

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ТКАНИ ПЕЧЕНИ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОРИСТОГО МАТРИКСА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

УДК 57.085.21:612.35–018:512.8

Поступила 20.03.2015 г.



М.М. Боброва, лаборант-исследователь;

Л.А. Сафонова, лаборант-исследователь;

О.И. Агапова, научный сотрудник лаборатории бионанотехнологий;

М.Е. Крашенинников, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;

М.Ю. Шагидулин, к.м.н., зав. отделом экспериментальной трансплантологии и искусственных органов;

И.И. Агапов, д.б.н., профессор, зав. лабораторией бионанотехнологий

Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова
Минздрава России, Москва, 123182, ул. Щукинская, 1

Цель исследования — изучение механических и биологических свойств децеллюляризованной ткани печени при использовании ее в качестве пористого матрикса в регенеративной медицине.

Материалы и методы. Методом децеллюляризации получены три группы образцов печени с применением растворов для перфузии (тритон X-100) с разной концентрацией. Выявление сосудистого русла производили путем перфузии 0,5% раствора голубого декстрана. Были использованы методы гистологического окрашивания ткани, оптической микроскопии, а также сканирующей электронной микроскопии. Проверку пролиферативной активности клеток на полученном матриксе осуществляли с помощью культуры клеток гепатокарциномы человека Нер-G₂.

Результаты. Децеллюляризованная печень крысы была получена путем ее перфузии по портальной вене раствором натрий-фосфатного буфера, содержащим детергенты: тритон X-100 в разных концентрациях и додецилсульфат натрия. Установлено, что децеллюляризация ткани не приводит к изменениям микроструктуры тканевого матрикса, сосудистая сеть органа остается неповрежденной. Наибольшей прочностью на разрыв и эластичностью обладает матрикс печени, децеллюляризованный раствором, содержащим 3% тритона X-100. Из децеллюляризованной ткани были изготовлены микрочастицы со средним размером 200 мкм. В экспериментах с культурой гепатокарциномы человека Нер-G₂ показано, что наибольшая пролиферативная активность клеток проявляется на микрочастицах матрикса печени, децеллюляризованного раствором, содержащим 3% тритона X-100.

Заключение. Полученный методом децеллюляризации матрикс печени сохраняет нативную трехмерную структуру ткани печени и сосудистое русло. Децеллюляризованный матрикс является биосовместимым, поддерживает адгезию и пролиферацию клеток культуры гепатокарциномы человека Нер-G₂ и имеет подходящие для хирургии механические свойства.

Ключевые слова: децеллюляризация; децеллюляризованная печень; межклеточный матрикс; клеточные микроносители.

English

Liver Tissue Decellularization as a Promising Porous Scaffold Processing Technology for Tissue Engineering and Regenerative Medicine

M.M. Bobrova, Clinical Research Assistant;

L.A. Safonova, Clinical Research Assistant;

Для контактов: Боброва Мария Михайловна, e-mail: mariabobrova.msu@gmail.com

O.I. Agapova, Researcher, Bionanotechnology Laboratory;
M.E. Krasheninnikov, PhD, Senior Researcher, Cellular Technology Laboratory;
M.Yu. Shagidulin, MD, PhD, Head of the Department of Experimental Transplantology and Artificial Organs;
I.I. Agapov, DSc, Professor, Head of Bionanotechnology Laboratory

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,
 Ministry of Health of the Russian Federation, 1 Stchukinskaya St., Moscow, 123182, Russian Federation

The aim of the investigation was to study mechanical and biological properties of decellularized liver tissue when used as a porous matrix in regenerative medicine.

Materials and Methods. Three groups of liver samples were prepared by decellularization using a perfusion solution with different concentrations of Triton X-100. The vascular network was visualized by perfusion of 0.5% blue dextran solution. We used histological tissue staining, optical microscopy and scanning electron microscopy. Human hepatocarcinoma cell line Hep-G₂ was used to assess the proliferative cell activity on the obtained matrix.

Results. Decellularized rat liver was prepared by perfusion of sodium phosphate buffer via the portal vein, the buffer containing the following detergents: Triton X-100 of different concentrations and sodium dodecyl sulfate. Decellularization of whole organ does not lead to changes in the specific structure of the tissue scaffold, the vascular network also does not damaged. Decellularized liver with 3% Triton X-100 solution has the highest tensile strength and elasticity. Microparticles with a mean size 200 μm were prepared from decellularized liver matrix. There was investigated cell compatibility for hepatoblastoma cell line Hep-G₂. The cell compatibility was significantly higher on microparticles from decellularized liver scaffold with 3% Triton X-100 solution.

