

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-3-123-133

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО МАТРИКСА ДЛЯ БИОИСКУССТВЕННОЙ ПЕЧЕНИ

А.М. Григорьев¹, Ю.Б. Басок¹, А.Д. Кириллова¹, Л.А. Кирсанова¹, Н.П. Шмерко¹,
А.М. Суббот², Е.А. Немец¹, И.А. Милосердов^{1, 3}, М.Ю. Шагидулин^{1, 3}, В.И. Севастьянов¹

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

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней», Москва, Российская Федерация

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Дефицит донорских органов для трансплантации печени при лечении терминальных стадий печеночной недостаточности диктует необходимость разработки альтернативных методов, к которым относятся технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины. **Целью работы** было исследование способности тканеспецифического матрикса из децеллюляризованных фрагментов печени человека (ДФПч) поддерживать адгезию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) и НерG2 в статических условиях и в проточном биореакторе. **Материалы и методы.** Для децеллюляризации фрагментов (не более 8 мм³) печени человека использовали обработку поверхностно-активными веществами (ПАВ) – додецилсульфатом натрия, Тритоном X-100 с последующей экспозицией в ДНКазе. Биохимические исследования включали определение количества ДНК в исследуемых образцах. Эффективность отмывки от ПАВ оценивали по цитотоксичности матрикса на культуре фибробластов NIH 3T3. Оценку жизнеспособности и метаболической активности клеток проводили методом прижизненного окрашивания комплексом флуоресцентных красителей LIVE/DEAD® и PrestoBlue™ (Invitrogen, США). Морфологическое исследование клеточно-инженерных конструкций печени проводили с использованием методов гистологического окрашивания и сканирующей электронной микроскопии с лантаноидным контрастированием. **Результаты.** Показано, что использованная методика децеллюляризации печени позволяет получать биосовместимый матрикс с остаточным количеством ДНК менее 1%, способный поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч и НерG2. В биореакторе на 7-е сутки культивирования наблюдали образование единого конгломерата матрикса ДФПч с многочисленными группами жизнеспособных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Содержание мочевины в культуральной среде превышает значение для образцов, полученных в статических условиях, и составляет $1,5 \pm 0,1$ ммоль/л, что свидетельствует о метаболической активности НерG2 в составе полученных культуральных систем. Показано, что постоянный поток культуральной среды перфузионного биореактора способствовал росту пролиферативной активности НерG2 и позволил обеспечить более равномерную колонизацию клетками матрикса по сравнению со статическими условиями культивирования. **Заключение.** Найдены условия равномерного заселения ДФПч в проточном биореакторе клеточными культурами. Способность матрикса поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч и НерG2 в течение 11 суток свидетельствует о возможности его использования в тканевой инженерии печени.

Ключевые слова: печень, децеллюляризация, мезенхимальные стромальные клетки, НерG2, клеточно-инженерная конструкция, тканевая инженерия, биореактор.

Для корреспонденции: Григорьев Алексей Михайлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 193-86-62. E-mail: Bear-38@yandex.ru

Corresponding author: Alexey Grigoriev. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (499) 193-86-62. E-mail: Bear-38@yandex.ru

EXPERIMENTAL APPROACHES TO CREATING A TISSUE-SPECIFIC MATRIX FOR A BIOARTIFICIAL LIVER

A.M. Grigoriev¹, Yu.B. Basok¹, A.D. Kirillova¹, L.A. Kirsanova¹, N.P. Shmerko¹,
A.M. Subbot², E.A. Nemets¹, I.A. Miloserdov^{1, 3}, M.Yu. Shagidulin^{1, 3}, V.I. Sevastyanov¹

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

³ Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Shortage of donor organs for liver transplantation in the treatment of end-stage liver disease dictates the need to develop alternative methods that include technologies on tissue engineering and regenerative medicine. **Objective:** to study the ability of a tissue-specific matrix from decellularized human liver fragments (DHLF) to maintain adhesion and proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAT-MSCs) and HepG2 under static conditions and in a flow-through bioreactor. **Materials and methods.** Treatment with surfactants (SAS) – sodium dodecyl sulfate, Triton X-100 – followed by exposure to DNase was used for decellularization of human liver fragments (no more than 8 mm³). Biochemical screening included the determination of DNA quantity in the test samples. Efficiency of surfactant washing was assessed by the cytotoxicity of the matrix in the NIH 3T3 fibroblast culture. Viability and metabolic activity of cells were assessed via vital staining with a complex of fluorescent dyes LIVE/DEAD[®] and PrestoBlue[™] (Invitrogen, USA). Morphological examination of the liver cell-engineered constructs was carried out through histological staining and scanning electron microscopy with lanthanide contrast. **Results.** It was shown that the liver decellularization method used allows to obtain a biocompatible matrix with a residual DNA quantity <1%, which is capable of maintaining adhesion and proliferation of hAT-MSCs and HepG2. On day 7 of cultivation in the bioreactor, there was formation of a single conglomerate of the DHLF matrix with numerous groups of viable cells with a high nuclear-cytoplasmic ratio. The urea content in the culture medium is 1.5 ± 0.1 mmol/L, exceeding that of samples obtained under static conditions. This indicates the metabolic activity of HepG2 in the composition of the obtained culture systems. It was shown that constant flow of the culture medium in the perfusion bioreactor increased the proliferative activity of HepG2 and allowed to provide a more uniform colonization by matrix cells in comparison with static cultivation conditions. **Conclusion.** The conditions for uniform colonization of DHLFs in a flow-through bioreactor with cell cultures were established. The ability of the matrix to maintain adhesion and proliferation of hADSCs and HepG2 for 11 days indicates that it could be used in liver tissue engineering.

Keywords: liver, decellularization, mesenchymal stem cells, HepG2, cell-engineered construct, tissue engineering, bioreactor.

ВВЕДЕНИЕ

Дефицит донорских органов для трансплантации печени при лечении терминальных стадий печеночной недостаточности диктует необходимость разработки альтернативных методов, к которым относятся технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины [1, 2].

Децеллюляризация тканей представляет собой перспективный метод создания матриксов для регенеративной медицины благодаря удалению иммунных факторов (ДНК, галактоза- α -1,3-галактоза) и сохранению в значительной степени специфичной для органов и тканей морфологии и естественного внеклеточного матрикса (ВКМ), включающего необходимые сайты для адгезии, миграции и пролиферации клеток [3, 4].

Значительные успехи в настоящее время достигнуты при децеллюляризации целой печени путем перфузии растворами поверхностно-активных веществ (ПАВ) [5, 6]. Привлекательность подобного

способа децеллюляризации заключается в потенциальной возможности получения целых органов при заселении клетками с использованием перфузии и трансплантации полученных тканеинженерных конструкций *in vivo* путем создания анастомозов с сохраненными сосудистыми структурами [7, 8]. Однако децеллюляризация целой печени имеет ряд недостатков: низкая эффективность удаления клеток и их фрагментов и рецеллюляризации из-за нарушений микроциркуляции и сложность транспорта достаточных количеств кислорода и питательных веществ к клеткам в толще органа. В связи с этим наиболее рациональным подходом выглядит децеллюляризация не целого органа, а его фрагментов. Ранее нами был разработан способ децеллюляризации фрагментов печени человека, позволивший получить матрикс с полным отсутствием клеточного детрита и сохранной структурой ткани [9]. Отметим, что взаимодействие клеток с полученным тканеспецифическим матриксом изучено не было.

