

DOI: 10.15825/1995-1191-2025-1-103-113

ХИМИЧЕСКАЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ТКАНИ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ ПУТЕМ ДВУХЭТАПНОЙ ОБРАБОТКИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫМИ И ОСМОРЕГУЛИРУЮЩИМИ ВЕЩЕСТВАМИ СПОСОБСТВУЕТ ПОВЫШЕНИЮ СОХРАННОСТИ СТРУКТУРЫ ВНЕКЛЕТочНОГО МАТРИКСА ПЕЧЕНИ

А.Д. Белова¹, Е.А. Немец¹, Д.Д. Филин¹, А.С. Пономарева¹, Л.А. Кирсанова¹,
Ю.Б. Басок¹, В.И. Севастьянов^{1, 2}

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

² АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

Цель: разработать и исследовать тканеспецифический матрикс, полученный с применением модифицированного режима химической децеллюляризации фрагментов печени свиньи, направленного на эффективное повышение сохранности структуры внеклеточного матрикса (ВКМ), сокращение срока децеллюляризации и улучшение очистки матрикса от клеточных элементов. **Материалы и методы.** Исходную ткань свинной печени измельчали для получения тканевых фрагментов. Применяли 5 режимов децеллюляризации, последовательно меняя концентрации и сроки обработки поверхностно-активными веществами (ПАВ): 0,1% додецилсульфат натрия (SDS) и 0,1% или 1% Triton X-100, без и в сочетании с фосфатно-солевым буфером (PBS). Содержание гликозаминогликанов (ГАГ) в полученных фрагментах определяли, лизируя образцы 12 ч в растворе папаина при +65 °С с последующей инкубацией в красителе – 1,9-диметилметиленовом синем. Количественное определение ДНК в образцах проводили с применением набора DNeasy Blood&Tissue Kit и красителя Quant-iT PicoGreen. Морфологию образцов исследовали с использованием гистологических методов окрашивания. Цитотоксичность полученных образцов *in vitro* оценивали на культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3 методом прямого контакта. **Результаты.** Обработка ткани 0,1% SDS в течение 2,5 ч с дополнительной обработкой 1% Triton X-100, содержащим PBS, в течение 21,5 ч (режим 4) способствовала повышению ГАГ до $11,66 \pm 0,61$ мкг/мг по сравнению с $0,68 \pm 0,06$ мкг/мг (режим 5). Дополнительная обработка образцов, полученных в режиме 4, ДНКазой I типа позволила снизить содержание ДНК с $99,75 \pm 3,93$ до $14,93 \pm 4,91$ нг/мг, что свидетельствовало об эффективном удалении клеточных компонентов. Цитотоксичность этого матрикса не обнаружена. **Заключение.** Оптимизация режима химической децеллюляризации фрагментов печени свиньи позволила повысить сохранность структур ВКМ, сократить время децеллюляризации и эффективно снизить содержание клеточных элементов. Модифицированный протокол децеллюляризации фрагментов печени свиньи позволил получить нецитотоксичный тканеспецифический матрикс с низкой потенциальной иммуногенностью и более сохранной структурой ВКМ и количеством ГАГ.

Ключевые слова: свиная печень, децеллюляризация, гликозаминогликаны, тканевая инженерия.

Для корреспонденции: Белова Александра Дмитриевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (963) 633-94-34. E-mail: sashak1994@mail.ru

Corresponding author: Aleksandra Belova. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (963) 633-94-34. E-mail: sashak1994@mail.ru

CHEMICAL DECELLULARIZATION OF PORCINE LIVER BY TWO-STAGE TREATMENT WITH SURFACTANTS AND OSMOREGULATORS ENHANCES PRESERVATION OF LIVER EXTRACELLULAR MATRIX STRUCTURE

A.D. Belova¹, E.A. Nemets¹, D.D. Filin¹, A.S. Ponomareva¹, L.A. Kirsanova¹, Yu.B. Basok¹, V.I. Sevastianov^{1, 2}

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

² Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

Objective: to develop and investigate a tissue-specific matrix obtained using a modified chemical porcine liver decellularization regime in order to effectively increase preservation of extracellular matrix (ECM) structure, reduce decellularization time and improve purification of the ECM from cellular elements. **Materials and methods.** Original porcine liver was minced to obtain tissue fragments. Five decellularization regimes were used, with the concentrations and timing of surfactant treatments varied: 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.1% or 1% Triton X-100, without and in combination with phosphate-buffered saline (PBS). The glycosaminoglycan (GAG) content of the resulting fragments was determined by lysing the samples for 12 hours in papain solution at +65 °C and then incubating them in 1,9-dimethylmethylene blue. DNA quantification was carried out using DNeasy Blood&Tissue Kit and Quant-iT PicoGreen dye. The morphology of the samples was studied using histological staining techniques. Cytotoxicity of the samples *in vitro* was evaluated on an NIH/3T3 mouse fibroblast culture by direct contact. **Results.** Treatment with 0.1% SDS for 2.5 hours with additional treatment with 1% Triton X-100 containing PBS for 21.5 hours (regime 4) increased GAG content to $11.66 \pm 0.61 \mu\text{g}/\text{mg}$ compared to $0.68 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{mg}$ (regime 5). The DNA content of samples obtained in regime 4 decreased from $99.75 \pm 3.93 \text{ ng}/\text{mg}$ to $14.93 \pm 4.91 \text{ ng}/\text{mg}$ after additional treatment with type I DNase, indicating that cellular components were effectively removed. This matrix showed no cytotoxicity. **Conclusion.** By optimizing the chemical decellularization regime for porcine liver, we were able to improve preservation of ECM structures, shorten decellularization time and effectively reduce the content of cellular elements. The modified decellularization protocol allowed to obtain a non-cytotoxic tissue-specific matrix with a low potential immunogenicity and a more preserved ECM structure and higher GAG content.

Keywords: porcine liver, decellularization, glycosaminoglycans, tissue engineering.

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие развития тканевой инженерии бесклеточные матриксы, полученные путем децеллюляризации органов и тканей, прочно заняли свою нишу среди биodeградируемых материалов, применяемых в качестве клеточного носителя в клеточно-инженерных конструкциях. Биоэквиваленты ткани печени являются не только многообещающей альтернативой трансплантации печени в условиях дефицита донорских органов, но и эффективными моделями для отбора *in vitro* лекарственных субстанций.