Conclusion. Decellularization-produced liver matrix was found to preserve the native three-dimensional structure of liver tissue and vascular network. Decellularized matrix is biocompatible. It maintains the adhesion and proliferation of human hepatocarcinoma cell line Hep-G₂ and has mechanical properties appropriate for surgery.

Key words: decellularization; decellularized liver; extracellular matrix; cell microcarriers.

Трансплантация печени — это единственный радикальный способ лечения тяжелой печеночной недостаточности, но количество таких операций в настоящее время ограничивается острой нехваткой доступных для трансплантации донорских органов. Длительность ожидания операции и высокая стоимость традиционной пересадки печени обуславливают необходимость поиска альтернативных, более экономичных и эффективных стратегий трансплантации печени [1]. Трансплантация клеток печени — один из современных методов терапии. Однако, несмотря на оптимистические и обнадеживающие результаты ее применения в эксперименте и клинике, остается немало проблем, требующих своего решения. К таковым относятся развитие иммунного ответа при использовании алло- и ксеногенных клеток и необходимость применения эффективных иммуносупрессоров, а также разработка способов инкапсулирования изолированных гепатоцитов или специальной обработки ферментами для пролонгирования сроков их функционирования в организме [2, 3].

Децеллюляризация тканей и органов — перспективная технология, которая служит основой создания матричных материалов для тканевой инженерии и регенеративной медицины. С помощью данной методики может быть получен внеклеточный матрикс печени с сосудами, который можно использовать для создания печеночных трансплантатов [4]. Преимуществом технологии децеллюляризации является сохранение структуры печеночного матрикса, сосудистой сети органа, печеночной капсулы, желчных протоков. Вторично заселенный клетками печени печеночный матрикс поддерживает специфические биологические функции печени, включая секрецию альбумина и мочевины, а также обеспечивает механические свойства, характерные для

нативной печени. Такие печеночные трансплантаты могут быть имплантированы в орган донора, обеспечивая его функциональную активность с минимальным ишемическим повреждением [5].

Цель исследования — изучение механических и биологических свойств децеллюляризованной ткани печени при использовании ее в качестве пористого матрикса в регенеративной медицине.

Методика исследования

Децеллюляризация печени. В эксперименте использовали мужские особи крыс линии Wistar (250–350 г). Все процедуры по уходу и работе с животными выполняли в соответствии с протоколами, утвержденными Комитетом по уходу и использованию животных Министерства здравоохранения и социального развития РФ, приказ №755 от 12.08.1977, и Декларацией Всемирной медицинской организации (Хельсинки, 2000). Работа одобрена Этическим комитетом ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Минздрава РФ.

За 1 ч до начала операции крысе вводили 200 мкл гепарина для снижения тромбообразования, далее через 30 мин — 200 мкл ангиопротектора, в качестве которого использовали Трентал, и перед операцией для общего парентерального наркоза — 200 мкл Тиопентала. Все препараты вводили внутривенно. Портальную вену канюлировали, и печень полностью извлекали из тела крысы. Печень сначала перфузировали 200 мл натрий-фосфатного буфера со скоростью 150 мл/ч с помощью перистальтического насоса, чтобы освободить орган от крови. Далее готовили три группы образцов печени, в процедуре децеллюляризации которых использовали три варианта перфузии лизирующими растворами следующего состава: 1-я группа — перфузия раствором,

содержащим 500 мл натрий-фосфатного буфера, 0,1% додецилсульфата натрия, 1% тритона X-100; 2-я группа — последовательная перфузия двумя растворами, содержащими 500 мл натрий-фосфатного буфера, 0,1% додецилсульфата натрия, но в первом применяли тритон X-100 с концентрацией 1%, а во втором — 2%; 3-я группа — последовательная перфузия тремя растворами, содержащими 500 мл натрий-фосфатного буфера, 0,1% додецилсульфата натрия, при этом в первом использовали тритон X-100 с концентрацией 1%, во втором — 2% и в третьем — 3%. Перфузию проводили со скоростью 150 мл/ч. Содержащиеся в растворах детергенты удаляли из печени перфузией с натрий-фосфатным буфером.

Анализ сосудистого русла матрикса. Децеллюляризованную печень окрашивали на выявление сосудистого русла путем перфузии 0,5% раствора голубого декстрана с молекулярной массой 2 МДа со скоростью 150 мл/ч.

