

УДК 57.085.23

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ КАК КЛЮЧЕВОЙ ЭТАП СОЗДАНИЯ БИОСОВМЕСТИМОГО МАТЕРИАЛА

© 2023 г. Д. В. Товпеко^{1,*}, А. А. Кондратенко¹, А. П. Астахов¹, А. А. Гусаков¹, А. И. Зоря¹, Андрей И. Зоря¹, В. Е. Чернов¹, Л. И. Калужная¹

¹НИЦ “Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова” МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: tovpeko.dmitry@gmail.com

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После доработки 09.10.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Острый дефицит подходящих для трансплантации органов и тканей является предпосылкой для развития тканевой инженерии, способствующей решению проблем, возникающих при алло- и ксенногенной трансплантации. Методы тканевой инженерии направлены на создание тканеинженерных конструкций для имплантации с применением биосовместимых материалов самостоятельно или в сочетании с клетками и биологически активными молекулами. Биосовместимый материал должен быть структурно и функционально близким к нативной структуре заменяемого органа или ткани, а также способствовать адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток, используемых при рецеллюляризации. Перспективными для тканевой инженерии считаются биоматериалы на основе естественного внеклеточного матрикса. Одним из наиболее широко используемых и эффективных методов создания неиммуногенной и безопасной конструкции на основе внеклеточного матрикса является технология децеллюляризации, заключающаяся в удалении клеточных компонентов из соответствующих органов и тканей. Децеллюляризацию осуществляют физическими, химическими и ферментативными (биологическими) методами. При использовании любого метода децеллюляризации происходят изменения в составе внеклеточного матрикса, а также в той или иной степени нарушение его структуры, что необходимо учитывать при разработке оптимального протокола децеллюляризации.

DOI: 10.56304/S2782375X23040150

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Основные методы децеллюляризации

1.1. Физические методы обработки

1.2. Химические методы обработки

1.3. Ферментативные методы обработки

2. Оценка полноты децеллюляризации

Заключение

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время во всем мире существует проблема нехватки донорских органов и тканей для трансплантации [1, 2]. За 2022 г. в России выполнено 2555 пересадок органов, из них более 250 детям [3], в то время как в листах ожидания трансплантации органов в медицинских организациях России за этот же год состояло до 10000 реципиентов [3]. Помимо тех, кто находится в листах ожидания, многие пациенты страдают от терминальной стадии заболевания органов, но не считаются кандидатами на трансплантацию по

ряду причин в соответствии с текущими протоколами распределения. Кроме того, учитывая сложности, связанные с организацией донорства органов и их трансплантации, во многих медицинских организациях нашей страны подобные операции не проводят. Что касается пересадки тканей, к сожалению, в России нет соответствующего учета. Но согласно Международному регистру донорства органов и трансплантации (IRO-DaT), например, в Канаде выполнено более 12000 трансплантаций тканей за 2022 г., включая трансплантацию роговицы, кожи, сердечных клапанов и скелетной мышечной ткани.

Острый дефицит подходящих для трансплантации органов и тканей является предпосылкой для развития тканевой инженерии, способствующей решению проблем, возникающих при алло- и ксенногенной трансплантации. Методы тканевой инженерии направлены на создание тканеинженерных конструкций для имплантации с применением биосовместимых материалов самостоятельно или в сочетании с клетками (клеточ-

ными линиями) и биологически активными молекулами [1, 2, 4].

Биосовместимый материал должен быть структурно и функционально близким к нативной структуре заменяемого органа или ткани, а также способствовать адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток, используемых при рецеллюляризации [1]. Перспективными для тканевой инженерии считаются материалы на основе естественного внеклеточного матрикса (ВКМ) [1]. ВКМ представляет собой трехмерную макромолекулярную сеть, состоящую из коллагена, протеогликанов, гликозаминогликанов, эластина, фибронектина, ламининов и других биомолекул [1, 2]. Компоненты ВКМ играют важную роль в мобилизации факторов роста, хемокинов, цитокинов и регулировании адгезии, миграции, дифференцировки и пролиферации клеток [1]. Стоит отметить, что ВКМ по своему биохимическому составу и структурной организации является уникальным для каждой ткани [2] и потому наиболее перспективным для тканевой инженерии.

Одним из наиболее широко применяемых и эффективных методов создания безопасного и биосовместимого неиммуногенного материала на основе ВКМ является технология децеллюляризации, заключающаяся в удалении клеточных антигенов и других иммуногенных компонентов из соответствующих органов и тканей [1, 5, 6].

