

**К ВОПРОСУ О ПОЛУЧЕНИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МАТРИЧНЫХ КАРКАСОВ
МЕТОДОМ ПЕРФУЗИОННОЙ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ**

А.В. ЧЕРНЫХ*, Ю.В. МАЛЕЕВ*, А.Н. ШЕВЦОВ**, А.Ю. ПУЛЬВЕР**, Б.Е. ЛЕЙБОВИЧ***

* ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко»
Минздрава России, ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394036, Россия

** ООО «Институт биологии старения», ул. Платонова, 19, оф. 510, г. Воронеж, 394018, Россия

*** НУЗ «Дорожная областная клиническая больница на станции Воронеж-1 ОАО «РЖД»»,
Пер. Здоровья, 2, г. Воронеж, 394024, Россия

Аннотация. В статье приводится описание первого опыта получения внеклеточных матричных каркасов из печени крысы в лаборатории «Института биологии старения» (г. Воронеж). Эксперимент выполнен на 34 крысах-самцах линии *Long-Evans* массой 300±50 г. Стандартная схема децеллюляризации печени включала 24-часовую перфузию 1% раствором лаурилсульфата натрия (*SDS*, додецилсульфат натрия), приготовленным на основе фосфатного буфера с добавлением 0.02% ЭДТА, с периодической заменой раствора спустя 1, 8 и 16 часов с помощью специально разработанной системы, включающей роторный насос. После окончания перфузии для очищения сосудистого русла органа от децеллюляризующих агентов, литических ферментов и тканевого детрита органокомплекс в течение 15 минут подвергали перфузии физиологическим раствором. Авторами статьи разработан и применен на практике алгоритм оценки качества децеллюляризации матричных каркасов, получаемых в лабораторных условиях. Он заключается в последовательно проводимой визуальной оценке свойств матрикса, объективной оценке гистологических срезов и последующими иммуногистохимическими исследованиями. Доказано, что предварительная заморозка органокомплекса, перфузированного раствором внеклеточного криопротектора, положительно влияет на результаты децеллюляризации. Данная методика позволяет в короткие сроки получать качественные внеклеточные матричные каркасы с максимальной сохранностью матричных гликопротеидов.

Ключевые слова: регенераторная медицина, внеклеточный матрикс, децеллюляризация, криопротектор, иммуногистохимия, печень, трегалоза, додецилсульфат натрия, замораживание, гликопротеиды.

**TO THE QUESTION OF PRODUCING EXTRACELLULAR MATRIX FRAMES BY PERFUSION
DECELLURIZATION**

A.V. TCHERNYKH*, Yu.V. MALEEV*, A.N. SHEVTSOV**, A.Yu. PUL'VER**, B.E. LE'BOVICH***

* *Voronezh State N.N. Burdenko Medical University, Studencheskaya str., 10, Voronezh, 394036, Russia*

** *Institute of Biology of Aging, Platonov str., 19, of.510, Voronezh, 394018, Russia*

*** *The Road Regional Hospital at the station Voronezh-1 JSC "Russian Railways, per. Zdorovya, 2, Voronezh, 394024, Russia*

Abstract. This article describes the first experience of producing extracellular matrix frames from rats' liver in the laboratory the "Institute of biology of aging" (Voronezh). The experiment was performed on 34 Wistar male Long-Evans, mass of 300 ± 50 gr. Standard scheme decellurization of liver included 24-hour perfusion of 1% sodium lauryl sulfate (SDS, sodium dodecyl sulfate), prepared on the basis of phosphate buffer supplemented with 0,02% EDTA with periodic replacement of the solution after 1, 8 and 16 hours via a specially designed system comprising rotary pump. After perfusion for purification of vessel channel of body from the agents of decellurization, lytic enzymes and tissue detritus, an organic complex for 15 minutes was perfused with saline. The authors developed and applied in practice the algorithm for estimating the quality decellurization of matrix frames, produced in the laboratory. The algorithm is consistently pursued visual evaluation matrix properties, an objective assessment of histological sections and subsequent immune histochemical studies. It is proved that the provisional freezing of the organic complex perfused by solution extracellular cryoprotectant, has a positive effect on decellurization results. This technique allows to quickly obtaining a high-quality extracellular matrix frames with maximum preservation of matrix glycoproteins.

