

## ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ФРАГМЕНТА ДОНОРСКОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО МАТРИКСА

А.С. Пономарева<sup>1</sup>, Л.А. Кирсанова<sup>1</sup>, Н.В. Баранова<sup>1</sup>, В.А. Сургученко<sup>1</sup>, Г.Н. Бубенцова<sup>1</sup>, Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, И.А. Милосердов<sup>1, 2</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Одной из актуальных задач тканевой инженерии является получение искусственного матрикса, способного имитировать для клеток микроокружение биологической среды. Таким матриксом при создании биоинженерной конструкции поджелудочной железы (ПЖ) может быть тканеспецифический каркас, полученный из децеллюляризованной ткани ПЖ. **Цель:** получение и исследование характеристических свойств тканеспецифического каркаса поджелудочной железы из децеллюляризованных фрагментов панкреатической ткани человека. **Материалы и методы.** Протокол децеллюляризации включал в себя 3 цикла замораживания и оттаивания фрагментов ПЖ с последующей обработкой поверхностно-активными веществами – додецилсульфатом натрия и Тритоном X100. На каждом этапе децеллюляризации проводили рутинное окрашивание образцов гематоксилином и эозином и на общий коллаген. Дополнительно проводили иммуногистохимический анализ срезов децеллюляризованной ПЖ человека (ДПЖч) на коллаген I типа и эластические волокна. Ядра клеток в исходных образцах и полученном матриксе визуализировали, используя флуоресцентное окрашивание DAPI. Определяли количество ДНК в нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ. Цитотоксичность тканеспецифического матрикса оценивали *in vitro* методом прямого контакта. Матриксные свойства образцов ДПЖч определяли с использованием МСК жировой ткани человека. **Результаты.** Предложен способ децеллюляризации ПЖ, позволяющий получение тканеспецифического матрикса в виде соединительно-тканного каркаса, полностью свободного от детрита с сохраненной тонковолокнистой сетевидной структурой, в которой выявлены эластические и коллагеновые волокна, в том числе коллагена I типа. Окрашивание DAPI подтверждало отсутствие ядерного материала в децеллюляризованном матриксе, а остаточное количество ДНК не превышало 0,1%. Доказано отсутствие цитотоксичности матрикса и его способность поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч. **Заключение.** Как один из этапов создания биоинженерной конструкции ПЖ, разработан способ получения биосовместимого (отсутствие цитотоксичности и иммуногенности) тканеспецифического каркаса из децеллюляризованной панкреатической ткани человека с сохранением морфофункциональных свойств нативного внеклеточного матрикса ПЖ и обеспечивающего адгезию и пролиферацию клеточных культур.

*Ключевые слова:* поджелудочная железа, децеллюляризация, тканеспецифический каркас, тканевая инженерия.

**Для корреспонденции:** Пономарева Анна Сергеевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел.: (499) 196-26-61; (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

**For correspondence:** Ponomareva Anna Sergeevna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Tel.: (499) 196-26-61; (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

# DECELLULARIZATION OF DONOR PANCREATIC FRAGMENT TO OBTAIN A TISSUE-SPECIFIC MATRIX SCAFFOLD

A.S. Ponomareva<sup>1</sup>, L.A. Kirsanova<sup>1</sup>, N.V. Baranova<sup>1</sup>, V.A. Surguchenko<sup>1</sup>, G.N. Bubentsova<sup>1</sup>, Yu.B. Basok<sup>1</sup>, I.A. Miloserdov<sup>1, 2</sup>, V.I. Sevastianov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Sechenov University, Moscow, Russian Federation

One of the pressing issues in tissue engineering is on how to obtain an artificial matrix that can simulate a biological microenvironment for cells. When creating a bioengineered pancreatic construct, a tissue-specific scaffold obtained from decellularized pancreatic tissue can serve as such matrix. **Objective:** to obtain and study the characteristic properties of a tissue-specific pancreas scaffold from decellularized human pancreatic fragments. **Materials and methods.** The decellularization protocol included 3 freeze/thaw cycles, followed by treatment with surfactants (sodium dodecyl sulfate and Triton X100). At each decellularization stage, samples were routinely stained with hematoxylin and eosin and for total collagen. In addition, immunohistochemical staining of decellularized human pancreas (DHP) for type I collagen and elastic fibers was performed. Cell nuclei in the original samples and the resulting matrix were visualized using DAPI fluorescent staining. DNA quantity in the native and decellularized pancreatic tissue was determined. The cytotoxicity of the tissue-specific matrix was evaluated *in vitro* by direct contact. The matrix properties of DHP samples were determined using mesenchymal stem cells (MSCs) of human adipose tissue. **Results.** A pancreatic decellularization method is proposed. This method allows to obtain a tissue-specific matrix in the form of a connective tissue scaffold completely free of detritus with preserved thin-fiber mesh-like structure, in which elastic and collagen fibers, including type I collagen, are identified. DAPI staining confirmed the absence of nuclear material in the decellularized matrix, while residual amount of DNA did not exceed 0.1%. Absence of matrix cytotoxicity and its ability to maintain adhesion and proliferation of human adipose tissue-derived MSCs was proved. **Conclusion.** As one of the stages in creating a bioengineered pancreatic construct, a method has been developed for producing a biocompatible (lack of cytotoxicity and immunogenicity) tissue-specific scaffold from decellularized human pancreatic tissue. In the scaffold, the morphofunctional properties of the native extracellular matrix-based scaffolds of the pancreas are preserved. Adhesion and proliferation of cell cultures are ensured.

*Keywords: pancreas, decellularization, tissue-specific scaffold, tissue engineering.*

## ВВЕДЕНИЕ

Инсулинозависимый сахарный диабет является хроническим заболеванием, возникающим в результате истощения популяции  $\beta$ -клеток вследствие аутоиммунного повреждения. Современные исследования направлены на восполнение популяции  $\beta$ -клеток путем создания биоинженерных эквивалентов поджелудочной железы, состоящих из  $\beta$ -клеток, стволовых клеток или изолированных островков Лангерганса и матрикса-носителя, обеспечивающего более длительное выживание и эффективное функционирование трансплантируемых клеток. В качестве матриксов используют материалы различной природы, обладающие определенными физико-механическими, биологическими и функциональными свойствами, такими как биосовместимость, отсутствие иммуногенности, механическая прочность и эластичность, способность к биодеградации и т. д. [1]. Важным свойством матриксов для тканевой инженерии является имитация сигналов нативной микросреды, т. е. тканеспецифичность.