Были проведены многочисленные исследования с оценкой эффективности различных протоколов децеллюляризации с целью получения биосовместимого материала на основе дермы свиньи [5] и крупного рогатого скота [6], легочной ткани мышей [7], лентиккулы рогавицы человека [8], сердечных клапанов свиньи [9], кровеносных сосудов крыс [10] и свиней [11], суставного хряща [12] и мениска крупного рогатого скота [13], яичников мышей, овец и человека [14], седалищного нерва крыс [15, 16], сухожилий из крысиных хвостов [17], бычьего перикарда [18], печени свиньи [19], тонкой кишки свиньи [19], мочевого пузыря свиньи [19, 20], жировой ткани свиньи [21, 22], амниотической мембраны [23] и пуповины человека [24].

1. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ

Децеллюляризацию осуществляют физическими, химическими и ферментативными (биологическими) методами [1, 2, 25]. Выбор наиболее оптимального и эффективного способа децеллюляризации органа или ткани зависит от многих факторов, включая тип органа, видовую специфичность ткани, ее структуру, клеточный состав и плотность. Изменения в составе ВКМ могут вызывать сами агенты децеллюляризации,

в той или иной степени нарушая его структуру, что необходимо учитывать при разработке и оптимизации протокола децеллюляризации. Сохранность в бесклеточной конструкции на основе ВКМ структуры и всех его основных компонентов представляется необычайно важной и сложной задачей.

1.1. Физические методы обработки

К физическим методам децеллюляризации относят циклы замораживания—оттаивания [12, 24, 26, 27], прямое механическое воздействие [22], обработка ультразвуком [13], градиент давления [28], воздействие сверхкритического диоксида углерода ($scCO_2$) [21] и электропорация [10]. Использование этих методов приводит к лизису клеток без существенного нарушения ультраструктуры органа или ткани [29, 30].

Воздействие циклами попеременного замораживания и оттаивания является одним из наиболее широко используемых методов, при котором происходит образование внутриклеточных кристаллов льда, способных механически повредить клеточные мембраны [1, 30]. Метод попеременного замораживания и оттаивания может повторяться несколько раз, прежде чем обрабатываемый образец подвергнется дальнейшим этапам децеллюляризации. Многократное его повторение не приводит к значительной потере белков [27] и не влияет существенно на механические свойства ВКМ [7].

При электропорации, также называемой не-термической необратимой электропорацией, генерируются электрические импульсы микросекундной длительности для дестабилизации электрического потенциала клеточных мембран, вызывая образование на них микропор, приводящих к нарушению клеточного гомеостаза, и, как следствие, гибели клетки [1, 10]. Этот метод, как правило, сохраняет целостность, морфологию и трехмерную архитектуру ВКМ в органах или тканях, но ограничивается относительно малым размером электродов [1, 10, 30]. Однако, что более важно, децеллюляризация при электропорации должна проводиться *in vivo*, поскольку предполагается, что механизм удаления клеток является иммунноопосредованным [10, 25].

Под ультразвуком понимают звуковые волны, частота которых выше 20 кГц. Обработку ультразвуком, как правило, проводят в растворе додецилсульфата натрия для наиболее полной децеллюляризации [13, 31]. Применение ультразвука инициирует образование кавитационных пузырьков и приводит к увеличению проницаемости матрикса, что усиливает проникновение додецилсульфата натрия вглубь [13]. Такая обработка является эффективным методом децеллю-

ляризации, позволяющим сохранить основные компоненты ВКМ [13, 31]. Однако при увеличении мощности ультразвука, или длительности обработки, или неконтролируемости кавитации, могут наблюдаться структурные нарушения ткани и изменения ее механических свойств [30, 31].

Органы и ткани, которые подвергаются только физической децеллюляризации, в частности циклам замораживания–оттаивания, считаются девитализированными, поскольку клетки лизируются, но клеточный дебрис и генетический материал все еще остаются в обработанном образце [12, 25, 29]. Таким образом, существует риск развития иммунных реакций, которые могут возникнуть в связи с наличием в ткани остаточного клеточного и генетического материала [29]. Поэтому физические методы рекомендуется сочетать с другими для достижения полной децеллюляризации [12, 29, 30].

1.2. Химические методы обработки

При химической децеллюляризации применяют кислоты [18, 20] и основания [5, 6, 14], детергенты (поверхностно-активные вещества) [5, 12, 14, 20, 24, 26], гипо- и гипертонические растворы [8, 15, 16], хелатирующие вещества [23] и различные растворители (например, спирты, ацетон и трибутилфосфат) [1, 17, 19, 22].