Key words: regenerative medicine, extracellular matrix, decellurization, cryoprotectant, immunohistochemistry, liver, trehalose, sodium dodecyl sulfate, freezing, glycoproteins.

Введение. Развитие клинической трансплантологии по-прежнему сталкивается с рядом сложных проблем. Основными из них являются дефицит донорских органов, иммунологическая несовместимость

органов донора с организмом реципиента. Наиболее перспективным направлением решения данных проблем является выращивание иммуносовместимых донорских органов посредством культивирования собственных *стволовых клеток* (СК) реципиента на каркасе *внеклеточного матрикса* (ВКМ) донорских органов [2-4, 8].

ВКМ в тканевой инженерии не только определяет форму органа, но и контролирует дифференцировку клеток, а также стимулирует образование новых тканей [1, 5]. Основными требованиями к создаваемым каркасам являются биосовместимость, биodeградируемость, а также их способность регулировать клеточные пролиферацию, морфогенез и дифференцировку [7].

Современные способы химической децеллюляризации, используемой для получения ВКМ, характеризуются рядом недостатков, среди которых выделяются повреждение структуры, нарушение состава, биологической активности и биомеханических свойств матрикса.

В последнее время разрабатываются методики получения ВКМ путем децеллюляризации целых органов [6, 9, 10]. Перспективы развития данного направления нам видятся в дальнейшем совершенствовании методик децеллюляризации, оказывающих минимальное воздействие на химический состав и структуру ВКМ, а также минимизации побочных эффектов, вызванных замораживанием органокомплексов [11].

В связи с этим, **целью** работы явилась апробация методики оценки качества получения ВКМ при перфузионной децеллюляризации целых органов.

Материал и методы исследования. Эксперимент выполнен на 34 крысах-самцах линии *Long-Evans* массой 300±50 г. Все животные были разделены на 3 группы по 10 крыс в каждой. Четыре особи составили группу контроля.

Под общей анестезией в стерильных условиях выполняли канюлирование нижней полой и воротной вен. Для предотвращения свертывания крови в сосудистую систему печени под постоянным давлением со скоростью 2 мл/мин нагнетали раствор гепарина (0.2 ЕД). Это значительно облегчало ход последующей децеллюляризации, обеспечивая ее равномерность.

Печень отделяли от фиксирующего ее связочного аппарата и выделяли из раны. Перфузию печени выполняли с помощью специально разработанной системы, включающей роторный насос, обеспечивающий циркуляцию по замкнутой системе трубок. Затем печень помещали непосредственно в емкость с децеллюлярирующим раствором, который поступал в канюлю, введенную в воротную вену. Проходя сквозь сосудистое русло печени, перфузат естественным путем изливался обратно в емкость через просветы нижней полой вены и общей печенной артерии.

Стандартная схема перфузионной децеллюляризации включала 24-часовую перфузию 1% раствором лаурилсульфата натрия (*SDS*, додецилсульфат натрия, англ. – *sodium dodecyl sulfate*), приготовленным на основе фосфатного буфера с добавлением 0.02% ЭДТА, с периодической заменой раствора спустя 1, 8 и 16 часов. После окончания перфузии для очищения сосудистого русла органа от децеллюлярирующих агентов, литических ферментов и тканевого детрита органокомплекс в течение 15 минут подвергали перфузии физиологическим раствором. В качестве контроля выполнена децеллюляризация двух органокомплексов по предложенной схеме без предварительного цикла замораживания–оттаивания, а также, в обоих случаях проведено *иммуногистохимическое* (ИГХ) исследование печени, не подвергавшейся обработке.