Не вызывает сомнения тот факт, что наиболее подходящим для клеток остается «родной» матрикс

с характерными особенностями структуры и состава. Для получения тканеспецифического матрикса органы и ткани подвергают децеллюляризации для удаления ДНК, клеточного материала и клеточных поверхностных антигенов с помощью ряда методов, использующих химическую, ферментативную или механическую обработку [2]. Протоколы децеллюляризации должны быть разработаны с учетом таких факторов, как плотность и толщина исходной ткани, количество клеток, содержание липидов [2, 3].

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой полипептидные цепи коллагена, ламинина, фибронектина и эластина, переплетенные с полисахаридными цепями – гликозаминогликанами [4]. Обычно коллагены обеспечивают структурную жесткость и сцепление тканей, поддержку целостности и формы, структуры органа; эластины обеспечивают прочность, упругость и растяжимость ткани. Кроме того, фибронектин, фибриллин и ламинин участвуют в ремоделировании цитоскелета, сократительной способности и дифференциальной клеточной адгезии [4].

Состав и организация ВКМ варьируется от ткани к ткани, однако основная функция всех ВКМ заключается в обеспечении механической поддержки клеток и поддержании множества биологических функций, таких как жизнеспособность и рост клеток. В поджелудочной железе ВКМ, в составе которого определяется коллаген I, III, IV, V и VI типа, эластин, а также ламинин и фибронектин, регулирует основные аспекты биологии островков, включая развитие, морфологию и дифференцировку, внутриклеточную передачу сигналов, экспрессию генов, адгезию и миграцию, пролиферацию, секрецию и выживаемость [4, 5]. Взаимодействия клетка–матрикс важны для того, чтобы зрелые  $\beta$ -клетки оставались функциональными и избегали апоптоза, а также для поддержания функциональной массы  $\beta$ -клеток [6]. Во время процесса выделения островки часто лишаются значительной части ВКМ и васкулярной сети, что в дальнейшем негативно сказывается на жизнеспособности изолированных ОЛ. Показано, что островки, которые частично сохраняют ВКМ после выделения, демонстрируют снижение скорости апоптоза и значительно лучше поддерживают секрецию инсулина, чем более агрессивно очищенные островки [4].

Учитывая, насколько существенную роль играет ВКМ в обеспечении жизнеспособности и функционирования ОЛ, в процессе децеллюляризации важно не только освободить матрикс от клеточного компонента, но и по возможности максимально сохранить неизменными структуру и состав ВКМ. В дальнейшем такой матрикс может быть рецеллюляризован соответствующими типами клеток с перспективой получения тканевого эквивалента ПЖ с определенными функциональными свойствами [6].

Матрикс поджелудочной железы как целого органа был получен от мышей [7, 8], крыс [9], свиней [6, 10] и человека [11]. Однако восстановление сосудистой сети таких интактных децеллюляризованных каркасов органов является сложной задачей. Альтернативный подход, который особенно актуален для эндокринного трансплантата островков, заключается в объединении клеток с децеллюляризованным матриксом, полученным из фрагмента поджелудочной железы [3]. Такая стратегия может быть перспективна для приложений тканевой инженерии из-за простоты ее использования.

В нашем исследовании мы изучили возможность получения тканеспецифического матрикса ПЖ, используя для децеллюляризации небольшие фрагменты панкреатической ткани. Такой подход позволяет повысить эффективность децеллюляризации, полноценно заселить клетками весь объем децеллюляризованного матрикса, упростить доставку кислорода и питательных веществ к донорским клеткам, в том числе в глубине матрикса, значительно снизить стоимость процедуры децеллюляризации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Исходный материал

В работе использовали хвостовую часть ПЖ, полученную в результате мультиорганного забора органов посмертных доноров ( $n = 6$ ) и не пригодную для трансплантации (возраст доноров 34–63 года).

### Децеллюляризация ПЖ

Для повышения эффективности децеллюляризации в протокол исследования был введен цикл замораживания–оттаивания с целью деструкции клеток ткани на предварительном этапе. Фрагменты донорской поджелудочной железы подвергали 1, 2 или 3 циклам замораживания при  $-80^{\circ}\text{C}$  и оттаивания до  $+37^{\circ}\text{C}$  с последующим механическим измельчением ткани до  $1 \times 1 \times 1$  мм. Далее фрагменты ткани обрабатывали в трех сменах буферного раствора ( $\text{pH} = 7,4$ ), содержащего растворы 0,1% додецилсульфата натрия и повышающую концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3% соответственно) (Sigma, США). В каждом растворе образец находился в течение суток при комнатной температуре в условиях постоянного перемешивания со скоростью 2 об/мин на роллерной системе CellRoll (INTEGRABiosciencesAG, Швейцария). При смене растворов мелкодисперсный матрикс фильтровали с применением металлического сита (диаметр ячеек 0,4–0,6 мм) и возвращали в раствор с более высокой концентрацией Тритон X100.

По окончании процесса децеллюляризации фрагменты ПЖч тщательно отмывали от остатков поверхностно-активных агентов в течение 72 часов в фосфатном буферном растворе с добавлением антибиотика/антимикотика. Отмытые фрагменты ПЖч вносили в криопробирки, замораживали и подвергали  $\gamma$ -стерилизации (1,5 Мрад).

### Гистологическое исследование

На каждом этапе децеллюляризации с целью контроля эффективности процесса часть материала фиксировали в 10% забуференном формалине, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в смеси хлороформа и этанола, хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм получали с помощью микротомы RM2245 (Leica, Германия) и в дальнейшем окрашивали гематоксилином и эозином, на общий коллаген (метод Массона) и на эластические волокна (метод Унны–Тенцера), ядра клеток визуализировали флуоресцентным окрашиванием DAPI (Sigma, США). Кроме того, проводили постановку иммуногистохимической реакции на коллаген I типа, используя anti-collagen I antibody (Abcam, Великобритания) и систему визуализации Rabbit Specific HRP|DAB (ABC) Detection IHCkit (Abcam, Великобритания).

## Определение общего количества ДНК в матриксе

Остаточное количество ДНК служит индикатором сохранившихся в децеллюляризованном матриксе клеточных компонентов, несущих основную долю антигенов, обеспечивающих реакцию отторжения трансплантата [12].

Перед исследованием образцы хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Выделение ДНК проводили с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя.