Гистологические исследования печеночного матрикса. Из полученного печеночного матрикса были сделаны криосрезы толщиной 14 мкм на криотоме Leica CM 1900 UV (Leica Microsystems GmbH, Германия). Для этого матрикс в формалине помещали в холодильник при -70°C на 1 ч. Далее производили окраску гематоксилином и эозином для выявления ядросодержащих клеток. На срез наносили гематоксилин на 10 мин, потом смывали водой. Затем на 1 мин наносили эозин, смывали водой. После этого удаляли воду из срезов, инкубируя их в двух порциях 96% этанола по 2 с. Далее производили окончательное обезвоживание срезов, инкубируя их в двух порциях 100% ксилола по 5 с. Полученные окрашенные срезы заключали в канадский бальзам.

Для изучения структуры печеночного матрикса использовали оптический микроскоп Carl Zeiss Axiovert 25 (Jena, Германия) с камерой Axio Cam HRC (Carl Zeiss, Германия).

Изучение механических свойств матрикса печени. Свойства децеллюляризованной печени исследовали на разрывной машине Zwick/Roell BZ 2.5/TNIS (Zwick GmbH & Co. KG, Германия). Для работы на аппарате готовили образцы размером 5 см \times 5 мм. Толщина образцов измеряли и учитывали при расчетах. Образцы помещали в зажимы прибора. Предварительная нагрузка составляла 0,05 Н. Далее проводили испытание образцов на растяжение со скоростью 50 мм/мин. Измеряли значения двух величин: прочность на разрыв в МПа и эластичность, или удлинение в процентах от первоначальной длины образца. Полученные кривые зависимости силы от удлинения обрабатывали статистически с помощью программы TestXpert (Zwick GmbH & Co. KG, Германия).

Получение микрочастиц из децеллюляризованного матрикса печени. Для получения микрочастиц децеллюляризованную печень измельчали с помощью хирургических ножниц, перемещали в пробирку и доводили объем до 15 мл раствором 15% глицерина в натрий-фосфатном буфере с рН=7,4. Инкубировали 20 мин, после чего центрифугировали 10 мин при

8500 г. Осадок измельчали в жидком азоте с помощью предварительно охлажденных пестика и ступки в течение 5 мин. Полученные частицы перемещали в чистую предварительно охлажденную пробирку и доводили объем до 25 мл 70% этанолом при перемешивании. Полученную массу фильтровали через марлю, сложенную вдвое, для избавления от крупных неразмельченных частиц ткани. Полученную суспензию частиц центрифугировали 10 мин при 450 г, супернатант отбирали и к осадку добавляли 25 мл 70% этанола. Затем центрифугировали 10 мин при 450 г и отбирали супернатант. Далее к полученному после центрифугирования осадку объемом 10 мл добавляли 10 мл 70% этанола, ресуспендировали, центрифугировали 5 мин при 450 г, после чего супернатант отбирали и снова к осадку добавляли 10 мл 70% этанола. Процедуру повторили 2 раза. Осадок ресуспендировали, полученная суспензия содержала микрочастицы из децеллюляризованного матрикса печени со средним размером 200 мкм. Процесс фракционирования частиц контролировали визуально на оптическом микроскопе.

Анализ структуры микрочастиц из матрикса печени методом сканирующей электронной микроскопии. Образцы децеллюляризованной печени для сканирующей микроскопии фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом в фосфатно-солевом буфере в течение 2 ч в темноте при комнатной температуре. Далее фиксированные образцы отмывали 5 раз по 5 мин в фосфатно-солевом буфере, затем обезвоживали проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией, инкубируя 30 мин в каждом, и переносили в ацетон. Образцы высушивали методом перехода критической точки с помощью прибора HCP-2 criticalpoint dryer (Hitachi Ltd., Япония). Высушенные образцы покрывали слоем золота толщиной 20 нм в атмосфере аргона при ионном токе 6 мА и давлении 0,1 мм рт. ст. с использованием прибора IonCoaterIB-3 (Eiko Engineering, Япония), затем анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Camscan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания). Разрешение микроскопа — 10 нм, рабочее напряжение — 20 кВ. Изображения получали с использованием программного обеспечения MicroCapture (SMA, Россия).

Анализ пролиферативной активности клеток на децеллюляризованном матриксе. Эксперимент проводили в пробирках объемом 2 мл. Для исследования пролиферативной активности использовали три различных субстрата: 1) частицы, изготовленные из децеллюляризованной печени из 1-й группы образцов; 2) частицы, изготовленные из децеллюляризованной печени из 3-й группы образцов; 3) в качестве положительного контроля применяли цитодекс-3. В каждую пробирку вносили по 50 мкл носителей, 100 мкл среды инкубации DMEM с добавлением 20 ммоль/мл HEPES, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина. Среда инкубации содержала $5,3 \cdot 10^4$ клеток культуры гепатокарциномы человека Hep-G₂. Клетки инкубировали в термостате при 37°C в 5% CO₂ при перемешивании в течение 9 дней.