К основным преимуществам матриксов, полученных на основе децеллюляризованных органов, относятся: сохранность микроструктуры и состава естественного внеклеточного матрикса (ВКМ), что позволяет поддерживать близкое к нативному микроокружение для клеток при рецеллюляризации; низкая степень иммуногенности, достигаемая за счет удаления клеточных компонентов; высокая

степень биосовместимости; возможность использования для децеллюляризации ксеногенных органов и тканей [1, 2]. В связи с этим матриксы на основе децеллюляризованных тканей и органов способны служить не только физическим каркасом для клеток, но также способны поддерживать их пролиферативную и функциональную активность [3, 4]. Важной задачей при разработке протоколов децеллюляризации является максимальное сохранение в матриксе одного из основных компонентов ВКМ – гликозаминогликанов (ГАГ). ГАГ играют ключевую роль в процессах адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток [5], что связано с их способностью взаимодействовать с цитокинами, факторами роста, ферментами и белками [6].

Выбор способа децеллюляризации ткани или органа зависит от множества факторов, таких как тип органа, видовая специфичность ткани, ее структура и плотность. По характеру воздействия методы децеллюляризации разделяют на физические, химические и ферментативные [7, 8].

Как правило, при химической децеллюляризации применяют поверхностно-активные вещества (ПАВ) Triton X-100 и додецилсульфат натрия (SDS), которые разрушают клеточную мембрану и денатурируют белки. При этом считается, что неионогенный Triton X-100 менее агрессивен по отношению к коллагену, эластину и ГАГ в составе ВКМ, чем SDS [9, 10]. Именно поэтому после применения SDS необходима более тщательная отмывка матрикса во избежание сохранения цитотоксических остатков вещества в глубине ткани, что сопряжено с трудностью его удаления из-за ионной природы [11–13].

Для повышения проницаемости клеточной мембраны и лучшего доступа ПАВ вглубь ткани прибегают к синергетическому эффекту от объединения в одном протоколе децеллюляризации разных методов [14, 15].

Так, для повышения эффективности процесса децеллюляризации ткани печени мыши Kobes et al. применяли сочетанное воздействие ПАВ и веществ, вызывающих развитие осмотического шока [16]. Осмотический шок (гипер- и гипотонический раствор) вызывает лизис клеток, оказывая при этом незначительное влияние на ВКМ, а также помогает удалить остатки клеток из ткани после лизиса [17, 18]. Suss et al. использовали для децеллюляризации нервной ткани раствор SDS с добавлением ЭДТА в сочетании с ультразвуком [19].

Ранее нами был предложен протокол создания тканеспецифического микродисперсного матрикса из децеллюляризованной печени путем длительного применения (72 часа) трех растворов ПАВ, содержащих SDS и увеличивающиеся концентрации Triton X-100, с дополнительной обработкой ДНКазой [20, 21]. К достоинствам данного метода относится включение Triton X-100 в протокол для эффективного удаления остатков SDS [12]. К недостаткам относится длительность процесса децеллюляризации и использование магнитной мешалки, что отрицательно влияет на состав и структуру ВКМ.

Цель настоящей работы состояла в разработке и исследовании тканеспецифического матрикса, полученного с применением модифицированного режима химической децеллюляризации фрагментов печени свиньи, направленного на эффективное повышение сохранности структуры ВКМ, сокращение срока децеллюляризации и улучшение очистки матрикса от клеточных элементов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Для децеллюляризации использовали печень свиньи, полученную на бойне (ООО «АПК «ПРОМАГРО», г. Старый Оскол) после забоя здоровых животных. Исходную ткань замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед началом экспериментов печень размораживали и механически измельчали с помощью скальпеля и ножниц для получения фрагментов печени свиньи (ФПс) размером не более $1,5 \times 1,5\text{ мм}$.

Режимы децеллюляризации ФПс

Обработку ФПс проводили, используя 5 режимов децеллюляризации при температуре $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и постоянном перемешивании при скорости 90 об/мин с использованием шейкера-инкубатора ES-20/60 (Biosan, Латвия). Режимы децеллюляризации представлены в таблице.

Заметим, что во всех режимах ФПс обрабатывали последовательно раствором, содержащим ПАВ в дистиллированной воде, и раствором фосфатно-солевого буфера (PBS; 137 мМ NaCl, 2,67 мМ KCl, 1,47 мМ KH_2PO_4 , 8,1 мМ Na_2HPO_4 , pH = 7,4), содержащим ПАВ (раствор с низкой ионной силой) в течение выбранного интервала времени.

Обработка ДНКазой ФПс

Для достижения полноты удаления клеточных компонентов, оцениваемой по остаточному количеству ДНК, после децеллюляризации образцов в режиме 4 мы включали дополнительную обработку ФПс раствором ДНКазы I типа (СайСторЛаб, Рос-

Таблица

Режимы децеллюляризации фрагментов печени свиньи

Porcine liver decellularization regimes

№ режима	I стадия	II стадия
1	$\text{H}_2\text{O} + \text{SDS } 0,1\% - 2,5\text{ часа}$	$\text{PBS} + \text{SDS } 0,1\% - 21,5\text{ часа}$
2	$\text{H}_2\text{O} + \text{Triton X-100 } 0,1\% - 2,5\text{ часа}$	$\text{PBS} + \text{Triton X-100 } 0,1\% - 21,5\text{ часа}$
3	$\text{H}_2\text{O} + \text{Triton X-100 } 1\% - 2,5\text{ часа}$	$\text{PBS} + \text{Triton X-100 } 1\% - 21,5\text{ часа}$
4	$\text{H}_2\text{O} + \text{SDS } 0,1\% - 2,5\text{ часа}$	$\text{PBS} + \text{Triton X-100 } 1\% - 21,5\text{ часа}$
5	$\text{H}_2\text{O} + \text{Triton X-100 } 1\% - 18\text{ часов}$	$\text{PBS} + \text{SDS } 0,1\% - 6\text{ часов}$

Примечание. PBS – фосфатно-солевой буфер.

Note. PBS – phosphate-buffered saline.

сия). Образцы объемом 0,5 мл помещали в 1,0 мл 10 мМ Трис-НСl буферного раствора (рН 7,6), содержащего 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМоль СаCl₂ и 50 Ед/мл ДНКазы I, и инкубировали в течение 48 часов при температуре +37 °С.

Определение содержания гликозаминогликанов в нативной печени и децеллюляризованных ФПс

Для количественного определения содержания ГАГ в нативных и децеллюляризованных ФПс (ДФПс) образцы лиофилизировывали при температуре –80 °С (FreeZone, Labconco, США). После лиофилизации образцы, массой 30 мг каждый (n = 3), лизировали в растворе папаина (Sigma-Aldrich, США) при +65 °С в течение 12 часов. Концентрацию ГАГ определяли с помощью красителя 1,9-диметилметиленового синего (DMMB) (Sigma-Aldrich, США) и планшетного ридера Tecan Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария), измеряя абсорбцию при длине волны 525 нм.