Для количественного определения двухцепочечной ДНК использовали флуоресцентный краситель  $\text{TM}$ Picogreen Quant-iT (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Кратко, 50 мкл лизата исследуемого образца разбавляли в пропорции 1:1 буферным раствором TE, а затем добавляли к 100 мкл раствора красителя. В течение 5 минут полученный раствор инкубировали при комнатной температуре без доступа света, далее образцы активировали излучением с длиной волны 480 нм и затем анализировали на ридере для микропланшетов Spark 10M (Tecan Trading AG, Швейцария) при длине волны 520 нм. Для определения абсолютного количества ДНК использовали калибровочную кривую ДНК бактериофага  $\lambda$  (Invitrogen, США) (0 нг/мл – 1000 нг/мл).

## Исследование цитотоксичности матрикса

Цитотоксичность образцов матрикса в виде фрагментов децеллюляризованной ткани поджелудочной железы человека в условиях *in vitro* оценивали методом прямого контакта согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-5-2011 на культуре фибробластов мыши линии L929 [13]. Отрицательным контрольным образцом служила культуральная среда с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС, HyClone, SV30160.03, США). Положительным контрольным образцом – стандарт цинка одноэлементный водный 10 000 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Все процедуры проводили в асептических условиях. Мониторинг культуры осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

Метаболическую активность фибробластов после контакта с образцами матрикса определяли через 24 ч с помощью реагента prestoBlue $\text{TM}$  Cell Viability Reagent (Invitrogen $\text{TM}$ , США) согласно протоколу, рекомендуемому производителем. Изменение поглощения среды регистрировали с использованием ридера для микропланшетов Spark 10M с программным обеспечением SparkControl $\text{TM}$ Magellan V1.2.20 на длинах волн 570 и 600 нм.

Количественную и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения

Microsoft Excel 2007. Все результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  среднее квадратичное отклонение. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Исследование функциональных свойств матрикса

Функциональные свойства матрикса ДПЖч относительно его способности поддерживать адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток исследовали на культуре мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). Посев МСК ЖТч (II пассаж) производили из расчета  $15 \times 10^4$  клеток/10 мг матрикса. Через 6 суток культивирования несколько образцов были отобраны для оценки жизнеспособности МСК ЖТч с помощью набора LIVE/DEAD $\text{®}$  Cell Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular probes $\text{®}$  by Life technologies $\text{TM}$ , США). А через 15 суток культивирования оставшиеся образцы матрикса с клетками были зафиксированы в 10% забуференном формалине для дальнейшего гистологического анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Гистологический анализ нативной ПЖ

Проведенное морфологическое исследование нативной ПЖ выявило, что три исследованные железы имели признаки выраженного липоматоза, в то время как в трех других железах были обнаружены признаки диффузного фиброза панкреатической ткани (рис. 1).

### Гистологический анализ ткани с липоматозом на разных этапах децеллюляризации фрагментов ПЖ

Было исследовано 3 серии образцов нативной ПЖ с признаками липоматоза, отличающихся количеством циклов замораживания и оттаивания. Проведенное гистологическое исследование показало, что на начальном этапе обработки – после однократного замораживания – в ткани ПЖ с липоматозом наблюдали частичное повреждение клеток панкреатической паренхимы, выражающееся в деструкции, прежде всего клеток ацинарной ткани. При этом границы между клетками непосредственно в ацинусах выглядели стертыми, размытыми, а клеточные ядра не визуализировались или были пикнотичными. Однако контуры ацинусов еще четко определялись. Островки Лангерганса в целом выглядели структурно более сохранными, хотя отмечалась гиперхромность значительной части ядер инсулоцитов. Следует отметить, что процесс деструкции клеток на данном этапе не носил глобального характера и захватывал не более 50% исследуемого фрагмента панкреатической ткани (рис. 2, а, б).



Фрагменты ПЖ с липоматозом, подвергшиеся двум циклам замораживания–оттаивания, в значительной степени отличались по морфологическим признакам от предыдущей серии образцов. Прежде

всего это касалось тотального распространения процесса клеточной деструкции на весь тканевой фрагмент. Не наблюдали даже частичного сохранения морфологических признаков первоначальной струк-