В первой серии эксперимента органокомплексы после изъятия из раны подвергали тридцатиминутной перфузии фосфатным буфером для поддержания нормального кислотно-щелочного баланса. Затем органокомплексы замораживали при температуре –20°C. Спустя 24 часа после замораживания органокомплекс размораживали при 37°C на водяной бане.

Во второй серии эксперимента перед замораживанием органокомплексы перфузировали в течение 30 минут 10% раствором глицерина (проникающего криопротектора) в фосфатном буфере.

Третья серия эксперимента отличалась тем, что перед заморозкой органокомплексы перфузировали в течение 30 минут 5% раствором трегалозы (непроникающего криопротектора) в фосфатном буфере. Во всех сериях эксперимента после размораживания выполнялась децеллюляризация по вышеописанной схеме.

Результаты перфузии оценивали по специально разработанному протоколу, включающему следующие параметры: окраску органа, прозрачность ткани, степень визуализации сосудистого русла, сохранность объемной структуры органа. Для объективной оценки полученных результатов проводили гистологическое исследование препаратов, предварительно окрашенных гематоксилином и эозином, а также по Ван-Гизону. Это позволяло оценить степень децеллюляризации и сохранность структуры элементов ВКМ. При этом учитывали наличие клеток в срезе, сохранность структуры сети матрикса, наличие его разрывов, внутритканевого отека. Для определения степени сохранности функционально важных гликопротеидов внеклеточного матрикса (эластина и фибронектина) на заключительном этапе работы выполнено ИГХ исследование.

Все образцы исследуемой ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 часов для дальнейшего гистологического, гистохимического и ИГХ исследований. После заливки образцов ткани в парафин изготавливали серийные срезы ротационным микротомом *Leica RM 2125 RT*.

ИГХ белков ВКМ выполнялось на парафиновых срезах толщиной 4 мкм с использованием иммуно-энзимного полимерного метода детекции *Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)* (*NICHIREI BIOSCIENCES INC.*, Япония) с помощью поликлональных кроличьих антител на эластин, а также моноклональных кроличьих антител – на фибронектин (*EPITOMICS, ABBIOTEC, THERMO SCIENTIFIC, Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, США) с предварительной депарафинизацией, регидратацией и демаскировкой антигенов реактивом *Declare® (Cell Marque™)*, США) в соответствии с инструкцией. Далее проводили гашение эндогенной пероксидазы 3% раствором перекиси водорода в абсолютном метаноле, срезы инкубировали первичными антителами, добавляли *Histofine® Simple Stain MAX PO* (аминокислотные полимеры, соединенные с пероксидазой и антимишиным, антикроличьим иммуноглобулином). Продукт реакции выявляли с помощью *N Histofine® DAB-3S kit* (*NICHIREI BIOSCIENCES INC.*, Япония).

Готовые гистологические препараты изучали с помощью обычной световой микроскопии на микроскопе *Leica DM 4000* (Германия) под малым ($\times 100$) и большим ($\times 400$) увеличениями. Микрофотографии были получены с помощью камеры *Leica DFC 490* (Германия).

Экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», № 701 от 27.07.1978 г. «О внесении дополнений в приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.», положениями Хельсинской декларации по вопросам медицинской этики и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1989). При выполнении исследований и оформлении результатов работы были также учтены «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденные Приказом Минвуза № 742 от 13.11.1984 г.

Результаты и их обсуждение. При гистологическом исследовании препаратов контрольной группы установлено, что на фоне межклеточного отека отмечаются локусы удовлетворительно децеллюляризированной ткани, расположенной преимущественно у ворот печени, а также участки с клеточным детритом и отдельные островки с сохранившимися гепатоцитами. Для контроля ИГХ исследования взяты две свежеезъятые печени. Отмечены экспрессия элементов матрикса, целостность его сети и отсутствие разрывов.