Окрашивание двухцепочечной ДНК красителем DAPI в нативной печени и ДФПс

Для предварительной оценки содержания ДНК в нативной печени свиньи (n = 3) и ДФПс (n = 3) образцы предварительно замораживали при –20 °С, заливали средой для замораживания (Leica, Германия), а затем при помощи криостатирующего микротомы Leica CM1900 UV (Leica, Германия) производили срез толщиной 10 мкм. Полученный срез окрашивали флуоресцентным красителем 4',6-диамидин-2-фенилиндолом (DAPI) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мкг/мл. Каждый образец визуально оценивали на наличие или отсутствие сохранившейся ДНК с использованием флуоресцентного микроскопа Leica THUNDER Imager (Leica, Германия).

Количественное определение ДНК в нативной печени и ДФПс

Для количественной оценки содержания ДНК в образцах нативной печени и ДФПс применяли набор для выделения ДНК DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для исследования брали навеску 10 мг нативной печени (n = 3) или ДФПс (n = 3). Для количественного определения двухцепочечной ДНК использовали набор с флуоресцентным красителем Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits and dsDNA Reagents (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для подсчета количества ДНК в образцах использовали планшетный ридер

Tecan Spark 10M (Tecan Trading AG, Швейцария) при длине волны 520 нм.

Определение цитотоксичности *in vitro* ДФПс

Цитотоксичность образцов ДФПс *in vitro* оценивали в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10993-5-2011 [22] на культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3 (ATCC®CRL-1658™, American Type Culture Collection) методом прямого контакта. Фибробласты культивировали в стандартных культуральных флаконах площадью 25 см² (CELLSTAR Greiner Bio-One, Германия) в полной ростовой среде (ПРС), содержащей DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л, DMEM high glucose с HEPES, ПанЭко, Россия), 10% телячьей сыворотки (Biosera, Германия), антибиотик и антимиотик Anti-Anti (Gibco, ThermoFisherScientific, США) и 2 мМ глутамин (ПанЭко, Россия) в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (+37 °С, увлажненная атмосфера, содержащая 5 ± 1% CO₂). Клетки удаляли с поверхности культурального пластика с помощью диссоциирующего реагента TrypLE Express Enzyme (Gibco, ThermoFisherScientific, США). Исходное количество клеток в суспензии определяли, используя счетчик клеток TC 20TM Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories Inc., США). Для исследования цитотоксического эффекта фибробласты высевали в культуральные 96-луночные плоскодонные планшеты (CELLSTAR Greiner Bio-One, Германия) в концентрации 1–2 × 10⁶ клеток на лунку и инкубировали в ПРС до образования 80 ± 10% монослоя при стандартных условиях. Затем вносили исследуемые образцы (n = 8) в лунки с клеточным монослоем и инкубировали в течение 24 часов. Морфологические изменения фибробластов оценивали с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

Для исследования влияния образцов ДФПс на жизнеспособность NIH/3T3 проводили окрашивание клеток комплексом флуоресцентных витальных красителей LIVE/DEAD Cell Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes by Life Technologies, США) согласно протоколу, рекомендуемому производителем, с последующим анализом на флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония).

В качестве отрицательного контрольного образца для учета фоновой реакции клеток использовали питательную среду DMEM с высоким содержанием глюкозы 4,5 г/л (ПанЭко, Россия). Положительным контрольным образцом был стандарт цинка одноэлементный водный 10 000 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США).

Гистологическое исследование нативной печени и ДФПс

Образцы исходной ткани печени и ДФПс фиксировали в 10% растворе формалина, промывали в проточной воде и обезвоживали в спиртах восходящей концентрации. Затем выдерживали в смеси этанола с хлороформом, в хлороформе и заливали в парафин. Гистологические срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Массона на общий коллаген и альциановым синим на ГАГ. Анализ и фотосъемку препаратов проводили с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония).

Статистический анализ полученных результатов

Обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel (2021). Находили средние значения и среднеквадратичные отклонения. Достоверность различий определяли, используя t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показано влияние использованных режимов децеллюляризации печени свиньи (см. табл.) на концентрацию ГАГ в образцах ДФПс. Для сравнения на рис. 1 представлены также данные для ДФПс, полученные по ранее разработанному протоколу с

применением перемешивания на магнитной мешалке [20, 21]. Известно, что в исходной ткани печени свиньи содержание ГАГ ниже ($0,59 \pm 0,03$ мкг/мг сухой ткани), чем в децеллюляризованной ткани, и это связано с высокой массовой долей печеночных клеток, содержащихся в ней (до 80% массы органа) [23].

При обработке фрагментов печени 0,1% SDS в течение 24 часов (режим 1) сохранялось небольшое количество ГАГ – $3,42 \pm 1,03$ мкг/мг сухой ткани, что незначительно отличается от ранее разработанного протокола – $3,03 \pm 0,24$ мкг/мг сухой ткани [20, 21]. Заметим, что в ряде работ также показано негативное влияние SDS на ГАГ при децеллюляризации различных тканей и органов [24, 25]. При оценке влияния 0,1% (режим 2) и 1% (режим 3) концентрации Triton X-100, который улучшает проницаемость клеточной мембраны и облегчает лизис клеток, на сохранение ГАГ в ВКМ значимой разницы выявлено не было ($9,38 \pm 0,67$ и $10,74 \pm 0,95$ мкг/мг сухой ткани соответственно).

Остаточные количества ГАГ после децеллюляризации фрагментов печени в режимах 3 и 4 статистически достоверно не отличались между собой ($10,74 \pm 0,95$ и $11,66 \pm 0,61$ мкг/мг сухой ткани соответственно).

В режиме 5 децеллюляризации, в котором на первой стадии агентом децеллюляризации был 1% Triton X-100 (18 часов), а на второй 0,1% SDS (6 часов), количество сохранившихся ГАГ оказалось наименьшим – $0,68 \pm 0,06$ мкг/мг сухой ткани.

