

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-4-70-77

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ФРАГМЕНТОВ ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА КАК ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕЛКОДИСПЕРСНОГО МАТРИКСА ДЛЯ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПЕЧЕНИ

Е.А. Немец¹, Л.А. Курсанова¹, Ю.Б. Басок¹, М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, Е.А. Волкова¹,
С.Т. Метельский¹, В.И. Севастьянов¹

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

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

К одной из актуальных задач при создании биоинженерной печени как альтернативы трансплантации донорской печени при лечении терминальных стадий печеночной недостаточности относится поиск матрикса, способного временно выполнять функции внеклеточного матрикса (ВКМ) печени и обеспечивать необходимые условия для поддержания жизнеспособности и функциональной эффективности клеток. Основным недостатком матриксов из резорбируемых биополимерных материалов является отсутствие тканеспецифичности и невозможность воспроизведения уникальной структуры ВКМ печени. Цель настоящей работы состояла в разработке технологии получения децеллюляризованных фрагментов печени с сохранением структурных свойств ее ВКМ. **Материалы и методы.** Децеллюляризацию механически измельченных фрагментов печени человека проводили в трех сменах буферного раствора (рН = 7,4), содержащего 0,1% додецилсульфата натрия и повышающуюся концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3% соответственно). Исследовали влияние длительности, условий отмывки (статика, динамика, ротационная система, магнитная мешалка) и способов измельчения печени на сохранность структуры ВКМ печени и полноту удаления клеточных элементов и детрита. Срезы децеллюляризованных образцов фрагментов печени окрашивали гематоксилином и эозином, а также методом Массона для выявления соединительно-тканых элементов. **Результаты и обсуждение.** Методами гистологического анализа показано, что оптимальным является режим отмывки фрагментов печени в течение 3 суток при комнатной температуре в статике, сопровождающийся перемешиванием на магнитной мешалке 2–3 раза в сутки в течение 1 ч. Более длительное время или большая кратность режима перемешивания сопровождается увеличением риска нарушения структуры печеночной ткани. Предложен алгоритм предварительного исследования донорской печени человека с целью оптимизации процесса получения децеллюляризованных фрагментов печени. **Выводы.** Предложен алгоритм оценки пригодности донорской печени человека для децеллюляризации и найдены оптимальные условия получения децеллюляризованных фрагментов печени с сохранением структуры ВКМ печени и полным удалением клеточных элементов и детрита.

Ключевые слова: печень, децеллюляризация, внеклеточный матрикс, тканеспецифичность, тканеинженерная конструкция.

Для корреспонденции: Немец Евгений Абрамович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 193-86-62. E-mail: evgnemets@yandex.ru

For correspondence: Nemets Evgenij Abramovich. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (499) 193-86-62. E-mail: evgnemets@yandex.ru

TECHNOLOGY FEATURES OF DECELLULARIZATION OF HUMAN LIVER FRAGMENTS AS TISSUE-SPECIFIC FINE-GRAINED MATRIX FOR CELL-ENGINEERING LIVER CONSTRUCTION

E.A. Nemets¹, L.A. Kirsanova¹, Ju.B. Basok¹, M.Ju. Schagidulin^{1, 2}, E.A. Volkova¹, S.T. Metelsky¹, V.I. Sevastianov¹

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

One of the problems when you create a bioengineered liver, as an alternative to transplantation of the donor liver in the treatment of end-stage liver failure, is the matrix, able to temporarily perform the functions of the natural extracellular matrix (ECM) and provide the necessary conditions to maintain the viability of the liver cells. The main disadvantage of resorbable biopolymer matrices is the absence of tissue specific properties and the impossibility of reproducing the unique structure of the ECM of the liver. **Aim:** to develop technology for decellularization of liver tissue fragments, saving the structural properties of native ECM of the liver. **Materials and methods.** The decellularization of mechanically grinded human liver fragments was carried out in three changes of buffer solution (pH = 7.4) containing 0.1% sodium dodecyl sulfate and increasing the concentration of Triton X100 (1%, 2% and 3%, respectively). During technology development were investigated the effects of duration, conditions (static, dynamic, rotary system, magnetic stirrer) washing and methods of liver tissue grinding on the completeness of removal of cellular elements and detritus preserving the the liver ECM structure. Slices of decellularized liver tissue samples were stained by hematoxylin and eosin, and Masson method for the detection of connective-tissue elements. **Results.** Histological analysis methods showed that the best from the point of view of efficiency of decellularization and the safety of the structure of own human liver ECM, is a mode of washing of liver fragments for three days at room temperature in static conditions, accompanied by stirring by a magnetic stirrer for 2–3 times a day for one hour. Longer time or a large multiplicity of mixing mode is accompanied by increased risk of liver tissue damage. On the basis of the experimental results obtained the algorithm of preliminary study of donor human liver designed to optimize the process of obtaining decellularization fragments of liver tissue was elaborated. **Conclusion.** It was elaborated the algorithm and technology of obtaining of decellularized liver tissue fragments from the human donor liver which saved the structural properties of native ECM of the liver and complete removal of cellular elements and detritus.