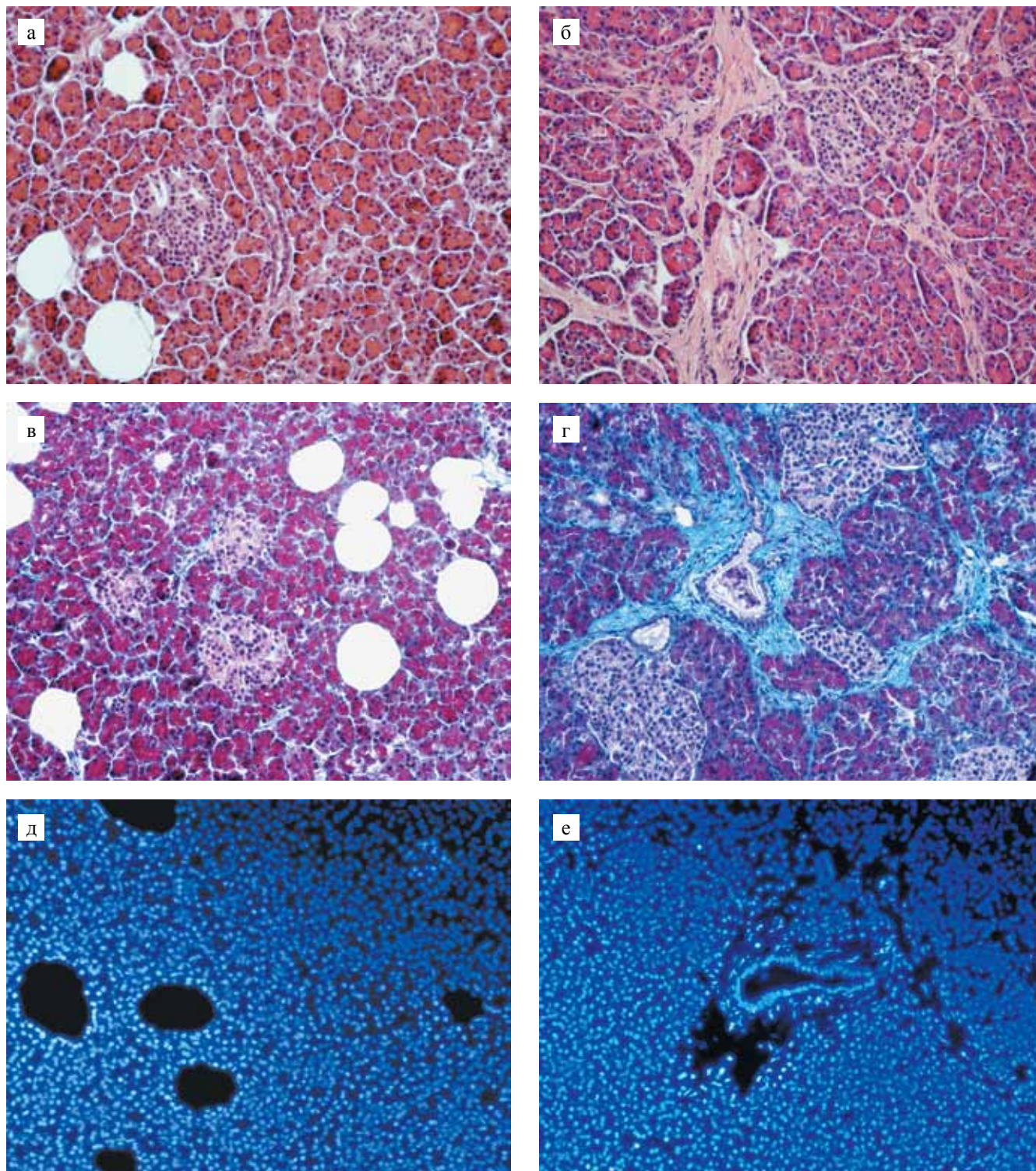


Рис. 1. Гистологическая картина поджелудочной железы человека: а, в, д – нативная донорская поджелудочная железа с признаками липоматоза; б, г, е – нативная донорская поджелудочная железа с признаками фиброза; а, б – гематоксилин и эозин; в, г – метод Массона; д, е – окрашивание клеточных ядер DAPI.  $\times 200$

Fig. 1. The histological presentation of human pancreas: а, в, д – native donor pancreas with lipomatosis features; б, г, е – native donor pancreas with fibrosis features; а, б – hematoxylin and eosin; в, г – Masson's method; д, е – nuclear DAPI staining.  $\times 200$



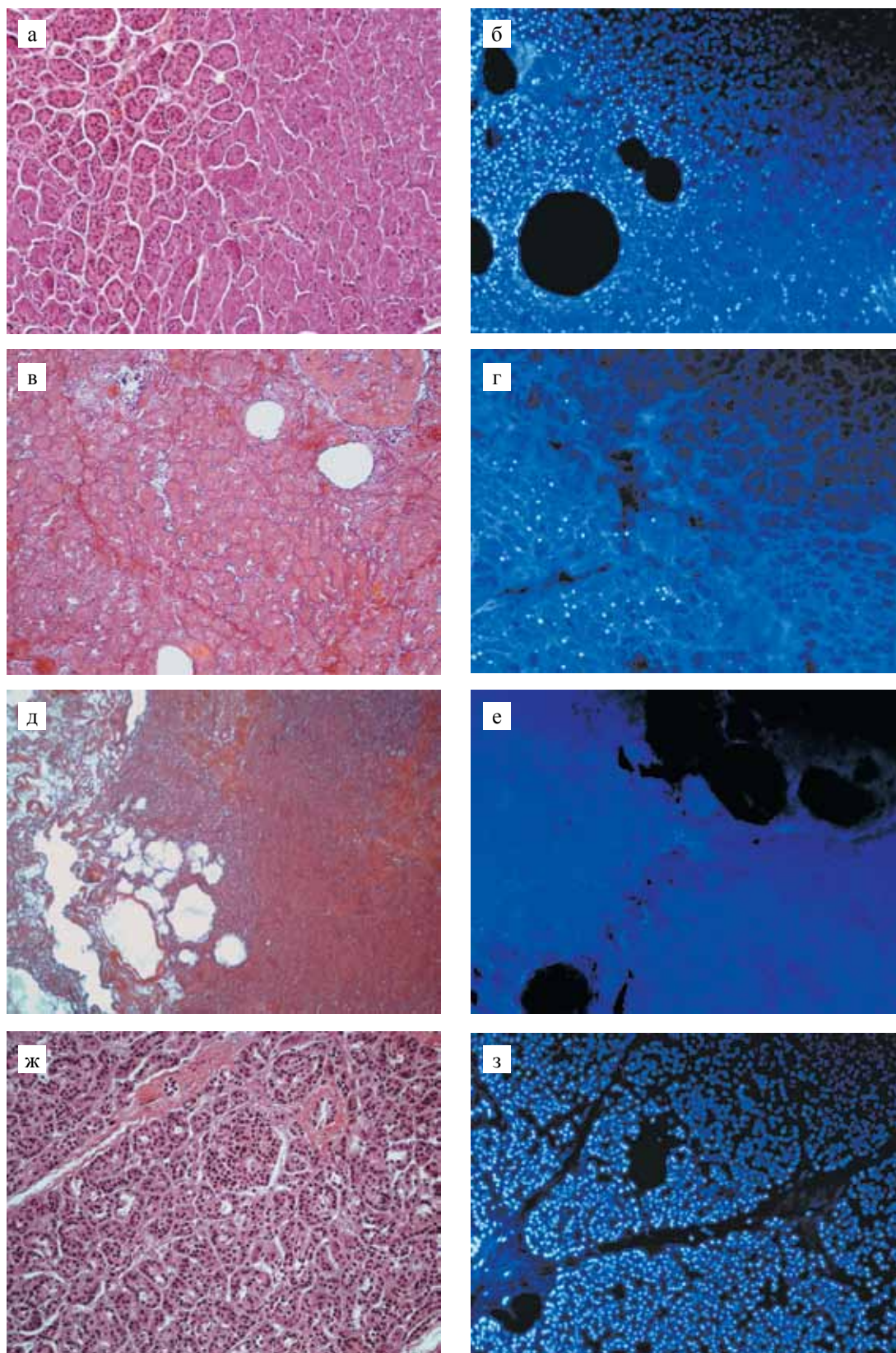


Рис. 2. Гистологическая картина ткани поджелудочной железы после последовательных циклов замораживания–оттаивания: а, б – 1 цикл замораживания до  $-80^{\circ}\text{C}$  и оттаивания до  $+37^{\circ}\text{C}$ ; в, г – 2 цикла; д, е – 3 цикла замораживания–оттаивания ПЖ с липоматозом; ж, з – 3 цикла замораживания–оттаивания ПЖ с фиброзом; а, в, д, ж – гематоксилин и эозин; б, г, е, з – окрашивание ядер DAPI.  $\times 200$