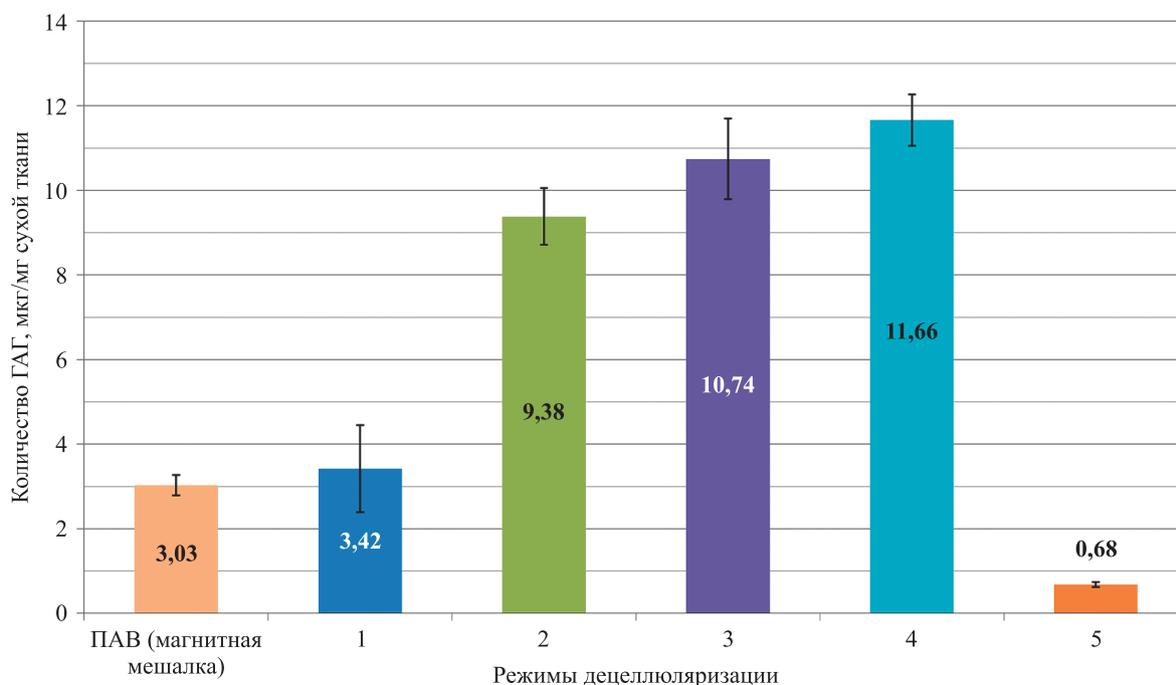


Рис. 1. Влияние режима децеллюляризации фрагментов печени свиньи на содержание ГАГ

Fig. 1. Effect of porcine liver decellularization regime on GAG content

Помимо сохранения структуры и основных компонентов ВКМ основным принципом децеллюляризации является удаление клеток и клеточного детрита из ткани. Одним из критериев успешной децеллюляризации является отсутствие ядерного материала, выявляемого при окрашивании флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), который обладает селективностью к двухцепочечной ДНК и, связываясь с ней в образце ткани, флуоресцирует в 20 раз интенсивнее (рис. 2, а-е) [18].

Как видно из рис. 2, а, в исходной ткани печени свиньи определялась характерная флуоресценция ядер. В ДФПс флуоресценция зависела от выбора режима децеллюляризации и от степени удаления клеток и клеточных фрагментов. Так, образец, обработанный в режиме 1, характеризовался средним количеством видимых ядер (рис. 2, б). При этом после обработки образцов ткани в режимах 2 и 3 (рис. 2, в, г) наблюдали множественные клеточные ядра, что свидетельствует о недостаточности применения в процессе децеллюляризации лишь одно-

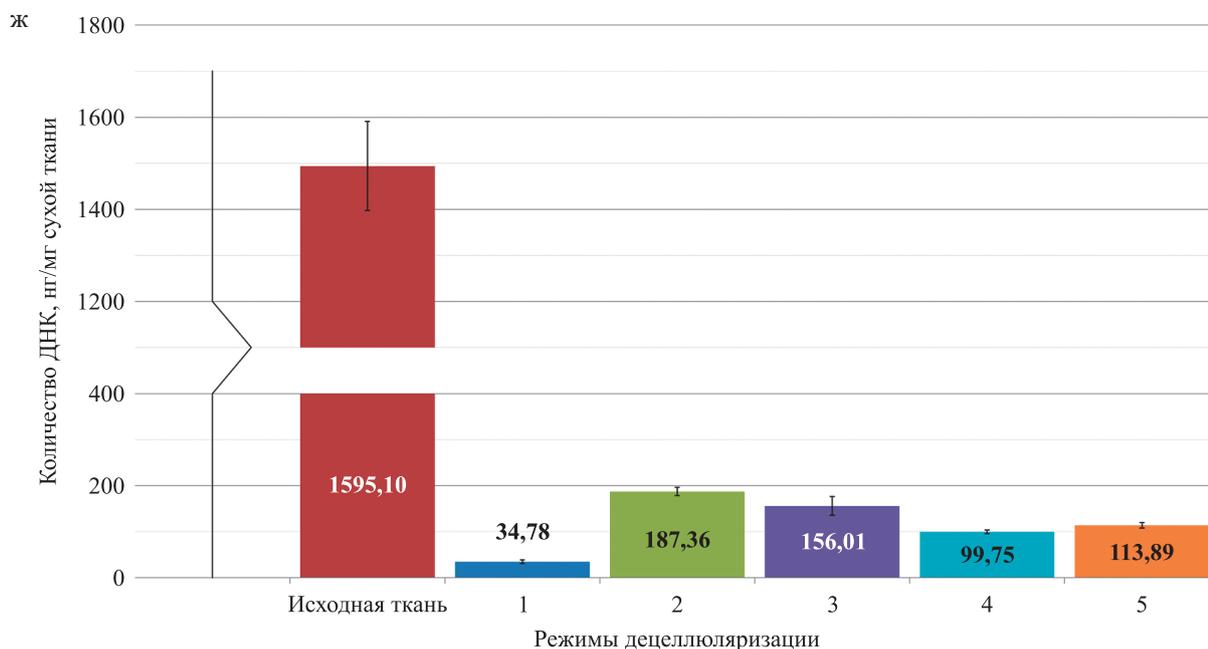
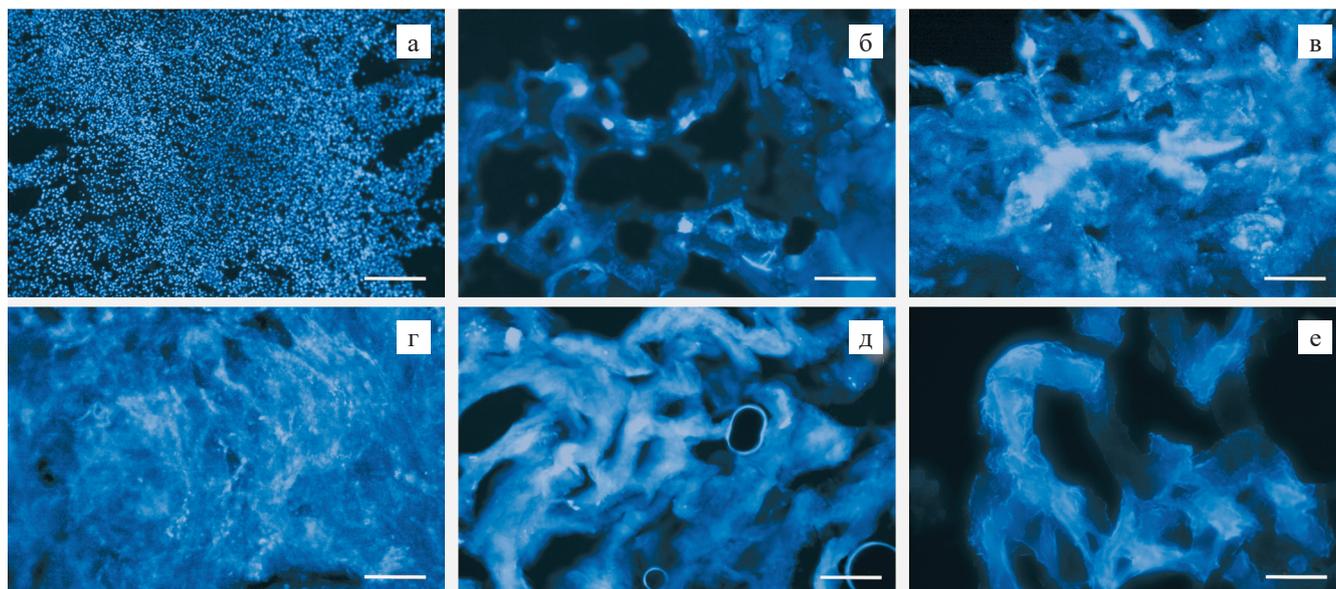