Оценку пролиферативной активности проводили с помощью МТТ-теста на 3, 6 и 9-й дни эксперимента. В каждую пробирку вносили по 50 мкл пятикратного раствора 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ), который является субстратом для функционирующих в живых клетках митохондриальных дегидрогеназ, инкубировали в термостате при 37°C в 5% CO₂ в течение 4 ч. При этом образовывались нерастворимые темно-синие кристаллы формазана [6]. Затем пробирки центрифугировали в течение 15 мин при 885 g. Супернатант удаляли, осадок формазана растворяли в диметилсульфоксиде. Окрашенный раствор переносили в 96-луночный планшет. Значение оптической плотности регистрировали при длине волны 540 нм на приборе Picon (Picon Incorporated Company, Германия; «Униплан», Россия).

Обработка данных. Статистический анализ результатов проводили методом дисперсионного анализа, уровень статистической значимости *p* принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Децеллюляризация — это метод, в основе которого лежит удаление из ткани или целого органа клеток и большей части компонентов главного комплекса гистосовместимости за счет перфузии с растворами детергентов [7]. Была получена освобожденная от клеток печень крысы путем перфузии с увеличивающимися концентрациями детергентов (рис. 1). Концентрации тритона X-100 для децеллюляризации печени были выбраны из ранее опубликованных источников [8–10], но в нашей работе в рамках одного исследования впервые проведено сравнение трех разных концентраций тритона X-100

в отмывочном буфере для получения децеллюляризованных образцов. Чтобы оценить сохранение функционального сосудистого русла, децеллюляризованный матрикс печени окрашивали внутрисосудистым введением раствора голубого декстрана (см. рис. 1); при использовании всех трех концентраций тритона X-100 отмечено сохранение сосудистого русла.

Сохранение архитектуры сосудистого дерева органа — одно из главных преимуществ данной технологии, поскольку основной проблемой всех искусственных трансплантатов является их адекватная васкуляризация. Именно поэтому децеллюляризацию можно считать перспективной методикой в плане преодоления проблемы обеспечения васкуляризации трансплантата. Еще одним преимуществом этого метода является возможность после децеллюляризации с сохраненными структурными и функциональными особенностями нативной капиллярной сети перезаселять печеночный матрикс взрослыми гепатоцитами и прогенеторными клетками перфузией культуры *in vitro* [11].

Для оценки структуры печеночного матрикса были сделаны криосрезы, полученные препараты окрашивали гематоксилин-эозином. Анализ препаратов показал, что после перфузии оптимально сохранялись трехмерная архитектура и естественный структурный мембранный матрикс. Гистология не выявила ядерного или цитоплазматического окрашивания в децеллюляризованном матриксе (рис. 2). Отмывка от клеток и их компонентов позволяет избежать иммунного ответа при использовании изделий из децеллюляризованного матрикса. Таким образом, децеллюляризация дает возможность создавать биоинженерные конструкции с минимальной имму-