Fig. 2. The histological presentation of pancreatic tissue after successive cycles of freezing and thawing: а, б – 1 cycle of freezing up to  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawing up to  $+37^{\circ}\text{C}$ ; в, г – 2 cycles; д, е – 3 cycles of freezing and thawing of pancreas with lipomatosis; ж, з – 3 cycles of freezing and thawing of pancreas with fibrosis; а, в, д, ж – hematoxylin and eosin; б, г, е, з – nuclear DAPI staining.  $\times 200$



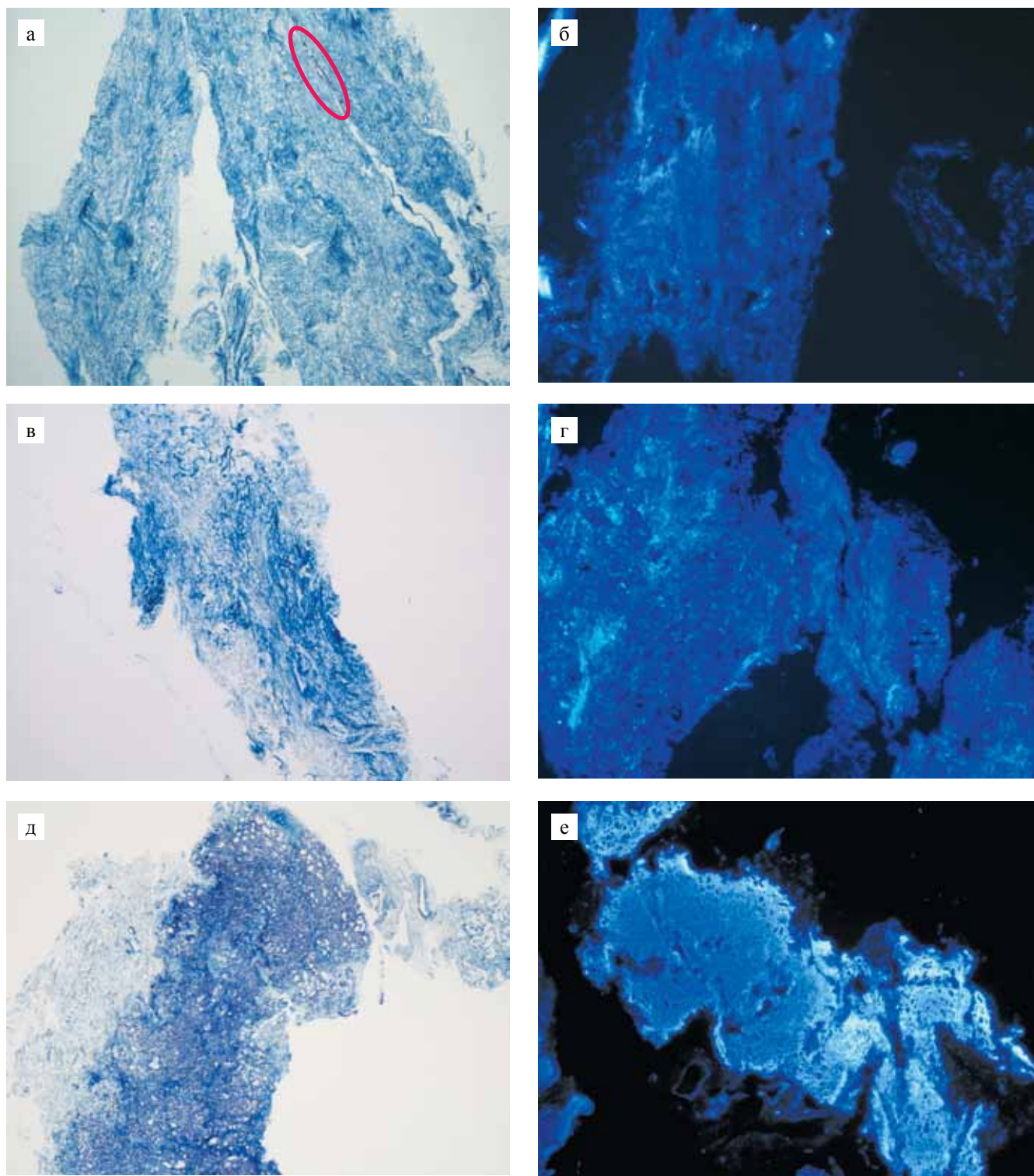


Рис. 3. Гистологическая картина децеллюляризованной поджелудочной железы (ДПЖ): а, б – ДПЖ с липоматозом после 2 циклов замораживания–оттаивания, красным овалом отмечен участок с микрофрагментами клеточного детрита; в, г – ДПЖ с липоматозом после 3 циклов замораживания–оттаивания; д, е – ДПЖ с фиброзом после 3 циклов замораживания–оттаивания; а, в, д – метод Массона; б, г, е – окрашивание ядер DAPI.  $\times 100$

Fig. 3. The histological presentation of decellularized pancreas (DP): а, б – DP with lipomatosis after 2 cycles of freezing and thawing, the red oval marks the area with microfragments of cellular detritus; в, г – DP with lipomatosis after 3 cycles of freezing and thawing; д, е – DP with fibrosis after 3 cycles of freezing and thawing; а, в, д – Masson's method; б, г, е – nuclear DAPI staining.  $\times 100$

туры панкреатической ткани: ацинусы, островки, их фрагменты не были обнаружены. В образцах определяли лишь разбросанные в толще одиночные сохранившиеся клетки или отдельные пикнотичные ядра. Строма при этом обильно маскировалась мелкими зернами клеточного детрита (рис. 2, в, г). Было принято решение использовать полученные таким способом образцы для дальнейшей обработки поверхностно-активными агентами с целью получения очищенного ВКМ ПЖ. В результате проведенной децеллюляризации соединительно-тканый каркас удалось извлечь от основной массы детрита и получить образцы, характеризующиеся тонковолокнистой ажурной структурой, где, однако, локально выявляли минимальное включение зерен клеточного детрита (рис. 3, а, б).

В образцах фрагментов ПЖ с липоматозом после трех последовательных циклов замораживания–оттаивания в отличие от ранее исследованных образцов сохранившиеся клетки, клеточные ядра, продукты кариорексиса не обнаруживали. При этом строма маскировалась мелкодисперсными фрагментами детрита (рис. 2, д, е).