Рис. 2. Влияние режима децеллюляризации фрагментов печени свиньи на содержание ДНК. Окрашивание DAPI: а – исходная печень свиньи, б – режим 1, в – режим 2, г – режим 3, д – режим 4, е – режим 5, размер масштабной линейки 100 мкм; ж – количественное содержание ДНК во фрагментах печени свиньи

Fig. 2. Effect of porcine liver decellularization regime on DNA content. DAPI staining: а – original porcine liver tissue, б – regime 1, в – regime 2, г – regime 3, д – regime 4, е – regime 5, scale bar 100 μm; ж – quantitative DNA content in porcine liver fragments

го раствора Triton X-100 для удаления клеточного материала. При этом обработка фрагментов печени в режиме 4 (рис. 2, д), в котором в качестве децеллюляризирующих агентов был использован 0,1% SDS, а затем 1% Triton X-100, наблюдали значительно меньшее количество сохранившихся клеток, чем при обработке в режимах 2 и 3. Режим 5, при котором сначала применялся 1% Triton X-100, а затем 0,1% SDS, характеризовался отсутствием видимых ядер.

Применение всех режимов децеллюляризации позволило значительно снизить содержание ДНК в ДФПс по сравнению с исходной тканью (рис. 2, ж), что важно для снижения потенциальной иммуногенности матрикса. На основании критериев, предложенных Crapo et al., децеллюляризованный матрикс должен содержать не более 50 нг ДНК/мг ткани, при этом Triton X-100 и SDS способны удалить до 90% ДНК из тканей [18, 26]. Так, применение режима 1, где образец обрабатывали раствором 0,1% SDS, позволило сократить количество ДНК до $34,78 \pm 3,82$ нг/мг сухой ткани, что составило 2,18% от количества ДНК в исходной ткани печени ($1595,10 \pm 96,80$ нг/мг сухой ткани). Вероятно, в резком снижении ДНК при использовании режима 1 свою роль сыграл синергетический эффект воздействия изменения осмотической силы растворов SDS на ткань, способствующий повышению эффективности разрушения клеточных мембран и лизиса клеток.

Применение остальных режимов децеллюляризации не позволило достичь минимального порога удаления ДНК в 50 нг/мг ткани. Это указывает на необходимость включения в данные протоколы дополнительных этапов, облегчающих проникновение децеллюляризирующих агентов вглубь матрикса для разрушения клеточных мембран и лизиса клеток.

Стоит заметить, что обработка ткани только раствором Triton X-100 в концентрациях 0,1 и 1,0% (режимы 2 и 3) не дает возможности эффективно удалять клетки – генетически-активный материал, однако такая обработка сохраняет высокое количество ГАГ ($9,38 \pm 0,67$ и $10,74 \pm 0,95$ мкг/мг сухой ткани соответственно). Аналогичная ситуация происходит и с режимом децеллюляризации 4, где последовательное воздействие 0,1% SDS и 1% Triton X-100 позволило снизить количество ДНК только до $99,75 \pm 3,93$ нг/мг сухой ткани, что значительно выше минимально требуемого уровня, но при этом сохраняется максимальное количество ГАГ – $11,66 \pm 0,61$ мкг/мг сухой ткани.

Для подтверждения полученных результатов проводили гистологическое окрашивание ДФПс. Мы исследовали два образца, полученные в разных режимах децеллюляризации: режим 1, который характеризовался минимальным количеством остаточного ДНК, и режим 4, позволивший сохранить наибольшее количество ГАГ в матриксе на основе ДФПс (рис. 3).