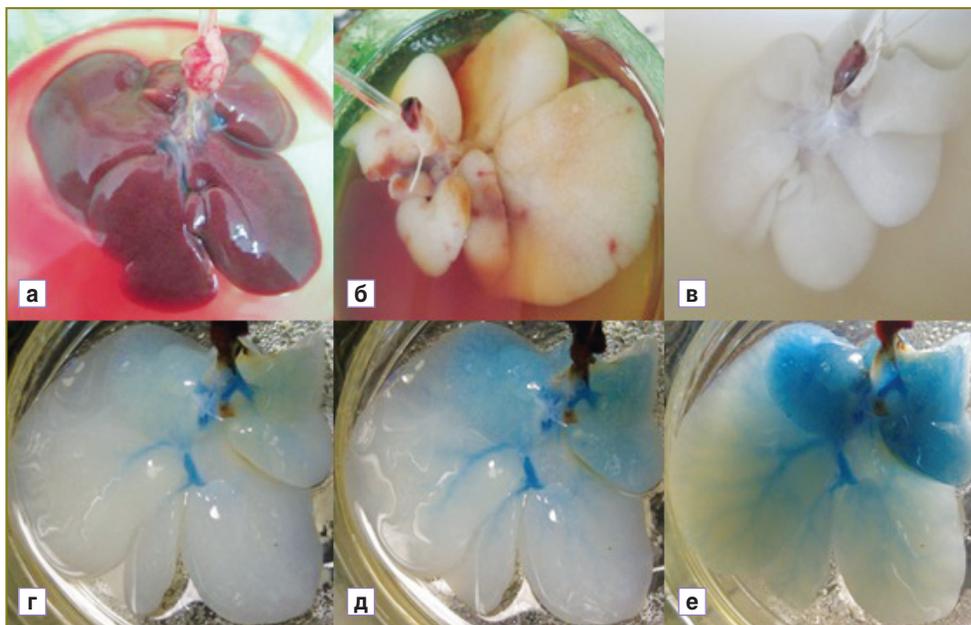


Рис. 1. Децеллюляризованная печень: *a* — перфузия печени с раствором натрий-фосфатного буфера для освобождения от крови; *б* — перфузия печени с лизирующим раствором (образец из 1-й группы); *в* — отмывка печени от детергентов; *г* — печень через 6 мин после начала окрашивания; *д* — печень через 7 мин после начала окрашивания; *е* — печень через 9 мин после начала окрашивания

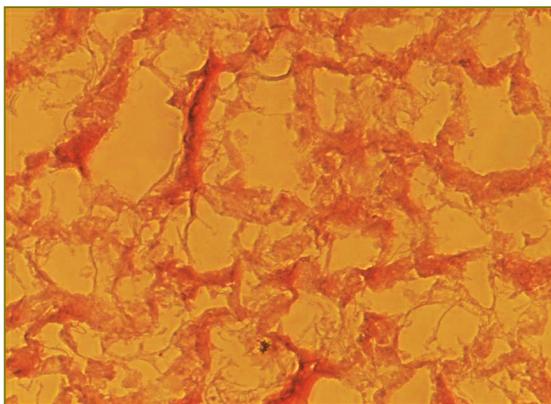


Рис. 2. Межклеточный матрикс децеллюляризованной печени (образец из 3-й группы); окраска гематоксилином и эозином. Сохранена специфическая структура печеночного матрикса, гистология не выявила ядер ($\times 200$, фазовый контраст)

Показатели прочности на разрыв и эластичности различных образцов матрикса печени (указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений)

Образец	Прочность, МПа	Эластичность, %
Децеллюляризованная печень из 1-й группы	0,16 \pm 0,03	64,25 \pm 4,65
Децеллюляризованная печень из 2-й группы	0,18 \pm 0,06	55,33 \pm 10,0
Децеллюляризованная печень из 3-й группы	1,11 \pm 0,04	77,50 \pm 5,79
Нативная печень	0,27 [14]	—

ногенностью. Децеллюляризованный матрикс создает необходимое микроокружение для клеток, которое влияет на их морфологию, дифференцировку и пролиферацию [12] и, следовательно, при заселении клетками обеспечит необходимое окружение для восстановления функциональной активности органа, так как его нативная структура полностью сохранилась. Различий в структуре матриксов, децеллюляризованных с помощью растворов с различными концентрациями тритона X-100, не обнаружено, поэтому данные для образцов из 1-й и 2-й групп не приведены.

Механические свойства межклеточного матрикса, такие как прочность на разрыв и эластичность, являются важными биофизическими параметрами, поскольку способны повлиять на морфологию клеток, их пролиферацию и дифференцировку [13]. Кроме того, механические свойства образцов — важный показатель пригодности изделия в хирургии. Поэтому было проанализировано изменение механических свойств матрикса печени в зависимости от способа децеллюляризации и концентрации детергентов. Для регистрации значения прочности материала на разрыв (МПа) и эластичности (процент удлинения) образцы подвергались деформации на разрывной машине Zwick/Roell

BZ 2.5/TNIS. Значения показателей, измеренных в ходе эксперимента, представлены в таблице.

Таким образом, наиболее прочными и эластичными являются образцы децеллюляризованной печени из 3-й группы. По данным литературы [15], в состав межклеточного матрикса печени входят следующие компоненты: структурные белки (коллаген, эластин), адгезивные белки (фибронектин, ламинин, тенасцин), гликозаминогликаны, протеоглики, гликопротеины. В связи с различной растворимостью компонентов внеклеточного матрикса в отмывочном буфере его качественный и количественный состав может меняться после децеллюляризации органа, что будет обуславливать изменение физических свойств матрикса.

Из полученного децеллюляризованного матрикса печени были изготовлены микрочастицы со средним размером 200 мкм. Суспензия таких частиц может быть использована в качестве носителей гепатоцитов для восстановления печени путем инъекций. Для выявления трехмерной структуры полученных микроносителей образцы микрочастиц децеллюляризованной печени анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 3).

По данным сканирующей электронной микроскопии, матрикс характеризуется разветвленной системой пор размером в среднем 20 мкм. Подобная пористая структура оптимальна для адгезии гепатоцитов [16]. Таким образом, в результате децеллюляризации печени сохраняется пористая разветвленная структура матрикса, что позволяет клеткам глубоко проникать и мигрировать внутри матрикса, тем самым способствуя воссозданию трехмерной структуры нативной ткани печени.