Key words: liver, decellularization, extracellular matrix, tissue specificity, a tissue-engineered construction.

ВВЕДЕНИЕ

Пересадка солидных органов остается единственным радикальным способом сохранения жизни пациенту с терминальной стадией. Острейшей проблемой современной клинической трансплантологии является повсеместная нехватка донорских органов, которая, согласно прогнозам на ближайшие годы, будет только увеличиваться. В связи с этим чрезвычайно актуальным остается поиск альтернативных трансплантации способов лечения. В последние годы основной акцент в решении этой задач делается на использование технологий тканевой инженерии, направленных на создание биоинженерных эквивалентов жизненно важных органов. Суть данного подхода заключается в создании *in vitro* или *in vivo* имплантируемых длительно функционирующих специализированных биомедицинских клеточных продуктов – клеточно- и тканеинженерных конструкций солидных органов (сердце, печень, почка, поджелудочная железа, легкие) [1, 2].

Биоискусственные системы представляют собой сочетание биodeградируемого матрикса на ос-

нове материалов различной природы и нативных биологических структур (биологически активные молекулы, факторы роста, функционирующие клетки и т. д.). Одной из ключевых задач является создание каркасов (матрикс) биоискусственных органов с необходимыми физико-химическими и биологическими свойствами. Наибольшее предпочтение отдается биополимерным матриксам на основе альгинатов, коллагена, желатина, хитозана, гиалуроновой кислоты, полиэфиров бактериального происхождения. Эти матриксы наряду с высокотехнологичными свойствами обладают в разной степени выраженности биосовместимостью, механической прочностью, эластичностью, биodeградельностью, отсутствием иммуногенности. Однако эти матриксы не обладают тканеспецифичной каркасностью, и потому нуждаются в декорировании их поверхности путем введения дополнительных структур – сайтов для адгезии клеток.

Известны способы изготовления нативного матрикса различных паренхиматозных органов, обеспечивающие изготовление тканеспецифично-

го объемного матрикса – каркаса целого органа с сохранением архитектоники ткани и микроциркуляторного русла путем децеллюляризации органа: печени, почек, сердца и других органов [3]. Каркасные белки нативных (цельных) матриксов интегративно содержат в своем составе остатки тканевых структур (гликопротеиды внеклеточного вещества, структурные белки межклеточных контактов и факторы прикрепления клеток), которые позволяют оптимизировать условия для пролонгированной жизнедеятельности прикрепившихся клеток.

В литературе описаны успешные эксперименты по децеллюляризации целой печени животных: крыс [4], кроликов [5], свиньи [6]. Также описан эксперимент по децеллюляризации левой латеральной доли, взятой у пациента с гемангиомой печени [7]. Однако не решены такие вопросы, как высокий процент неполной децеллюляризации трупных донорских трансплантатов из-за возникающих в нем нарушений микроциркуляции; полноценного заселения клетками всего объема децеллюляризованных матриксов; сложность доставки кислорода и питательных веществ ко всем прикрепленным донорским клеткам, особенно в глубине матрикса; сложность и низкая эффективность децеллюляризации и реинжиниринга децеллюляризованных органных матриксов и др.

Одним из решений существующих проблем при использовании цельной децеллюляризованной печени в качестве матрикса для создания биоинженерной конструкции печени является децеллюляризация фрагментов печени.

Цель настоящей работы состояла в разработке способа изготовления из децеллюляризованной ткани печени мелкодисперсного матрикса, сохраняющего нативные свойства и тканеспецифичность, в качестве каркаса при создании клеточно-инженерной конструкции печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Забор донорского человеческого материала

Эксперименты были выполнены на человеческой печени, которая не могла быть использована для трансплантации: участки здоровой печени, которые не помещались в организм реципиента в силу его антропометрических данных и полученные в результате резекции или донорские органы с выраженным жировым гепатозом. Полученные образцы транспортировали в стерильном физиологическом растворе и замораживали при температуре -20°C .