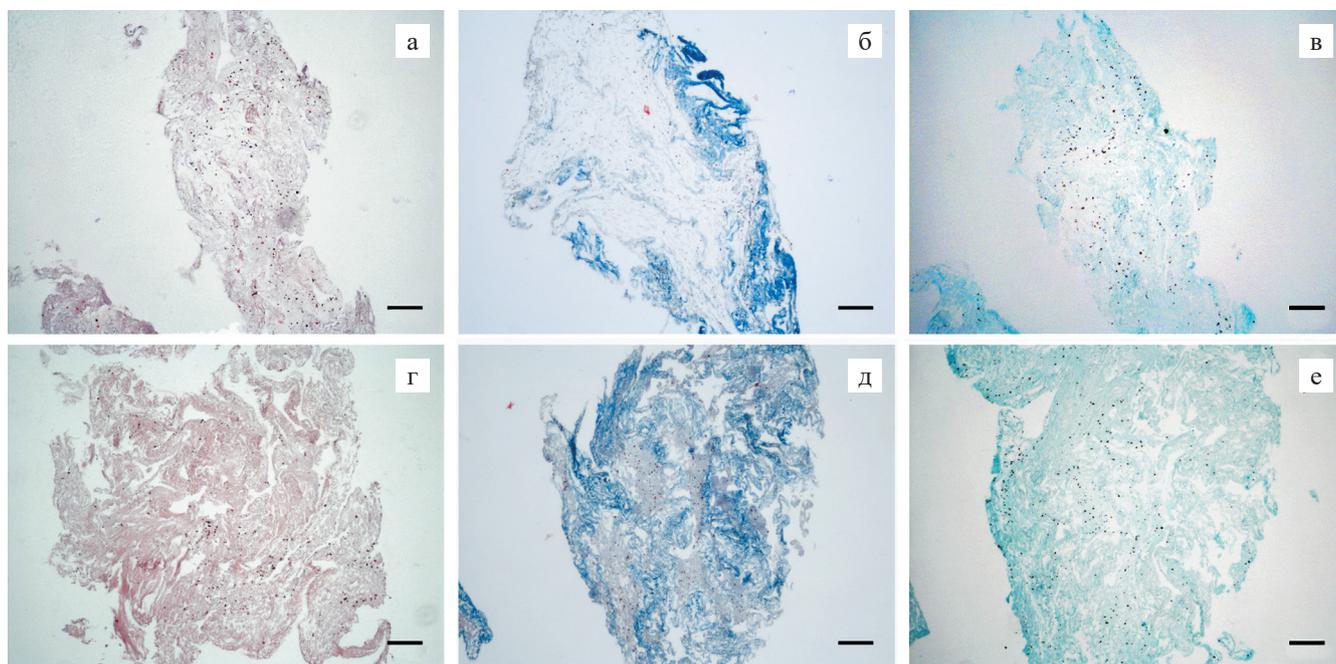


Рис. 3. Влияние режима обработки фрагментов печени свиньи на эффективность децеллюляризации. Окрашивание гематоксилином и эозином: а – режим 1, г – режим 4. Окрашивание по методу Массона: б – режим 1, д – режим 4. Окрашивание альциановым синим: в – режим 1, е – режим 4. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 3. Effect of porcine liver treatment regime on decellularization efficiency. H&E stain: а – regime 1, г – regime 4. Masson's trichrome stain: б – regime 1, д – regime 4. Alcian blue stain: в – regime 1, е – regime 4. Scale bar 100 μ m

Так, при окрашивании гематоксилином и эозином и по методу Массона в образце, обработанном по режиму 1 (рис. 3, а, б), наблюдаются полиморфные фрагменты децеллюляризованной печени с сохранной внутридольковой структурой и выраженной пористостью. Стоит заметить, что такая структура матрикса может позитивно отразиться при рецеллюляризации ДФПс, так как хорошая пористость будет способствовать проникновению питательных веществ к клеткам, находящимся в объеме матрикса, и процессам неоваскуляризации. При этом в образце нет сохраненных клеточных ядер и клеточного детрита, что подтверждается и количественным определением остаточного ДНК. Окрашивание альциановым синим на ГАГ проявляется очень слабо (рис. 3, в), что в совокупности с количественным определением количества ГАГ свидетельствует о минимальном сохранении этого компонента ВКМ после децеллюляризации печени свиньи в режиме 1.

ДФПс после обработки в режиме 4 (рис. 3, г–е) характеризуется наличием конгломератов, сформированных фрагментами печени, имеющих плотное расположение волокон и сниженную пористость. При этом образец позитивно окрашивается по методу Массона на общий коллаген и альциановым синим на ГАГ (рис. 3, д, е). Однако в образце виден сохранившийся клеточный детрит. Гистологический анализ подтвердил данные количественного определения ДНК и ГАГ в ДФПс, полученные в режиме 4. Образец характеризуется высоким содержанием сохранившихся ГАГ и недостаточным воздействием

децеллюляризирующих агентов для требуемого уровня удаления ДНК. Для достижения более полной степени удаления ДНК была проведена дополнительная обработка образцов ДФПс, полученных после децеллюляризации в режиме 4, раствором ДНКазы I типа. Как видно из рис. 4, это позволило сократить уровень ДНК до 0,94% от исходного количества ($14,93 \pm 4,91$ от $1595,10 \pm 96,80$ нг/мг в сухой ткани соответственно).

В результате проведенных исследований для максимального сохранения структуры ВКМ, количества ГАГ и повышения эффективности удаления клеток и клеточного материала был выбран режим децеллюляризации 4.

Оценка цитотоксичности ДФПс методом прямого контакта на клеточной культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3 показала отсутствие изменений морфологии клеток и сравнимое с отрицательным контролем (рис. 5, в) количество жизнеспособных фибробластов (рис. 5, а). При этом в положительном контрольном образце наблюдали цитотоксический эффект – клетки имели ошаренную форму (рис. 5, д).

Отсутствие цитотоксического эффекта ДФПс, полученного при децеллюляризации в режиме 4, подтверждается окрашиванием витальным красителем LIVE/DEAD (рис. 5, б). При контакте с образцами наблюдается большое количество жизнеспособных клеток, сформировавших монослой, сравнимое с отрицательным контролем (рис. 5, г). В положительном контроле наблюдали погибшие клетки с красной флуоресценцией (рис. 5, е). На основании проведен-