Оценку пролиферативной активности клеток проводили на примере культуры гепатокарциномы человека Нер-G₂. В качестве положительного контроля использовали коммерческий микроноситель цитодекс-3, который представляет собой микросферы со средним диаметром 175 мкм, покрытые денатурированным коллагеном. Наибольшая пролиферативная активность клеток



Рис. 3. Изображение микрочастицы децеллюляризованного печеночного матрикса (образец из 3-й группы), полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии

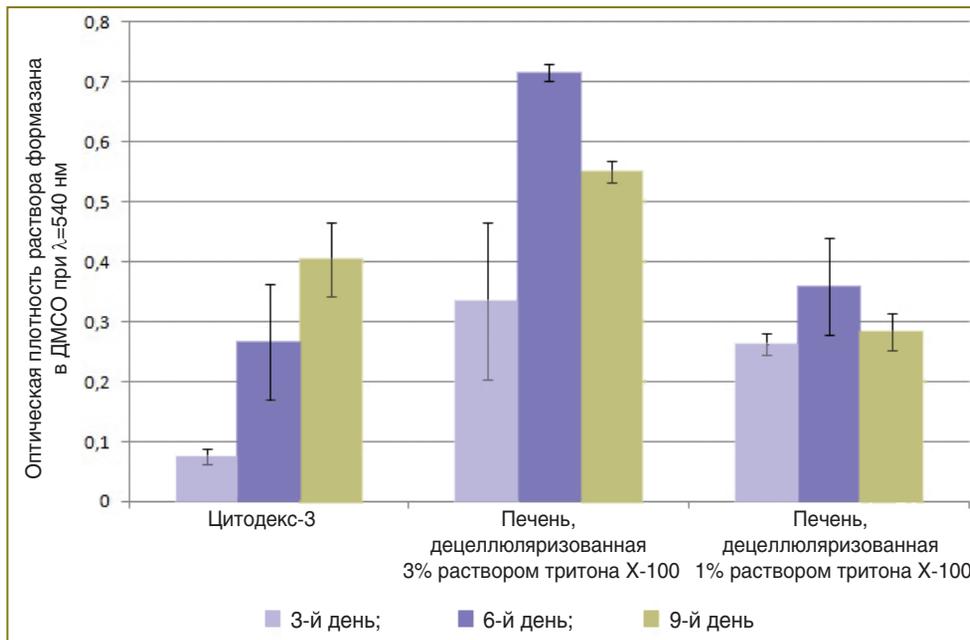


Рис. 4. Данные о пролиферативной активности клеток культуры Hep-G₂ на различных носителях на 3, 6 и 9-й дни эксперимента (указаны значения стандартного отклонения для 5 независимых измерений); ДМСО — диметилсульфоксид

была зарегистрирована на микрочастицах матрикса децеллюляризованной печени из 3-й группы (рис. 4). Более высокая пролиферативная активность может быть обусловлена качественным и количественным изменением состава матрикса, поскольку компоненты внеклеточного матрикса имеют разную растворимость в растворе детергента. При такой концентрации тритона X-100 в ходе перфузии могут стать доступными для клеток экранированные ранее сайты для связывания с рецепторами, способствующие адгезии гепатоцитов, RGD-последовательности на фибронектине и коллагене [17]. Кроме того, путем перфузии 3% раствором тритона X-100 могут высвободиться факторы роста, связанные с компонентами межклеточного матрикса, например фактор роста гепатоцитов в нативных условиях, связанный с перликаном [18].

Такого рода микроматрицы могут быть использованы как носители клеток для гепатоцитарной трансплантации или как материал для инъекционного лечения, так как сохраняются архитектура межклеточного матрикса и предположительно состав белков внеклеточного матрикса, что позволяет создать нативное микроокружение для гепатоцитов.

Децеллюляризация органа является перспективным методом регенеративной медицины не только в области создания полномасштабных биоинженерных конструкций, таких как трансплантат органа, но и в ряде других областей: 1) создание специфических микроносителей для клеток; 2) получение гидрогелей из лиофилизированной децеллюляризованной ткани путем ее обработки пепсином с последующим растворением в натрий-фосфатном буфере; 3) изготовление покрытий из раствора компонентов межклеточного матрикса

ферментативно-расщепленной лиофилизированной децеллюляризованной ткани [19].

Микроносители могут быть использованы в качестве вспомогательного материала при трансплантации в сухом виде или в виде суспензий для инъекций как минимально инвазивный метод лечения. Например, микрочастицы из децеллюляризованного кожного матрикса используются для регенерации кожных покровов [20].