Присущие мезенхимальным стромальным клеткам (МСК) иммуномодулирующие свойства, способность к стимуляции регенерации и возможность дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки указывают на возможность их применения для создания клеточно-инженерных конструкций (КИК) печени для лечения различных заболеваний печени [10]. Из-за сложности экспансии и низкой жизнеспособности первичных гепатоцитов при культивировании *in vitro* для исследования взаимодействия специализированных клеток с фрагментами децеллюляризованной печени целесообразно использовать клеточные линии, способные выполнять характерные для печеночных клеток функции [11]. Заметим, что хотя метаболические функции клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 ограничены по сравнению с первичными гепатоцитами, их использование в качестве модели гепатоцитов *in vitro* обусловлено доступностью HepG2, простотой в обращении, почти неограниченной продолжительностью жизни и стабильностью фенотипа [12].

Известно, что для создания наиболее близких к естественным условиям при культивировании *in vitro* используют биореакторы, позволяющие улучшить питание клеток, транспорт к ним газов и выведение продуктов обмена веществ за счет постоянной циркуляции культуральной среды [13]. Тем не менее культивирование клеток в потоке не лишено недостатков, связанных с механическими повреждениями клеток, большого расхода культуральных сред и сложностью поддержания асептических условий при длительных экспериментах.

Целью работы было исследование способности тканеспецифического матрикса из децеллюляризованных фрагментов печени человека (ДФПч) поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч и HepG2 в статических условиях и проточном биореакторе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали отмытую по традиционной методике от элементов крови раствором Custodiol (Dr. F. Koehler Chemie GmbH, Германия) донорскую человеческую печень, не пригодную для трансплантации по причине выраженного жирового гепатоза (более 40%). Отмытую печень или ее часть помещали в стерильный физиологический раствор, в случае если стеатоз был выявлен до отмытки сосудистого русла, или в консервант Custodiol, в случае если наличие выраженной жировой инфильтрации определяли после удаления из печени элементов крови.

Фрагменты печени (размер не более $2 \times 2 \times 2$ мм) получали с использованием скальпеля и ножниц. Децеллюляризацию фрагментов печени человека проводили в трех сменах фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) (138 мМ NaCl, 2,67 мМ KCl, 1,47 мМ

KH_2PO_4 , 8,1 мМ Na_2HPO_4 , pH = 7,4), содержащего 0,1% додецилсульфата натрия (SDS) и повышающую концентрацию Triton X-100: 1%, 2% и 3% [9]. Общее время децеллюляризации составляло 72 ч – по 24 ч для каждой смены раствора ПАВ при перемешивании на магнитной мешалке.

Затем фрагменты печени человека обрабатывали в растворе ДНКазы I типа (New England Biolabs Inc., США). Образцы матрикса объемом 0,5 мл помещали в 1,0 мл 10 мМ Трис-HCl буферного раствора (pH 7,6), содержащего 2,5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМоль CaCl_2 и 50 Е/мл ДНКазы I и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С.

Отмывка ДФПч от ПАВ включала экспозицию матрикса в PBS, содержащем антибиотик (ампициллин, 20 мкг/мл) и антимикотик (амфотерицин В, 2,0 мкг/мл) в течение 96 ч с последующей стерилизацией образцов γ -облучением (1,5 Мрад).

Остаточное содержание ДНК являлось индикатором сохранившихся в образцах ДФПч клеточных компонентов, несущих основную долю антигенов, обуславливающих реакцию отторжения ксеногенного матрикса. Для выделения ДНК из исходной и децеллюляризованной ткани использовали набор DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Образцы исходной печени человека (n = 3) и ДФПч (n = 3) массой 10 мг лизировали с использованием лизирующего буфера и протеиназы К в течение 16 часов при +56 °С. Для количественного определения ДНК в образцах был выбран флюоресцентный краситель $\text{TM}^{\text{P}}\text{Picogreen Quant-iT}$ (Invitrogen, США).

Источником МСК ЖТч была подкожная жировая клетчатка здорового донора, взятого у него при информированном добровольном согласии. Образец подкожной жировой ткани измельчали скальпелем, подвергали двукратной промывке холодным (+4...+6 °С) раствором Хенкса, а затем инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °С в течение 20 мин. После чего полученную суспензию последовательно пропускали через клеточные сита диаметром пор 100 и 70 мкм.

Все клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в полной ростовой среде (ПРС) состава DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мМ L-глутамин (Gibco, США) и культивировали до формирования монослоя, меняя среду 2 раза в неделю. Перевод клеток в суспензию осуществляли путем обработки раствором Версена при 37 °С в течение 1 мин с последующим добавлением диссоциирующего агента TrypLeTM (Invitrogen, США). Для экспериментов брали клетки 3-го пассажа.

Культура клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 была получена из лаборатор-

ной коллекции клеточных культур отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова».

Цитотоксичность образцов матрикса исследовали в соответствии с ГОСТ ISO 10993-5-2011 [14] методом прямого контакта образцов с культурой фибробластов мыши линии NIH 3T3, полученных из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных ГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Иванова РАМН» (ГУ НИИВ РАМН).

Фибробласты мыши высевали в культуральные плоскостонные 6-луночные планшеты и инкубировали в течение суток при температуре 37 °С в стандартных условиях во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1)% CO₂. На поверхность образовавшегося (80 ± 10)% монослоя клеток помещали исследуемые образцы. Через сутки инкубации визуально оценивали морфологию и лизис клеток по стандартной методике с использованием биологического микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония). Отрицательным контролем была ПРС, содержащая эмбриональную телячью сыворотку, положительным контролем – стандартный раствор цинка в азотной кислоте (9,95 мг Zn в 1–2 вес.% HNO₃, разведение 1:200 раствором 0,9% NaCl для инъекций).

HerG2 и МСК ЖТч культивировали по стандартной методике до состояния конfluence монослоя 70–80%, после чего смывали с пластика с использованием раствора Версена и реактива TrypLe™ (Invitrogen, США) и готовили рабочую суспензию клеток в ПРС с концентрацией 1 × 10⁵ кл/мл. Подсчет клеток и оценку их жизнеспособности проводили на счетчике клеток TS20 (BioRad, США) согласно методике производителя.

Пеллеты матрикса (30 мг) размораживали и помещали в ПРС на сутки при комнатной температуре. Перед нанесением клеток ДФПч дополнительно дважды промывали свежей ПРС. Для заселения матрикса в каждую пробирку с ДФПч добавляли аликвоту клеточной суспензии. Пробирки помещали в штатив и встряхивали на лабораторном шейкере MultiBio 3D (Biosan, Латвия) в режиме реципрокного вращения платформы при 80 об/мин в течение 2 часов для равномерного распределения клеток по поверхности матрикса. Далее пробирки помещали в инкубатор и культивировали в стандартных условиях.

Оценку жизнеспособности и адгезии клеток проводили методом прижизненного окрашивания комплексом флуоресцентных красителей LIVE/DEAD® (Invitrogen, США). Данный комплекс включает в себя два компонента: calcein AM дает зеленую флуоресценцию живых клеток, регистрируемую при длине волны 515 нм, ethidium homodimer-1, проникая через поврежденную мембрану клеток и связываясь с ДНК, дает красную флуоресценцию при 635 нм. Микро-

скопию проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon Ti (Nikon, Япония).