Процесс децеллюляризации

Фрагменты печени человека (ФПЧ) получали измельчением на механическом гомогенизаторе

MPW-302 (Польша) в течение 15–30 секунд или вручную при помощи ножниц и скальпеля (размер фрагментов не более $1 \times 1 \times 3$ мм). Децеллюляризацию проводили в трех сменах фосфатного буферного раствора (ФБС) (138 mM NaCl , $2,67 \text{ mM KCl}$, $1,47 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $8,1 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH } 7,4$, $\text{pH} = 7,4$), содержащего додецилсульфат натрия (SDS) и повышающую концентрацию Тритона X100:

А. 400 мл ФБС, содержащего 1% Triton X-100 и 0,1% SDS.

Б. 400 мл ФБС, содержащего 2% Triton X-100 и 0,1% SDS.

В. 400 мл ФБС, содержащего 3% Triton X-100 и 0,1% SDS.

В каждом растворе образец обрабатывали в течение суток в условиях постоянного перемешивания на ротационной системе для флаконов (2 об./мин) или при периодическом (1–3 раза в сутки по 1 часу) перемешивании на магнитной мешалке. По окончании процесса децеллюляризации ФПЧ ополаскивали на фильтре 400 мл ФБС и тщательно отмывали от остатков поверхностно-активных агентов в течение 72 часов со сменой буферного раствора (400 мл ФБС) один раз в сутки.

Для сохранения нативных свойств матрикса проводили лиофилизацию полученных децеллюляризованных фрагментов печени человека: сначала их замораживали в течение 15 часов при температуре -40°C , затем высушивали в лиофильной сушке Labconco Free Zone при давлении 0,02–0,03 мБар в течение 2 суток.

Гистологическое исследование образцов децеллюляризованной печени

Образцы децеллюляризованной печени фиксировали в 10-процентном растворе формалина на ФБС, промывали в течение 15 минут в проточной воде и обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (70, 80, 96%; по 5 минут в каждой смене спиртового раствора), выдерживали по 5–7 минут в смеси этанола и хлороформа, хлороформе и заливали в парафин.

Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные с помощью микротомы Leica RM3255, депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, а также по методу Массона для выявления соединительно-тканых элементов. Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon eclipse, оснащенный цифровой фотокамерой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты сравнительного анализа влияния выбора способа предварительного механического измельчения и режима перемешивания на эффективность децеллюляриза-

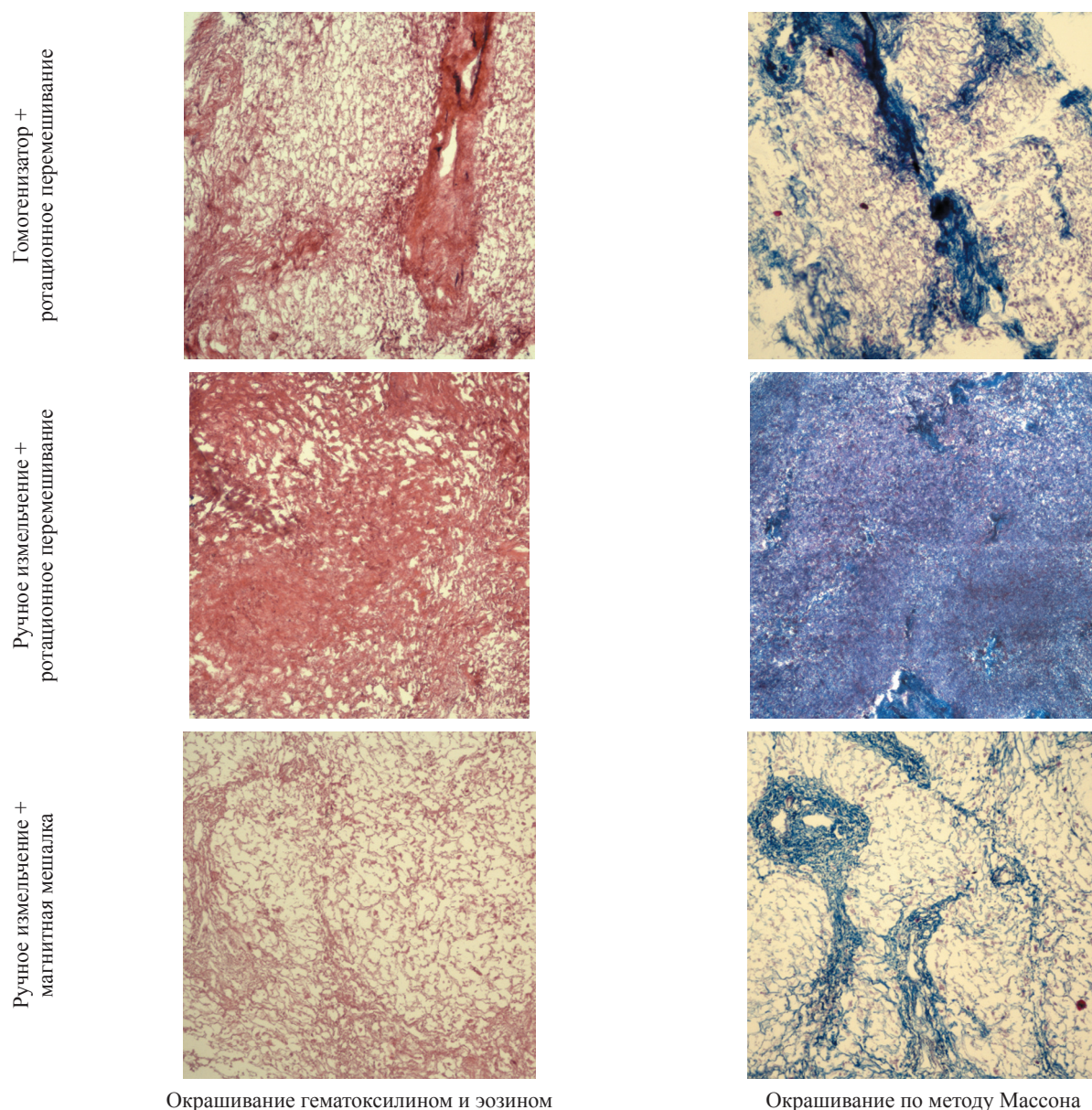


Рис. 1. Влияние выбора способа предварительного механического измельчения и режима перемешивания на эффективность децеллюляризации ФПЧ печени человека. $\times 100$

Fig. 1. The influence of the preliminary mechanical grinding method and mixing mode on the efficiency of HLF decellularization. $\times 100$

ции ФПЧ. Эксперимент был проведен на фрагментах печени одного и того же донора.

Как видно из рис. 1, при режиме отмытки с применением механического измельчения на гомогенизаторе с последующим использованием для перемешивания ротационной системы децеллюляризованный образец имел волокнисто-гранулярную структуру с преобладанием волокнистого компонента. При этом в ячейках, образованных волокнами стромы, выявлялось значительное количество пикнотических ядер и сохранившихся неразрушенными печеночных клеток.

В случае ручного механического измельчения и последующей децеллюляризации с применением

ротационной системы в препарате наблюдали плохо отмытый плотный образец с высоким содержанием клеточного детрита и выраженной отеком компонентов стромы.

Наилучший результат – практически полностью волокнистую структуру с минимальным содержанием фрагментов клеточного детрита – продемонстрировал образец, полученный при измельчении ткани вручную с применением магнитной мешалки в циклическом режиме (3 раза в сутки по одному часу). Однако при окрашивании на соединительную ткань (по Массону) в препарате выявили отдельные разрывы коллагеновых волокон стромы, что дало основания предположить

некоторую избыточность данного режима перемешивания.

С целью отработки алгоритма перемешивания в процессе отмывки ФПЧ от гепатоцитов было проведено два эксперимента, в ходе которых контролировали эффективность децеллюляризации в зависимости от выбора режима перемешивания и длительности процесса.

Было применено три режима:

1. Один раз в сутки перемешивание на магнитной мешалке в течение 1 часа, остальное время (23 часа) – отмывка в статике.
2. Два раза в сутки перемешивание на магнитной мешалке по 1 часу, остальное время (22 часа) – отмывка в статике.

3. Три раза в сутки перемешивание на магнитной мешалке по 1 часу, остальное время (21 час) – отмывка в статике.

На рис. 2 суммированы результаты первого из экспериментов. Образцы трупной печени механически измельчали при помощи ножниц и скальпеля на фрагменты, размерами не превышающими $1 \times 1 \times 3$ мм, и децеллюляризовали в растворах 0,1% SDS и Triton X-100 с повышающейся концентрацией.

Как видно из рис. 2, чем энергичнее производилась отмывка с применением магнитной мешалки, тем эффективнее шел процесс децеллюляризации. В первый день обработки образцы ФПЧ, отмываемые в условиях однократного или двукратного перемешивания,

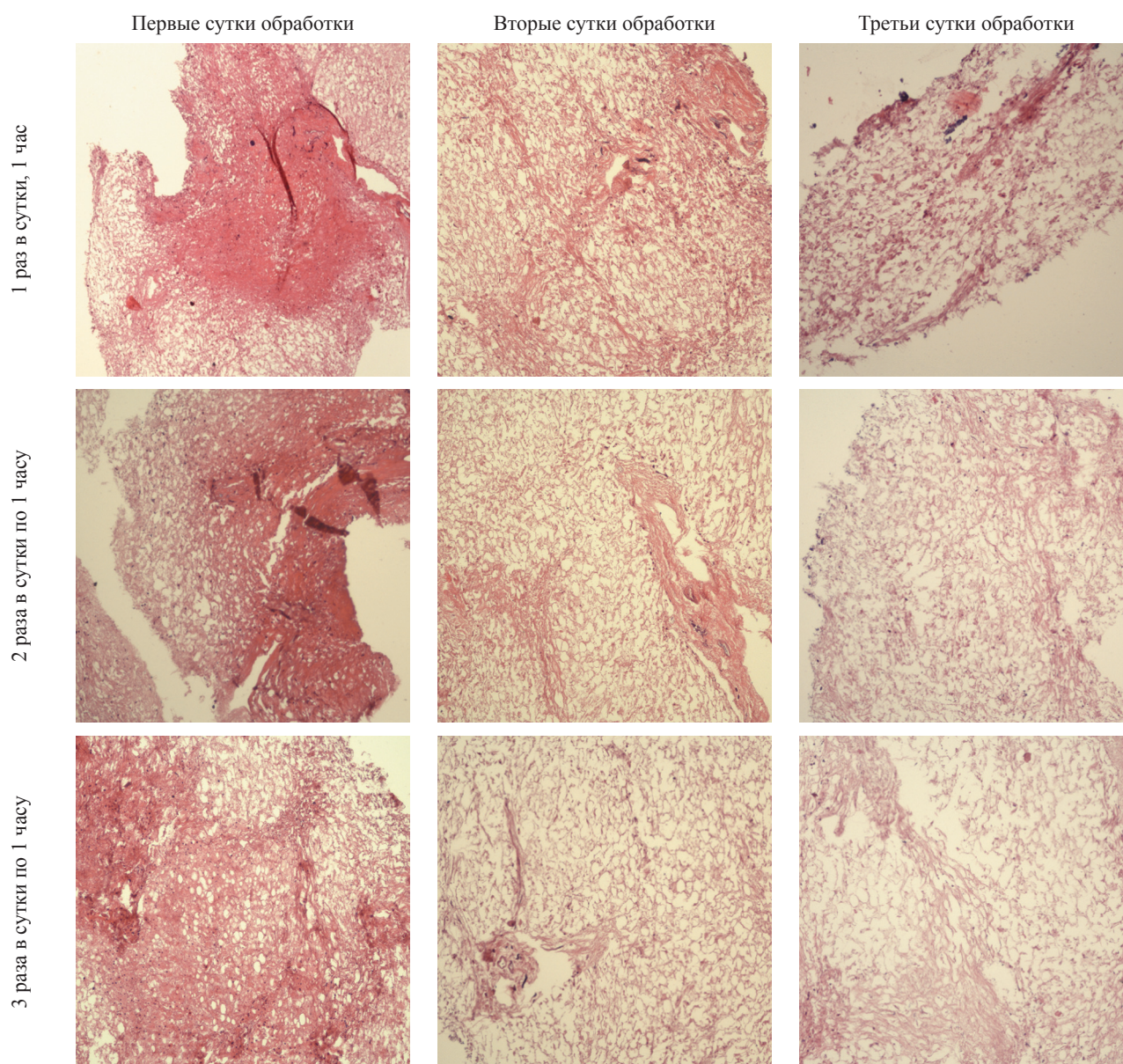


Рис. 2. Эффективность децеллюляризации мелкодисперсных фрагментов печени человека в зависимости от выбора режима перемешивания и длительности обработки (окрашивание гематоксилином и эозином). $\times 100$. Эксперимент 1

Fig. 2. The effectiveness of HLF decellularization depending on the choice of mixing mode and treatment duration (staining with hematoxylin and eosin). $\times 100$. Experiment 1

вания, имели преимущественно плотную структуру с большим количеством сохранившихся клеток и высоким содержанием клеточного детрита. В случае трехкратного перемешивания уже после первых суток отмывки волокнистый компонент стромы в образце становился более выраженным. Однако в толще ФПЧ сохранялся более плотный участок, в котором обнаружили немногочисленные целые клетки с гиперхромными пикнотичными ядрами и мелкие фрагменты клеточного детрита.

На вторые сутки отмывки все образцы имели преимущественно рыхлую, волокнистую структуру, однако в образце, обработанном с применением магнитной мешалки один раз в сутки, выявлялись небольшие более плотные (менее отмывые) участки

с высоким содержанием фрагментов клеточного детрита. Лучше всего был отмыт образец после трехкратного перемешивания: обнаруживались лишь одиночные клетки в состоянии деструкции (рис. 2).

После третьих суток децеллюляризации стало очевидно, что однократного перемешивания явно недостаточно для эффективной отмывки мелкодисперсных фрагментов печени человека: в исследуемых образцах наряду с рыхлыми обнаруживались включения плотных, плохо отмываемых участков. Образцы, полученные с применением двукратной и трехкратной обработки при помощи магнитной мешалки, продемонстрировали характерную волокнисто-ячеистую структуру стромы хорошо отмываемой ткани с минимальным содержанием клеточного де-