В первой серии эксперимента перед децеллюляризацией органокомплексы подвергали циклу замораживания–оттаивания без предварительной перфузии криопротекторами. При визуальном осмотре печень была уменьшена в объеме, на поверхности долей при микроскопии выявлены повреждения в виде разрывов капсулы и паренхимы. Ткань печени в области ворот прозрачная, белая, в толще видны сосуды, однако дистальнее разрывов ткань печени имела светло-коричневый оттенок, была непрозрачной, сосуды не визуализировались, что свидетельствует о низком качестве децеллюляризации (рис. 1).



Рис. 1. 1-я серия эксперимента. Внешний вид печени

Это подтверждено результатами гистологического исследования. При микроскопии выявлены внеклеточный отек, большое количество клеточного детрита и островки с гепатоцитами (рис. 2).

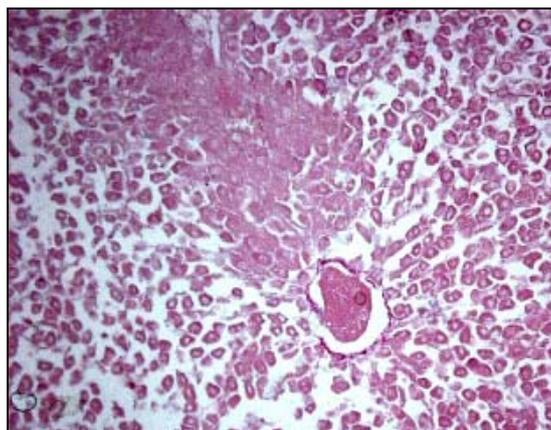


Рис. 2. 1-я серия эксперимента. Структура печени крысы после децеллюляризации. Микрофотография. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, ок. 10 (увеличение 400)

При выполнении ИГХ исследования срезов на уровне ворот печени отмечается экспрессия элементов ВКМ, однако матрикс значительно разрежен, отмечаются разрывы, нарушена архитектоника; что объясняется наличием внеклеточного тканевого отека и отсутствием предохранения матрикса перед замораживанием (рис.3 а, б).

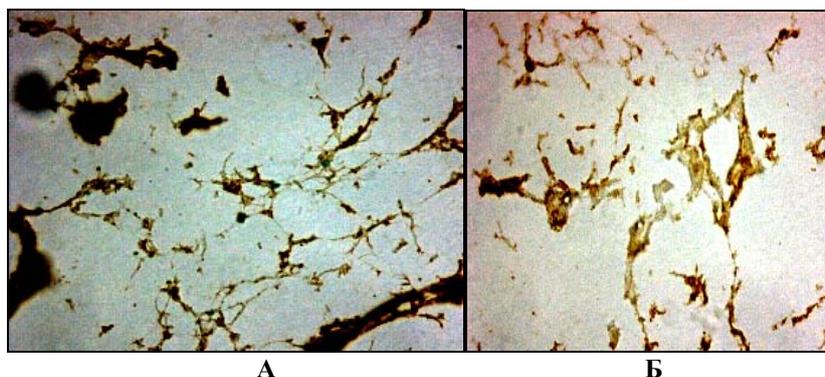


Рис. 3. 1-я серия эксперимента. Эластин (а) и фибронектин (б) в печени крысы. Микрофотография. Об. 40, ок. 10 (увеличение 400)

На наш взгляд, наличие большого количества клеточного детрита и островков с гепатоцитами в образцах 1-й серии эксперимента обусловлено тем, что децеллюляризирующий раствор не проникает на периферию долей печени из-за нарушения целостности сосудов в области поврежденной ткани печени.

Во 2-й серии экспериментов органокомплекс перед замораживанием перфузировали 10% раствором глицерина. При визуальном осмотре в ткани отсутствовали разрывы, она имела светло-коричневый цвет, была непрозрачной, сосуды не визуализировались, что свидетельствует о низкой степени децеллюляризации (рис. 4).