Определение метаболической активности клеток проводили с помощью теста с реактивом PrestoBlue™ (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Спектрофотометрический анализ выполняли на планшетном ридере Tecan Spark10 (Tecan, Австрия). При исследовании метаболической активности на каждую пеллету ДФПч наносили 5 × 10⁴ клеток HerG2 или 2 × 10⁴ МСК ЖТч. Данные измерения поглощения использовали для расчета коэффициента метаболической активности (K) по формуле:

$$K = \frac{117,216 \times Abs_{570} - 80,586 \times Abs_{600}}{155,677 \times Abs_{600} - 14,652 \times Abs_{570}} \times 100\%,$$

где Abs₅₇₀ – поглощение при длине волны 570 нм; Abs₆₀₀ – поглощение при длине волны 600 нм.

При создании КИК на 1 пеллету ДФПч наносили 1 × 10⁵ клеток HerG2 или 1 × 10⁵ МСК ЖТч. Для проведения экспериментов по культивированию HerG2 на ДФПч в условиях потока использовали модифицированный вариант перфузионного биореактора [13]. Скорость потока составляла 0,02 мл/мин. На 7-е сутки культуральную камеру с КИК извлекали из биореактора.

Были исследованы следующие типы образцов: фрагмент нативной печени человека, фрагмент децеллюляризованной печени человека, КИК – МСК ЖТч, культивированные на децеллюляризованном фрагменте печени.

Морфологию поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов изучали совместно с сотрудниками лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ «НИИ глазных болезней» методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием лантаноидного контрастирования.

Пробоподготовка водосодержащих образцов для СЭМ с напылением токопроводящего слоя требует их обезвоживания, что приводит не только к структурным изменениям таких объектов, но и плохой визуализации клеточных элементов. Метод лантаноидного контрастирования позволяет наблюдать нефиксированные биологические образцы в режиме низкого вакуума после выдержки их в насыщенном растворе редкоземельного металла. При этом сохраняется максимально нативное состояние исследуемого объекта, а изображение, полученное в режиме детекции обратного рассеянных электронов, несет расширенную информацию о клеточных структурах [15].

Протокол обработки включал первичную промывку, выдержку 45 мин в контрастирующем растворе BioREE (ООО «Глаукон», Россия) и финальную промывку дистиллированной водой. После контрастирования с поверхности образца удаляли избыток влаги воздушной кистью и размещали его на предметном

столике микроскопа EVO LS10 (Zeiss, Германия). Наблюдения проводились в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па), при ускоряющем напряжении 20 кВ.

Для морфогистологических исследований исходные и децеллюляризованные образцы готовили по стандартной методике, окрашивали гематоксилином и эозином и по методу Массона. Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon eclipse (Nikon, Япония), оснащенный цифровой фотокамерой.

Концентрацию глюкозы и мочевины определяли на биохимическом анализаторе KonelabPrime 60i (Thermo Fisher Scientific, Финляндия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что децеллюляризация фрагментов печени человека с использованием ПАВ позволяет удалить клеточный детрит и сохранить структуру ткани [9]. Однако при определении количества ДНК в ДФПч было обнаружено, что процесс химической децеллюляризации привел к удалению лишь $69,5 \pm 3,6\%$ ДНК (рис. 1). Заметим, что при децеллюляризации печени рекомендуется сохранять не более 10% от количества ДНК в исходной ткани [16]. В связи с этим в протокол децеллюляризации после обработки ПАВ был введен дополнительный этап, включающий экспозицию ДФПч в растворе ДНКазы I. Как видно из рис. 6, обработка ДНКазой позволила снизить остаточное количество ДНК в децеллюляризованном образце до $3,6 \pm 0,6$ нг/мг ткани (менее 1%), что свидетельствует о хорошей децеллюляризации, и соответственно, низкой иммуногенности полученного матрикса [17].

Исследование цитотоксичности методом прямого контакта на фибробластах мыши линии NIH/3T3 не обнаружило проявлений цитотоксического эффекта печеночного матрикса на протяжении времени исследования 24 ч. Динамика роста клеток практически не отличалась в опытном и контрольном вариантах. Не наблюдали зон лизиса клеток под образцом либо в зоне контакта образца с клетками. Тест на жизнеспособность с трипановым синим, проведенный через 24 часа контакта клеток с образцами, также не выявил наличия цитотоксического эффекта. На основании полученных данных был сделан вывод об эффективности протокола отмычки матрикса от ПАВ и отсутствии цитотоксичности ДФПч.

Отсутствие цитотоксичности матрикса позволило перейти к исследованию жизнеспособности и пролиферативной активности МСК ЖТч на поверхности ДФПч. Методом прижизненной флюоресцентной микроскопии было показано, что хотя некоторая часть клеток находится в суспензионном состоянии

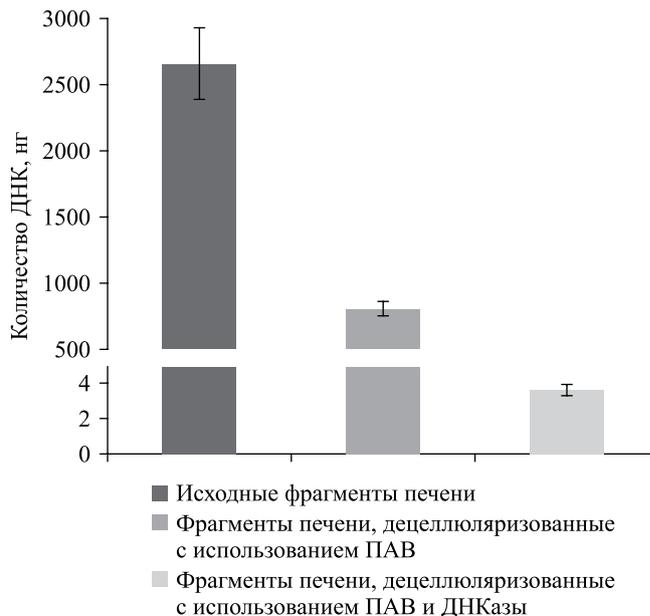


Рис. 1. Количество ДНК в исходных и децеллюляризованных фрагментах печени человека

Fig. 1. The amount of DNA in the original and decellularized fragments of the human liver

в культуральной среде, большая часть клеток успешно прикрепляется к поверхности матрикса и пролиферирует уже на 3-и сутки эксперимента (рис. 2, а). В начале эксперимента клетки распределяются по поверхности матрикса неравномерно – в первую очередь происходит активная колонизация краевых зон ДФПч. Затем клетки мигрируют в объем матрикса, формируя клеточную сеть, а потом и сплошные участки плотных клеточных слоев (рис. 2, б).

На рис. 3 представлены результаты СЭМ исследования нативной и децеллюляризованной печени человека, а также КИК, включающей МСК ЖТч, культивированные на децеллюляризованных фрагментах печени человека в течение 7 суток.