Обычно используют такие кислоты, как уксусная, надуксусная, соляная и серная, и такие основания, как гидроксиды аммония, кальция и натрия. Кислоты солибилизируют цитоплазматические компоненты и разрушают нуклеиновые кислоты и их фрагменты [14, 25]. Щелочные растворы вызывают или катализируют деградацию нуклеиновых кислот и биомолекул путем гидролиза [2, 6]. Одним из основных недостатков при обработке кислотами является то, что они могут снижать прочность и механические свойства ВКМ из-за воздействия на его некоторые основные компоненты [1, 2, 18]. Так, при обработке уксусной кислотой могут наблюдаться разрушение и удаление коллагенов из ВКМ с соответствующим снижением прочности конструкции [18]. В то же время использование щелочных растворов может способствовать существенным изменениям структуры матрикса в связи с частичной денатурацией молекул коллагена [6, 14], а также приводить к удалению факторов роста [5]. Успешность децеллюляризации будет варьироваться в зависимости от типа и концентрации используемой кислоты или основания, времени обработки и типа обрабатываемого материала.

Химическая децеллюляризация также может быть выполнена с использованием детергентов. Различают три их основных типа: неионные, ионные и цвиттерионные [1, 2, 25, 29].

Неионные детергенты, такие как Triton X-100, разрушают клеточную мембрану, нарушая липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, в значительной степени сохраняя белок-белковые [2, 25, 26]. При их воздействии белки растворяются, но нативная структура белков, как правило, остается неизменной [2]. Основным недостатком неионных детергентов является то, что при длительном воздействии они способны вызвать значительное снижение содержания гликозаминогликанов и отрицательно повлиять на ультраструктуру ВКМ [2, 25, 26].

Ионные детергенты, такие как додецилсульфат натрия, дезоксихолат натрия, Triton X-200, лизируют клетки и разрушают их мембраны, подвергают клеточное содержимое дальнейшей деградации, а затем удаляют клеточную популяцию и дебрис из ткани [12, 25]. Ионные детергенты имеют тенденцию вызывать денатурацию и расщепление белков за счет белок-белковых взаимодействий, сопровождающихся изменением их нативной структуры [2], а также удалять факторы роста из тканей [5]. Кроме того, они могут приводить к значительной потере сульфатированных гликозаминогликанов [12, 20, 24, 27] и оказывать негативное влияние на процесс рецеллюляризации из-за цитотоксичности, обусловленной их остаточным содержанием в полученном материале [2, 9]. Как правило, ионные детергенты считаются более эффективными, чем неионные [17], однако их влияние на целостность и состав ткани зависит от конкретного органа, типа ткани, концентрации и длительности воздействия [12, 17, 20].

Цвиттерионные детергенты, такие как 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS), сульфобетаин-10 (SB-10) и сульфобетаин-16 (SB-16), обладают свойствами как ионных, так и неионных детергентов [25]. Хотя цвиттерионные детергенты вызывают меньшую денатурацию белков по сравнению с ионными, они также склонны удалять меньшее количество клеточного материала [29].

Использование гипо- и гипертонических растворов приводит к лизису клеток, вызывая осмотический шок и разрушение клеточной мембраны в органах и тканях, оказывая минимальное влияние на молекулы матрикса или его структуру [15, 25]. Для достижения максимального осмотического эффекта принято поочередно погружать органы или ткани в гипо- и гипертонические растворы в течение нескольких циклов [16]. Гипотонические растворы могут лизировать клетки за счет осмотического шока и способствовать увеличению проникновения других агентов децеллюляризации, в то время как гипертонические растворы обезживают клетки и разрушают связь ДНК с белками [8]. Однако гипо- и гипертонические растворы не

способны полностью очистить и удалить клеточный дебрис из тканей [16, 25].

Хелатирующие вещества (или хелатообразующие агенты), такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) и этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA), нарушают адгезию клеток к белкам ВКМ, секвестрируя ионы металлов (Ca^{2+} и Mg^{2+}) [23, 25]. Как правило, их применяют совместно с детергентами или ферментами, поскольку они не способны вызвать даже поверхностного удаления клеток [23, 25].

1.3. Ферментативные методы обработки

Ферментативная децеллюляризация чаще всего используется непосредственно после других методов децеллюляризации или совместно с ними с целью облегчения деградации клеток и более эффективного удаления остаточного ядерного материала из матрикса [22, 29]. Обычно используют трипсин [5, 11], нуклеазы [16, 24], липазу [22], диспазу [23], термолизин [23] и α -галактозидазу [32]. Каждый из ферментов характеризуется своим собственным механизмом действия.

Трипсин представляет собой сериновую протеазу, которая селективно гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами основных аминокислот – лизина и аргинина [11, 25]. Эффективность децеллюляризации и сохранение компонентов ВКМ при обработке трипсином зависят от его концентрации и времени воздействия [11]. Полная децеллюляризация только трипсином требует длительного времени воздействия, что коррелирует со снижением уровня некоторых белков и гликозаминогликанов [26], приводя к отрицательным изменениям механических свойств ВКМ [11].

Нуклеазы, такие как дезоксирибо- и рибонуклеаза, расщепляют фосфодиэфирные связи между нуклеотидными субъединицами нуклеиновых кислот [25]. Как правило, эти ферменты используются совместно с химическими методами обработки, что приводит к более эффективной элиминации нуклеиновых кислот [9]. Однако удаление самих нуклеаз после обработки затруднено [25].

При использовании диспазы происходит гидролиз N-концевых пептидных связей неполярных аминокислотных остатков. Преимущество диспазы заключается в том, что она расщепляет только фибронектин и коллаген IV. Длительная обработка диспазой ограничена из-за прямого воздействия на общую ультраструктуру ВКМ [25].

Чтобы свести к минимуму нежелательные эффекты при обработке ферментами, следует тщательно выбирать подходящую концентрацию, температуру и длительность обработки [1]. Сочетанное использование ферментов и детергентов

или хелатирующих агентов является более эффективным [2].

2. ОЦЕНКА ПОЛНОТЫ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ

Для оценки полноты (эффективности) децеллюляризации проводят количественные и качественные методы исследования. Измерение количества двухцепочечной (дц) ДНК в децеллюляризованном матриксе является текущим “золотым стандартом” для оценки степени успешной децеллюляризации. Минимальными критериями качественной децеллюляризации являются:

- количественное содержание дцДНК менее 50 нг на миллиграмм сухой массы;
- фрагменты ДНК должны иметь длину менее 200 пар нуклеотидов;
- отсутствие ядерного материала в тканевых срезах при гистологическом окрашивании гематоксилином и эозином (haematoxylin and eosin, H&E) и окрашивании флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) [25].

