., 2003. – С. 83-95.*
- 2. Ogoke O., Oluwole J., Parashurama N. Bioengineering considerations in liver regenerative medicine // J. Biol. Eng. 2017. Vol. 11. P. 46. doi: 10.1186/s13036-017-0081-4.*
- 3. Michalopoulos GK. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. Hepatology 2016;65(4):1384–92.*
- 4. Akbari S., Sevinç G.G., Ersoy N., Basak O., Kaplan K., Sevinç K., Ozel E., Sengun B., Enustun E., Ozcimen B., Bagriyanik A., Arslan N., Önder T.T., Erdal E. Robust, Long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling // Stem Cell Reports. 2019. Vol. 13, № 4. P. 627-641. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.08.007.*

5. Cao L., Wang J., Bo L., Li D.W., Yin N., Zhou A.W., Mao C.P. Effects of hypoxia on the growth and development of the fetal ovine hepatocytes in primary culture // *Biomed. Environ. Sci.* 2019. Vol. 32, № 8. P. 592–601. doi: 10.3967/bes2019.077.
6. Nicolas C.T., Hickey R.D., Chen H.S., Mao S.A., Lopera Higuaita M., Wang Y., Nyberg S.L. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts // *Stem Cells.* 2017. Vol. 35, № 1. P. 42–50. doi: 10.1002/stem.2500.
7. Olsavsky Goyak K.M., Laurenzana E.M., Omiecinski C.J. Hepatocyte differentiation // *Methods Mol. Biol.* 2010. Vol. 640. P. 115–138. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7\_6.
8. Sica V., Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Izzo V., Maiuri M.C., Kroemer G. Organelle-specific initiation of autophagy // *Mol. Cell.* 2015. Vol. 59, № 4. P. 522–39. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.021.
9. Kroemer G., Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control // *Nat. Rev. Cancer.* 2005. Vol. 5, № 11. P. 886–897. doi: 10.1038/nrc1738.
10. Ha J., Guan K.L., Kim J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism // *Mol. Aspects Med.* 2015. Vol. 46. P. 46–62. doi: 10.1016/j.mam.2015.08.002.
11. He L., Zhang J., Zhao J., Ma N., Kim S.W., Qiao S., Ma X. Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress // *Adv. Nutr.* 2018. Vol. 9, № 4. P. 493–504. doi: 10.1093/advances/nmy011.
12. Krause P., Unthan-Fechner K., Probst I., Koenig S. Cultured hepatocytes adopt progenitor characteristics and display bipotent capacity to repopulate the liver // *Cell Transplant.* 2014. Vol. 23, № 7. P. 805–817. doi: 10.3727/096368913X664856.

#### References:

1. Pashkov A.N., Koshelev P.I., Sanpin K.A. Cultivation of hepatocytes on a solid carrier // *Materials of the International conference of surgeons of hepatologists.* –M., 2003. – C. 83–95.
2. Ogoke O., Oluwole J., Parashurama N. Bioengineering considerations in liver regenerative medicine // *J. Biol. Eng.* 2017. Vol. 11. P. 46. doi: 10.1186/s13036-017-0081-4.
3. Michalopoulos GK. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology* 2016;65(4):1384–92.
4. Akbari S., Sevinç G.G., Ersoy N., Basak O., Kaplan K., Sevinç K., Ozel E., Sengun B., Enustun E., Ozcimen B., Bagriyanik A., Arslan N., Önder T.T., Erdal E. Robust, Long-term culture of endoderm-derived hepatic organoids for disease modeling // *Stem Cell Reports.* 2019. Vol. 13, № 4. P. 627–641. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.08.007.
5. Cao L., Wang J., Bo L., Li D.W., Yin N., Zhou A.W., Mao C.P. Effects of hypoxia on the growth and development of the fetal ovine hepatocytes in primary culture // *Biomed. Environ. Sci.* 2019. Vol. 32, № 8. P. 592–601. doi: 10.3967/bes2019.077.
6. Nicolas C.T., Hickey R.D., Chen H.S., Mao S.A., Lopera Higuaita M., Wang Y., Nyberg S.L. Concise review: liver regenerative medicine: from hepatocyte transplantation to bioartificial livers and bioengineered grafts // *Stem Cells.* 2017. Vol. 35, № 1. P. 42–50. doi: 10.1002/stem.2500.
7. Olsavsky Goyak K.M., Laurenzana E.M., Omiecinski C.J. Hepatocyte differentiation // *Methods Mol. Biol.* 2010. Vol. 640. P. 115–138. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7\_6.
8. Sica V., Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Izzo V., Maiuri M.C., Kroemer G. Organelle-specific initiation of autophagy // *Mol. Cell.* 2015. Vol. 59, № 4. P. 522–39. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.021.
9. Kroemer G., Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control // *Nat. Rev. Cancer.* 2005. Vol. 5, № 11. P. 886–897. doi: 10.1038/nrc1738.
10. Ha J., Guan K.L., Kim J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism // *Mol. Aspects Med.* 2015. Vol. 46. P. 46–62. doi: 10.1016/j.mam.2015.08.002.
11. He L., Zhang J., Zhao J., Ma N., Kim S.W., Qiao S., Ma X. Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress // *Adv. Nutr.* 2018. Vol. 9, № 4. P. 493–504. doi: 10.1093/advances/nmy011.
12. Krause P., Unthan-Fechner K., Probst I., Koenig S. Cultured hepatocytes adopt progenitor characteristics and display bipotent capacity to repopulate the liver // *Cell Transplant.* 2014. Vol. 23, № 7. P. 805–817. doi: 10.3727/096368913X664856.