Как иллюстрируют микрофотографии (рис. 3, а, б), нативная ткань значительно отличалась по структуре поверхности от децеллюляризованной. Исходная ткань имела сплошную рельефную поверхность. После удаления клеток матрикс приобрел пористую структуру. Границы пор представляли собой переплетение многочисленных микро- и нановолокон. Размер пор был гетерогенен: присутствовали как мелкие поры размером около 1–2 мкм, так и крупные поры размером до 20 мкм. Светлые образования, определяющиеся на поверхности децеллюляризованной ткани и КИК, скорее всего, представляют собой связанные с матриксом фосфоросодержащие компоненты культуральной среды, адсорбированные на его поверхности. МСК ЖТч, прикрепившиеся к поверхности носителя, имели распластанную форму, что свидетельствует о биосовместимости ДФПч

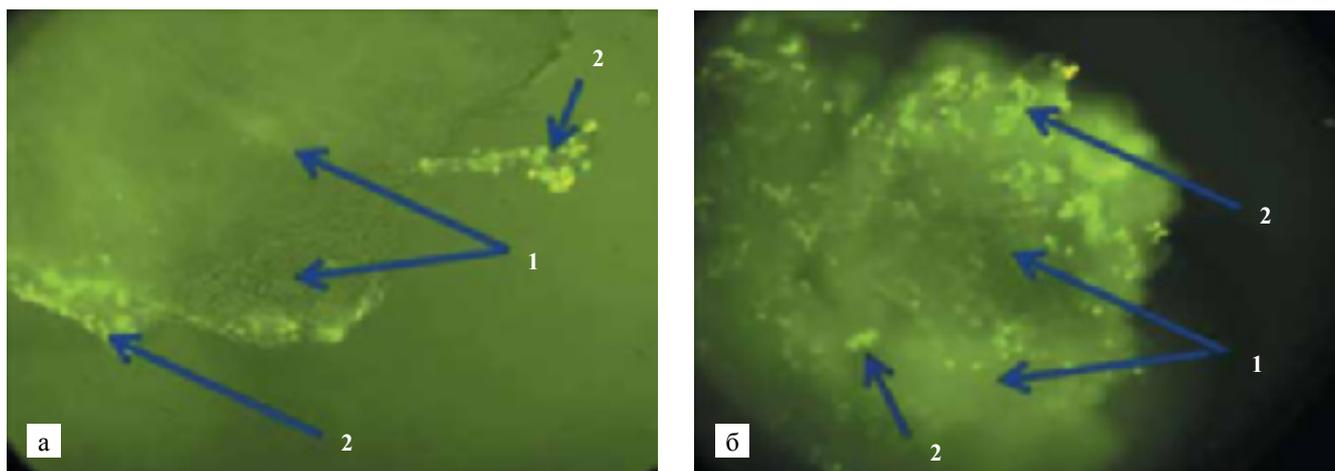


Рис. 2. Жизнеспособность МСК ЖТч на поверхности ДФПч: а – 3-и сутки культивирования; б – 7-е сутки культивирования; 1 – поверхность ДФПч; 2 – МСК ЖТч. Окрашивание флюоресцентными красителями Live/Dead. ×40

Fig. 2. Viability of MSC HAT on the surface of the: а – 3 days of cultivation; б – 7 days of cultivation; 1 – the surface of the DPPL; 2 – the MSC HAT. Coloring with Live/Dead fluorescent dyes. ×40

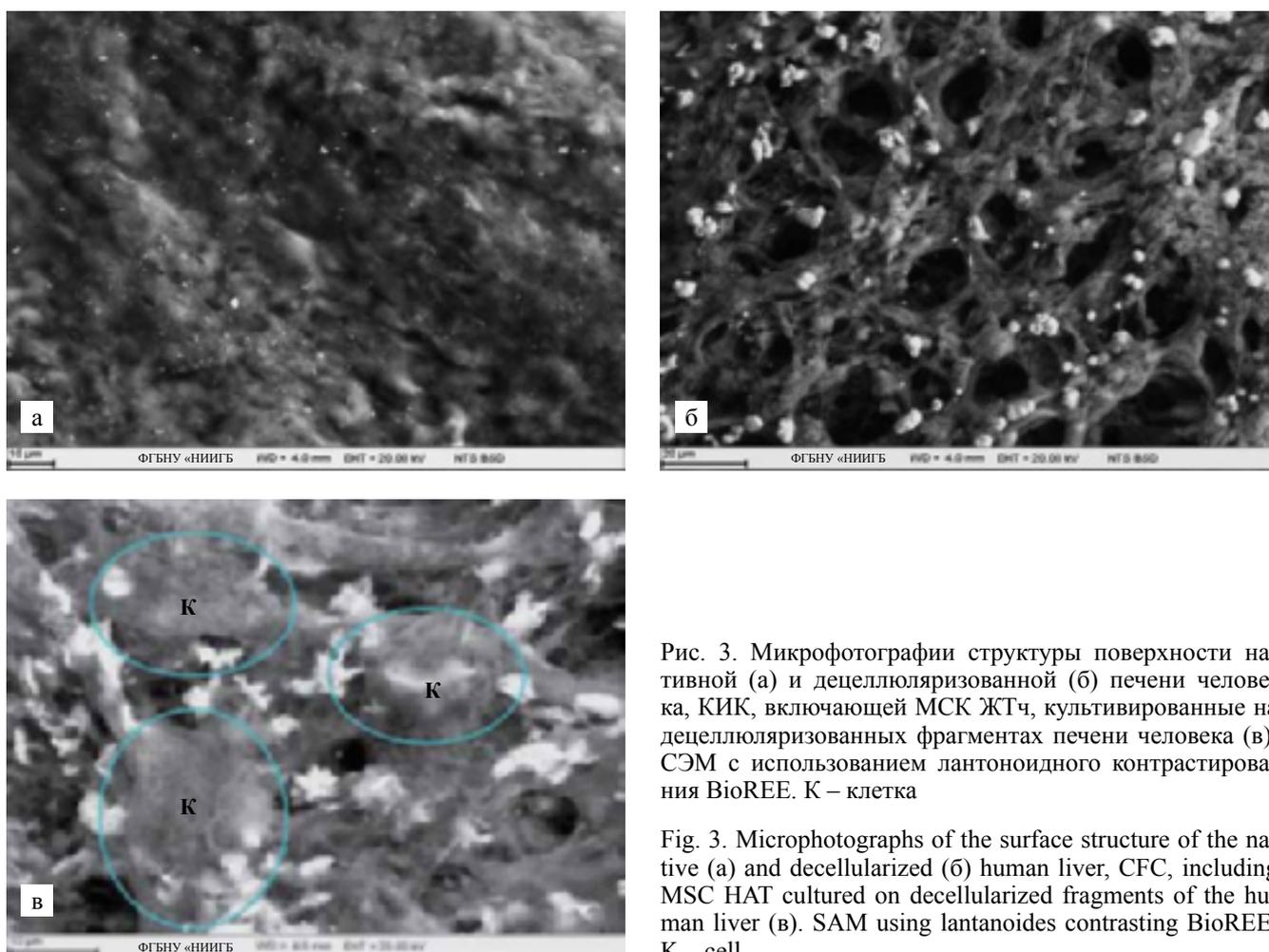


Рис. 3. Микрофотографии структуры поверхности нативной (а) и децеллюляризованной (б) печени человека, КИК, включающей МСК ЖТч, культивированные на децеллюляризованных фрагментах печени человека (в). СЭМ с использованием лантоноидного контрастирования BioREE. К – клетка

Fig. 3. Microphotographs of the surface structure of the native (a) and decellularized (б) human liver, CFC, including MSC HAT cultured on decellularized fragments of the human liver (в). SEM using lanthanoides contrasting BioREE. К – cell

матрикса относительно взаимодействия с клетками (рис. 3, в).

Полученные данные СЭМ были подтверждены гистологическим анализом. Как видно из рис. 4, морфология клеток распластанная фибробластоподоб-

ная, что характерно для МСК ЖТч в фазе активной пролиферации.

