

DOI: 10.15825/1995-1191-2023-3-76-86

ВЛИЯНИЕ ТРИПСИНА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО СУСТАВНОГО ХРЯЦА СВИНЬИ

А.Д. Кириллова, Е.А. Немец, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, В.А. Рыжикова, Е.А. Волкова, Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов

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

Цель работы: исследовать влияние включения в протокол децеллюляризации суставного хряща свиньи стадии предобработки его трипсином на способность к восстановлению биохимического состава и функциональных свойств полученной мелкодисперсной тканеспецифической матрицы при сокультивировании с мезенхимными стромальными клетками жировой ткани человека (МСК ЖТч). **Материалы и методы.** Суставной хрящ свиньи микронизировали до размеров не более 250 мкм. Полученные микрочастицы суставного хряща свиньи (МХс) обрабатывали раствором трипсина (0,05; 0,25; 0,50%) / ЭДТА при +37 °С в течение 24 часов. Далее МХс последовательно инкубировали в течение 24 часов в трех растворах поверхностно-активных веществ, содержащих 0,1% додецилсульфат натрия и повышающуюся концентрацию Triton X-100 (1, 2, 3%), при комнатной температуре и в растворе ДНКазы I типа при +37 °С в течение 48 часов. Затем оценивали степень изменения биохимического состава и способность децеллюляризованных МХс (ДМХс) матриц в составе клеточно-инженерных конструкций (КИК) поддерживать адгезию МСК ЖТч, их пролиферацию, а также потенциальную способность оказывать стимулирующее регенерационное воздействие. В ДМХс и КИК исследовали содержание ДНК, гликозаминогликанов (ГАГ) и коллагена. Морфологию образцов исследовали с использованием гистологического и иммуногистохимического окрашивания. **Результаты исследования.** Гистологический анализ показал отсутствие клеток и детрита в образцах ДМХс. При предварительной обработке МХс раствором с наименьшим содержанием трипсина (0,05%) / ЭДТА в образцах сохранилось $5,14 \pm 0,87$ нг/мг ДНК, при этом снизилось содержание ГАГ до $5,34 \pm 0,9$ мкг/мг и коллагена до 154 ± 34 мкг/мг. К 28-м суткам культивирования КИК выявлена наработка адгезированными клетками собственного внеклеточного матрикса (ВКМ), содержащего ГАГ и коллаген. Количество ДНК в нем составляло $6,30 \pm 0,11$ мкг/КИК, а количество ГАГ $19,36 \pm 0,73$ мкг/КИК. **Заключение.** Предобработка трипсином позволяет достичь равномерной полной децеллюляризации МХс. Вместе с тем наступившие изменения состава ВКМ свидетельствуют о снижении способности МСК ЖТч в процессе сокультивирования с ДМХс синтезировать ГАГ и коллаген II типа. Увеличение пролиферативной активности адгезированных МСК ЖТч, а также тканеспецифичность ДМХс-матрицы позволят продолжить исследования в направлении создания гидрогелевой формы матрикса, способной повысить специфический и стимулирующий регенераторный потенциал в процессе сокультивирования с клетками того же фенотипа.

Ключевые слова: хрящевая ткань, децеллюляризация, трипсин, мезенхимные стромальные клетки, тканевая инженерия.

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

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

EFFECT OF TRYPSIN ON BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF DECELLULARIZED PORCINE ARTICULAR CARTILAGE

A.D. Kirillova, E.A. Nemets, A.M. Grigoriev, L.A. Kirsanova, V.A. Ryzhikova, E.A. Volkova, Yu.B. Basok, V.I. Sevastianov

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

Objective: to study the effect of trypsin pretreatment in the porcine articular cartilage decellularization protocol on the ability to restore the biochemical composition and functional properties of the resulting finely dispersed tissue-specific scaffold when co-cultured with human adipose-derived stem cells (hADSCs). **Materials and methods.** Porcine articular cartilage was micronized to a maximum size of 250 μm . The resulting porcine articular cartilage microparticles (CMps) were treated with trypsin (0.05, 0.25, 0.50%) / EDTA solution at +37 °C for 24 hours. Then, the CMps were successively incubated for 24 hours in three surfactant solutions containing 0.1% sodium dodecyl sulfate and increasing concentration of Triton X-100 (1, 2, 3%) at room temperature and in DNase I solution at +37 °C for 48 hours. The degree of change in the biochemical composition and the ability of decellularized CMps (DCMps) scaffolds within cell-engineered constructs (CECs) to support hADSC adhesion and proliferation, as well as their potential ability to exert a stimulatory regenerative effect, were then assessed. DNA, glycosaminoglycans (GAGs) and collagen content in the DCMps and CECs were examined. The morphology of the samples was examined using histological and immunohistochemistry staining. **Results.** Histological analysis showed that there were no cells and detritus in the DCMp samples. Pretreatment of CMps with a solution with the lowest content of trypsin (0.05%) / EDTA in the samples retained 5.14 ± 0.87 ng/mg DNA in the samples, while GAG content decreased to 5.34 ± 0.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and collagen to 154 ± 34 $\mu\text{g}/\text{mg}$. By day 28 of CEC cultivation, adherent cells had produced their own extracellular matrix (ECM) containing GAGs and collagen. The amount of DNA in it was 6.30 ± 0.11 $\mu\text{g}/\text{CEC}$ and that of GAGs was 19.36 ± 0.73 $\mu\text{g}/\text{CEC}$. **Conclusion.** Pretreatment with trypsin allows achieving uniformly complete decellularized CMps. At the same time, onset of changes in the ECM composition indicates a decrease in the ability of hADSCs to synthesize GAGs and type II collagen during co-culturing with DCMps. The increased proliferative activity of adherent hADSCs, as well as the tissue specificity of the DCMp scaffold will allow further research towards a hydrogel matrix capable of enhancing the specific and stimulating regenerative potential when co-cultured with cells of the same phenotype.

Keywords: cartilage tissue, decellularization, trypsin, mesenchymal stromal cells, tissue engineering.

ВВЕДЕНИЕ

Перспективным терапевтическим решением проблемы восстановления структуры и функций поврежденной хрящевой ткани являются технологии малоинвазивного внутрисуставного введения клеточно-инженерных конструкций (КИК), состоящих из резорбируемых биосовместимых матриц (скаффолдов, носителей), нагруженных стволовыми или тканеспецифическими клетками, и биоактивных молекул. Многообещающими выглядят матрицы из децеллюляризованных тканей, способные не только удерживать клетки в зоне повреждения хряща, но и обеспечивать им необходимые для жизнедеятельности условия.

Децеллюляризацией называют процесс, при котором происходит полное разрушение клеток и удаление клеточного материала из ткани или органа под определенным воздействием. При этом важной задачей децеллюляризации является максимально возможное сохранение компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), что позволяет тканеспецифическо-

му скаффолду поддерживать адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток [1].

В настоящее время тканеспецифические скаффолды получают из децеллюляризованного цельного органа (печени, почек, сердца, легких, поджелудочной железы) [2–6] или из децеллюляризованных микрофрагментов органа [7, 8] с использованием физических, химических и ферментативных способов обработки [9]. Достаточно часто применяют сразу несколько способов обработки. Например, при децеллюляризации хрящевой ткани к стандартной обработке поверхностно-активными веществами (ПАВ) добавляют циклы замораживания/оттаивания, обработку ДНКазой I типа [10] и сверхкритическим диоксидом углерода (ск- CO_2), что позволяет облегчить диффузию децеллюляризирующих агентов в объем ВКМ [11] и тем самым обеспечить более эффективный лизис клеток [12], сократить время и повысить однородность обработки ткани.

Одним из методов децеллюляризации органов и тканей служит обработка их хелатирующими

агентами, такими как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). ЭДТА способствует диссоциации клеток от белков ВКМ путем связывания ионов металлов [13, 14]. Так как даже при интенсивном перемешивании одних хелатирующих агентов для удаления клеток недостаточно [15], то их обычно используют в сочетании с ферментами, в том числе с трипсином [16, 17].

Трипсин обычно используется в качестве ферментативного агента децеллюляризации для отделения клеток от структурных белков ВКМ, разрушения ультраструктуры тканей и улучшения диффузии в объеме последующих децеллюлярирующих агентов [16, 17]. Степень удаления клеток и компонентов ВКМ под действием трипсина зависит от срока инкубации. Полная децеллюляризация только трипсином может потребовать длительной инкубации (не менее 24 часов) даже для неплотных тканей [18]. Заметим, что белки обладают ограниченной устойчивостью к расщеплению трипсином [19], поэтому длительное воздействие трипсина даже в концентрации 0,03–0,05% способно существенно снизить концентрацию биомолекул ВКМ (гликозаминогликанов (ГАГ), коллагена, эластина), нарушить его структуру и изменить механические свойства [20–22].

Таким образом, для улучшения эффективности процесса децеллюляризации на начальном этапе применяют сочетание двух агентов – трипсина и ЭДТА. При этом для минимизации негативного влияния трипсина на белки ВКМ концентрацию трипсина снижают, добавляя в процесс децеллюляризации и другие методы, например обработку ткани ПАВ или ДНКазой. Особенно это актуально для полного удаления клеточных ядер из плотных тканей, например хряща [23].

Несмотря на то что предварительная обработка трипсином описана в ряде протоколов децеллюляризации хряща [24, 25], эти исследования ограничиваются лишь анализом биохимических и механических свойств децеллюляризованной матрицы, а также оценкой ее цитотоксичности *in vitro* и функциональной эффективности *in vivo*. При этом влияние существенного снижения содержания ГАГ и коллагена в децеллюляризованной ткани хряща на способность адгезированных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) при сокультивировании синтезировать ГАГ и коллаген II типа не исследовали.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния включения в протокол децеллюляризации суставного хряща свиньи стадии предобработки его трипсином на способность к восстановлению биохимического состава и функциональных свойств полученной мелкодисперсной тканеспецифической матрицы при адгезии МСК ЖТч в процессе их сокультивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объект исследования, суставной хрящ тазобедренных и коленных суставов свиньи, получен от ООО «АПК «ПРОМАГРО» г. Старый Оскол после забоя здоровых животных. После транспортировки в охлажденном виде (+4 °С) хрящ удаляли с суставных поверхностей скальпелем, нарезали фрагментами размером не более 5 × 5 × 5 мм, замораживали при –20 °С и хранили при этой температуре до момента начала криопомола. Для получения микрочастиц хряща свиньи (МХс) применяли метод криопомола с использованием криомельницы CryoMill (Retch, Германия).

Определение размеров частиц

Распределение по размерам МХс в суспензии определяли методом лазерной дифракции с использованием проточной ячейки лазерного дифракционного анализатора SALD-7101 (Shimadzu, Япония). Для проведения измерения размеров микрочастиц использовали коэффициент преломления 1,35. В качестве дисперсной среды был выбран глицерин. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения WingSald II (Shimadzu, Япония).

Режимы децеллюляризации

Навеску 100 мг МХс помещали в раствор трипсина 2500 ед/мг (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0,05; 0,25 и 0,50% с 0,53 мМ ЭДТА (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали при +37 °С и периодическом перемешивании на магнитной мешалке (3 раза в сутки по 1 часу при скорости 200 оборотов в минуту) в течение 24 часов.

Затем МХс обрабатывали в трех сменах раствора фосфатно-солевого буфера pH = 7,4 («ПанЭко», Россия), содержащего 0,1% додецилсульфат натрия (SDS) (Sigma-Aldrich, США) и повышающуюся концентрацию Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США), при комнатной температуре и периодическом перемешивании:

- 1) раствор, содержащий 1% Triton X-100 + 0,1% SDS – 24 часа;
- 2) раствор, содержащий 2% Triton X-100 + 0,1% SDS – 24 часа;
- 3) раствор, содержащий 3% Triton X-100 + 0,1% SDS – 24 часа.

Для достижения полноты децеллюляризации МХс дополнительно инкубировали в растворе ДНКазы I типа («СайСторЛаб», Россия) в течение 48 часов при температуре +37 °С.

Для отмывки децеллюляризованных микрочастиц хряща свиньи (ДМХс) от децеллюлярирующих агентов применяли водный раствор антибиотика (ампи-

циллин, 20 мкг/мл) и антимикотика (амфотерицин В, 2 мкг/мл).

Отмытые образцы ДМХс-матриц стерилизовали γ -облучением дозой 1,5 Мрад.

Количественное определение ДНК

Выделение ДНК проводили с использованием набора DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для определения двухцепочечной ДНК использовали набор для анализа с флуоресцентным красителем Quant-iT Picogreen dsDNA Assay Kits and dsDNA Reagents (ThermoFisherScientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Дальнейший анализ проводили с использованием планшетного спектрофлуориметра Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария) при длине волны 520 нм.

Количественное определение ГАГ

Для анализа содержания ГАГ образцы предварительно инкубировали в растворе папаина (Sigma-Aldrich, США) при +65 °С в течение 12 часов. Для определения ГАГ использовали катионный краситель 1,9-диметилметиленовый синий (DMMB) (Sigma-Aldrich, США). Окрашивание проводили в 96-луночном планшете: в лунку добавляли 20 мкл лизата и 200 мкл рабочего раствора красителя и затем определяли содержание ГАГ на планшетном спектрофлуориметре Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария) при длине волны 525 нм.

Количественное определение коллагена

Содержание коллагена определяли с применением набора Sircol Soluble Collagen Assay (Biocolor, Великобритания) в образцах исходной ткани и в децеллюляризованных микрочастицах хряща свиньи (ДМХс). Для экстракции коллагена все образцы лизировали в растворе 0,01 М HCl, содержащем 1 мг/мл пепсина (Sigma-Aldrich, США), в течение 12 часов при комнатной температуре. Полученные лизаты обрабатывали реагентами из набора согласно инструкции производителя. Оптическую плотность в каждом образце определяли в 96-луночных планшетах при длине волны 556 нм на планшетном спектрофлуориметре Spark 10M (Tecan Trading, Швейцария).

Исследование функциональных свойств ДМХс-матрицы

Функциональная эффективность тканеспецифической ДМХс-матрицы заключается в поддержании адгезии, пролиферации и функциональной активности тканеспецифических клеток *in vitro*. Мы исследовали способность ДМХс и МСК ЖТч при сокультивировании образовывать КИК, содержащую ГАГ и коллаген. Источником МСК ЖТч была подкожная

жировая клетчатка здорового донора, полученная при информационном добровольном согласии.

Каждая КИК включала 5 мг стерильных ДМХс и 5×10^5 МСК ЖТч, полученных в асептических условиях. Матрикс заселяли клетками в пробирках с полной ростовой средой (ПРС) на орбитальном шейкере MultiBio 3D (Biosan, Латвия) и затем инкубировали в стандартных условиях в течение 3 суток. ПРС содержала DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) (1 : 1) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), 1% антибиотика-антимикотика (Gibco, США) и 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия). Затем ПРС заменяли на хондрогенную дифференцировочную среду, включавшую DMEM HG (Gibco, США), 10% ITS+ (Corning, США), 1% пирувата натрия (Gibco, США), 0,25% аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 0,0001% дексаметазона (Sigma-Aldrich, США), 0,002% трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- β 1) (PeproTech, США) и 1% антибиотика-антимикотика (Gibco, США), и культивировали в течение 28 суток. Замену среды осуществляли каждые вторые сутки. В эксперименте использовали клетки третьего пассажа.

Оценку жизнеспособности МСК ЖТч в составе КИК проводили методом прижизненного окрашивания с применением набора LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и инвертированного микроскопа Leica DMi8 Thunder (Leica Microsystems, ФРГ). Морфологию образцов исследовали с использованием гистологического и иммуногистохимического окрашивания.

Гистологическое

и иммуногистохимическое исследование

Образцы фиксировали в 10% растворе формалина, промывали в проточной воде и обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в смеси этанола с хлороформом, затем в хлороформе и заливали в парафин. Срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали DAPI, гематоксилином и эозином, альциановым синим и по методу Массона. Иммуногистохимическое исследование на коллаген II типа проводили с использованием Novocastra Lyophilized Rabbit Polyclonal antibody Collagen Type II, для визуализации применяли систему детекции Novocastra Concentrated Peroxidase Detection System (Leica Biosystems, ФРГ). Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили с использованием инвертированного микроскопа Nikon EclipseTi (Nikon, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены результаты измерений 5 образцов ДМХс. Размер микрочастиц не превышал 220 мкм, что позволяет разрабатывать для использо-

вания малоинвазивную инъекционную форму КИК на основе ДМХс-матрицы.

Ранее мы показали [10], что применение только ПАВ не обеспечивает эффективной степени децеллюляризации МХс. Было высказано предположение, что введение стадии предварительной обработки МХс раствором трипсина/ЭДТА с последующей инкубацией образцов в растворах ПАВ и ДНКазы позволит повысить полноту децеллюляризации.

В настоящем исследовании при гистологическом анализе в ДМХс независимо от использованной концентрации трипсина клетки обнаружены не были (рис. 2). Также не визуализировались ядерный материал и клеточный детрит, что свидетельствует о равномерной децеллюляризации МХс (рис. 2, д, и, н). Отсутствие ядерного материала во всех ДМХс-матрицах (рис. 2, з, м, р), в отличие от исходного состояния ткани (после криодеструкции) (рис. 2, г), было подтверждено при окрашивании образцов флуоресцентным красителем DAPI.

При окрашивании по Массону ВКМ исходной ткани гомогенно окрашивался исключительно в синий цвет благодаря присутствию коллагена [26]. Вместе с тем при окрашивании ДМХс-матрицы тем же способом выявлялась метахромазия, увеличивающаяся по мере роста концентрации трипсина (рис. 2, е, к, о), что свидетельствует о биохимических изменениях в децеллюляризованном ВКМ.

Нативный ВКМ суставного хряща интенсивно окрашивался альциановым синим на ГАГ (рис. 2, в), в отличие от образцов ДМХс-матриц, в которых качественным методом ГАГ обнаружены не были (рис. 2, ж, л, п).

Данные проведенного гистологического анализа подтвердили высокую эффективность децеллюляризации ткани суставного хряща – отсутствие клеток и клеточного детрита независимо от концентрации

трипсина в диапазоне от 0,05 до 0,50%. Поэтому, принимая во внимание, что ферментативные методы децеллюляризации, в частности трипсин, снижают остаточное количество ГАГ в децеллюляризованных тканях [27], дальнейшие исследования мы проводили только с ДМХс-матрицей, обработанной минимальной концентрацией трипсина (0,05%), позволяющей свести к минимуму отрицательное воздействия трипсина на состав ВКМ.

Еще одним показателем эффективности выбранного метода децеллюляризации служат результаты определения концентрации остаточного количества ДНК в образцах ДМХс-матриц по сравнению с исходной тканью суставного хряща. После предобработки трипсином (концентрация 0,05%) / ЭДТА содержание ДНК в ДМХс-матрице значительно снизилось – с $366,85 \pm 53,03$ нг/мг ткани в исходных образцах до $5,14 \pm 0,87$ нг/мг в ткани после децеллюляризации.

Ранее мы исследовали влияние включения в протокол децеллюляризации МХс различных дополнительных этапов обработки. Было установлено, что оптимальным с точки зрения удаления ДНК, клеток и клеточного детрита, а также сохранения биохимического состава ДМХс является протокол, включающий помимо ПАВ и ДНКазы дополнительную обработку ультразвуком (УЗ). При таком способе обработки МХс остаточное количество ДНК составило $1,8 \pm 0,6$ нг/мг ткани [28].

Остаточное количество ДНК в ДМХс-матрицах, дополнительно обработанных как трипсином, так и УЗ [28], составляло менее 50 нг/мг ткани, что является минимальным критерием для удовлетворения цели децеллюляризации [13]. Кроме того, видимый ядерный материал на гистологических срезах ДМХс-матриц, окрашенных гематоксилином и эозином и DAPI, отсутствовал, что свидетельствовало о низкой иммуногенности ДМХс-матриц.

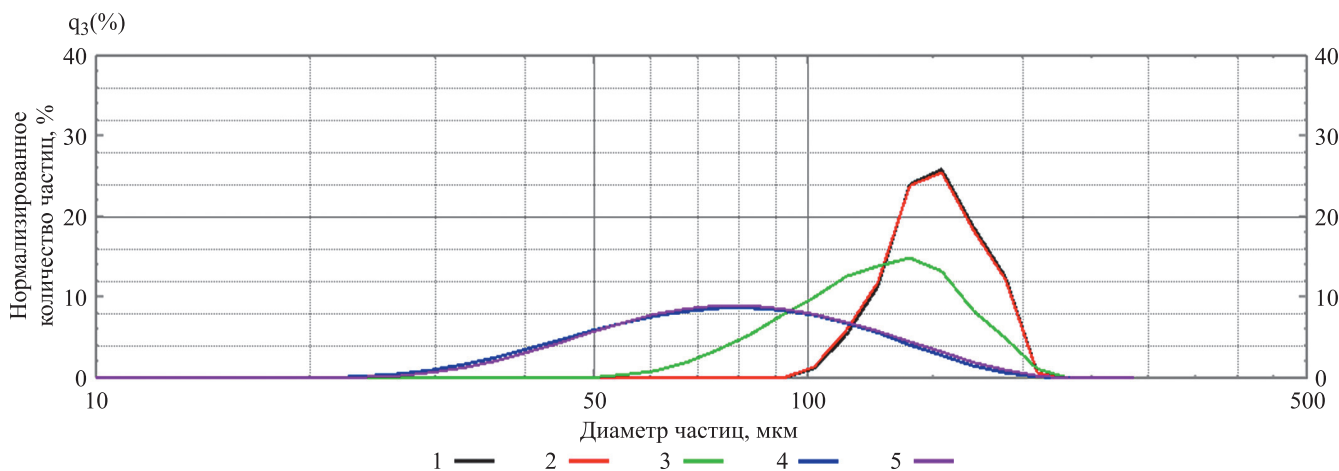


Рис. 1. Распределение децеллюляризованных микрочастиц суставного хряща по размерам в суспензии

Fig. 1. Microparticle size distribution in suspension

В настоящем исследовании резкое снижение (практически полное отсутствие) ГАГ в ДМХс было подтверждено результатами количественного определения: установлено содержание ГАГ $5,34 \pm 0,9$ и 154 ± 22 мкг/мг в ДМХс и исходной ткани соответственно.

Содержание фибриллярного коллагена после децеллюляризации хряща с трипсином также снизилось до 154 ± 34 мкг/мг по сравнению с его количеством в исходной ткани хряща – 508 ± 103 мкг/мг, что указывает на значительный ферментативный гидролиз коллагена в составе ДМХс при обработке их трипсином в течение суток при температуре $+37^\circ\text{C}$ [29]. Можно предположить, что сокращение

времени и/или снижение температуры инкубации ДМХс позволит повысить сохранность структуры фибриллярного коллагена в ДМХс.

Применение дополнительной обработки микрочастиц УЗ позволило нам ранее [12] минимизировать потерю ГАГ и фибриллярного коллагена в ДМХс-матрице: их содержание составило 58 ± 12 и 417 ± 47 мкг/мг соответственно.

Таким образом, введение стадии ферментативной предобработки трипсином в минимальной концентрации 0,05% в процесс децеллюляризации хряща позволяет удалить клетки и их фрагменты, а также существенно снизить содержание ДНК в ДМХс до $5,14 \pm 0,87$ нг/мг (более чем на 90%), что было не-

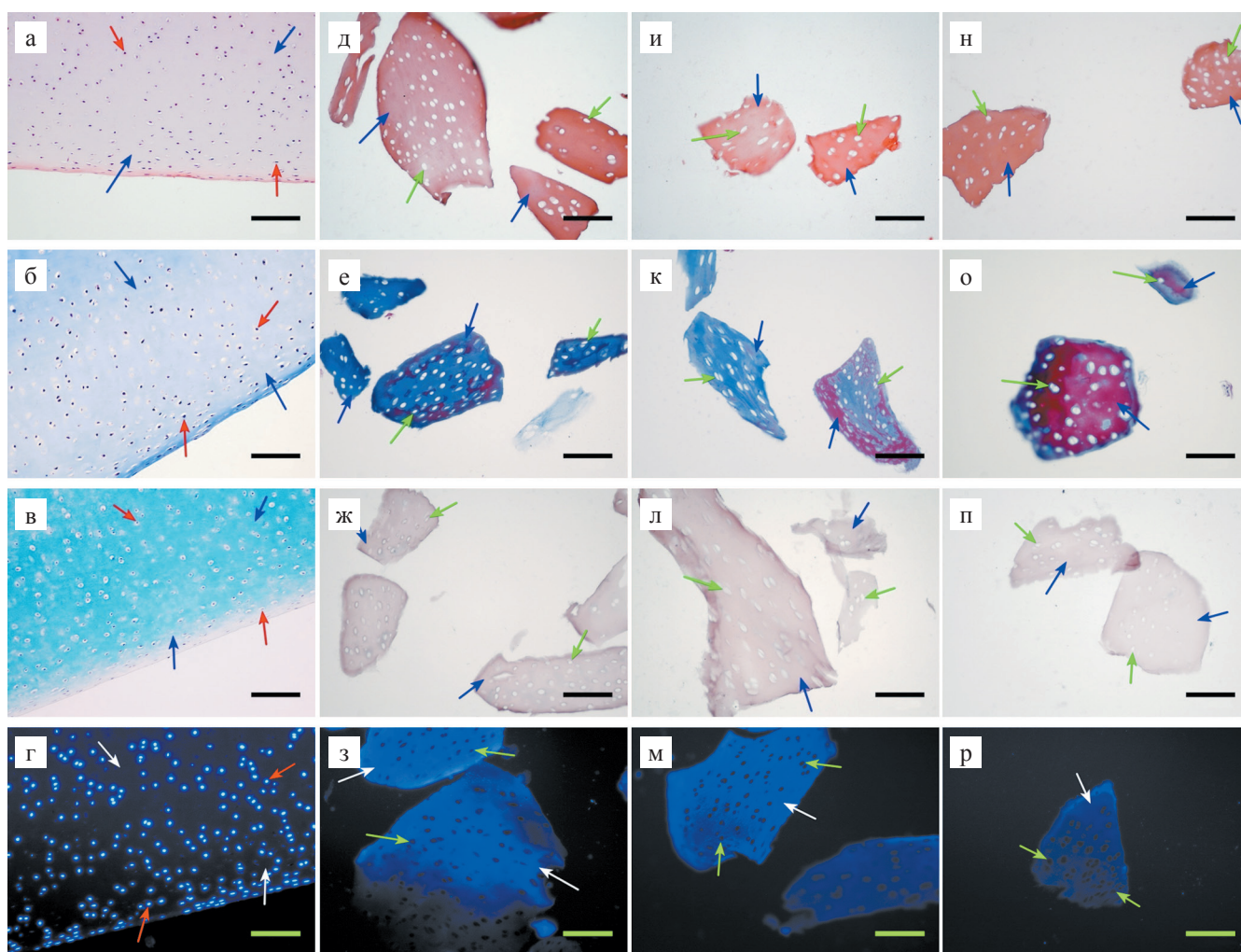


Рис. 2. Гистологическое исследование исходной и децеллюляризованной хрящевой ткани: а, б, в, г – исходная ткань; д, е, ж, з – децеллюляризация с использованием 0,05% трипсина; и, к, л, м – децеллюляризация с использованием 0,25% трипсина; н, о, п, р – децеллюляризация с использованием 0,50% трипсина; а, д, и, н – окрашивание гематоксилином и эозином; б, е, к, о – окрашивание по методу Массона; в, ж, л, п – окрашивание альциановым синим; г, з, м, р – окрашивание DAPI. Синие и белые стрелки – микрочастицы, красные стрелки – клетки, зеленые стрелки – пустые лакуны. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 2. Histological examination of original and decellularized cartilage tissue: а, б, в, г – original tissue; д, е, ж, з – decellularization using 0.05% trypsin; и, к, л, м – decellularization using 0.25% trypsin; н, о, п, р – decellularization using 0.50% trypsin; а, д, и, н – H&E stain; б, е, к, о – Masson's trichrome stain; в, ж, л, п – alcian blue stain; г, з, м, р – DAPI stain. Blue and white arrows indicate microparticles, red arrows show cells, and green arrows indicate empty lacunas. Scale bar = 100 μm

возможно достигнуть при использовании ПАВ без дополнительных способов обработки [10]. Однако одновременно со снижением ДНК в ДМХс снизилась концентрация фибриллярного коллагена (на 70%) и ГАГ (на 97%), что свидетельствует о значительном деструктивном воздействии трипсина на ВКМ. Значительное снижение ГАГ мы наблюдали при использовании и других протоколов децеллюляризации суставного хряща [28].

Следующим этапом работы было проведение исследования функциональных свойств ДМХс-матрицы. В связи с этим нами был проведен эксперимент по созданию КИК, состоящих из ДМХс и адгезированных МСК ЖТч, с последующей оценкой жизнеспособности этих клеток в процессе сокультивирования, а также выполнением биохимических и гистологических исследований КИК.

В предыдущем исследовании нами было показано, что иммунофенотипический профиль экспрессии маркеров в клетках, выделенных из жировой ткани, соответствовал критериям Международного общества клеточной терапии и подтверждал принадлежность этих клеток к мультипотентным МСК. Первичная культура клеток характеризовалась высоким уровнем экспрессии CD29, CD44, CD49b, CD73 и CD90, при этом в культуре не наблюдалось экспрессии CD34, CD45 или HLA-DR [30].

Выполненная нами прижизненная флуоресцентная микроскопия показала, что к 21-м суткам культивирования МСК ЖТч происходило увеличение количества клеток на поверхности матрикса (рис. 3).

Мы наблюдали слияние ДМХс и образование единого конгломерата. В основной массе окрашенных в зеленый цвет живых клеток определяются также мертвые клетки, имеющие красный цвет.

При проведении гистологического исследования в КИК мы наблюдали микрочастицы ДМХс, соединенные адгезированными и вновь наработанными клетками ВКМ в единый конгломерат, а также выраженную клеточную пролиферацию (рис. 4).

В центральной зоне к 14-м суткам культивирования наблюдаются участки клеточного некроза, сопровождающиеся образованием продуктов карioreксиса. Это можно объяснить недостаточным поступлением питательных веществ вглубь КИК. При этом с увеличением срока культивирования возрастало и количество гиперхромных ядер, что говорит о нарушении структуры клеточного ядра, и соответственно, о возрастании количества клеток в состоянии деградации. В поверхностной зоне КИК естественные деструктивные клеточные процессы мы наблюдали лишь к 21-м суткам культивирования. При окрашивании по Массону были видны равномерно распределенные коллагеновые волокна. При окрашивании альциановым синим визуализировался наработанный клетками ВКМ, содержащий ГАГ. При этом с увеличением срока культивирования равномерность окрашивания ВКМ возрастала, что говорит об увеличении наработки ГАГ адгезированными и вновь образованными клетками.

При иммуногистохимическом окрашивании ВКМ на коллаген II типа через 28 суток культивирования

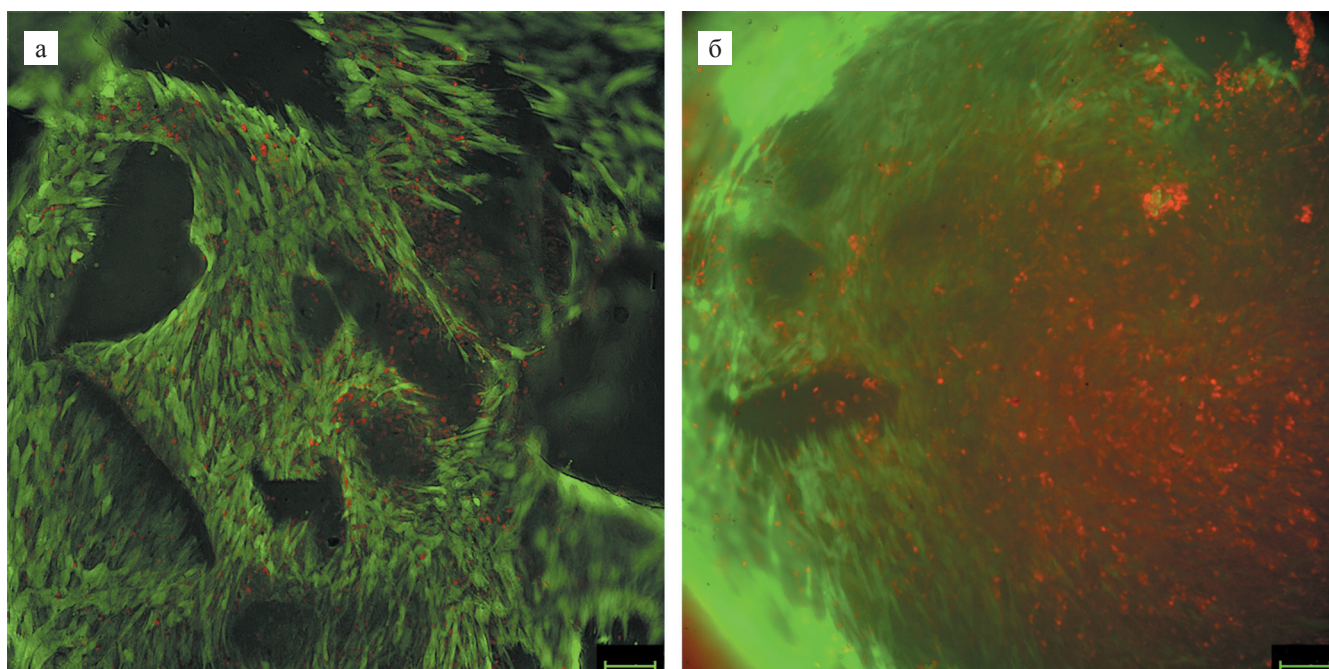


Рис. 3. Исследование жизнеспособности клеток в КИК: а – 14-е сутки; б – 21-е сутки. Окрашивание LIVE/DEAD. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 3. Study of cell viability in CECS: a – day 14; б – day 21. Live/Dead stain. Scale bar = 100 μ m

КИК было выявлено положительное окрашивание (рис. 5). Однако окрашивание было неинтенсивным, что свидетельствует о слабой наработке адгезированными и вновь образованными клетками основного типа коллагена суставного хряща.

Биохимическое исследование КИК после 28 суток культивирования включало определение в них концентрации ДНК и ГАГ. Оказалось, что количество ДНК возросло с $5,14 \pm 0,87$ нг/мг в ДМХс до $6,30 \pm 0,11$ мкг/КИК, а количество ГАГ также увеличилось с $5,34 \pm 0,9$ мкг/мг в ДМХс до $19,36 \pm 0,73$ мкг/КИК. На основании этих данных был рассчитан уровень продукции ГАГ в расчете на единицу ДНК – он составил $3,07 \pm 0,61$ ГАГ, мкг/ДНК, мкг.

Ранее [28] нами было проведено сравнительное исследование эффективности нескольких протоко-

лов децеллюляризации МХс относительно полноты удаления клеток и генного материала при максимально возможном сохранении основных компонентов ВКМ и дана оценка функциональных свойств КИК. Оказалось, что при сокультивировании МСК ЖТч с ДМХс-матрицей, децеллюляризованной предобработкой 0,05% трипсином/ЭДТА, количество ДНК на 28-е сутки, отражающее появление новых клеток, было выше, чем при использовании протоколов с другими дополнительными видами воздействия (циклы замораживания/оттаивания, ск-СО₂, УЗ). Однако количество ГАГ, наработанных адгезированными клетками на ДМХс-матрицах, было ниже, что свидетельствовало о негативных последствиях обработки ВКМ трипсином/ЭДТА. Уровень продукции ГАГ в расчете на единицу ДНК был также минималь-

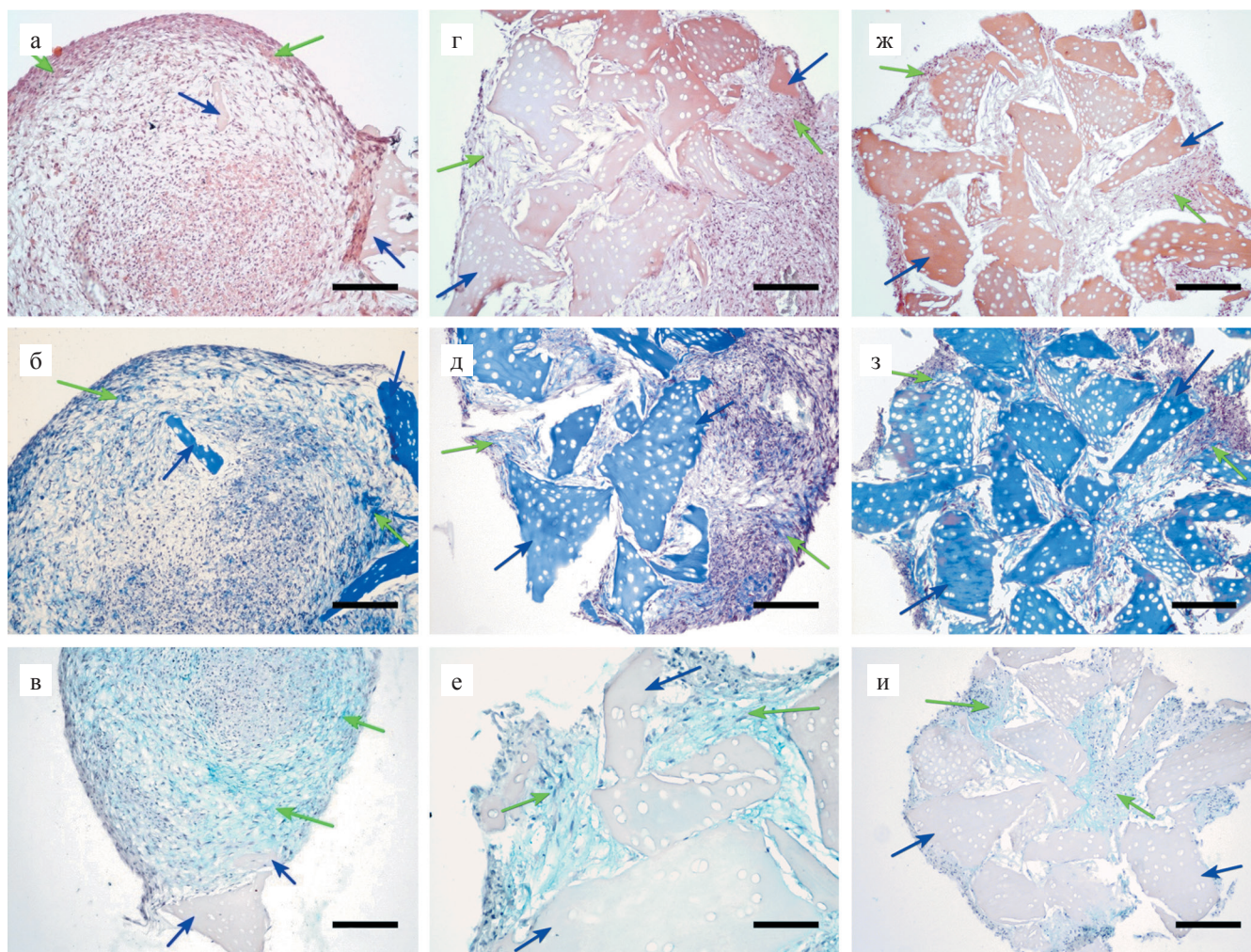


Рис. 4. Гистологическое исследование КИК: а, б, в – 14-е сутки культивирования; г, д, е – 21-е сутки культивирования; ж, з, и – 28-е сутки культивирования; а, г, ж – окрашивание гематоксилином и эозином; б, д, з – окрашивание по методу Массона; в, е, и – окрашивание альциановым синим. Синие стрелки – микрочастицы ДХс, зеленые стрелки – ВКМ, наработанный адгезированными и вновь образованными клетками. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 4. Histological examination of CEC: а, б, в – day 14 of cultivation; г, д, е – day 21 of cultivation; ж, з, и – day 28 of cultivation; а, г, ж – H&E stain; б, д, з – Masson's trichrome stain; в, е, и – alcian blue stain. Blue arrows indicate decellularized porcine articular cartilage microparticles, green arrows indicate ECM produced by adherent and newly formed cells. Scale bar = 100 μ m

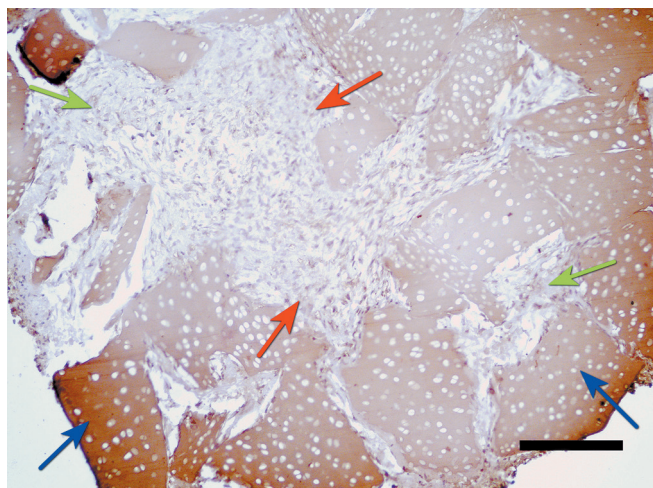


Рис. 5. Иммуногистохимическое исследование КИК на коллаген II типа. На 28-е сутки культивирования в КИК содержится мало коллагена II типа. