

Кириллова Александра Дмитриевна

**ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МАТРИКСЫ
ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ПЕЧЕНИ
И СУСТАВНОГО ХРЯЦА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель

доктор биологических наук,
профессор

Севастьянов Виктор Иванович

Официальные оппоненты:

Кирпатовский Владимир Игоревич - доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Антонова Лариса Валерьевна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «21» сентября 2021 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России и на сайте <http://transpl.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСТИО 001.21
кандидат ветеринарных наук

Волкова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Дефицит донорских органов диктует необходимость поиска альтернативных трансплантации подходов к лечению заболеваний различных органов. Одним из таких подходов является разработка клеточно-инженерных конструкций для замещения функций поврежденных органов или стимуляции процессов их физиологической регенерации [Севастьянов В.И., 2014].

Основными компонентами клеточно-инженерных конструкций, являющимися биомедицинскими клеточными продуктами, являются:

1) клеточные культуры, способные сформировать функциональный внеклеточный матрикс;

2) матриксы, выполняющие роль трехмерных носителей клеточного материала, каркасов и, в ряде случаев, питательной среды при формировании 3D-тканевых структур;

3) биоактивные молекулы - цитокины и факторы роста, стимулирующие процессы миграции и дифференцировки клеток.

На данный момент для создания матриксов используют множество материалов, как природного, так и синтетического происхождения [Севастьянов В.И. и др., 2011]. Однако наиболее перспективными на сегодняшний день являются тканеспецифические матриксы, полученные после децеллюляризации нативных тканей и органов. Известно, что основной функцией внеклеточного матрикса является обеспечение жизнедеятельности и функциональной активности клеточных структур. Именно тканеспецифические матриксы могут в наибольшей степени имитировать специфичный состав и структуру внеклеточного матрикса различных органов и тканей, что обуславливает их потенциальную способность эффективно стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток, и, соответственно, регенерацию поврежденной ткани. Заметим, что при разработке способов и режимов децеллюляризации следует учитывать не только структурные особенности исходной ткани, но и ее видовую специфичность.

Основная проблема при удалении клеточного и генного материала в процессе децеллюляризации заключается в необходимости максимально возможного сохранения структурных и биохимических свойств, присущих внеклеточному матриксу нативной ткани или органов [Wang Y. et al., 2015]. В связи с этим, на наш взгляд, целесообразным является децеллюляризация не целого органа, а его фрагментов [Севастьянов В.И. и др., 2020; Готье С.В. и др., 2019], что позволяет увеличить эффективность обработки ткани децеллюляризирующими агентами и уменьшить время их воздействия. Кроме того, в случае микронизации децеллюляризованных фрагментов происходит еще большее увеличение площади контакта матрикса со средой при сохранении его общего объема, что улучшает адгезию и пролиферации клеток.

Цель исследования: разработка и исследование тканеспецифических матриксов тканей печени и суставного хряща для создания биомедицинских клеточных продуктов.

Задачи исследования

1. Изучить влияние видовой специфичности и морфологии исходной ткани на изменение структуры, концентрации ДНК и гликозаминогликанов в процессе децеллюляризации.
2. Найти оптимальные способы и режимы децеллюляризации ткани печени крысы, свиньи и суставного хряща свиньи.
3. Разработать лабораторные регламенты децеллюляризации ткани печени и суставного хряща свиньи.
4. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* оценить биологическую безопасность тканеспецифических матриксов из децеллюляризованных тканей печени и суставного хряща свиньи.
5. Исследовать *in vitro* функциональные свойства тканеспецифических матриксов из децеллюляризованных тканей печени и суставного хряща свиньи.

Научная новизна

- установлены особенности процесса децеллюляризации ткани печени в зависимости от её видовой специфичности и принципиальные различия в процессе децеллюляризации ткани печени и хрящевой ткани.
- проведено сравнительное исследование морфологических и биохимических свойств тканеспецифических матриксов на основе децеллюляризованных тканей, различающихся по видовой специфичности и типу.
- разработаны лабораторные регламенты децеллюляризации ткани печени и суставного хряща свиньи, обеспечивающие наименьшие изменения микроархитектоники ткани, а также содержания гликозаминогликанов, по сравнению с исходной тканью, при минимальном количестве ДНК.
- в экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказана биологическая безопасность тканеспецифических матриксов из децеллюляризованной ткани печени и суставного хряща свиньи.
- в экспериментах *in vitro* доказана способность тканеспецифических матриксов из децеллюляризованной ткани печени и суставного хряща свиньи поддерживать жизнеспособность и специфическую активность клеточных культур.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе проведения исследования результаты являются основой для разработки клеточно-инженерных конструкций печени и хряща, в которых одним из основных компонентов будет тканеспецифический матрикс на основе ксеногенных децеллюляризованных тканей печени и суставного хряща.

Методология и методы диссертационного исследования

В качестве объектов исследования были выбраны печень крысы и свиньи, суставной хрящ свиньи, а также образцы тканеспецифических матриксов на основе децеллюляризованных тканей печени и хряща.

В работе применяли комплекс методов: гистологических для анализа морфологических особенностей объектов исследования, флуоресцентной микроскопии для первичной оценки эффективности децеллюляризации, биохимические методы для количественной оценки ДНК и содержания гликозаминогликанов в децеллюляризованной ткани.

Биосовместимые свойства тканеспецифических матриксов оценивали *in vitro* по степени цитотоксичности и гемолитической активности образцов и *in vivo* при их внутримышечной имплантации лабораторным животным.

Исследования *in vitro* функциональной эффективности тканеспецифических матриксов из децеллюляризованной ткани печени и суставного хряща проводили относительно способности матриксов поддерживать адгезию, жизнеспособность и специфическую активность клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и процессы адгезии, пролиферации и хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека, соответственно.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Оптимальные способы и режимы децеллюляризации зависят от видовой специфичности и структуры исходной ткани.

2. Разработанные лабораторные регламенты децеллюляризации ткани печени и суставного хряща свиньи обеспечивают наименьшие изменения в микроархитектонике и концентрации гликозаминогликанов, а также минимальное количество ДНК в децеллюляризованных образцах по сравнению с исходной тканью.

3. Биосовместимые свойства полученных тканеспецифических матриксов из децеллюляризованной ткани печени и суставного хряща свиньи отвечают критериям биологической безопасности *in vitro* и *in vivo*.

4. Тканеспецифический матрикс из децеллюляризованной ткани печени свиньи поддерживает адгезию, жизнеспособность и специфическую активность клеточной культуры HepG2.

5. Тканеспецифический матрикс из децеллюляризованного суставного хряща свиньи поддерживает адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку клеточной культуры мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечивается четкой постановкой задач, достаточным объемом исследования, применением современных лабораторных методов исследования, корректной статистической обработкой данных и всесторонней оценкой полученных результатов в сравнении с данными научной литературы.

Апробация работы состоялась 04 июня 2021 года на совместной конференции научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения и результаты диссертации были доложены и обсуждены на III Сеченовском международном биомедицинском саммите (SIBS-2019) (Москва, 20–21 мая 2019 г.); Научно-практической конференции с международным участием «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» (Ростов-на-Дону, 30 сентября–06 октября 2019 г.); XVI Российской ежегодной конференции молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (Москва, 1–4 октября 2019 г.); IV Национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 7–9 октября 2019); IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 20–23 ноября 2019); Конгрессе Молодых ученых Европейского общества искусственных органов «Cloud-yESAO» (7–11 сентября, 2020 г.); IV Международном конгрессе ассоциации ревмоортопедов (Москва, 18–19 сентября 2020 г.); X Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 5–7 октября 2020 г.); VII Троицкой конференции с международным участием «Медицинская физика» (Троицк, 19–21 октября 2020 г.); Шестом междисциплинарном научном форуме с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 23–26 ноября 2020 г.); IV Сеченовском международном биомедицинском саммите (SIBS-2020) (Москва, 17–18 ноября 2020 г.).

Связь работы с научными программами, планами, темами

Диссертационная работа выполнялась в рамках государственного задания Минздрава России на осуществление научных исследований и разработок по теме: «Создание и экспериментальное исследование биомедицинских клеточно- и тканеинженерных продуктов печени и хряща на основе композитных тканеспецифических резорбируемых матриц» (2018–2020 гг.), № государственной регистрации АААА-А18-118012390460-3, гранта РФФИ № 18-29-06012 «Сверхкритический диоксид углерода как инструмент повышения биосовместимых и функциональных свойств биополимерных и тканеспецифических матриц для клеточно- и тканеинженерных конструкций» (2018-2021 гг.).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практику отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в образовательный процесс кафедры трансплантологии и искусственных органов Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в разработке способов децеллюляризации тканей печени и хряща, в процессе получения тканеспецифических матриксов на основе децеллюляризованных тканей печени и хряща, в оценке эффективности децеллюляризации ткани суставного хряща свиньи с применением окрашивания образцов флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) и в проведении биохимических исследований тканеспецифических матриксов.

Автор самостоятельно осуществляла обобщение, анализ и статистическую обработку полученных результатов.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 23 научные работы, в том числе 9 статей: 6 из них - в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Центра, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 3 статьи - в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах данных; 14 публикаций - в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций. Получен патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, результатам собственных исследований и их обсуждению, заключения, выводов и списка литературы, включающего 165 источников, в том числе 24 отечественных и 141 зарубежных. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, иллюстрирована 32 рисунками, содержит 6 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Объекты исследования

Для получения тканеспецифических матриц и проведения дальнейших исследований были использованы следующие объекты. Печень половозрелых крыс-самцов породы Wistar (вес 180-220 г), полученных из питомника лабораторных животных (ООО «Кролинфо»). Печень и суставной хрящ свиньи (вес 120 кг), полученные на бойне ООО «АПК «ПРОМАГРО» после забоя здоровых животных.

Мелкодисперсные фрагменты печени (МФП) получали измельчением образцов печени вручную с помощью ножниц (размер не более 2x2x2 мм). Суставной хрящ нарезают фрагментами размером не более 5x5x5 мм, замораживали при -20°C и хранили при этой температуре до момента начала криопомола.

Все манипуляции с животными проводили с соблюдением биоэтических принципов, утверждённых Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях ETS N 123 и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утверждёнными Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н.

Метод криопомола для получения микрочастиц свиного хряща

Для получения микрочастиц суставного хряща (МСХ) требуемого диапазона размеров применяли метод криопомола с использованием криомельницы CryoMill (RetchGmbH, Германия), которая позволяет проводить помол в условиях непрерывного охлаждения жидким азотом. Микрочастицы хряща получали в криомельнице при частоте помола 25 Гц в течение 3 минут. Фракции частиц требуемого размера в диапазоне 100-250 мкм выделяли просеиванием помола через набор сит с соответствующим размером пор.

Методы децеллюляризации

Для сравнительного анализа эффективности децеллюляризации ткани печени и суставного хряща были выбраны следующие способы, модифицированные в процессе разработки оптимальных протоколов децеллюляризации:

- обработка растворами поверхностно-активных веществ (ПАВ) [Онищенко Н.А. и др., 2016];
- низкая и высокая ионная сила децеллюляризирующего раствора (осмотический шок) [Gardin C. et al, 2015];
- циклическое замораживание/оттаивание [Utomo L. et al., 2015];
- обработка в среде сверхкритического CO_2 (ск- CO_2) [Antons J. et al., 2018];
- обработка ДНКазой [Verstegen M.M.A. et al., 2017].

Обработка растворами поверхностно-активных веществ

Для выбора наиболее эффективного способа децеллюляризации МФП и МСХ были опробованы различные варианты децеллюляризации. Исходя из данных литературы [Онищенко Н.А. и др., 2016] инкубацию МФП и МСХ проводили в трёх сменах фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 0,1% додецилсульфат натрия (SDS) и повышающуюся концентрацию Triton X-100:

1. Раствор, содержащий 1% Triton X-100 + 0,1% SDS.
2. Раствор, содержащий 2% Triton X-100 + 0,1% SDS.
3. Раствор, содержащий 3% Triton X-100 + 0,1% SDS.

В каждом из трёх растворов образцы обрабатывали в течение суток при периодическом перемешивании (3 раза в сутки) на магнитной мешалке (ИКА, Германия) при различных скоростях перемешивания: 200, 300 и 400 об/мин. Время децеллюляризации для обоих видов ткани составляло 72 часа.

Для МФП дополнительно исследовали более щадящий режим децеллюляризации с применением ПАВ, но без контакта образца с перемешивающим элементом – с помощью ротационных систем INTEGRA (Швейцария) и BioSan (Латвия). В предварительных экспериментах были найдены минимально влияющие на структуру образцов скорости перемешивания - 2 и 5 об/мин.

***Низкая и высокая ионная сила децеллюляризирующего раствора
(осмотический шок) в сочетании с ПАВ***

Высокая и низкая ионная сила рабочих растворов

МФП при комнатной температуре обрабатывали последовательно раствором 0,1% SDS в дистиллированной воде, раствором 1N NaCl + 0,1% SDS (раствор с высокой ионной силой) и раствором PBS + 0,1% SDS (раствор с низкой ионной силой) в течение выбранного интервала времени.

Низкая ионная сила рабочего раствора

МФП при комнатной температуре обрабатывали последовательно раствором 0,1% SDS в дистиллированной воде и раствором PBS + 0,1% SDS (раствор с низкой ионной силой) в течение выбранного интервала времени.

В каждом из растворов образцы обрабатывали при периодическом перемешивании (3 раза в сутки) на магнитной мешалке. Дополнительно исследовали режим децеллюляризации МФП с применением метода осмотического шока и ПАВ, но без контакта образца с перемешивающим элементом – с помощью ротационных систем при скоростях перемешивания 2 и 5 об/мин.

Циклическое замораживание/оттаивание

Микрочастицы суставного хряща свиньи помещали в криопробирки и подвергали сухой заморозке в сосуде Дьюара при -196°C в течение одного часа, после чего производили оттаивание в термостате при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа. При необходимости цикл замораживание/оттаивание повторяли выбранное количество раз.

Обработка в среде сверхкритического CO_2

Для повышения эффективности децеллюляризации образцы хрящевой ткани свиньи дополнительно обрабатывались в атмосфере ск- CO_2 в ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова» РАН на установке Spe-ed™ SFE (Applied Separations, США) при давлении 300 Бар, температуре $+35^{\circ}\text{C}$, скорости потока ск- CO_2 $2,5 \pm 0,5$ мл/мин в течение 8-24 часов. Этанол в концентрации 10% был использован в качестве модификатора полярности.

Обработка ДНКазой

После децеллюляризации образцов с использованием ПАВ, для достижения полноты удаления клеточных компонентов, измеряемой по остаточному количеству ДНК, образцы обрабатывали в растворе ДНКазы I типа (New England Biolabs Inc., США). Образцы объемом 0,5 мл помещали в 1 мл буферного раствора, содержащего 50 Е/мл ДНКазы I и инкубировали в течение 48 часов при температуре +37°C.

Метод лазерного дифракционного анализа для определения размеров микрочастиц суставного хряща

Распределение микрочастиц хряща по размерам в суспензии определяли с помощью лазерного дифракционного анализатора SALD-7101 (Shimadzu, Япония). Длина волны лазера была равна 375 нм. В качестве дисперсионной среды был использован глицерин. Измерение проводили для трех репрезентативных образцов.

Методы гистологического анализа образцов

Образцы фиксировали в 10% растворе забуференного формалина в течение 24 часов, обезвоживали и заливали в парафин. Срезы депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Массона и альциановым синим. Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония), оснащенный цифровой фотокамерой.

Метод флуоресцентной микроскопии с использованием красителя DAPI для оценки полноты удаления ДНК

Степень децеллюляризации микрочастиц суставного хряща свиньи оценивали с использованием флуоресцентного красителя DAPI. Проводили окрашивание образцов в 24-луночной планшете раствором специфического для двухцепочечной ДНК флуоресцентного красителя DAPI в концентрации 1 мкг/мл (6 мг хряща на 1 лунку). Длина волны возбуждения красителя составляет 358 нм, длина волны максимума излучения - 461 нм.

В каждом образце, с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония), определяли количество микрочастиц матрикса (Рисунок 1):

- не децеллюляризованных;
- частично децеллюляризованных, содержащих отдельные клетки;
- полностью децеллюляризованных.

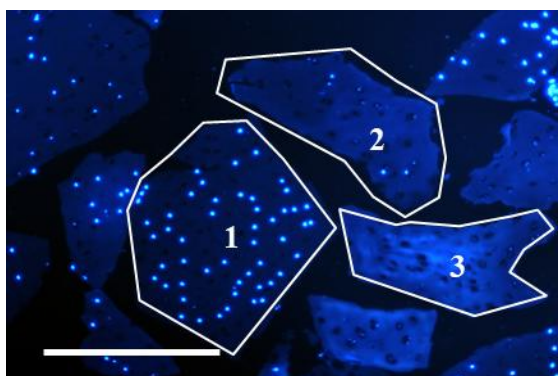


Рисунок 1 – Микрочастицы хряща свиньи после криопомола. Окрашивание DAPI: 1 – не децеллюляризованные микрочастицы; 2 – частично децеллюляризованные микрочастицы; 3 – полностью децеллюляризованные микрочастицы. Ув. x 200

Биохимическое исследование тканеспецифических матриц

Метод определения количества ДНК

Выделение ДНК проводили с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя.

Для количественного определения двухцепочечной ДНК использовали флуоресцентный краситель Quant-iT™ PicoGreen (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы активировались излучением с длиной волны 480 нм, и полученная термоэлектронная эмиссия анализировалась на планшетном спектрофлуориметре Tecan Spark 10M (Tecan Trading AG, Швейцария) при длине волны 520 нм.

Метод определения количества гликозаминогликанов

Для количественного определения гликозаминогликанов (ГАГ) образцы предварительно лиофилизовали. После лиофилизации образцы массой 30 мг (n=3) инкубировали в растворе папаина (Sigma-Aldrich, США) при +65°C в течение 12 часов.

Для количественного анализа ГАГ был использован катионный краситель 1,9-диметилметиленовый синий (Sigma-Aldrich, США), специфически связывающийся с сульфатированными ГАГ. Окрашивание проводили в 96-луночной планшете: в лунку добавляли 20 мкл лизата и 200 мкл рабочего раствора красителя с последующим определением на спектрофлуориметре Tecan Spark 10M (Tecan Trading AG, Швейцария) при длине волны 525 нм.

Метод определения *in vitro* цитотоксичности

Цитотоксичность образцов исследовали в соответствии с ГОСТ ISO 10993–5–2011. Применяли метод прямого контакта и метод вытяжек из образцов на культуре МСК ЖТч, полученной из фрагмента подкожной жировой клетчатки от здорового донора в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова».

Через 24 часа инкубации оценивали морфологию и лизис клеток. Для выявления возможного пролонгированного цитотоксического эффекта наблюдение за ростом клеток вели вплоть до 3 суток. Отрицательным контролем служила культуральная среда для клеток МСК ЖТч, содержащая сыворотку, положительным – стандартный раствор цинка в азотной кислоте. Анализ и фотосъемку образцов проводили, используя световой микроскоп Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония). МСК ЖТч окрашивали по Гимзе.

Метод испытаний *in vitro* гемолитической активности

Гемолитическую активность образцов определяли совместно с АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» в соответствии с ГОСТ ISO 10993–4–2011 непрямым методом, а именно, по гемолизу, индуцированного веществами, экстрагируемыми из тестируемого объекта.

К исследуемым образцам добавляли 0,9% раствор NaCl в соотношении масса образца (г): экстрагирующая жидкость (мл) = 1:30. В качестве отрицательного контроля использовали 0,9% раствор NaCl, в качестве положительного контроля – дистиллированную воду.

Количественным критерием метода служит относительная величина гемолиза (α_r) в %. Образец признается гемосовместимым, если $\alpha_r \leq 2,0\%$.

Имплантационный тест для оценки *in vivo* биологической безопасности тканеспецифических матриц

Исследование биологической безопасности тканеспецифических децеллюляризованных матриц из печени и хряща и проверка их соответствия требованиям, предъявляемым к медицинским изделиям по ГОСТ ISO 10993–6–2011, были проведены совместно с АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий». Для оценки местного действия матрицы имплантировали половозрелым аутбредным крысам (самкам) в мышечную ткань. Контролем служили ложнопериорированные крысы, которым проводили операцию, не закладывая имплантаты.

Через 21 день, 2, 3 и 6 месяцев животных выводили из эксперимента и оценивали биологическую реакцию тканей с помощью макроскопического и гистологического исследований.

Для гистологического исследования забирали место имплантации (участок мышечной ткани) вместе с достаточным количеством окружающей его ткани для оценки местной тканевой реакции. Вырезанные участки тканей фиксировали в 10% растворе формалина с последующей заливкой в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии с помощью лабораторного микроскопа LeicaDM 1000 (Leica Microsystems CSC GmbH, Германия).

Исследование функциональной эффективности тканеспецифических матриц на культурах клеток

Специфическая эффективность тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной ткани *in vitro* заключается в поддержании адгезии, пролиферации и функциональной активности тканеспецифических клеток.

Для определения функциональной активности КИК хряща *in vitro* исследовали способность микрочастиц матрикса и клеточной компоненты соединяться и образовывать тканевой эквивалент, содержащий ГАГ и коллаген. В КИК хряща использовали МСК ЖТч, способные к дифференцировке в хондрогенном направлении. Источником МСК ЖТч была подкожная жировая клетчатка здорового донора, полученная при информационном добровольном согласии.

Специфическая эффективность КИК печени *in vitro* оценивалась по способности матрикса и клеточной компоненты образовывать единый конгломерат и способности клеток вырабатывать мочевины. Концентрацию мочевины в образцах культуральной среды, полученной при культивировании КИК печени, определяли на биохимическом анализаторе Konelab Prime 60i (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). КИК печени включала клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, полученную из лабораторной коллекции клеточных культур отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова».

Морфологию образцов исследовали с использованием гистологических методов окрашивания.

Методы статистического анализа полученных данных

Обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Находили средние значения вариант и среднеквадратичные отклонения. Достоверность различий определяли, используя критерий t-Стьюдента и критерий Уилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Децеллюляризация фрагментов печени крысы

Для начала, основываясь на литературных данных [Онищенко Н.А. и др., 2016], был проведен эксперимент, в ходе которого контролировали эффективность децеллюляризации МФП крысы в зависимости от выбора режима перемешивания на магнитной мешалке в растворах SDS и Triton X-100. Сравнивали различные скорости перемешивания: 200, 300 и 400 об/мин. Выяснилось, что применение для децеллюляризации МФП крысы растворов ПАВ при перемешивании на магнитной мешалке не приводит к полному удалению клеток и клеточного детрита из ткани печени и сохранению микроструктуры ВКМ. При всех исследованных скоростях перемешивания в гистологических препаратах МФП крысы наблюдаются отдельные сохраненные целые клетки и зерна клеточного детрита, а также разрушение структуры ВКМ. Это говорит о том, что для МФП крысы необходимо подобрать такой режим децеллюляризации, который будет менее травматичным для микроструктуры ВКМ, но при этом достаточным для разрушения клеток и удаления клеточного детрита.

Нами было опробовано перемешивание образцов в растворах ПАВ с применением ротационной системы при различных скоростях перемешивания (2 и 5 об/мин). Ротационная система позволяет проводить процесс децеллюляризации более бережно по отношению к образцам, так как отсутствует непосредственный контакт образца с перемешивающим магнитным элементом. Применение ротационной системы и обработки ПАВ для децеллюляризации МФП крысы показывает лучший результат, по сравнению с применением перемешивания на магнитной мешалке в растворах ПАВ. Однако в препаратах все равно видны разрушения структуры матрикса, а при скорости 5 об/мин различаются целые клетки и клеточный детрит.

Далее, мы попробовали снизить степень разрушения структуры ВКМ, применив для децеллюляризации МФП крысы метод осмотического шока – обработку образцов рабочими растворами с высокой и низкой ионной силой с добавлением 0,1% SDS в течение 24 часов. От предыдущих методов этот отличается отсутствием в составе рабочих растворов неионного ПАВ Triton X-100 и снижением времени децеллюляризации с 72 часов до 24 часов. Данный способ был отработан с применением и магнитной мешалки со скоростью 200 об/мин, и ротационной системы (2 и 5 об/мин). Децеллюляризация МФП крысы рабочим раствором с низкой ионной силой + 0,1% SDS привела к хорошим результатам при перемешивании на магнитной мешалке (скорость 200 об/мин) и на ротационной системе со скоростью 5 об/мин.

По результатам гистологических исследований, содержащих в себе анализ 9 способов децеллюляризации, были выбраны два режима децеллюляризации МФП крысы, оказавшиеся подходящими по эффективности удаления клеток и клеточного детрита, а также по сохранению структуры матрикса.

Первый режим – перемешивание на магнитной мешалке при скорости 200 об/мин при низкой ионной силе рабочего раствора + 0,1% SDS.

Второй режим – перемешивание на ротационной системе при скорости 5 об/мин при низкой ионной силе рабочего раствора + 0,1% SDS.

Для дальнейшей разработки оптимального протокола децеллюляризации печени крысы был проведен количественный анализ содержания ДНК в исходной и децеллюляризованных образцах тканей по двум найденным режимам.

В исходной ткани печени крысы ДНК содержалось в количестве $565,4 \pm 8,6$ нг/мкг ткани. Результаты количественного определения ДНК в образцах децеллюляризованных МФП крысы показали, что после обработки исходной ткани в режиме, включающем перемешивание на магнитной мешалке при скорости 200 об/мин и осмотический шок (низкая ионная сила) + 0,1% SDS, количество ДНК в децеллюляризованной ткани снизилось до $4,5 \pm 1,1$ нг/мкг ткани. При режиме, включающем перемешивание на ротационной системе при скорости 5 об/мин и низкой ионной силе рабочего раствора + 0,1% SDS, количество ДНК снизилось до $5,6 \pm 0,9$ нг/мкг ткани. Количество остаточного ДНК соответствует 0,9% и 0,8% от количества ДНК в исходной ткани печени крысы, что соответствует критерию полноты удаления клеток [Zhang L. et al., 2017]. Таким образом, оба режима можно признать достаточными для удаления ДНК из тканей печени крысы. Дальнейшие исследования направлены на анализ сохранности основных структурных компонентов ВКМ - ГАГ.

В исходной ткани печени крысы количество ГАГ составляет $0,18 \pm 0,02$ мкг/мг ткани. Такое количество объясняется высоким содержанием клеток в исходной ткани по сравнению с децеллюляризованной тканью печени. При режиме децеллюляризации МФП крысы, включающего перемешивание на магнитной мешалке при скорости 200 об/мин и обработку рабочим раствором с низкой ионной силой + 0,1% SDS, количество ГАГ составляет $1,01 \pm 0,21$ мкг/мг ткани. Перемешивание образцов на ротационной системе при скорости 5 об/мин в рабочем растворе с низкой ионной силой + 0,1% SDS в меньшей степени влияет на концентрацию ГАГ в децеллюляризованной ткани, равную $3,13 \pm 0,24$ мкг/мг ткани. Из полученных данных можно сделать вывод о том, что режим децеллюляризации на ротационной системе со скоростью 5 об/мин с низкой ионной силой рабочего раствора + 0,1% SDS более щадяще влияет на структуру матрикса и содержание в нем ГАГ, чем режим с магнитной мешалкой.

Децеллюляризация фрагментов печени свиньи

Матрикса, созданные на основе децеллюляризованных тканей и органов свиньи, уже успешно используются в клинической практике [Pina S. et al., 2019]. Кроме того, децеллюляризация позволяет снизить иммуногенность за счет снижения количества ДНК и эпитопов галактозы – основных факторов, вызывающих иммунную реакцию организма человека на свиньи ткани [Wu, L.C. et al., 2017].

Для изучения влияния видовой специфичности исходной ткани печени на выбор подходящего режима децеллюляризации и его воздействия на структуру тканеспецифического матрикса были применены режимы и способы децеллюляризации МФП свиньи (Рисунок 2А, Б) аналогичные режимам и способам децеллюляризации МФП крысы.

Из данных гистологического анализа следует, что наилучшие результаты с точки зрения сохранности микроструктуры матрикса, полноты удаления клеток и клеточного детрита были получены при децеллюляризации МФП свиньи в растворах ПАВ на

магнитной мешалке при 300 об/мин (Рисунок 2В, Г). Заметим, что для печени крысы децеллюляризация ПАВ как на магнитной мешалке, так на ротационной системе, дала неудовлетворительные результаты.

Подходящим способом децеллюляризации МФП свиньи оказался также способ с применением растворов с низкой ионной силой + 0,1% SDS при перемешивании на ротационной системе со скоростью 5 об/мин (Рисунок 2Д, Е). Заметим, что такой способ также подошел и для децеллюляризации МФП крысы.

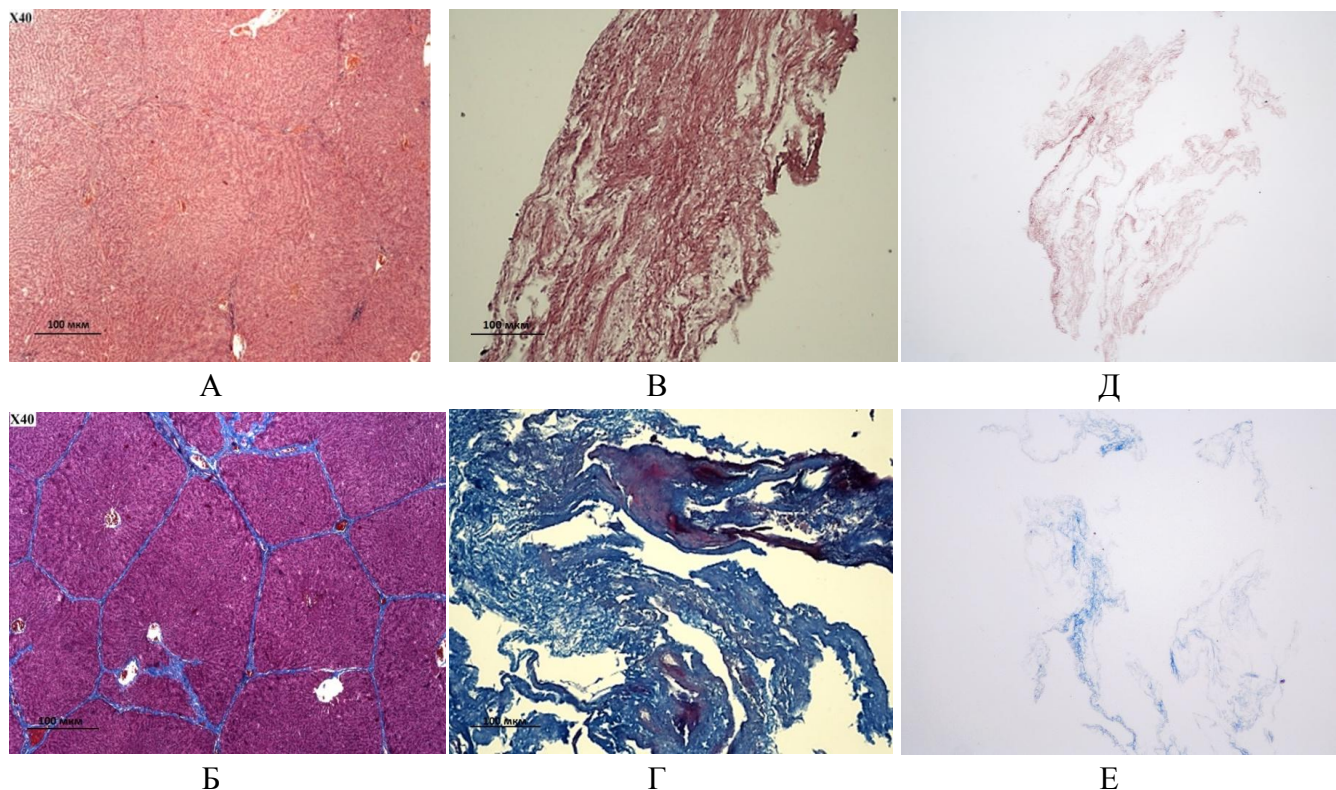


Рисунок 2 – Исходные и децеллюляризованные мелкодисперсные фрагменты печени свиньи: А, Б – исходные фрагменты, Ув. x 40; В, Г – магнитная мешалка, 200 об/мин, Ув. x 200; Д, Е – ротационная система, 5 об/мин, Ув. x 100 (А, В, Д – окрашивание гематоксилином и эозином; Б, Г, Е – окрашивание по методу Массона)

Таким образом, было выделено два режима децеллюляризации печени свиньи, показывающие хорошие результаты с точки зрения удаления клеток с клеточным детритом и сохранения структуры матрикса.

Первый режим – перемешивание на магнитной мешалке при скорости 300 об/мин в растворах ПАВ.

Второй режим - перемешивание на ротационной системе при скорости 5 об/мин + осмотический шок (низкая ионная сила) + 0,1% SDS.

Однако по результатам определения остаточного количества ДНК выяснилось, что остаточное количества ДНК в децеллюляризованных МФП свиньи при использование магнитной мешалки при скорости 300 об/мин, составляет 70% от количества ДНК в исходной ткани при рекомендуемом не более 10% [Zhang L., 2017]. В связи с этим, в данный протокол децеллюляризации после обработки ПАВ был введен дополнительный этап, включающий инкубацию фрагментов печени свиньи в растворе

ДНКазы I. Обработка ДНКазой позволила снизить остаточное количество ДНК в децеллюляризованном образце до 0,7%, что составляет $10,3 \pm 1,5$ нг/мг ткани.

Второй режим децеллюляризации, показавший хорошие результаты по данным гистологического анализа, включающий применение осмотического шока (низкой ионной силы + 0,1% SDS) в совокупности с ротационной системы со скоростью 5 об/мин, показал снижение количества ДНК до 1,5% от ее количества в исходной ткани ($23,7 \pm 1,4$ нг/мг ткани).

Таким образом, оба метода децеллюляризации МФП свиньи, выбранных по результатам гистологических исследований, показали хорошие результаты по содержанию остаточного количества ДНК. Дальнейшее уточнение протокола децеллюляризации было сделано по количеству сохранных ГАГ в составе ВКМ образцов.

Количества ГАГ в исходных образцах тканей печени свиньи составляет $0,59 \pm 0,03$ мкг/мг ткани. После децеллюляризации ткани, включающей обработку растворами ПАВ на магнитной мешалке со скоростью 300 об/мин и обработку в растворе ДНКазы, содержание ГАГ составляет $3,03 \pm 0,24$ мкг/мг ткани, а после децеллюляризации, состоящей из обработки образцов растворами ПАВ на ротационной системе со скоростью 5 об/мин в совокупности с низкой ионной силой + 0,1% SDS - $9,23 \pm 1,03$ мкг/мг ткани.

Соответственно, второй режим обработки ткани печени свиньи (перемешивание на ротационной системе со скоростью 5 об/мин в растворе с низкой ионной силой + 0,1% SDS) является оптимальным для сохранения ГАГ в децеллюляризованных образцах МФП свиньи.

Из полученных данных следует, что при разработке протокола децеллюляризации необходимо учитывать видовую принадлежность печени. Как оказалось, удовлетворительных критериев децеллюляризации МФП крысы удалось достичь при применении рабочего раствора с низкой ионной силой в течение 24 часов. При этом применение раствора с низкой ионной силой + 0,1% SDS для децеллюляризации МФП свиньи ведет к сохранению чуть большего количества ДНК, чем в МФП крысы, однако и этого количества достаточно для признания этого метода удовлетворительным для удаления клеточного материала. Для снижения количества остаточного ДНК в МФП свиньи необходимо применять более длительный способ децеллюляризации, заключающийся в применении ПАВ на магнитной мешалке в течение 72 часов и затем инкубацию в растворе ДНКазы. Это говорит о различии в видовой специфике строения ткани печени, что обуславливает необходимость разработки индивидуальных протоколов децеллюляризации для каждой ткани печени. Это подтверждает и изменение в количестве ГАГ после процесса децеллюляризации. Ткань печени крысы подвержена большему изменению содержания ГАГ, чем ткань печени свиньи.

Децеллюляризация микрочастиц суставного хряща свиньи

Были отработаны режимы получения МСХ свиньи методом криопомола при температуре жидкого азота с выделением фракции 100-250 мкм. Помол предварительно измельченных вручную фрагментов хряща производили на криомельнице жидким азотом. Для наших целей был подобран следующий режим помола: 1 цикл длительностью 3 минуты при частоте 25 Гц.

Был проведен анализа количества децеллюляризованных и не децеллюляризованных фрагментов МСХ в образцах, полученных при комбинации разного количества циклов замораживания/оттаивания с обработкой растворами ПАВ. Из полученных результатов следует, что комбинированный метод децеллюляризации хряща свиньи, включающий 10 циклов замораживания/оттаивания с последующей обработкой ПАВ приводит к снижению количества не децеллюляризованных частиц в 7 раз и возрастанию доли децеллюляризованных фрагментов в 6,8 раза по сравнению с действием ПАВ в отдельности. Однако образующиеся при замораживании кристаллы льда не только разрушают клеточные мембраны и снижают количество не децеллюляризованных частиц в образце, но и разрушают естественную структуру ВКМ. Поэтому необходимо снизить количество циклов замораживания/оттаивания до 3 циклов и добавить к данному методу дополнительные этапы обработки МСХ растворами ПАВ и ДНКазой.

Было исследовано влияние обработки в среде ск-СО₂ в различных режимах на эффективность децеллюляризации микрочастиц хряща, после обработки растворами ПАВ. Эффективность децеллюляризации следует признать недостаточной, чтобы рекомендовать комбинацию из обработки ск-СО₂ и ПАВ в качестве метода комплексной обработки хрящевой ткани с целью получения децеллюляризованного тканеспецифического матрикса. Для достижения необходимой полноты децеллюляризации нами предложено ввести дополнительный этап обработки микрочастиц хряща, заключающийся в обработке его раствором ДНКазы I после обработки растворами ПАВ и перед обработкой в среде ск-СО₂ + этанол в течение 8 часов.

Окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты дают наглядную картину состояния нативного суставного хряща свиньи (Рисунок 3А, Б). По результатам гистологических исследований были выбраны два режима децеллюляризации тканей суставного хряща свиньи, удовлетворяющих по полноте удаления клеток и клеточного детрита и сохранению структуры ВКМ.

Первый режим - 3 цикла замораживания/оттаивания + обработка ПАВ в комбинации с перемешиванием на магнитной мешалке + ДНКазы (Рисунок 3В, Г). Применение этого режима позволило снизить количество ДНК в децеллюляризованных микрочастицах хряща до $9,1 \pm 1,1$ нг/мг ткани, против количества в нативных микрочастицах $366,9 \pm 53,0$ нг/мг ткани). Снижение количества ДНК до 2,5% от исходной ткани свидетельствует о хорошей степени децеллюляризации и, соответственно, низкой иммуногенности полученного матрикса.

Второй режим - обработка ПАВ в комбинации с перемешиванием на магнитной мешалке + ДНКазы + обработка в среде ск-СО₂ с добавлением этанола в течение 8 часов (Рисунок 3Д, Е). Применение данного режима привело к снижению количества ДНК в децеллюляризованных микрочастицах свиного хряща до $18 \pm 1,3$ нг/мг ткани (4,9% от количества в исходной ткани).

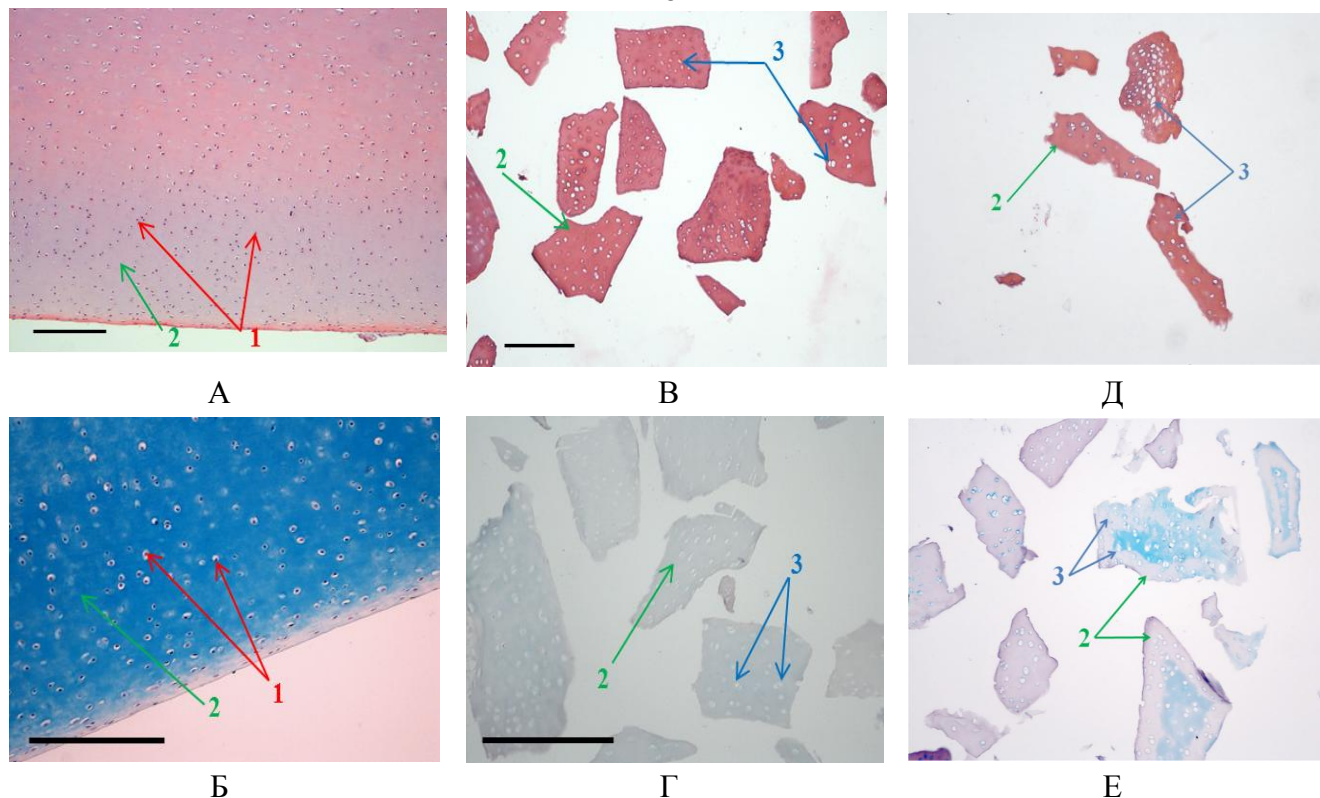


Рисунок 3 – Исходные и децеллюляризованные микрочастицы суставного хряща свиньи: А, Б – исходные частицы хряща; В, Г – обработка 3 циклами замораживания/оттаивания + ПАВ + ДНКазой; Д, Е – обработка ПАВ + ДНКазой + ск-СО₂ с добавлением этанола в течение 8 часов. (А, В, Д – окрашивание гематоксилином и эозином; Б, Г, Е – окрашивание по методу Массона. 1 – целые клетки, 2 – ВКМ, 3 – пустые лакуны без клеток) Ув. x 100

Дальнейшие исследования направлены на анализ сохранности основного структурного компонентов ВКМ МСХ - ГАГ.

По результатам определения ГАГ в исходных и децеллюляризованных тканях суставного хряща видно, что в исходной хрящевой ткани количество ГАГ составляет $153,6 \pm 22$ мкг/мг, при обработке 3 циклами замораживания/оттаивания + растворами ПАВ + ДНКазой количество ГАГ составляет $7,7 \pm 0,8$ мкг/мг ткани. Очевидно, циклы замораживания/оттаивания оказывают негативное влияние на содержание ГАГ в матриксе. При обработке хряща последовательно растворами ПАВ, обработкой в среде ск-СО₂ и обработкой раствором ДНКазы, количество ГАГ составляет $33,9 \pm 6,4$ мкг/мг ткани.

По количеству содержания ГАГ в децеллюляризованной ткани можно признать режим децеллюляризации, включающий обработку ПАВ, обработку в среде ск-СО₂ и обработку раствором ДНКазы наиболее оптимальным с точки зрения сохранения ГАГ в составе ВКМ.

После проведения гистологических и биохимических исследований образцов децеллюляризованных тканей суставного хряща свиньи оптимальным режимом децеллюляризации признан режим, включающий последовательную обработку хряща в растворах ПАВ, в среде ск-СО₂ и в растворе ДНКазы I.

Таким образом, беря во внимание полученные результаты по децеллюляризации печени крысы, печени свиньи и суставного хряща свиньи можно сказать, что для достижения полной децеллюляризации для более плотной структуры суставного хряща по

сравнению с тканью печени требуются более агрессивные методы децеллюляризации. Так, в протокол децеллюляризации суставного хряща был включен метод резкой смены температуры (циклы замораживания/оттаивания), который, за счет образованию кристаллов льда, разрушает клеточную мембрану. Однако применение циклов замораживания/оттаивания ведет к большей потере ГАГ, чем метод с применением обработки в среде ск-СО₂. Заметим, что из-за высокой плотности хряща обработку его в среде ск-СО₂ возможно провести только после предварительной обработки МСХ растворами ПАВ и ДНКазы. Учитывая, что оба метода децеллюляризации МСХ позволяют эффективно снизить процент остаточного количества ДНК, не выходя за границу рекомендованных 10% [Zhang L., 2017], следует признать оптимальным тот режим, который оказывает минимальное воздействие на содержание ГАГ в децеллюляризованных МСХ. В данном случае таким режимом является режим, включающий последовательную обработку МСХ в растворах ПАВ, в среде ск-СО₂ и в растворе ДНКазы I.

В то же время, достичь критерия эффективной децеллюляризации по остаточному количеству ДНК в МФП позволяют режимы, сочетающие в себе меньшее количество методов. Кроме того для этого требуется меньше времени. Так, оптимальный режим децеллюляризации МСХ (ПАВ (магнитная мешалка) + ДНКазы + ск-СО₂) позволяют достичь эффективной степени децеллюляризации за 7 дней. А для эффективной децеллюляризации МФП свиньи в выбранном режиме (низкая ионная сила (ротационная система 5 об/мин + 0,1% SDS)) требуется 24 часа.

Одновременно, для сохранности структуры печени необходимо было подобрать способы и режимы децеллюляризации, позволяющие одновременно удалить значительное количество ДНК из ткани печени и сократить до минимума повреждение структуры ВКМ. Так, перемешивание на ротационной системе со скоростью 5 об/мин в растворе с низкой ионной силой + 0,1% SDS является оптимальным для сохранения ГАГ в децеллюляризованных образцах МФП свиньи.

При разработке КИК печени и суставного хряща для клинического применения планируется использовать тканеспецифические матриксы, изготовленные на основе децеллюляризованных тканей свиньи. В связи с этим исследования биологической безопасности и функциональной эффективности были проведены только для тканеспецифических матриксов на основе децеллюляризованных тканей печени свиньи и суставного хряща свиньи.

Цитотоксичность in vitro

Исследование цитотоксичности методом прямого контакта на клеточной культуре МСК ЖТч не обнаружило проявлений цитотоксического эффекта тканеспецифического матрикса на основе децеллюляризованных тканей печени свиньи и суставного хряща свиньи на протяжении времени исследования (24 часа) как методом прямого контакта, так и методом вытяжек из матрикса. Пролонгированного цитотоксического эффекта также не обнаружили вплоть до окончания эксперимента на 3 сутки. На основании полученных данных может быть сделан вывод об отсутствии цитотоксических свойств у тканеспецифического матрикса на основе децеллюляризованной ткани печени свиньи и тканеспецифического матрикса на основе децеллюляризованного суставного хряща свиньи.

Гемолитическая активность in vitro

Результаты тестирования биосовместимых свойств децеллюляризованных матриксов печени свиньи, а также хрящевой ткани свиньи показали, что согласно критерию теста на гемолиз эритроцитов, индуцированный контактом с чужеродной поверхностью, все они соответствуют требованиям ГОСТ Р ИСО 10993–1–2011, предъявляемым к биосовместимым материалам. Таким образом, исследованные образцы тканеспецифических матриксов из децеллюляризованных тканей печени свиньи и суставного хряща свиньи удовлетворяют критерию гемосовместимости по тесту на гемолиз.

Биологическая безопасность in vivo (имплантационный тест)

Ранее показанное отсутствие цитотоксичности и гемолитического действия тканеспецифических матриксов *in vitro* дало нам основание перейти к исследованию биологической безопасности тканеспецифических матриксов на основе децеллюляризованных тканей печени и суставного хряща свиньи *in vivo*.

Отсутствие реакции мышечной ткани при имплантации в течение 6 месяцев указывает на соответствие тканеспецифических матриксов на основе децеллюляризованных тканей печени и хряща свиньи требованиям, предъявляемым к медицинским изделиям по ГОСТ ISO 10993–6–2011 «Исследования местного действия после имплантации».

Функциональная эффективность

При проведении исследования функциональной эффективности тканеспецифического матрикса на основе децеллюляризованной ткани печени свиньи было показано, что преимущественный рост эпителиоподобных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением наблюдается на поверхности матрикса к 3 суткам культивирования (Рисунок 4).

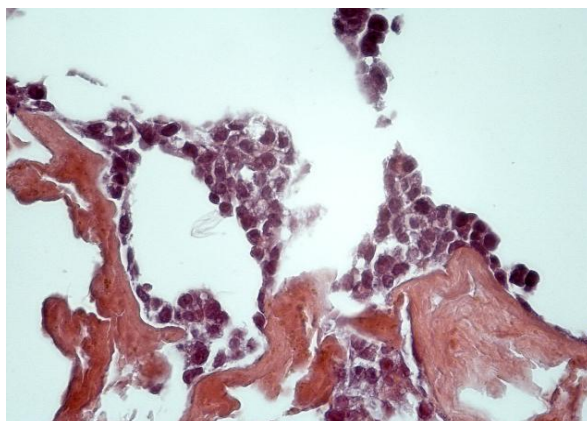


Рисунок 4 - Морфология клеток HepG2 при культивировании на тканеспецифическом матриксе на основе децеллюляризованной ткани печени свиньи на 3 сутки культивирования. Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. x 400

При этом клетки объединялись в многочисленные группы. Часть клеток формировала мелкие скопления в толще носителя. К 6 суткам наблюдали значительное увеличение клеточной массы, что было связано с активной клеточной пролиферацией. Метаболическую активность клеток печени определяли по наличию мочевины в

культуральной среде. Было показано, что через 3 суток биохимический анализ проб не выявил в образцах мочевины на уровне, превышающем предел обнаружения 1,1 ммоль/л. Однако к 7 суткам содержание мочевины в культуральной среде составило $1,2 \pm 0,1$ ммоль/л, что свидетельствует о метаболической активности клеток в составе полученных биоинженерных конструкций. Таким образом, было показано, что образцы тканеспецифического матрикса на основе децеллюляризованной ткани печени свиньи проявляют функциональную активность, подтвержденную распределением клеток в объеме матрикса и сохранением специфической метаболической активности.

При исследовании функциональной эффективности тканеспецифического матрикса на основе децеллюляризованной ткани суставного хряща свиньи *in vitro* на поверхности микрочастиц децеллюляризованного хряща МСК ЖТч пролиферировали, объединяя микрочастицы хряща в крупные агрегаты, и активно нарабатывали ВКМ (Рисунок 5А). Причем крупные конгломераты не распадались на более мелкие к окончанию эксперимента. Клетки характеризовались фибробластоподобной формой. Внутри конгломератов формировались многослойные клеточные зоны. Однако в центре конгломератов на 28 сутки культивирования в хондрогенной среде определяли участки некроза клеток. Положительное окрашивание образцов альциановым синим свидетельствует о наработке ГАГ клетками, вступившими в дифференцировку в хондрогенном направлении (Рисунок 5Б). Окрашивание ВКМ на коллаген было позитивным, причем, насыщенность окрашивания возрастала с увеличением времени культивирования, что совпадало с тенденцией наработки ГАГ. К 28 суткам коллаген наблюдали по всему объему ВКМ (Рисунок 5В).

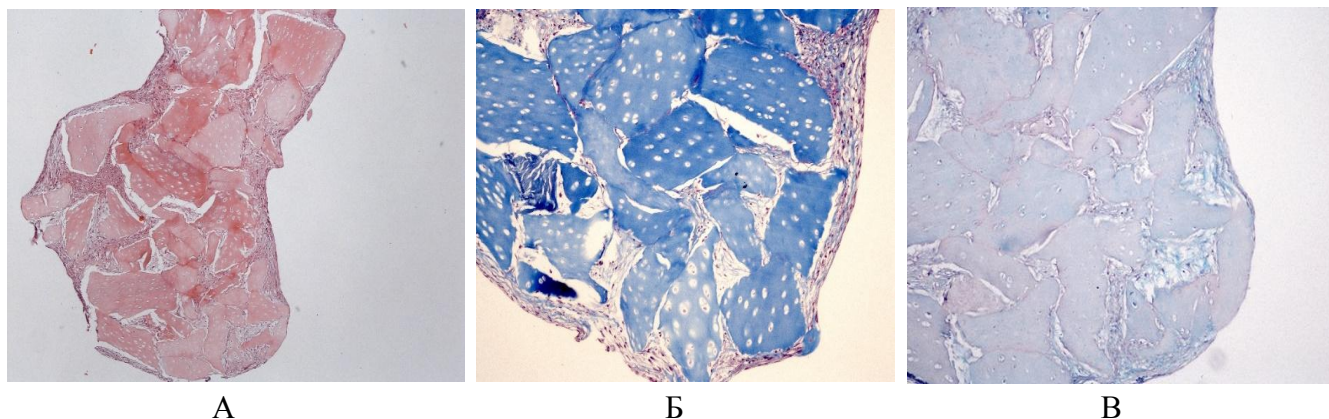


Рисунок 5 – Гистологическая картина на 28 сутки культивирования МСК ЖТч на поверхности тканеспецифического матрикса на основе децеллюляризованной ткани суставного хряща свиньи: А – окрашивание гематоксилином и эозином, Ув. x 40; Б – окрашивание по методу Массона, Ув. x 100; В – окрашивание альциановым синим, Ув. x 100

Таким образом, по результатам исследования функциональной эффективности тканеспецифического матрикса на основе децеллюляризованной ткани суставного хряща свиньи было продемонстрировано, что МСК ЖТч в составе КИК активно пролиферировали. В составе ВКМ, наработанного МСК ЖТч при культивировании в хондрогенной культуральной среде, были выявлены ГАГ и коллаген, что свидетельствует о высокой функциональной эффективности экспериментальных образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения данной работы были разработаны режимы получения тканеспецифических матриц на основе децеллюляризованных тканей в зависимости от их типа и видовой специфичности. Для тканей печени крысы и свиньи, суставного хряща свиньи были подобраны оптимальные режимы, позволяющие, при сохранении ГАГ в составе ВКМ, удалять клетки и генный материал из тканей. Режимы децеллюляризации были выбраны после проведения гистологических (окрашивание срезов тканей гематоксилином и эозином, а также по методу Массона) и биохимических исследований образцов (определение содержания ДНК, ГАГ).

Для тканей печени крысы оптимальным режимом децеллюляризации является перемешивание на ротационной системе при скорости 5 об/мин совместно с воздействием низкой ионной силы.

Для тканей печени свиньи оптимальным режимом децеллюляризации является режим, включающий перемешивание на ротационной системе со скоростью 5 об/мин в совокупности с низкой ионной силой.

Для тканей суставного хряща свиньи оптимальным режимом децеллюляризации является режим, включающий последовательную обработку хряща в растворах ПАВ, в среде ск-СО₂ и в растворе ДНКазы I.

Образцы полученных тканеспецифических матриц на основе децеллюляризованных тканей печени и суставного хряща свиньи, как наиболее перспективные, на наш взгляд, были исследованы на соответствие требованиям биологической безопасности. Были проведены исследования на цитотоксичность *in vitro*, на определение величины гемолиза, индуцированного поверхностью тканеспецифических матриц, и проведено изучение биологической безопасности тканеспецифических матриц из децеллюляризованных тканей печени свиньи *in vivo*.

Также на основании проведенных исследований была подтверждена функциональная эффективность тканеспецифических матриц из децеллюляризованных тканей печени и хряща свиньи *in vitro*. Это подтверждалось распределением клеток в объеме матрикса и сохранением активности клеточных культур.

Создание тканеспецифических матриц на основе децеллюляризованных ксеногенных органов позволит в будущем перейти к использованию КИК для замещения функций поврежденных органов или стимуляции процессов их физиологической регенерации.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при разработке протоколов децеллюляризации следует учитывать как видовую специфичность ткани, так и ее структуру. Показано, что для достижения полноты децеллюляризации плотной хрящевой ткани необходимо дополнительно использовать методы физической обработки.

2. Разработаны и экспериментально обоснованы лабораторные регламенты децеллюляризации ткани печени и суставного хряща свиньи, позволяющие получать тканеспецифический матрикс с наименьшим изменением концентрации гликозаминогликанов и сохранением структурных особенностей внеклеточного матрикса, содержащего минимальное количество ДНК.

3. В экспериментах *in vitro* (гемолитическая активность и цитотоксичность) и *in vivo* (имплантационный тест) доказана биологическая безопасность тканеспецифических матриксов, полученных из децеллюляризованной ткани печени свиньи и ткани суставного хряща свиньи.

4. При инкубации культуры НерG2 с тканеспецифическим матриксом из децеллюляризованной ткани печени свиньи, клетки, адгезированные на поверхности и мигрирующие в объем матрикса, сохраняют жизнеспособность и проявляют специфическую метаболическую активность. К 7 суткам содержание мочевины в культуральной среде составило $1,2 \pm 0,1$ ммоль/л.

5. При исследовании функциональной активности тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной ткани суставного хряща свиньи выявлена его способность эффективно поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При выборе способа и режимов децеллюляризации, минимально влияющих на микроархитектонику и содержание основных компонентов внеклеточного матрикса исходной ткани, следует учитывать видовую специфичность и структуру исходной ткани.

2. Для повышения полноты децеллюляризации плотных тканей необходимо микронизировать исходную ткань до размеров 100–250 мкм.

3. Оптимальные размеры фрагментов тканей паренхиматозных органов, при которых достигается наибольшая степень децеллюляризации с сохранением микроархитектоники исходной ткани, составляют 2x2x2 мм.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Sevastianov, V.I. Application of supercritical fluids for complete decellularization of porcine cartilage / V.I. Sevastianov, E.A. Nemets, A.E. Lazhko, Y.B. Basok, L.A. Kirsanova, A.D. Kirillova // Journal of Physics: Conference Series. – 2019. – Vol. 1347. – P. 012081.**
2. Basok Yu. B., Kirillova A.D., Grigoryev A.M., Kuznetsova E.G., Kirsanova L.A., Nemets E.A. Creation of an injectable tissue-specific matrix from decellularized fragments of articular cartilage. Abstracts book. Sechenov International Biomedical Summit 2019, 20.05–21.05.2019, Moscow, Russia. M.: Publishing house of Sechenov University, 2019, P. 11-12.
3. Немец Е.А., Лажко А.Э., Басок Ю.Б., Кирсанова Л.А., Кириллова А.Д., Севастьянов В.И. Сверхкритический CO₂ при децеллюляризации хрящевой ткани. Материалы X Научно-практической конференции с международным участием «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации», 30 сентября–06 октября 2019 г., Ростов-на Дону. С. 45-47.
4. Кириллова А.Д. Создание мелкодисперсного тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща. XVI Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». Москва. 1–4 октября 2019 г. / Сборник трудов. – М: ИМЕТ РАН, 2019, С. 190-192.
5. Басок Ю.Б., Немец Е.А., Кирсанова Л.А., Григорьев А.М., Кириллова А.Д., Севастьянов В.И. Микродисперсный тканеспецифический матрикс для тканевой инженерии хряща. Материалы IV Национального Конгресса «Трансплантация и донорство органов», 7–9 октября 2019 года, Москва. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № S. – С. 164.
6. Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Немец Е.А., Кириллова А.Д., Севастьянов В.И. Создание тканеинженерной конструкции хрящевой ткани на основе микронизированного тканеспецифического децеллюляризованного матрикса суставного хряща свиньи. Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине, 20–23 ноября 2019 года, Москва. Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – № S. – С. 36.
7. Басок, Ю.Б. Получение микродисперсного тканеспецифического децеллюляризованного матрикса из суставного хряща свиньи / Ю.Б. Басок, А.Д. Кириллова, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, Е.А. Немец, В.И. Севастьянов // Перспективные материалы. – 2020. - №5. – С. 51-60.
8. Кириллова, А.Д. Создание тканеспецифического микродисперсного матрикса из децеллюляризованной печени свиньи / А. Д. Кириллова, Ю.Б. Басок, А.Э. Лажко, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, Е.А. Немец, В.И. Севастьянов // Физика и химия обработки материалов. – 2020. - №4. – С. 41-50.
9. Немец, Е.А. Особенности получения тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного хряща свиньи / Е.А. Немец, А.Э. Лажко, Ю.Б. Басок, Л.А. Кирсанова, А.Д. Кириллова, В.И. Севастьянов // Сверхкритические флюиды. Теория и практика. – 2020. Т.15 - №2. – С. 3-13.

10. Nemets, E. A. Preparation of tissue-specific matrix from decellularized porcine cartilage / E.A. Nemets, A.E. Lazhko, Yu.B. Basoka, L.A. Kirsanova, A.D. Kirillova, V.I. Sevastianov // Russian Journal of Physical Chemistry B. – 2020. - Vol.14, № 8. - P. 1245-1251.

11. Basok, Yu.B. Fabrication of microdispersed tissue-specific decellularized matrix from porcine articular cartilage / Yu.B. Basok, A.D. Kirillova, A.M. Grigoryev, L.A. Kirsanova, E.A. Nemets, V.I. Sevastianov // Inorganic Materials: Applied Research. – 2020. – Vol.11 - №5. – P. 1153–1159.

12. Григорьев, А.М. Экспериментальные подходы к созданию тканеспецифического матрикса для биоискусственной печени / А.М. Григорьев, Ю.Б. Басок, А.Д. Кириллова, Л.А. Кирсанова, Н.П. Шмерко, А.М. Суббот, Е.А. Немец, И.А. Милосердов, М.Ю. Шагидулин, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. Т.22 - №3. – С. 123-133.

13. Шагидулин, М.Ю. Функциональная эффективность клеточно-инженерной конструкции печени на основе тканеспецифического матрикса (экспериментальная модель хронической печеночной недостаточности) / М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, А.Д. Кириллова, Е.А. Немец, Е.А. Волкова, И.М. Ильинский, Н.П. Можейко, В.И. Севастьянов, С.В. Готье // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т.22 - №4. – С. 89-97.

14. Басок Ю.Б., Кириллова А.Д., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Немец Е.А., Севастьянов В.И. Децеллюляризованный суставной хрящ свиньи как матрикс для создания тканеинженерной конструкции. Материалы X Всероссийского съезда трансплантологов, 5–7 октября 2020 г., Москва. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 5. – С. 131.

15. Кириллова А.Д., Григорьев А.М., Басок Ю.Б., Кирсанова Л.А., Шмерко Н.П., Немец Е.А., Шагидулин М.Ю., Севастьянов В.И. Тканеспецифический децеллюляризованный матрикс для биоинженерной конструкции печени. Материалы X Всероссийского съезда трансплантологов, 5–7 октября 2020 г., Москва. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 5. – С. 142.

16. Басок Ю.Б., Кириллова А.Д., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Немец Е.А., Перова Н.В., Севастьянов В.И. Разработка подходов для стимуляции регенерации суставного хряща на основе использования коллагенсодержащих носителей и мезенхимальных стромальных клеток. IV Международный конгресс ассоциации ревмоортопедов : Тезисы докладов конгресса, Москва, 18–19 сентября 2020 года / Редколлегия: М.А. Макаров [и др.]. – Москва: Издательско-полиграфический центр "Научная книга", 2020. – С. 8-10.

17. Basok Yu.B., Grigor'ev A.M., Kirillova A.D., Kirsanova L.A., Nemets E.A., Sevastianov V.I., Shagidulin M.Yu. Decellularized porcine liver fragments as tissue specific scaffolds for bioengineered human liver constructs. Proc. of the ESAO Annual Congress, 2020. International Journal of Artificial Organs. – 2020. – Vol.43, №8. – P. 518.

18. Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., **Кириллова А.Д.**, Немец Е.А., Севастьянов В.И. Клеточно-инженерные конструкции хрящевой ткани на основе биополимерного гидрогелевого и тканеспецифического матриков. Медицинская физика (ТКМФ-7) : Сборник тезисов VII Троицкой конференции с международным участием, Москва, 19–21 октября 2020 года. – Москва: Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 2020. – С. 195-196.

19. Басок Ю.Б., **Кириллова А.Д.**, Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Немец Е.А., Севастьянов В.И. Инъекционная форма клеточно-инженерной конструкции на основе тканеспецифического матрикса для восстановления хрящевой ткани. Шестой междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии». Москва. 23-27 ноября 2020 г. / сборник материалов. Том I – М: Центр научно-технических решений (АНО ЦНТР), 2020 г., с. 311-314.

20. **Кириллова А.Д.**, Григорьев А.М., Басок Ю.Б., Кирсанова Л.А., Немец Е.А., Шагидулин М.Ю., Севастьянов В.И. Получение тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной печени человека. Шестой междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии». Москва. 23-27 ноября 2020 г. / сборник материалов. Том I – М: Центр научно-технических решений (АНО ЦНТР), 2020 г., с. 360-362.

21. Григорьев А.М., Басок Ю.Б., Кирсанова Л.А., **Кириллова А.Д.**, Немец Е.А., Малкова А.П., Севастьянов В.И. Ксеногенная ткань печени как матрикс для биоинженерных конструкций. Медицинская физика (ТКМФ-7) : Сборник тезисов VII Троицкой конференции с международным участием, Москва, 19–21 октября 2020 года. – Москва: Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 2020. – С. 199-200.

22. **Kirillova A.D.**, Basok Yu.B., Lazhko A.E., Kirsanova L.A., Nemets E.A., Sevastianov V.I. Efficiency of using supercritical carbon dioxide for decellularization of articular cartilage. Abstracts book. Sechenov International Biomedical Summit 2020, 17.11–18.11.2020, Moscow, Russia. M.: Publishing house of Sechenov University, 2020, P. 16.

23. **Kirillova, A.D.** Creating a tissue-specific microdispersed matrix from a decellularized porcine liver / A.D. Kirillova, Yu.B. Basok, A.E. Lazhko, A.M. Grigoryev, L.A. Kirsanova, E.A. Nemets, V.I. Sevastianov / **Inorganic Materials: Applied Research**. – 2021. - Vol.12, № 3. - P. 812–819.

Патенты

1. Севастьянов В.И., Басок Ю.Б., Немец Е.А., Кирсанова Л.А., **Кириллова А.Д.**, Готье С.В. Способ получения тканеспецифического матрикса для тканевой инженерии хряща. Патент на изобретение RU 2716577 С1, 12.03.2020 (заявка № 2019115236 от 17.05.2019). Дата регистрации: 12.03.2020 г., опубликовано: 12.03.2020, Бюл. №8.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БМКП - биомедицинский клеточный продукт

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГАГ - гликозаминогликаны

КИК – клеточно-инженерная конструкция

МСК ЖТч - мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека

МФП – мелкодисперсные фрагменты печени

МСХ - микрочастицы суставного хряща

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ск-СО₂ – сверхкритический диоксид углерода

PBS – фосфатно-солевой буфер

SDS – додецилсульфат натрия