Традиционно применяемая трансплантация гепатоцитов имеет практические ограничения в основном за счет трудностей, связанных с получением достаточного количества функционирующих гепатоцитов, необходимых для терапевтической эффективности [21]. Кроме того, первичные гепатоциты легко утрачивают жизнеспособность и свои функции в культуре как *in vitro*, так и после трансплантации [22]. Одним из способов решения данных проблем может стать культивирование гепатоцитов на гидрогеле из межклеточного матрикса печени или покрытие поверхностей искусственных носителей компонентами матрикса печени для последующего культивирования и трансплантации гепатоцитов [23, 24]. Компоненты межклеточного матрикса в составе изделий создают естественное микроокружение, благоприятное для гепатоцитов, аналогичное микроокружению гепатоцитов в нативной ткани. Такие функциональные носители разрабатываются для тканевой инженерии печени, клеточной терапии и трансплантации. Более того, покрытия из децеллюляризованного матрикса печени и гидрогель на его основе обеспечивают более эффективную адгезию и пролиферацию гепатоцитов, в сравнении с классическими матрицами, такими как коммерческий коллаген и Matrigel [25].

Заключение. Изучение биологических и механических свойств децеллюляризованного матрикса печени крыс линии Wistar, который получен путем перфузии органа через портальную вену раствором, содержащим детергенты, с целью оценки возможности дальнейшего применения его в регенеративной медицине показало, что после децеллюляризации сохраняется трехмерная структура матрикса печени и сосудистого русла. Гистологическая оценка не выявила клеточных ядер и цитоплазматического окрашивания в децеллюляризованном печеночном матриксе. При культивировании клеток человеческой карциномы печени Hep-G₂ на децеллюляризованном матриксе печени их пролиферативная активность значительно выше, чем на искусственном микроносителе цитодексе. Наилучшие показатели по всем исследуемым параметрам зарегистрированы у образцов децеллюляризованной печени, которые получены путем последовательной отмывки растворами, содержащими тритон X-100 с концентрацией 1, 2 и 3%.

В ходе работы подобраны оптимальные параметры децеллюляризации печени крыс линии Wistar. Матрикс, полученный таким образом, имеет свойства, максимально близкие матриксу нативной ткани печени, позволяя разрешить многие проблемы, связанные с восстановлением структуры и функции печени. Более того, технологию децеллюляризации можно применять не только для получения целого бесклеточного матрикса, но и для изготовления микрочастиц, которые могут быть использованы при неинвазивных методах лечения и для поддержания функций печени. Децеллюляризованный матрикс печени и микрочастицы, полученные из него, можно считать уникальными конструкциями, имеющими нативную структуру ткани печени, что обеспечивает возможность их широкого применения в регенеративной медицине и тканевой инженерии.

Благодарности. Благодарим руководителя лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН Новикову Светлану Петровну и научного сотрудника Салохединову Регину Рушановну за помощь в проведении эксперимента по измерению механических свойств.

Финансирование исследования. Данная работа выполнена в рамках проекта ФЦПР 2014–2020 Министерства образования и науки РФ (Соглашение №14.604.21.0001, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0001).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Uygun B.E., Soto-Gutierrez A., Yagi H., Izamis M.L., Guzzardi M.A., Shulman C., Milwid J., Kobayashi N., Tilles A., Berthiaume F., Hertl M., Nahmias Y., Yarmush M.L., Uygun K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* 2010; 16(7): 814–820, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2170>.

2. Nari G.A., Cid M., Comín R., Reyna L., Juri G., Taborda R., Salvatierra N.A. Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers. *Rev Esp Enferm Dig* 2013; 105(3): 138–143, <http://dx.doi.org/10.4321/s1130-01082013000300004>.

3. Kobayashi N., Ito M., Nakamura J., Cai J., Hammel J.M., Fox I.J. Hepatocyte transplantation improves liver function and prolongs survival in rats with decompensated liver cirrhosis. *Transplant Proc* 1999; 31(1–2): 428–429, [http://dx.doi.org/10.1016/s0041-1345\(98\)01691-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0041-1345(98)01691-1).

4. Ye J.-S., Stoltz J.-F., de Isla N., Liu Y., Yin Y.-F., Zhang L. An approach to preparing decellularized whole liver organ scaffold in rat. *Biomed Mater Eng* 2015; 25(1 Suppl): 159–166, <http://dx.doi.org/10.3233/BME-141233>.

5. Harrison R.H., St-Pierre J.P., Stevens M.M. Tissue engineering and regenerative medicine: a year in review. *Tissue Eng Part B Rev* 2014; 20(1): 1–16, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2013.0668>.

6. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

7. Macchiarini P., Jungebluth P., Go T., Asnaghi M.A., Rees L.E., Cogan T.A., Dodson A., Martorell J., Bellini S., Parnigotto P.P., Dickinson S.C., Hollander A.P., Mantero S., Conconi M.T., Birchall M.A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372(9655): 2023–2030, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61598-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61598-6).

8. Shupe T., Williams M., Brown A., Willenberg B., Petersen B.E. Method of the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis* 2010; 6(2): 134–136, <http://dx.doi.org/10.4161/org.6.2.11546>.

9. Pan M.X., Hu P.Y., Chenq Y., Cai L.Q., Rao X.H., Wang Y., Gao Y. An efficient method for decellularization of the rat liver. *J Formos Med Assoc* 2014; 113(10): 680–687, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2013.05.003>.

10. Mirmalek-Sani S.H., Sullivan D.C., Zimmerman C., Shupe T.D., Petersen B.E. Immunogenicity of decellularized porcine liver for bioengineered hepatic tissue. *Am J Pathol* 2013; 183(2): 558–565, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.05.002>.

11. Barnes C.A., Brison J., Michel R., Brown B.N., Castner D.G., Badyak S.F., Ratner B.D. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *Biomaterials* 2011; 32(1): 137–143, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.007>.

12. Pei M., Li J.T., Shoukry M., Zhang Y. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2011; 22: 333–343.

13. Mattei G., Di Patria V., Tirella A., Alaimo A., Elia G., Corti A., Paolicchi A., Ahluwalia A. Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices. *Acta Biomater* 2014; 10(2): 875–882, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.023>.

14. Moffitt T.P., Baker D.A., Kirkpatrick S.J., Prael S.A. Mechanical properties of coagulated albumin and failure mechanisms of liver repaired with the use of an argon-beam coagulator with albumin. *J Biomed Mater Res* 2002; 63(6): 722–728, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.10389>.

15. Caralt M., Velasco E., Lanás A., Baptista P.M. Liver bioengineering: from the stage of liver decellularized matrix to the multiple cellular actors and bioreactor special effects. *Organogenesis* 2014; 10(2): 250–259, <http://dx.doi.org/10.4161/org.29892>.

16. Shirakigawa N., Ijima H., Takei T. Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2012; 114(5): 546–551, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.022>.
17. Canning P., Tan L., Chu K., Lee S.W., Gray N.S., Bullock A.N. Structural mechanisms determining inhibition of the collagen receptor DDR1 by selective and multi-targeted type II kinase inhibitors. *J Mol Biol* 2014; 426(13): 2457–2470, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.014>.
18. Londono R., Badylak S.F. Biological scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling. *Ann Biomed Eng* 2015; 43(3): 577–592, <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-014-1103-8>.
19. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater* 2009; 5(1): 1–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013>.
20. Zuo H., Peng D., Zheng B., Liu X., Wang Y., Wang L., Zhou X., Liu J. Regeneration of mature dermis by transplanted particulate acellular dermal matrix in a rat model of skin defect wound. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23(12): 2933–2944, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-012-4745-9>.
21. Strom S.C., Fisher R.A., Thompson M.T., Sanyal A.J., Cole P.E., Ham J.M., Posner M.P. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63(4): 559–569, <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-199702270-00014>.
22. Zhang W., Tucker-Kellogg L., Narmada B.C., Venkatraman L., Chang S., Lu Y., Tan N., White J.K., Jia R., Bhowmick S.S., Shen S., Dewey C.F. Jr., Yu H. Cell-delivery therapeutics for liver regeneration. *Adv Drug Delivery Rev* 2010; 62(7–8): 814–826, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.02.005>.
23. Hou Y.T., Ijima H., Matsumoto S., Kubo T., Takei T., Sakai S., Kawakami K. Effect of a hepatocyte growth factor/heparin-immobilized collagen system on albumin synthesis and spheroid formation by hepatocytes. *J Biosci Bioeng* 2010; 110(2): 208–216, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.016>.
24. Wang T., Feng Z.-Q., Leach M.K., Wu J., Jiang Q.J. Nanoporous fibers of type-I collagen coated poly(L-lactic acid) for enhancing primary hepatocyte growth and function. *Mater Chem B* 2013; 1(3): 339–346, <http://dx.doi.org/10.1039/c2tb00195k>.
25. Lee J.S., Shin J., Park H.M., Kim Y.G., Kim B.G., Oh J.W., Cho S.W. Liver extracellular matrix providing dual functional of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering. *Biomacromolecules* 2014; 15(1): 206–218, <http://dx.doi.org/10.1021/bm4015039>.