В ходе последующей децеллюляризации ткани с липоматозом после трех циклов замораживания–оттаивания наблюдали практически полное удаление зерен детрита (рис. 3, г), и как результат, получение очищенного тонковолокнистого матрикса, в котором при окрашивании по методу Массона отчетливо выявляли синие коллагеновые волокна (рис. 3, в). Проведенное иммуногистохимическое окрашивание также подтвердило наличие в составе ВКМ коллагена I типа, являющегося важнейшей составляющей

матрикса панкреатической ткани (рис. 3, а). При окрашивании орсеином выявляли красно-коричневые эластические волокна (рис. 3, б). Данные результаты свидетельствуют о сохранности основных фибриллярных белков матрикса панкреатической ткани.

### Гистологический анализ ткани с фиброзом на разных этапах децеллюляризации фрагментов ПЖ

Уже на первых этапах обработки поджелудочной железы с фиброзом было выявлено значительное различие в гистологической картине от ПЖ с липоматозом – даже после трех циклов замораживания–оттаивания во фрагментах ткани сохранялось значительное количество клеток с пикнотичными ядрами (рис. 2, ж, з).

Тем не менее была проведена дальнейшая обработка поверхностно-активными агентами таких образцов, чтобы подтвердить предположение о непригодности разработанного протокола децеллюляризации для поджелудочной железы с диффузным фиброзом. Действительно, в полученных образцах присутствуют участки с большим количеством сохранившихся клеток и ядер (рис. 3, д, е), в то время как при аналогичной обработке поджелудочной железы с липоматозом удается получить хорошо очищенный тонковолокнистый матрикс.

### Определение общего количества ДНК в матриксе ДПЖ

Количественный анализ показал, что при децеллюляризации поджелудочной железы с диффузным

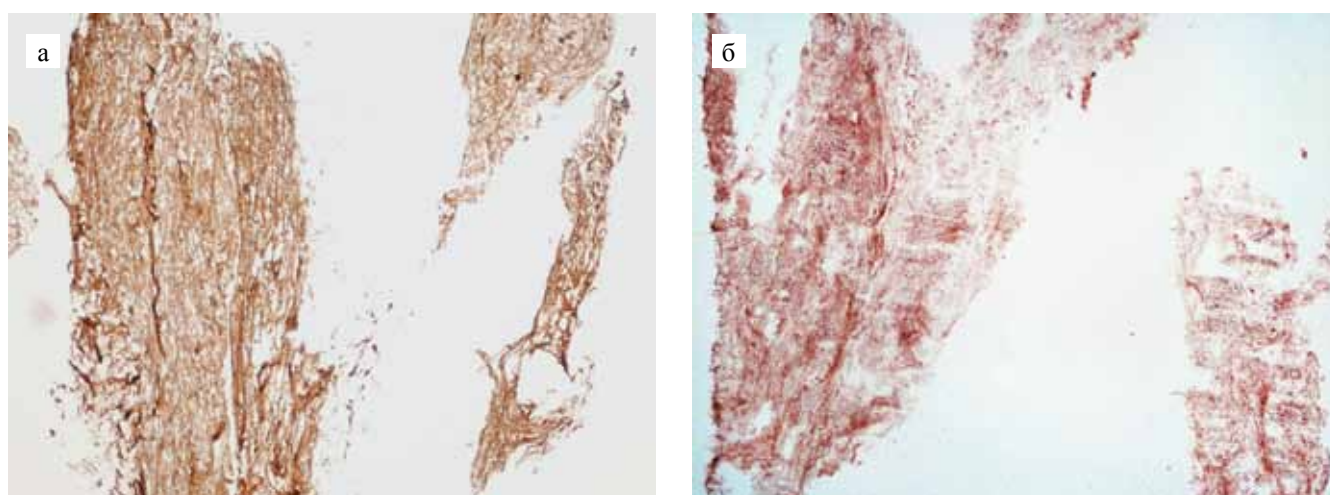


Рис. 4. Гистологическая картина децеллюляризованной поджелудочной железы с липоматозом: а – иммуногистохимическое окрашивание демонстрирует наличие в составе матрикса коллагена I типа; б – окрашивание по методу Унны–Тенцера выявляет наличие эластических волокон в матриксе.  $\times 100$

Fig. 4. The histological presentation of decellularized pancreas with lipomatosis: а – immunohistochemical staining demonstrates the presence of type I collagen in the matrix; б – Unna–Tenzer staining reveals the presence of elastic fibers in the matrix.  $\times 100$



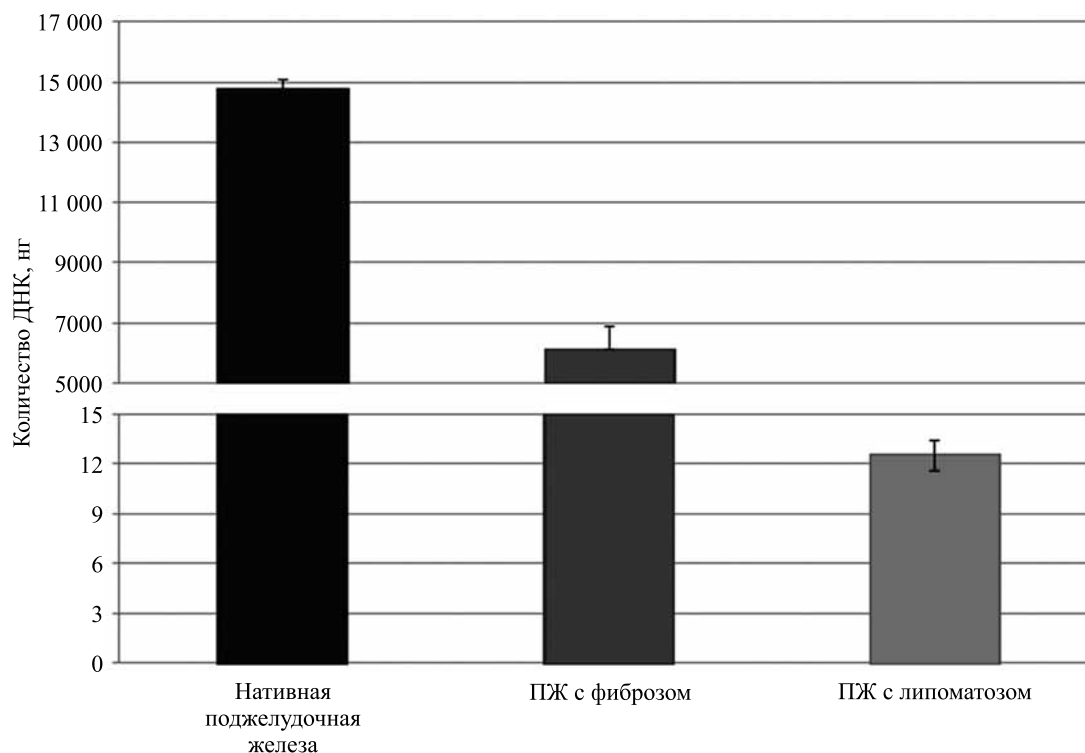


Рис. 5. Сравнительный анализ количественного содержания ДНК в нативной ткани, в поджелудочной железе с фиброзом и с липоматозом после децеллюляризации