Рис. 4. 2-я серия эксперимента. Внешний вид печени

При микроскопии срезов, изготовленных из участков органа, имеющих светло-коричневую окраску и неизменной ткани, на фоне интактных гепатоцитов присутствуют поля клеточного детрита. Структура внеклеточного матрикса сохранена, выражен межклеточный отек (рис. 5).

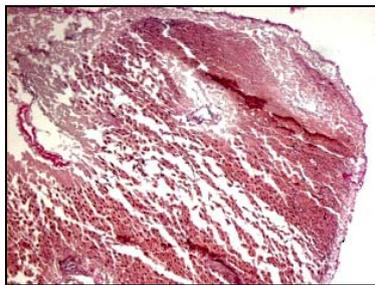


Рис. 5. 2-я серия эксперимента. Структура печени крысы после децеллюляризации. Микрофотография. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, ок. 10 (увеличение 400)

При ИГХ исследовании визуально выявлена сниженная экспрессия гликопротеидов (рис. 6 а, б). По-видимому, при децеллюляризации ВКМ был значительно поврежден.

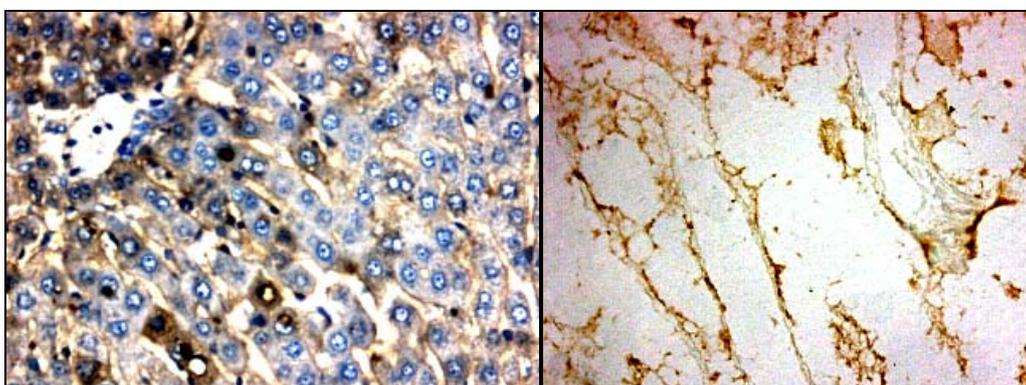


Рис. 6. 2-я серия эксперимента. ИГХ выявление фибронектина (а) с докраской гематоксилином (об. 40, ок. 10, увеличение 400) и эластина (об. 40, ок. 10, увеличение 400) (б) в печени крысы после децеллюляризации

Низкая степень децеллюляризации во 2-й серии эксперимента предположительно объясняется защитным действием глицерина по отношению к тканям органа на стадии замораживания. для компенсации этого может потребоваться пролонгирование перфузии децеллюляризирующим агентом. С целью подтверждения гипотезы, вне рамок эксперимента, перфузия была продолжена до 36 часов от начала опыта. Полученные результаты, в целом, повторяют результаты 3-й серии эксперимента, что свидетельствует о положительном влиянии на результаты децеллюляризации предварительной перфузии органо-комплекса любыми криопротекторами.

В третьей серии экспериментов перед выполнением перфузии по стандартной схеме печень подвергали циклу замораживания–оттаивания с предварительной перфузией 5% раствором трегалозы. При визуальном осмотре ткань печени имела белый цвет, была прозрачной и однородной. В толще ткани визуализировались контуры сосудов. Пространственная архитектура органа сохранена (рис. 7).

При микроскопии срезов, сделанных на нескольких уровнях, получены следующие результаты (рис. 8). Структура ВКМ сохранена, отмечают единичные микроразрывы матрикса. Обращает внимание полное отсутствие гепатоцитов и тканевого детрита, что позволяет оценить степень децеллюляризации как хорошую.