При этом рост фибробластоподобных клеток наблюдали на периферии всех частиц матрикса. Отметим, что одиночные клетки проникали вглубь

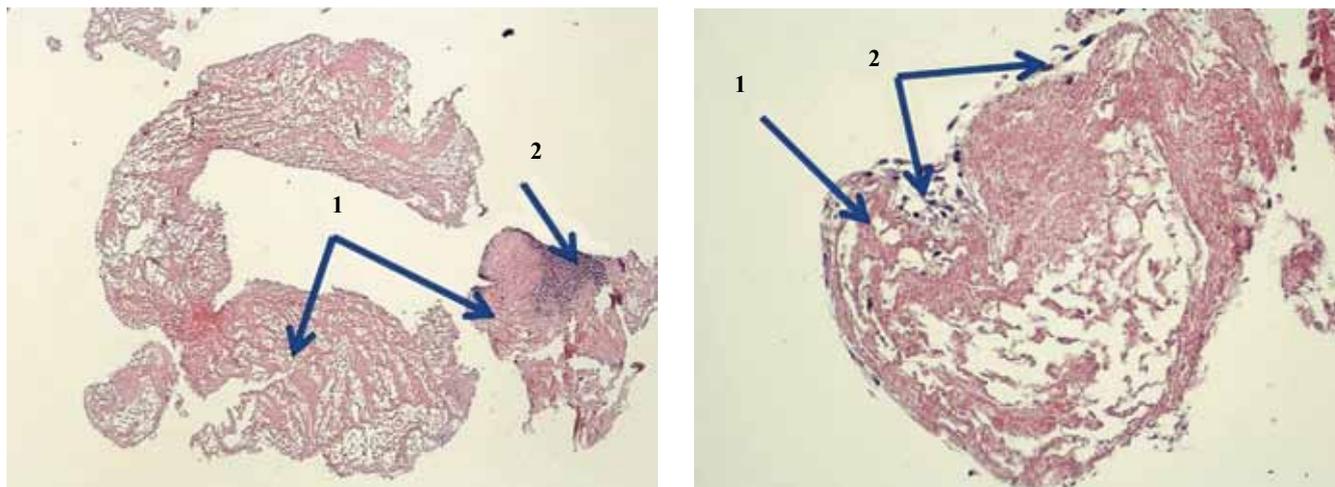


Рис. 4. Рост МСК ЖТч на тканеспецифическом матриксе из децеллюляризованной печени человека. 1 – матрикс; 2 – МСК. Окрашивание гематоксилином и эозином; а – $\times 40$, б – $\times 200$

Fig. 4. Growth of MSC HAT on the tissue-specific matrix of the decellularized human liver. 1 – the matrix; 2 – MSC HAT. Staining with hematoxylin and eosin; a – $\times 40$, б – $\times 200$

носителя, а на одном из фрагментов наблюдали выраженную пролиферацию.

Полученные положительные результаты по культивированию МСК на поверхности ДФПч позволили перейти к культуральной системе ДФПч – HepG2.

Анализ метаболической активности клеток показал, что ее рост происходит начиная с 3-х суток эксперимента и достигает максимума к 7-м суткам (рис. 5). Данные показателя метаболической активности подтверждает прижизненная флуоресцентная микроскопия (рис. 6, а, б).

При изучении заселения ДФПч клетками гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 было обнаружено, что клетки выборочно прикрепляются к поверхности

матрикса. На микрофотографиях (рис. 6, а, б) видно, что в основном клетки адгезируют к краевым участкам матрикса с последующей их активной пролиферацией. Центральные участки поверхности фрагментов матрикса заселяются клетками крайне слабо. По данным микроскопии и оценки метаболической активности клеток, ее максимум приходится на 7-е сутки. Эта тенденция сохраняется на всем протяжении эксперимента в течение 11 суток. К 11-м суткам пролиферативная активность падает, что связано со старением культуры. На рис. 6, в, видно, что к этому сроку краевые участки матрикса местами полностью покрыты сформированными клеточными скоплениями и пластами, в то время как

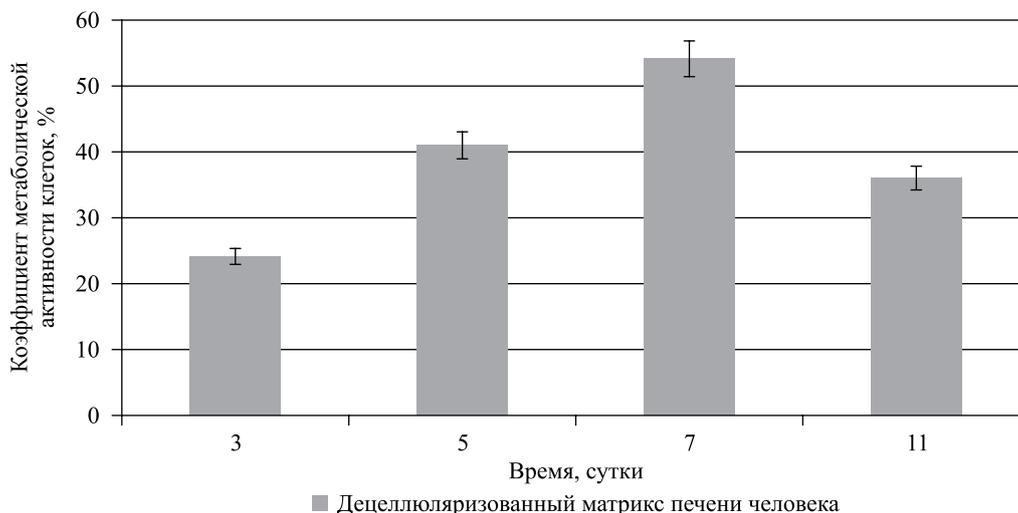


Рис. 5. Метаболическая активность клеток HepG2 на тканеспецифическом матриксе из децеллюляризованной печени человека

Fig. 5. Metabolic activity of HepG2 cells on a tissue-specific matrix from a decellularized human liver