Комплекс иммуногистохимических, гистологических и микроскопических методов исследования позволяет оценить изменения структуры ВКМ, а также его биохимический состав [33]. Количество гликозаминогликанов и коллагена в полученном материале, как правило, определяют с использованием 1,9-диметил-метиленового синего и реактива Эрлиха соответственно [24, 27]. Методы визуализации, такие как сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия и микрокомпьютерная томография, могут использоваться для оценки сохранности структуры ВКМ [33]. Кроме того, в зависимости от предполагаемого клинического применения могут быть исследованы механические свойства полученного материала, включая модуль упругости и прочность при растяжении [29, 33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большое количество разработанных методов децеллюляризации органов и тканей, не существует универсального подхода, который бы обеспечивал как полное удаление клеточных компонентов и генного материала с сохранением структуры и основных компонентов ВКМ, так и подходил бы ко всем органам и тканям. В связи с этим при разработке и оптимизации протокола децеллюляризации необходимо учитывать множество факторов, включая специфичность органа, тип, толщину, плотность и клеточный состав ткани, а также предполагаемое клиническое применение полученного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yi S., Ding F., Gong L., Gu X.* // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2017. V. 12. № 3. P. 233.
<https://doi.org/10.2174/1574888X11666160905092513>
2. *Cesur N.P., Yalman V., Laçin Türkoğlu N.* // *Cumhur. Med. J.* 2020. V. 42. № 2. P. 192.
<https://doi.org/10.7197/cmj.vi.609592>
3. *Готье С.В., Хомяков С.М.* // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2023. Т. 25. № 3. С. 8.
<https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-3-8-30>
4. *Крюков Е.В., Брижань Л.К., Хоминец В.В. и др.* // *Генеральный ортопедии.* 2019. Т. 25. № 1. С. 49.
<https://doi.org/10.18019/1028-4427-2019-25-1-49-57>
5. *Reing J.E., Brown B.N., Daly K.A. et al.* // *Biomaterials.* 2010. V. 31. № 33. P. 8626.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.083>
6. *Калмыкова Н.В., Демьяненко И.А., Шевлягина Н.В. и др.* // *Морфологические ведомости.* 2016. Т. 24. № 4. С. 36.
[https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24\(4\):36-45](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24(4):36-45)
7. *Nonaka P.N., Campillo N., Uriarte J.J. et al.* // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2014. V. 102. № 2. P. 413.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.34708>
8. *Huh M.I., Lee K.P., Kim J. et al.* // *J. Ophthalmol.* 2018. V. 2018. P. 2590536.
<https://doi.org/10.1155/2018/2590536>
9. *Rieder E., Kasimir M.T., Silberhumer G. et al.* // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004. V. 127. № 2. P. 399.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.06.017>
10. *Phillips M., Maor E., Rubinsky B.* // *J. Biomech. Eng.* 2010. V. 132. № 9. P. 091003.
<https://doi.org/10.1115/1.4001882>
11. *Gu Y., Wang F., Wang R. et al.* // *Cell Tissue Banking.* 2018. V. 19. № 3. P. 311.
<https://doi.org/10.1007/s10561-017-9675-9>
12. *Tavassoli A., Matin M.M., Niaki M.A. et al.* // *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2015. V. 18. № 12. P. 1221.
13. *Yusof F., Sha'ban M., Azhim A.* // *Int. J. Nanomed.* 2019. V. 14. P. 5491.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S207270>
14. *Eivazkhani F., Abtahi N.S., Tavana S. et al.* // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. V. 102. P. 670.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.092>
15. *Kim J.K., Koh Y.D., Kim J.O., Seo D.H.* // *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2016. V. 69. № 12. P. 1690.
<https://doi.org/10.1016/j.jbpts.2016.08.016>
16. *Cornelison R.C., Wellman S.M., Park J.H. et al.* // *Acta Biomater.* 2018. V. 77. P. 116.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.009>
17. *Cartmell J.S., Dunn M.G.* // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. V. 49. № 1. P. 134.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(200001\)49:1<134::aid-jbm17>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(200001)49:1<134::aid-jbm17>3.0.co;2-d)
18. *Dong X., Wei X., Yi W. et al.* // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2009. V. 20. № 11. P. 2327.
<https://doi.org/10.1007/s10856-009-3791-4>
19. *Brown B., Lindberg K., Reing J. et al.* // *J. Tissue Eng.* 2006. V. 12. № 3. P. 519.
<https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.519>
20. *Kao C.Y., Nguyen H.Q., Weng Y.C.* // *Polymers (Basel).* 2020. V. 12. № 12. P. 3007.
<https://doi.org/10.3390/polym12123007>
21. *Chung S., Kwon H., Kim N.P.* // *J. Cosmet. Med.* 2019. V. 3. P. 86.
<https://doi.org/10.25056/JCM.2019.3.2.86>
22. *Brown B.N., Freund J.M., Han L. et al.* // *Tissue Eng. C. Methods.* 2011. V. 17. № 4. P. 411.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2010.0342>
23. *Hopkinson A., Shanmuganathan V.A., Gray T. et al.* // *Tissue Eng. C. Methods.* 2008. V. 14. № 4. P. 371.
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0315>
24. *Safari F., Fani N., Eglin D. et al.* // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2019. V. 107. № 8. P. 1793.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.36698>
25. *Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F.* // *Biomater.* 2011. V. 32. № 12. P. 3233.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
26. *Cheng J., Wang C., Gu Y.* // *Biomed. Mater. Eng.* 2019. V. 30. № 2. P. 191.
<https://doi.org/10.3233/BME-191044>
27. *Fernández-Pérez J., Ahearne M.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 14933.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-49575-2>
28. *Sierad L.N., Shaw E.L., Bina A. et al.* // *Tissue Eng. C. Methods.* 2015. V. 21. № 12. P. 1284.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2015.0170>
29. *Kim Y.S., Majid M., Melchiorri A.J., Mikos A.G.* // *Bio-engineering Translational Medicine.* 2019. V. 4. № 1. P. 83.
<https://doi.org/10.1002/btm2.10110>
30. *Rabbani M., Zakian N., Alimoradi N.* // *J. Med. Signals Sensors.* 2021. V. 11. № 1. P. 1.
https://doi.org/10.4103/jmss.JMSS_2_20
31. *Lin C.H., Hsia K., Su C.K. et al.* // *Polymers (Basel).* 2021. V. 13. № 11. P. 1699.
<https://doi.org/10.3390/polym13111699>
32. *Nam J., Choi S.Y., Sung S.C. et al.* // *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2012. V. 45. № 6. P. 380.
<https://doi.org/10.5090/kjtcs.2012.45.6.380>
33. *Сотниченко А.С., Губарева Е.А., Куевда Е.В. и др.* // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2017. Т. 19. № 3. С. 65.
<https://doi.org/10.15825/1995-1191-2017-3-65-69>