Рис. 7. 3-я серия эксперимента. Внешний вид печени

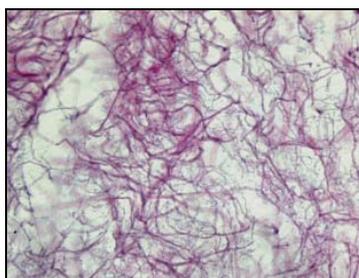


Рис. 8. 3-я серия эксперимента. Структура печени крысы после децеллюляризации. Микрофотография. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 63, ок. 10 (увеличение 630)

Степень сохранности гликопротеинов, образующих ВКМ, оценивали при помощи ИГХ исследования. При визуальном сравнении с контрольным образцом отмечена экспрессия гликопротеидов (рис. 9 а, б).

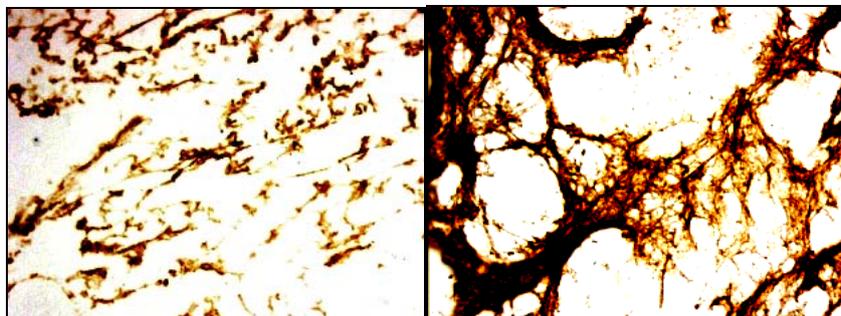


Рис. 9. 3-я серия эксперимента. ИГХ выявление фибронектина (а) и эластина в печени крысы после децеллюляризации. Микрофотография. Об. 40, ок. 10 (увеличение 400)

На основании результатов, полученных в эксперименте, можно утверждать, что предварительная перфузия раствором непроницающего криопротектора (трегалозы) увеличивает скорость децеллюляризации. Это объясняется различиями в механизмах действия внеклеточных (непроницающих) и внутриклеточных (проницающих) криопротекторов. Внутриклеточные криопротекторы, проникая сквозь клеточную мембрану, образуют водородные связи с молекулами воды, препятствуя как вне-, так и внутриклеточному формированию кристаллов льда. Внеклеточные же криопротекторы действуют только в межклеточном пространстве, не предохраняя клетки от образования внутриклеточного льда, что приводит к более быстрой децеллюляризации.

Выводы. Разработана и применена на практике методика оценки результатов децеллюляризации, заключающаяся в последовательной визуальной оценке свойств матрикса, объективной оценке гистологических срезов, иммуногистохимическом исследовании. Предложенная методика позволила оценивать качество получаемых в лабораторных условиях ВКМ каркасов. Установлено, что предварительная заморозка органокомплекса, перфузированного раствором внеклеточного криопротектора, положительно влияет на результаты децеллюляризации. Предложен способ перфузионной децеллюляризации печени крысы, основанный на использовании в качестве действующего агента 1% раствора додецилсульфата

натрия с предварительной заморозкой органа, перфузированного 5% раствором трегалозы. Предложенная методика позволяет в короткие сроки получать качественные внеклеточные матричные каркасы с максимальной сохранностью матричных гликопротеидов.