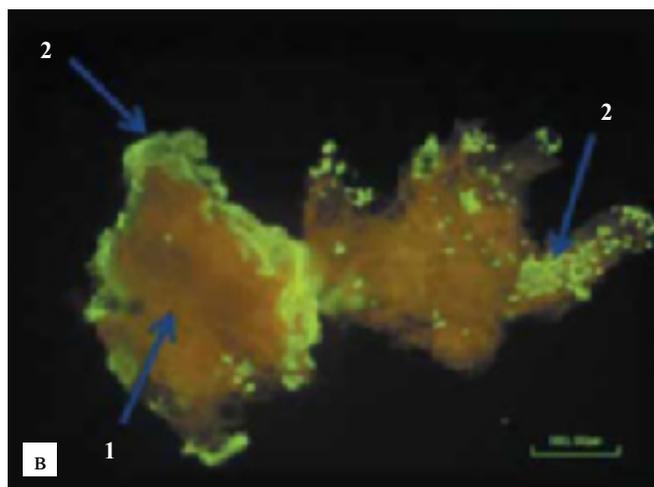
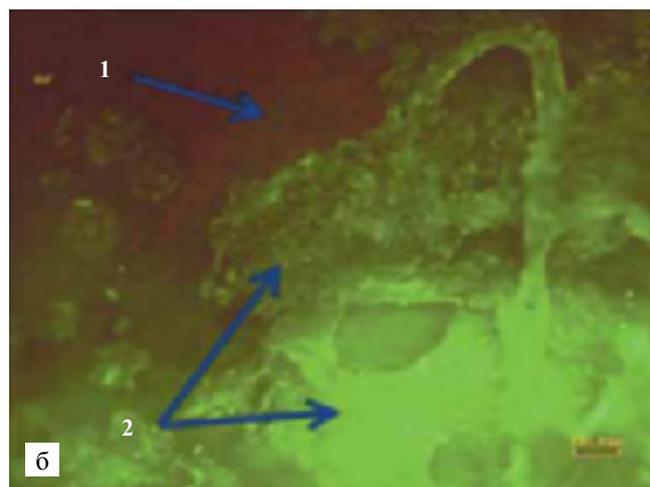
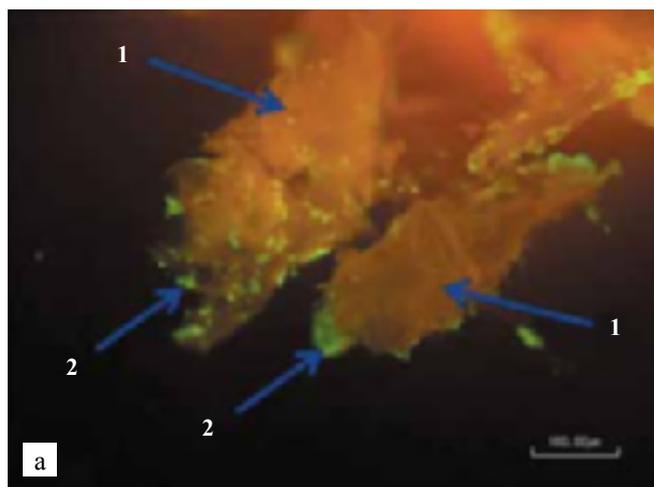


Рис. 6. Адгезия клеток HepG2 на поверхности тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной печени человека: а – 3-и сутки культивирования; б – 7-е сутки культивирования; в – 11-е сутки культивирования; 1 – поверхность матрикса; 2 – клетки HepG2. Окрашивание флуоресцентными красителями Live/Dead. $\times 40$

Fig. 6. Adhesion of HepG2 cells on the surface of a tissue-specific matrix from a decellularized human liver: a – 3 days of cultivation; б – 7 days of cultivation; в – 11 days of cultivation; 1 – the surface of the matrix; 2 – HepG2 cells. Coloring with Live/Dead fluorescent dyes. $\times 40$

в центральных зонах заселения клетками носителя так и не произошло.

Таким образом, прижизненная микроскопия образцов демонстрирует активную пролиферацию клеток HepG2 и неравномерную адгезию ДФПч (рис. 6).

При гистологическом анализе, как видно на рис. 7, преимущественный рост эпителиоподобных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением наблюдали на поверхности матрикса к третьим суткам культивирования. При этом клетки объединялись в многочисленные группы, а часть клеток формировала мелкие скопления в объеме матрикса. Отметим наличие коллагена в ДФПч, что говорит о сохранности основного структурного компонента ВКМ. К седьмым суткам наблюдали значительное увеличение клеточной массы, что было связано с активной клеточной пролиферацией. На поверхности носителя обнаруживались многослойные плотные клеточные пласты, а в толще матрикса наблюдалось образование более крупных, чем на предыдущем сроке, клеточных скоплений.

В клетках видна мелкозернистая цитоплазма с немногочисленными мелкими вакуолями, а также наблюдали атипичный митоз, характерный для данной клеточной линии (рис. 8).

Биохимический анализ проб культуральной среды на третьи сутки эксперимента не выявил в образцах мочевины на уровне, превышающем предел обнаружения 1,1 ммоль/л. Однако к 7-м суткам содержание мочевины в культуральной среде составило $1,2 \pm 0,1$ ммоль/л, что доказывает наличие функциональной активности клеток в составе КИК.

Было предположено, что обнаруженной неравномерной колонизации клетками матрикса и незначительного проникновения клеток в его объем при культивировании в статических условиях можно избежать при культивировании КИК ДФПч – HepG2 в проточном биореакторе [13].

Действительно, на 7-е сутки культивирования в биореакторе матрикс ДФПч с HepG2 образовывали единый конгломерат (рис. 9). Большинство многочисленных групп адгезированных эпителиоподобных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением клеток были жизнеспособны, окрашивались в зеленый цвет. Основная масса клеток была сосредоточена на поверхности матрикса, но клетки, формирующие небольшие скопления, определяли и в объеме носителя. Морфология клеток менялась с округлой на более вытянутую, некоторые клетки находились в состоянии деструкции.