Fig. 5. Quantification of DNA content in native tissue, in the pancreas with fibrosis and with lipomatosis after decellularization

фиброзом, согласно разработанному протоколу, в ткани сохранялось  $6128,3 \pm 718,0$  нг ДНК/мг ткани (41,5% ДНК). При этом после децеллюляризации поджелудочной железы с липоматозом нам удалось очистить ткань от ДНК в значительной степени ( $p < 0,05$ ): содержание ДНК снизилось с  $14782,2 \pm 319,9$  до  $12,6 \pm 0,9$  нг/мг ткани (рис. 5), что составляет 0,1% ДНК и свидетельствует о высокой эффективности разработанного протокола децеллюляризации и низкой иммуногенности полученного матрикса соответственно.

Исходя из полученных результатов, для дальнейших исследований использовали матриксы ДПЖч, полученные по предложенному протоколу децеллюляризации только для фрагментов ПЖ с выявленными признаками липоматоза.

### Цитотоксичность матрикса ДПЖч

Анализ результатов проводили согласно оценочной шкале степени ответной реакции клеток после инкубации с образцами матриксов в соответствии с ГОСТ ISO 10993-5-2011 (табл. 1). Отрицательный

Таблица 1

Степень ответной реакции клеток  
Stages of cell response

Степень реакции	Реакция	Наблюдения	
0	Отсутствует	Единичные интрацитоплазматические гранулы Пролиферирующих клеток более 90%	Нет лизиса
1	Незначительная	Не более 20% клеток круглые, слабо прикрепленные, без интрацитоплазматических гранул Пролиферирующих клеток более 80%, но менее 90%	Лизис не более 20%
2	Нерезкая	Не более 50% клеток круглые, не имеющие интрацитоплазматических гранул Пролиферирующих клеток более 50%, но менее 80%	Лизис не более 50%
3	Умеренная	Не более 70% монослой содержат круглые клетки Пролиферирующих клеток более 30%, но менее 50%	Лизис не более 70%
4	Резкая	Практически полностью разрушенный монослой Пролиферирующих клеток менее 30%	Лизис более 70%

контроль должен соответствовать степени реакции 0, положительный контроль – 3 или 4. Степень ответной реакции исследуемого образца не должна превышать 2.

В табл. 2 представлены значения, характеризующие жизнеспособность фибробластов L929 отно-

сительно отрицательного контроля – культуральной среды, содержащей 10% ЭТС. После контакта с образцами жизнеспособность фибробластов остается выше 90%, что соответствует степени реакции 0 и говорит об отсутствии цитотоксического действия образцов исследуемых матриц. Положительный

Таблица 2

**Процент жизнеспособных фибробластов линии L929 относительно отрицательного контроля**

**The percentage of viable fibroblasts of L929 line relative to the negative control**

№ образца	Наименование образца	% жизнеспособных клеток относительно отрицательного контроля $\pm$ сигма	Степень ответной реакции клеток
1	ДПЖч донор 1	$97,3 \pm 8,9$	0
2	ДПЖч донор 2	$90,5 \pm 3,9$	0
3	Положительный контроль	$7,8 \pm 2,3$	4