Литература

1. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс / Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гилевич И.В. [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. №7(4). С. 20–27.
2. Иванов Д.В., Хадарцев А.А. Клеточные технологии в восстановительной медицине: Монография / Под ред. А.Н. Лищука. Тула: Тульский полиграфист, 2011. 180 с.
3. Иванов Д.В., Хадарцев А.А., Хадарцев В.А., Седова О.А., Митюшкина О.А. Клиническое использование стволовых клеток (Обзор публикаций) // Вестник новых медицинских технологий. 2009. №4. С. 31–33.
4. Хадарцев А.А., Субботина Т.И., Иванов Д.В., Гонтарев С.Н., Яшин А.А., Луценко В.Д., Татьяненко Т.Н., Семикопенко А.В., Савин Е.И., Митюшкина О.А. Медико-биологические аспекты клеточных технологий: Монография / Под ред. А.А. Хадарцева. Тула: Изд-во ТулГУ – Белгород: ЗАО «Белгородская областная типография», 2013. 288 с.
5. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function // *ActaBiomater.* 2009. №5. P. 1–13.
6. Baptista P.M., Siddiqui M.M., Lozier G., Rodriguez S.R., Atala A., Soker S. The Use of Whole Organ Decellularization for the Generation of a Vascularized Liver Organoid // *Hepatology.* 2011. Vol. 53, № 2. P. 604–617.
7. Giancotti F.G. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression // *Curr Opin Cell Biol.* 1997. №9. P. 691–700.
8. Langer R. Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine // *Adv Mater.* 2009. №21. P. 3235–3241.
9. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung / Ott H.C. [et al.] // *Nat. Med.* 2008. №16. P. 927–933.
10. Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K. Perfusion decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart // *Nat. Med.* 2008. №14. P. 213–221.
11. Pulver A.Yu., Shevtsov A.N., Leybovich B.E., Artyuhov I.V., Maleev Yu.V., Peregodov A.G. Production of organ extracellular matrix using a freeze-thaw cycle employing extracellular cryoprotectants // *CRYO-LETTERS.* 2014. T. 35, №5. P. 400–406.

References

1. Gubareva EA, Sotnichenko AS, Gilevich IV, i dr. Morfologicheskaya otsenka kachestva detsellyulyarizatsii serdtsa i diafragmy krysa [Morphological evaluation of the quality of the heart and diaphragm of rats detsellyulyarizatsii]. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya.* 2012;7(4):20-7. Russian.
2. Ivanov DV, Khadartsev AA. Kletochnye tekhnologii v vosstanovitel'noy meditsine [Cellular technologies in regenerative medicine]: Monografiya. Pod red. Lishchuka AN. Tula: Tul'skiy poligrafist; 2011. Russian.
3. Ivanov DV, Khadartsev AA, Khadartsev VA, Sedova OA, Mityushkina OA. Klinicheskoe ispol'zovanie stvolovykh kletok (Obzor publikatsiy) [The clinical use of stem cells (Book Review)]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy.* 2009;4:31-3. Russian.
4. Khadartsev AA, Subbotina TI, Ivanov DV, Gontarev SN, Yashin AA, Lutsenko VD, Tat'yanenko TN, Semikopenko AV, Savin EI, Mityushkina OA. Mediko-biologicheskie aspekty kletochnykh tekhnologiy [Medical and biological aspects of cellular technologies]: Monografiya. Pod red. Khadartseva AA. Tula: Izd-vo TulGU – Belgorod: ZAO «Belgorodskaya oblastnaya tipografiya»; 2013. Russian.
5. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *ActaBiomater.* 2009;5:1-13.
6. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. The Use of Whole Organ Decellularization for the Generation of a Vascularized Liver Organoid. *Hepatology.* 2011;53(2):604-17.
7. Giancotti FG. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:691-700.
8. Langer R. Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Mater.* 2009;21:3235-41.
9. Ott HC, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat. Med.* 2008;16:927-33.

10. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK. Perfusion decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nat. Med. 2008,14:213-21.

11. Pulver AY, Shevtsov AN, Leybovich BE, Artyuhov IV, Maleev YV, Peregudov AG. Production of organ extracellular matrix using a freeze-thaw cycle employing extracellular cryoprotectants. CRYO-LETTERS. 2014;35(5):400-6.

Библиографическая ссылка:

Черных А.В., Малеев Ю. В., Шевцов А. Н., Пульвер А.Ю., Лейбович Б.Е. К вопросу о получении внеклеточных матричных каркасов методом перфузионной децеллюляризации // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2016. №3. Публикация 2-11. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2016-3/2-11.pdf> (дата обращения: 29.08.2016). DOI: 10.12737/21405.