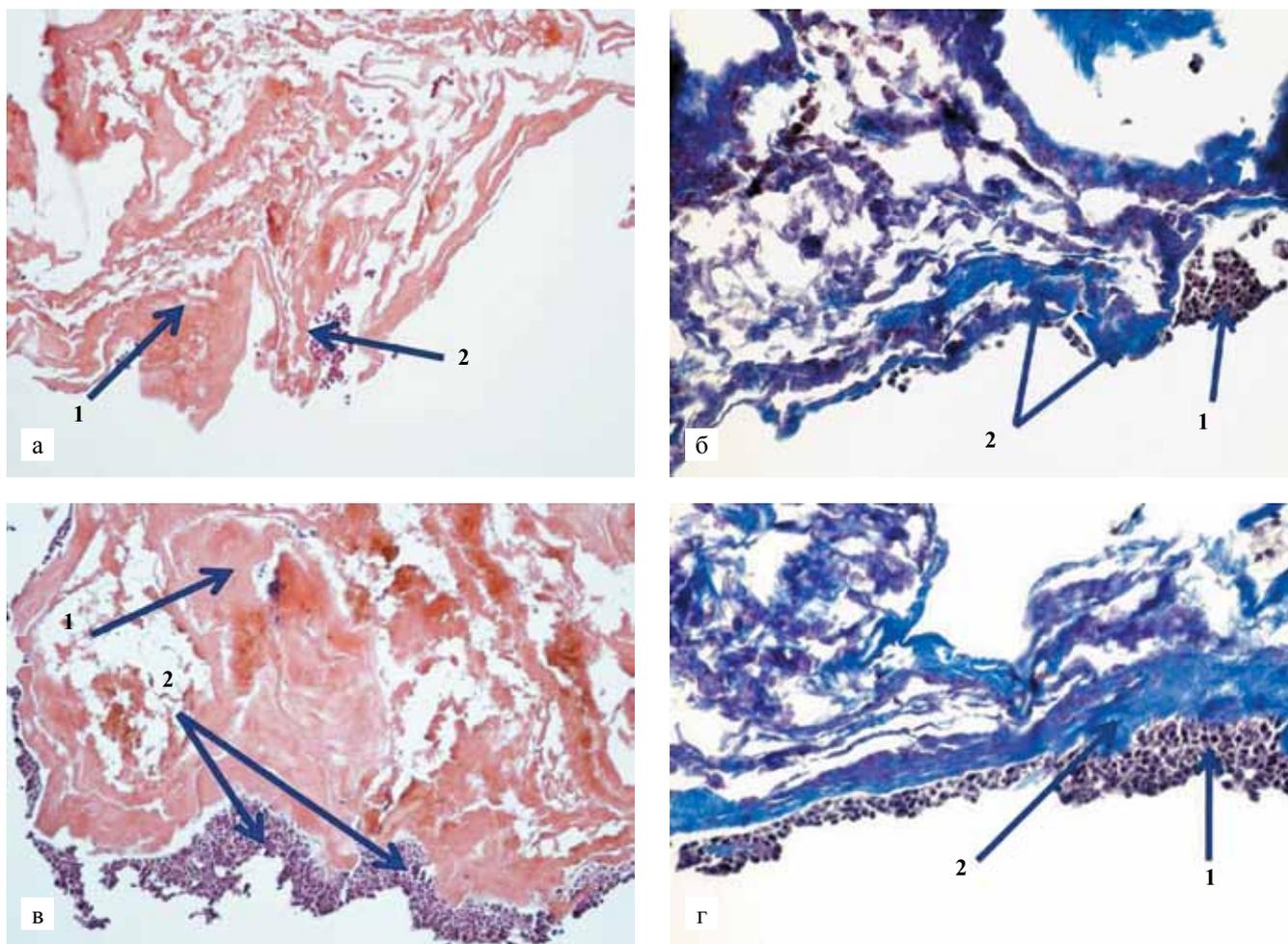


Рис. 7. Рост клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 на тканеспецифическом матриксе из децеллюляризованной печени человека. $\times 100$. Окрашивание гематоксилином и эозином: а – 3-и сутки культивирования; в – 7-е сутки культивирования; 1 – матрикс; 2 – клетки HepG2. Окрашивание на коллаген по Массону. б – 3-и сутки культивирования; г – 7-е сутки культивирования; 1 – клетки HepG2; 2 – коллаген. $\times 200$.

Fig. 7. Growth of human hepatocellular carcinoma cells HepG2 on a tissue-specific matrix from a decellularized human liver. $\times 100$. Staining with hematoxylin and eosin: а – 3 days of cultivation; в – 7 days of cultivation; 1 – matrix; 2 – HepG2 cells. Masson staining for collagen. б – 3 days of cultivation; г – 7 days of cultivation; 1 – HepG2 cells; 2 – collagen. $\times 200$

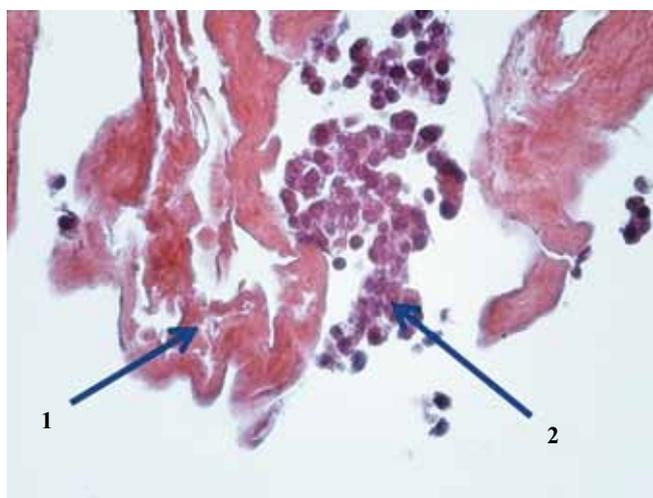


Рис. 8. Морфология клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 при культивировании на тканеспецифическом матриксе из децеллюляризованной печени человека, 3-и сутки культивирования, 1 – матрикс; 2 – клетки HepG2. $\times 400$. Окрашивание гематоксилином и эозином

Fig. 8. Morphology of human hepatocellular carcinoma cells HepG2 when cultured on a tissue-specific matrix from a decellularized human liver. 3 days of cultivation: 1 – matrix; 2 – HepG2 cells. $\times 400$. Staining with hematoxylin and eosin

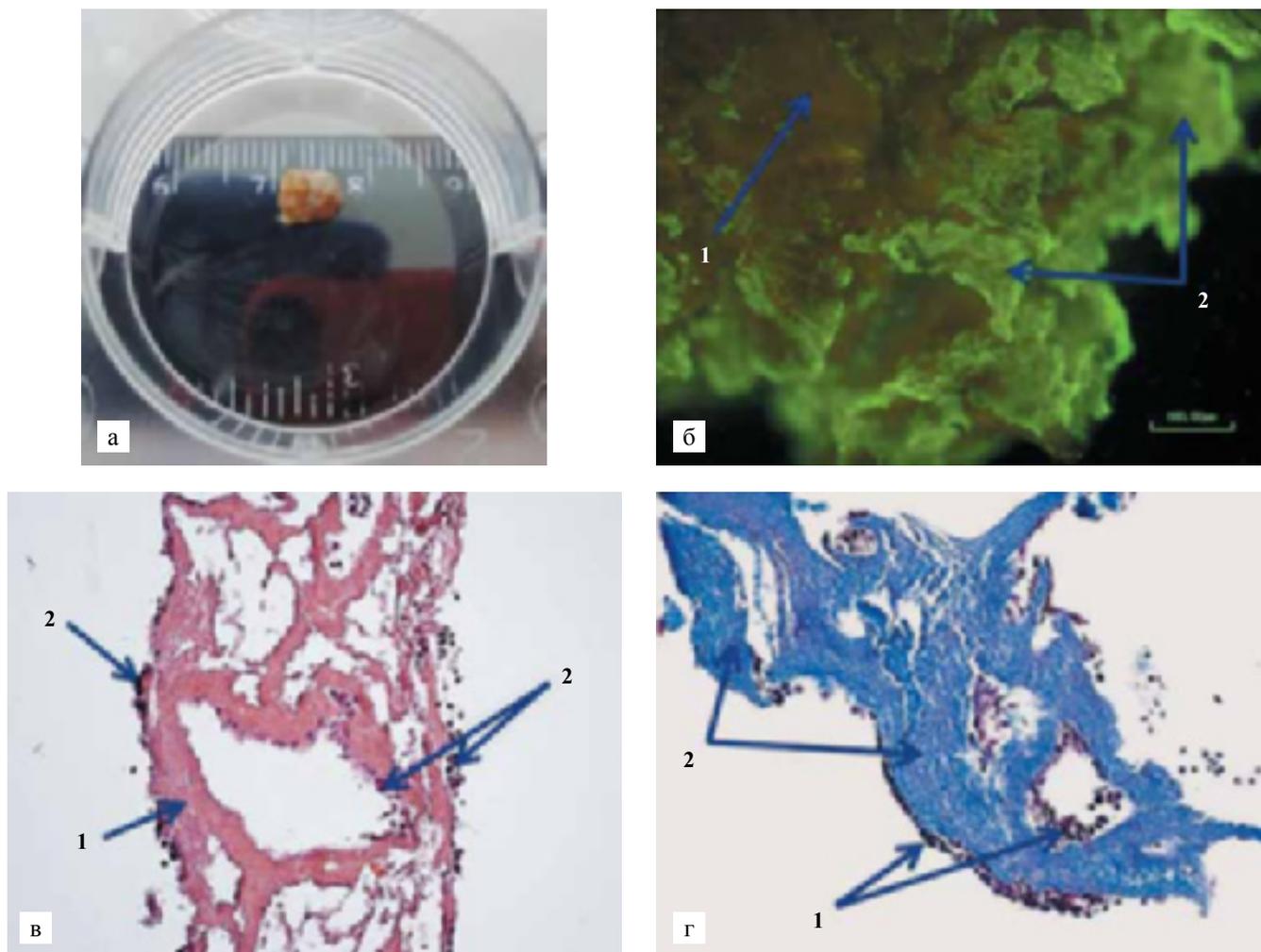


Рис. 9. Рост клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 на тканеспецифическом матриксе из децеллюляризованной печени человека в проточном биореакторе при скорости потока 0,02 мл/мин: а – обзорная фотография; б – окрашивание витальным красителем Live/Dead; 1 – матрикс; 2 – клетки HepG2. ×100; в – окрашивание гематоксилином и эозином; 1 – матрикс; 2 – клетки HepG2. ×200; г – окрашивание на коллаген по Массону; 1 – клетки HepG2; 2 – коллаген. ×200