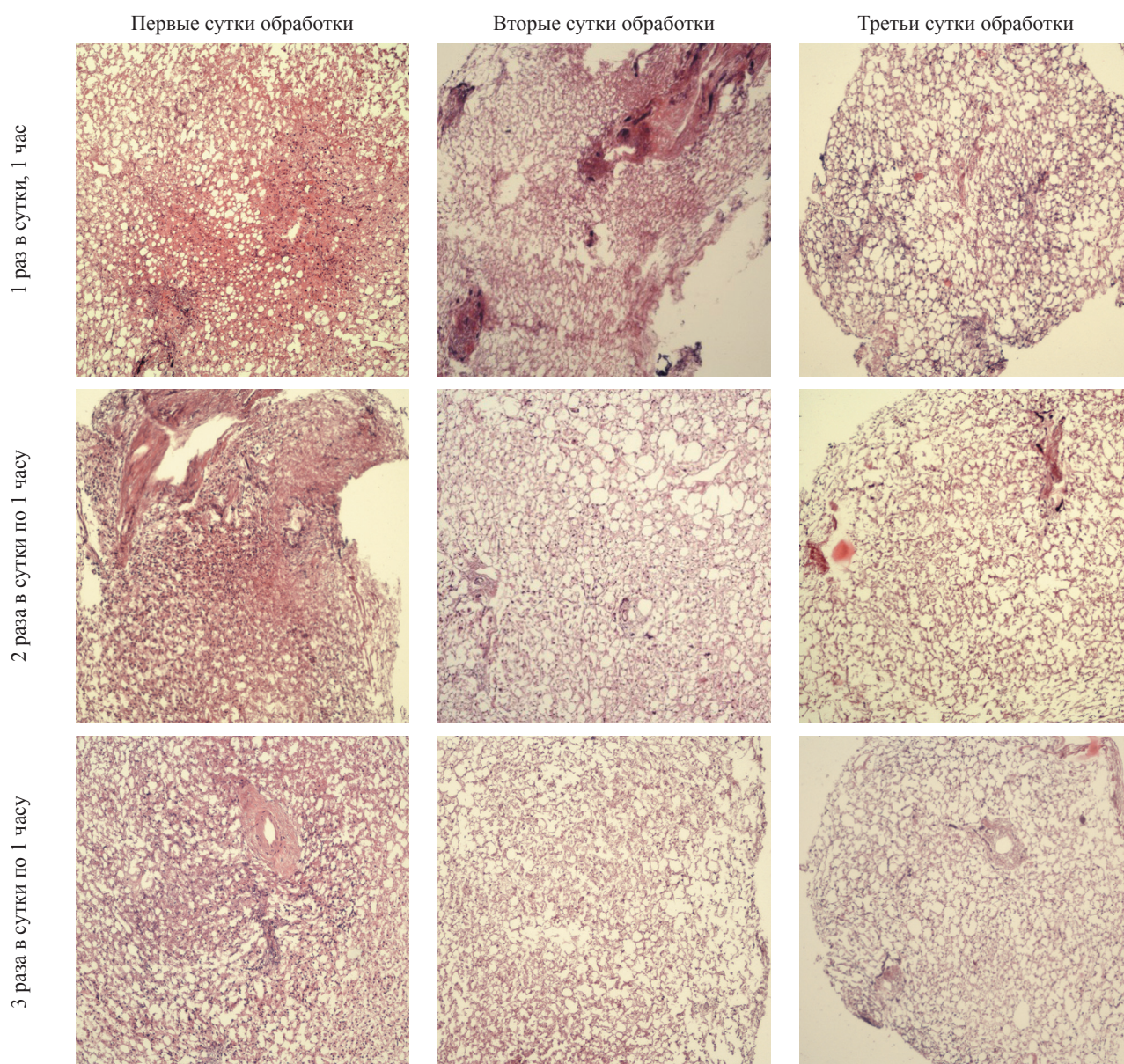


Рис. 3. Эффективность децеллюляризации мелкодисперсных фрагментов печени человека в зависимости от выбора режима перемешивания и длительности обработки (окрашивание гематоксилином и эозином). $\times 100$. Эксперимент 2

Fig. 3. The effectiveness of HLF decellularization depending on the choice of mixing mode and treatment duration (staining with hematoxylin and eosin). $\times 100$. Experiment 2

трита. Эффективность отмывки в случае трехкратного режима перемешивания несколько выше, однако при этом обнаруживались многочисленные разрывы коллагеновых нитей, что свидетельствует о частичном разрушении уникальной структуры матрикса.

Таким образом, оптимальной с точки зрения эффективности децеллюляризации и сохранения уникальной структуры внеклеточного матрикса в данном случае оказалась обработка с режимом перемешивания на магнитной мешалке – два раза в сутки по 1 часу.

Результаты, полученные в ходе второго эксперимента по изучению эффективности децеллюляризации в зависимости от выбора режима перемешивания и длительности процесса (рис. 3), в целом совпали с экспериментальными данными, полученными в ходе выполнения эксперимента 1 (рис. 2).

Однако во втором эксперименте при трехкратном режиме перемешивания следов частичного разрушения в структуре матрикса не было обнаружено. Следовательно, для данного препарата печени именно этот режим можно рекомендовать в качестве оптимального.

Также во всех образцах из эксперимента № 2, отмываемых по завершенному циклу децеллюляризации (три смены общей длительностью 1 сутки, в растворах 0,1% SDS и Triton X-100 с повышающейся концентрацией), отметили наличие пикнотичных клеточных ядер, которые присутствовали в ткани печени изначально (рис. 4) и при использованном способе обработки не разрушались.

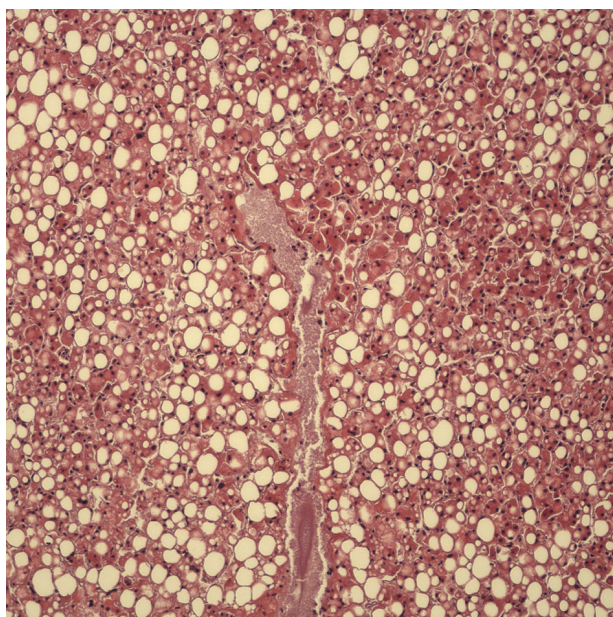


Рис. 4. Препарат исходной печени, децеллюляризация которой производилась в эксперименте 2 (окрашивание гематоксилином и эозином). $\times 100$

Fig. 4. Initial liver which was used for decellularization in experiment 2 (staining with hematoxylin and eosin). $\times 100$

Следовательно, образцы донорской печени с признаками кариопикноза не могут быть использованы в качестве источника получения тканеспецифического матрикса печени для биомедицинских клеточных продуктов.