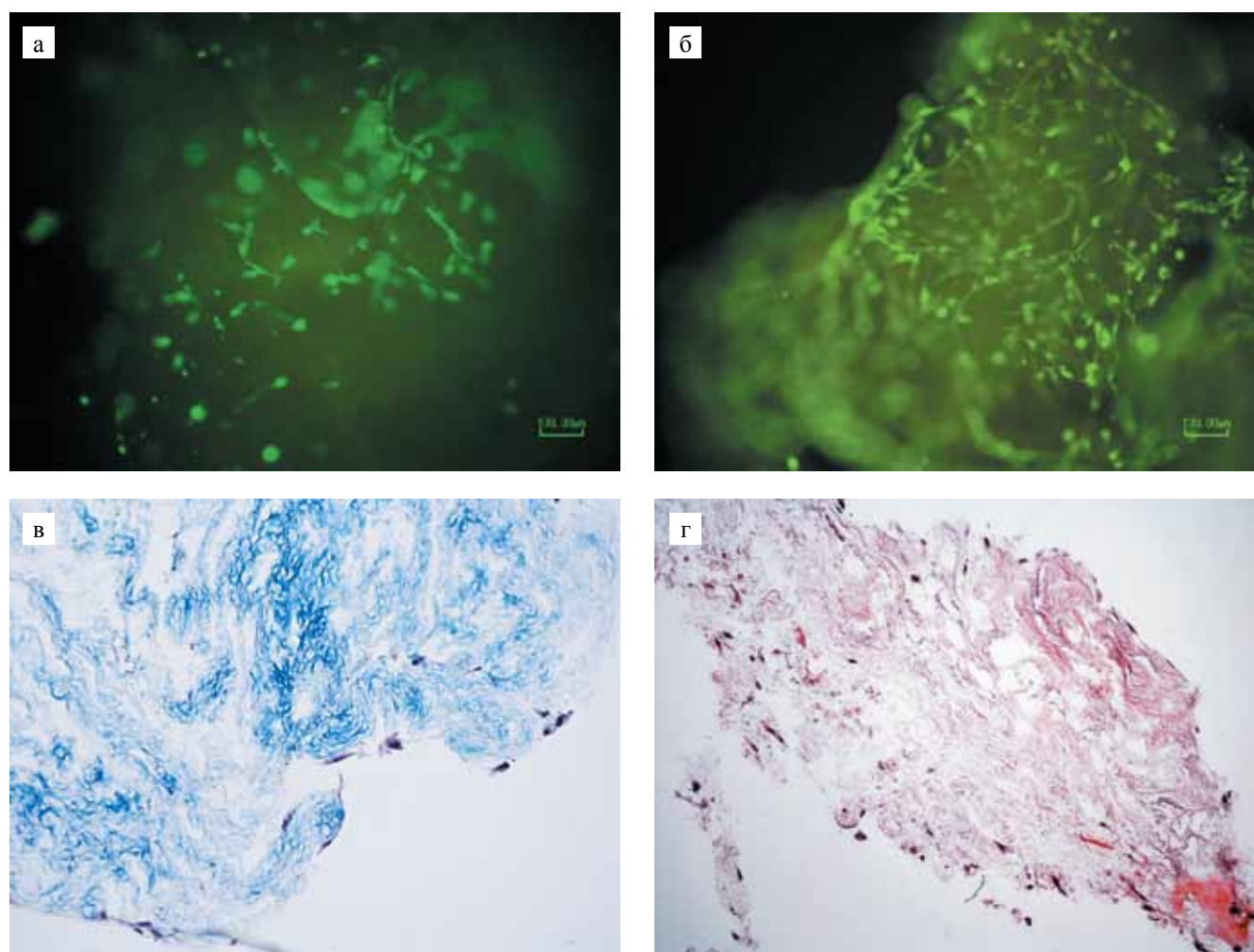


Рис. 6. Культивирование МСК ЖТч на тканеспецифическом каркасе поджелудочной железы: а – прижизненное окрашивание витальным красителем LIVE/DEAD® МСК ЖТч после 1 суток культивирования, б – прижизненное окрашивание клеток LIVE/DEAD® после 6 суток культивирования; в – МСК ЖТч после 15 суток культивирования на матриксе из ДПЖ, по методу Массона.  $\times 200$ ; г – МСК ЖТч после 15 суток культивирования на матриксе из ДПЖ, гематоксилин и эозин.  $\times 100$

Fig. 6. Culturing of hADMSCs on tissue-specific pancreas scaffold: а – intravital staining of hADMSCs with LIVE/DEAD® vital stain after 1 day of culturing, б – intravital staining of cells with LIVE/DEAD® after 6 days of culturing; в – hADMSCs after 15 days of culturing on DP-matrix, the Masson method.  $\times 200$ ; г – hADMSCs after 15 days of culturing on DP-matrix, hematoxylin and eosin.  $\times 100$



контроль показал резкую цитотоксичность, степень реакции 4.

## Функциональные свойства матрикса ДПЖч

Уже на первые сутки культивирования (рис. 6, а) МСК ЖТч на матриксах из ДПЖч наблюдали адгезию и распластывание клеток. К 6-м суткам количество МСК ЖТч увеличивалось, отсутствовали нежизнеспособные клетки, ядра которых окрашиваются в красный цвет (рис. 6, б).

Анализ гистологических препаратов образцов показал, что через 15 суток культивирования происходило интенсивное заселение матрикса МСК ЖТч. Клетки распластанные, имеют характерную для данного типа клеток фибробластоподобную форму, располагаются не только на поверхности, но и активно проникают в глубокие слои матрикса (рис. 6, в, г).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, определен критерий отбора исходного материала для эффективной децеллюляризации ПЖ человека. Выявлено преимущество использования ПЖ с липоматозом по сравнению с фиброзированной ПЖ. Предложенный протокол децеллюляризации фрагментов донорской поджелудочной железы с липоматозом является эффективным и позволяет получить тканеспецифический матрикс/каркас, свободный от клеток и клеточных фрагментов, с низким содержанием ДНК и сохранением морфофункциональных свойств ВКМ ПЖ. Полученный матрикс не проявляет признаков цитотоксичности, поддерживает адгезию и пролиферацию МСК ЖТч и может быть в дальнейшем использован для рецеллюляризации островковыми клетками (инсулоцитами, эндокринными клетками островков Лангерганса) при создании биоинженерной конструкции ПЖ.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сургученко ВА. Матрикс для тканевой инженерии и гибридных органов. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. Часть II, глава 1: 199–226. *Surguchenko VA. Matrkisy dlya tkanevoj inzhenerii i gibridnyh organov. Biosovmestimye materialy (uchebnoe posobie)*. Pod red. V.I. Sevast'yanova i M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011. Chast' II, glava 1: 199–226.
2. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 April; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
3. Sackett SD, Tremmel DM, Ma F, Feeney AK, Maguire RM, Brown ME et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Scientific Reports*. 2018; 8: 10452. doi: 10.1038/s41598-018-28857-1.
4. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular Matrix in Pancreatic Islets: Relevance to Scaffold Design and Transplantation. *Cell Transplant*. 2009; 18 (1): 1–12. doi: 10.3727/096368909788237195.
5. Riopel M, Wang K. Collagen matrix support of pancreatic islet survival and function. *Frontiers in Bioscience*. 2014 Jan; 19: 77–90. doi: 10.2741/4196.
6. Salvatori M, Katari R, Patel T, Peloso A, Mugweru J, Owusu K, Orlando G. Extracellular Matrix Scaffold Technology for Bioartificial Pancreas Engineering: State of the Art and Future Challenges. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2014; 8 (1): 159–169. doi: 10.1177/1932296813519558.
7. Wu D, Wan J, Huang Y, Guo Y, Xu T, Zhu M et al. 3D Culture of MIN-6 Cells on Decellularized Pancreatic Scaffold: *in vitro* and *in vivo* Study. *BioMed Research International*. 2015 Nov: 1–8. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/432645>.
8. Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello J, Halfter W, Uechi G et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (28): 6760–6772. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.066.
9. Napierala H, Hillebrandt K-H, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J et al. Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Scientific Reports*. 2017; 7: 41777. doi: 10.1038/srep41777.
10. Mirmalek-Sani S-H, Orlando G, McQuilling J, Pareta R, Mack D, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.
11. Peloso A, Urbani L, Cravedi P, Katari R, Maghsoudlou P, Fallas MEA et al. The human pancreas as a source of pro-tolerogenic extracellular matrix scaffold for a new generation bio-artificial endocrine pancreas. *Ann Surg*. 2016; 264 (1): 169–179. doi: 10.1097/SLA.0000000000001364.
12. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011. 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
13. Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*». Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*».

*Статья поступила в редакцию 3.02.2020 г.  
The article was submitted to the journal on 3.02.2020*