Fig. 9. Growth of human hepatocellular carcinoma cells HepG2 on a tissue-specific matrix from a decellularized human liver in a flow bioreactor at a flow rate of 0.02 ml/min: а – overview photo; б – Live/Dead vital dye staining; 1 – matrix; 2 – HepG2 cells. ×100; в – staining with hematoxylin and eosin; 1 – matrix; 2 – HepG2 cells. ×200; г – Masson staining for collagen; 1 – HepG2 cells; 2 – collagen. ×200

Метаболическая активность клеток при культивировании в биореакторе была также выше, чем в статике. В клетках активно проходили реакции энергетического обмена: содержание глюкозы в культуральной среде к седьмым суткам эксперимента значимо снизилось – с $7,69 \pm 0,38$ до $4,69 \pm 0,23$ ммоль/л. Содержание мочевины в культуральной среде ($1,5 \pm 0,1$ ммоль/л) превысило значение для образцов, полученных в статических условиях ($1,2 \pm 0,1$ ммоль/л).

Таким образом, показано, что культивирование тканеспецифического матрикса ДФПч с печеночными клетками HepG2 в биореакторе позволяет достичь более равномерной рецеллюляризации объема матрикса, повысить метаболическую активность и

обеспечить благоприятные условия для пролиферации клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен протокол децеллюляризации фрагментов донорской печени, позволяющей получить тканеспецифический матрикс, свободный от клеток и детрита, с низким содержанием ДНК и сохранением структуры ВКМ. Отсутствие цитотоксичности ДФПч и их способность поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч и тканеспецифических клеток HepG2 свидетельствует о возможности использования матрикса в тканевой инженерии печени. Показано преимущество рецеллюляризации матрикса

са ДФПч в проточном биореакторе по сравнению с культивированием ДФПч с HepG2.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-06012).

Авторы выражают благодарность И.А. Новикову (лаборатория фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ «НИИ глазных болезней») за помощь в проведении СЭМ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Croce S, Peloso A, Zoro T, Avanzini MA, Cobianchi L. A hepatic scaffold from decellularized liver tissue: food for thought. *Biomolecules*. 2019; 9 (12): 813. doi: 10.3390/biom9120813. PMID: 31810291.
2. Yang W, Xia R, Zhang Y, Zhang H, Bai L. Decellularized liver scaffold for liver regeneration. *Methods Mol Biol*. 2018; 1577: 11–23. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_5. PMID: 28856614.
3. Bilodeau C, Goltsis O, Rogers IM, Post M. Limitations of recellularized biological scaffolds for human transplantation. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020; 14 (3): 521–538. doi: 10.1002/term.3004. PMID: 31826325.
4. Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: a systematic review and future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (12): 4117. doi: 10.3390/ijms19124117. PMID: 30567407.
5. Ahmed E, Saleh T, Yu L, Kwak HH, Kim BM, Park KM et al. Micro and ultrastructural changes monitoring during decellularization for the generation of a biocompatible liver. *J Biosci Bioeng*. 2019; 128 (2): 218–225. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.02.007. PMID: 3090445.
6. Willemsse J, Versteegen MMA, Vermeulen A, Schurink IJ, Roest HP, van der Laan LJW et al. Fast, robust and effective decellularization of whole human livers using mild detergents and pressure controlled perfusion. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020; 108: 110200. doi: 10.1016/j.msec.2019.110200. PMID: 31923991.
7. Butter A, Aliyev K, Hillebrandt KH, Raschok N, Kluge M, Seiffert N et al. Evolution of graft morphology and function after recellularization of decellularized rat livers. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018; 12 (2): e807–e816. doi: 10.1002/term.2383. PMID: 27957815.
8. Naeem EM, Sajad D, Talaei-Khozani T, Khajeh S, Azarpira N, Alaei S et al. Decellularized liver transplant could be recellularized in rat partial hepatectomy model. *J Biomed Mater Res A*. 2019; 107 (11): 2576–2588. doi: 10.1002/jbm.a.36763. PMID: 31361939.
9. Готье СВ, Севастьянов ВИ, Шагидулин МЮ, Немец ЕА, Басок ЮБ. Тканеспецифический матрикс для тканевой инженерии паренхиматозного органа и способ его получения. Патент на изобретение RU 2693432 C2, 02.07.2019. *Gautier SV, Sevastyanov VI, Shagidulin MYu, Nemets EA, Basok YuB*. Tkanespetsificheskiy matriks dlya tkanevoy inzhenerii parenkhimatoznogo organa i sposob ego polucheniya. Patent na izobretenie RU 2693432 C2, 02.07.2019.
10. Elchaninov A, Fatkhudinov T, Usman N, Arutyunyan I, Makarov A, Lokhonina A et al. Multipotent stromal cells stimulate liver regeneration by influencing the macrophage polarization in rat. *World J Hepatol*. 2018 Feb 27; 10 (2): 287–296.; Zhou Q, Li L, Li J. Stem cells with decellularized liver scaffolds in liver regeneration and their potential clinical applications. *Liver Int*. 2015 Mar; 35 (3): 687–694. doi: 10.1111/liv.12581.
11. Shimoda H, Yagi H, Higashi H, Tajima K, Kuroda K, Abe Y et al. Decellularized liver scaffolds promote liver regeneration after partial hepatectomy. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 12543. doi: 10.1038/s41598-019-48948-x. PMID: 31467359.
12. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol*. 2015; 1250: 77–93. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_5.
13. Sevastyanov VI, Basok YB, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Vasilets VN. A perfusion bioreactor for making tissue-engineered constructs. *Biomedical Engineering*. 2017; 51 (3): 162–165.
14. ГОСТ ISO 10993-1-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*». М.: Стандартиформ, 2014. GOST ISO 10993-1-2011 «Izdeliya meditsinskikh izdeliy. Chast' 5. Issledovanie na tsitotoksichnost': metody *in vitro*». М.: Standartinform, 2014.
15. Novikov I, Subbot A, Turenok A, Mayanskiy N, Chebotar I. A rapid method of whole cell sample preparation for scanning electron microscopy using neodymium chloride. *Micron*. 2019; 124: 102687. doi: 10.1016/j.micron.2019.102687. PMID: 31302532.
16. Zhang L, Guan Z, Ye J-S, Yin Y-F, Stoltz J-F, de Isla N. Research progress in liver tissue engineering. *Biomed Mater Eng*. 2017; 29 (s1): S113–S119.
17. Crapo PM, Gilbert TW, Badyrak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
18. Nibourg GA, Hoekstra R, van der Hoeven TV, Ackermans MT, Hakvoort TB, van Gulik TM, Chamuleau RA. Increased hepatic functionality of the human hepatoma cell line HepaRG cultured in the AMC bioreactor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Aug; 45 (8): 1860–1868.

*Статья поступила в редакцию 6.07.2020 г.
The article was submitted to the journal on 6.07.2020*