На основе полученных экспериментальных данных был оптимизирован процесс децеллюляризации ФПЧ и разработан алгоритм предварительного исследования донорской печени человека с целью получения тканеспецифического матрикса печени, пригодного для использования в качестве носителя в тканевой инженерии.

Алгоритм заключается в следующем:

1. Препарат печени исследуют на присутствие гиперхромных пикнотичных ядер гепатоцитов и в случае их отсутствия приступают к пробной децеллюляризации.
2. Пилотные фрагменты мелкодисперсного матрикса, полученные путем механического измельчения, подвергают децеллюляризации в растворах 0,1% натриевой соли додецилсульфата натрия (SDS) и Triton X-100 с повышающейся концентрацией при двух режимах перемешивания на магнитной мешалке: два или три раза в сутки.
3. По результатам гистологического исследования полученных пилотных образцов выбирается режим перемешивания, оптимальный для данной донорской печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология получения децеллюляризованного носителя, состоящего из внеклеточного матрикса, выделенного из печени человека, заключающаяся в последовательной обработке предварительно измельченных фрагментов донорской печени в трех сменах буферного раствора ($\text{pH} = 7,4$), содержащего 0,1% додецилсульфата натрия и повышающуюся концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3% соответственно).

Показано, что пикнотичные ядра в процессе децеллюляризации под действием додецилсульфата натрия и Тритона X100 не разрушаются, поэтому образцы ткани печени, исходно содержащие пикнотичные ядра, не пригодны для получения децеллюляризованного носителя.

Доказано, что оптимальным с точки зрения эффективности децеллюляризации и сохранения структуры матрикса печени человека является режим отмывки ее фрагментов в течение трех суток при комнатной температуре в статике, сопровождающийся перемешиванием на магнитной мешалке дважды или трижды в сутки в течение одного часа. При таком режиме обработки паренхима трупной печени хорошо отмывается от клеточных элементов и остатков клеточного детрита. Более длительное время или большая кратность режима перемешива-

ния сопровождается повышением риска нарушения структуры стромы печеночной ткани.

Разработан алгоритм предварительного исследования донорской печени человека с целью получения тканеспецифического матрикса печени, пригодного для использования в качестве носителя в тканевой инженерии.

Работа выполнена при частичном финансировании государственного задания по теме «Разработка и экспериментальное исследование тканеспецифических матриксов для биомедицинских клеточных продуктов» (№ государственной регистрации 115102010014).

The work was performed with partial funding by state assignment on the topic «Development and experimental study of tissue-specific matrices for biomedical cell products» (№ state registration 115102010014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Sevastianov VI. Technologies of tissue engineering and regenerative medicine. *Russian J. of Transplantology and Artificial Organs*. 2014; 16 (3): 93–108.
2. Shagidulin M, Onishchenko N, Krashennnikov M et al. Treatment of chronic liver failure by transplantation of liver cells and bone marrow stem cells: 1 year experience // Proceeding of the European Society for Surgical Research, ESSR 2012, 47th Annual Congress (6–9 June 2012, Lille, France). 2012: 77–81.
3. Morris AH, Stamer DK, Kyriakides TR. The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials. *Semin. Immunol.* 2017; pii: S1044-5323(16)30110-5.
4. Sabetkish S, Kajbafzadeh AM, Sabetkish N, Khorrami-rooz R, Akbarzadeh A, Seyedian SL et al. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2015; 103 (4): 1498–1508.
5. Nari GA, Cid M, Comin R, Reyna L, Juri G, Taborda R, Salvatierra NA. Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2013; 105 (3): 138–143.
6. Bühler NE, Schulze-Osthoff K, Königsrainer A, Schenk M. Controlled processing of a full-sized porcine liver to a decellularized matrix in 24 h. *J. Biosci Bioeng.* 2015; 119 (5): 609–613.
7. Zheng X, Xiang J, Wu W, Liu X, Liu W, Lü Y. Preparation of a decellularized scaffold derived from human liver tissue. *Nan. Fang. Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2015; 35 (7): 1028–1033.

*Статья поступила в редакцию 25.09.2017 г.
The article was submitted to the journal on 25.09.2017*