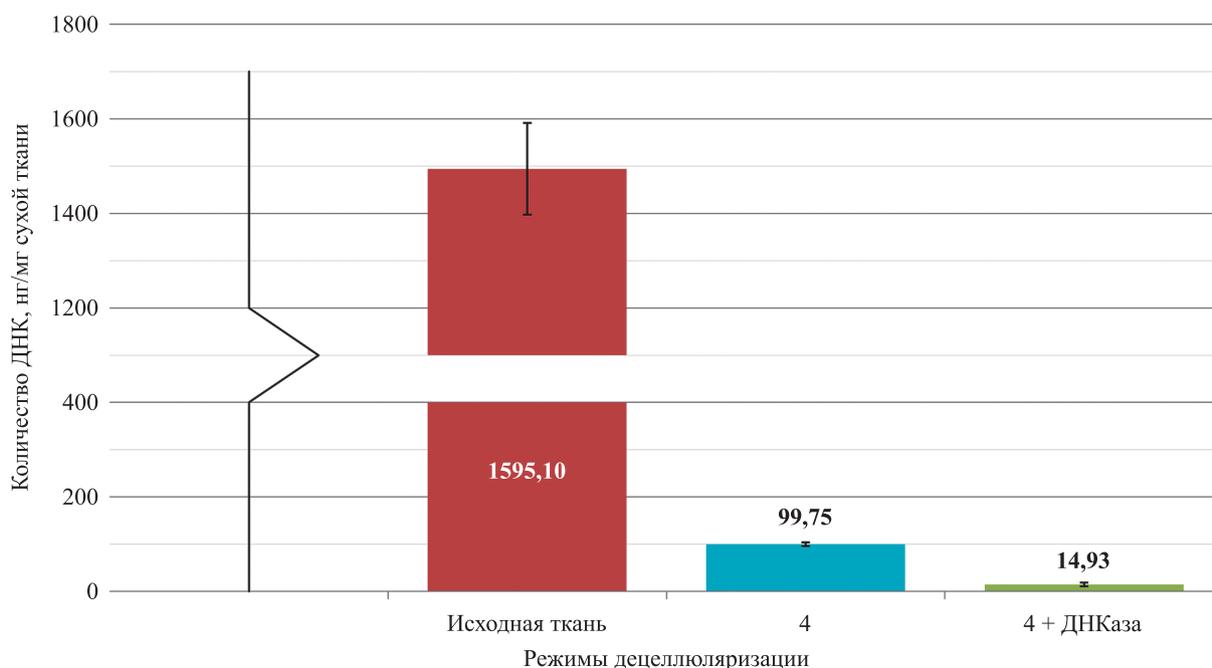


Рис. 4. Влияние обработки ДНКазой на эффективность децеллюляризации фрагментов печени свиньи

Fig. 4. Effect of DNase treatment on porcine liver decellularization efficiency

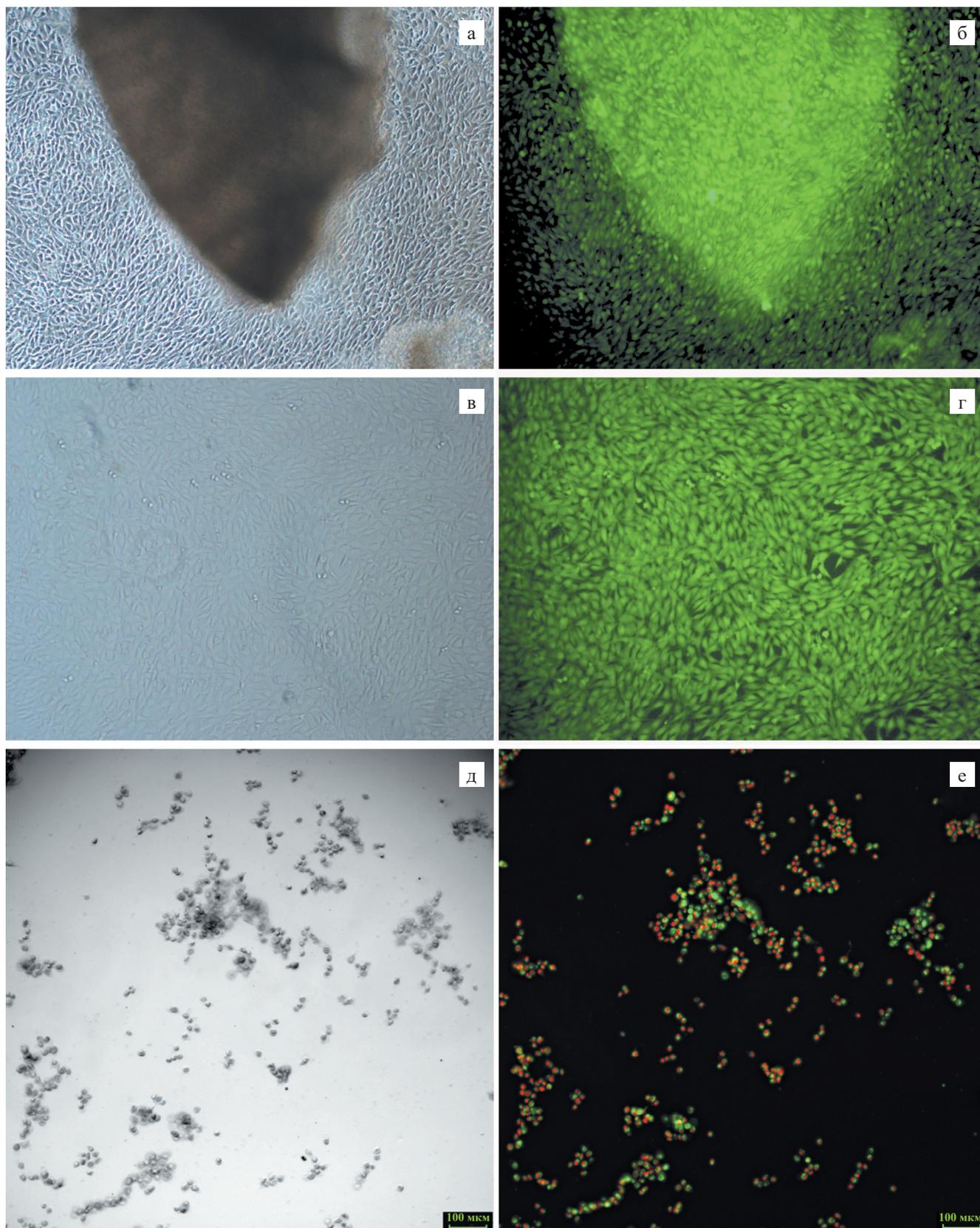


Рис. 5. Степень цитотоксичности матрикса на основе децеллюляризованных фрагментов печени свиньи, полученных в режиме 4, *in vitro*: а, б – опытный образец ДФПС; в, г – отрицательный контроль; д, е – положительный контроль; а, в, д – фазово-контрастная микроскопия; б, г, е – флуоресцентная микроскопия с витальным красителем LIVE/DEAD. $\times 40$

Fig. 5. Degree of cytotoxicity of matrix based on decellularized porcine liver fragments (DPLFs) obtained in regime 4, *in vitro*: а, б – test sample of DPLFs; в, г – negative control; д, е – positive control; а, в, д – phase-contrast microscopy; б, г, е – fluorescence microscopy with LIVE/DEAD vital dye. $\times 40$

ных экспериментов был сделан вывод об отсутствии цитотоксического эффекта ДФПс *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наше исследование выявило негативное влияние обработки SDS на сохранение одного из основных компонентов естественного ВКМ – ГАГ. Оптимизация режима химической децеллюляризации фрагментов печени свиньи путем двухэтапного применения поверхностно-активных и осморегулирующих веществ позволила сократить время обработки ткани почти в 2 раза, повысить сохранность структур ВКМ и снизить содержание клеточных компонентов в составе матрикса, обеспечив низкую потенциальную иммуногенность и отсутствие цитотоксического эффекта.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Dai Q, Jiang W, Huang F, Song F, Zhang J, Zhao H. Recent advances in liver engineering with decellularized scaffold. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10: 831477. doi: 10.3389/fbioe.2022.831477.
2. Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater.* 2021; 10: 15–31. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.09.014.
3. Isaeva EV, Beketov EE, Arguchinskaya NV, Ivanov SA, Shegay PV, Kaprin AD. Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering (Review). *Sovrem Tekhnologii Med.* 2022; 14 (3): 57–68. doi: 10.17691/stm2022.14.3.07.
4. García-Garreta E, Abduldaiem Y, Sawadkar P, Kyriakidis C, Lali F, Greco KV. Decellularised scaffolds: just a framework? Current knowledge and future directions. *J Tissue Eng.* 2020; 11: 2041731420942903. doi: 10.1177/2041731420942903.
5. Biomimetics of Extracellular Matrices for Cell and Tissue Engineered Medical Products / Ed. V.I. Sevastianov, Yu.B. Basok. Newcastle upon Tyne, UK: Cambridge Scholars Publishing, 2023; 339.
6. Sodhi H, Panitch A. Glycosaminoglycans in tissue engineering: a review. *Biomolecules.* 2020; 11 (1): 29. doi: 10.3390/biom11010029.
7. Huang Z, Godkin O, Schulze-Tanzil G. The challenge in using mesenchymal stromal cells for recellularization of decellularized cartilage. *Stem Cell Rev Rep.* 2017; 13 (1): 50–67. doi: 10.1007/s12015-016-9699-8.
8. Neishabouri A, Soltani Khaboushan A, Daghigh F, Kajbafzadeh AM, Majidi Zolbin M. Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: evaluation, modification, and application methods. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022; 10: 805299. doi: 10.3389/fbioe.2022.805299.
9. Jeong W, Kim MK, Kang HW. Effect of detergent type on the performance of liver decellularized extracellular matrix-based bio-inks. *J Tissue Eng.* 2021; 12: 2041731421997091. doi: 10.1177/2041731421997091.
10. Willemsse J, Versteegen MMA, Vermeulen A, Schurink IJ, Roest HP, van der Laan LJW, de Jonge J. 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.
11. Немец ЕА, Малкова АП, Духина ГА, Лажко АЭ, Басок ЮБ, Кириллова АД, Севастьянов ВИ. Влияние сверхкритического диоксида углерода на биосовместимые и резорбтивные свойства *in vivo* тканеспецифических матриксов из децеллюляризованных фрагментов печени свиньи. *Перспективные материалы.* 2021; 11: 20–31. Nemets EA, Malkova AP, Duhina GA, Lazhko AJ, Basok YuB, Kirillova AD, Sevastianov VI. Effect of supercritical carbon dioxide on the *in vivo* biocompatible and resorptive properties of tissue-specific scaffolds from decellularized pig liver fragments. *Promising materials.* 2021; 11: 20–31. [In Russ, English abstract]. doi: 10.30791/1028-978X-2021-11-20-31.
12. Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 9831534. doi: 10.1155/2017/9831534.
13. Syed O, Walters NJ, Day RM, Kim HW, Knowles JC. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomater.* 2014; 10 (12): 5043–5054. doi: 10.1016/j.actbio.2014.08.024.
14. Sevastianov VI, Basok YuB, Grigoriev AM, Nemets EA, Kirillova AD, Kirsanova LA et al. Decellularization of cartilage microparticles: Effects of temperature, supercritical carbon dioxide and ultrasound on biochemical, mechanical, and biological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2023; 111 (4): 543–555. doi: 10.1002/jbm.a.37474.
15. Bakhtiar H, Rajabi S, Pezeshki-Modaress M, Ellini MR, Panahinia M, Alijani S et al. Optimizing methods for bovine dental pulp decellularization. *J Endod.* 2021; 47 (1): 62–68. doi: 10.1016/j.joen.2020.08.027.
16. Kobes JE, Georgiev GI, Louis AV, Calderon IA, Yoshimaru ES, Klemm LM et al. A comparison of iron oxide particles and silica particles for tracking organ recellularization. *Mol Imaging.* 2018; 17: 1536012118787322. doi: 10.1177/1536012118787322.
17. Kim JK, Koh YD, Kim JO, Seo DH. Development of a decellularization method to produce nerve allografts using less invasive detergents and hyper/hypotonic solutions. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2016; 69 (12): 1690–1696. doi: 10.1016/j.bjps.2016.08.016.
18. 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.

19. Suss PH, Ribeiro VST, Motooka CE, de Melo LC, Tuon FF. Comparative study of decellularization techniques to obtain natural extracellular matrix scaffolds of human peripheral-nerve allografts. *Cell Tissue Bank*. 2022; 23 (3): 511–520. doi: 10.1007/s10561-021-09977-x.
20. Немец ЕА, Кирсанова ЛА, Басок ЮБ, Шагидулин МЮ, Волкова ЕА, Метельский СТ, Севастьянов ВИ. Особенности технологии децеллюляризации фрагментов печени человека как тканеспецифического мелкодисперсного матрикса для клеточно-инженерной конструкции печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2017; 19 (4): 70–77. Nemets EA, Kirsanova LA, Basok JB, Schagidulin MJ, Volkova EA, Metelsky ST, Sevastianov VI. Technology features of decellularization of human liver fragments as tissue-specific fine-grained matrix for cell-engineering liver construction. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2017; 19 (4): 70–77. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2017-4-70-77.
21. Кириллова АД, Басок ЮБ, Лажко АЭ, Григорьев АМ, Кирсанова ЛА, Немец ЕА, Севастьянов ВИ. Создание тканеспецифического микродисперсного матрикса из децеллюляризованной печени свиньи. *Физика и химия обработки материалов*. 2020; 4: 41–50. Kirillova AD, Basok YB, Lazhko AE, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Nemets EA, Sevastianov VI. Creating a tissue-specific microdispersed matrix from a decellularized porcine liver. *Physics and Chemistry of Materials Processing*. 2020; 4: 41–50. [In Russ, English abstract]. doi: 10.30791/0015-3214-2020-4-41-50.
22. ГОСТ ISO 10993-5-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*. М.: Стандартинформ, 2014; 9. GOST ISO 10993-5-2011. Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for *in vitro* cytotoxicity. М.: Standartinform, 2014; 9.
23. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development*. 2015; 142 (12): 2094–2108. doi: 10.1242/dev.114215.
24. Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenk-Layland K, Harasztosi C et al. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*. 2010; 31 (9): 2549–2554. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.088.
25. O'Neill JD, Anfang R, Anandappa A, Costa J, Javidfar J, Wobma HM et al. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann Thorac Surg*. 2013; 96 (3): 1046–1056. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.04.022.
26. Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB, Baptista PM, Aboushwareb T, Atala A, Yoo JJ. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials*. 2012; 33 (31): 7756–7764. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.023.

*Статья поступила в редакцию 17.08.2024 г.
The article was submitted to the journal on 17.08.2024*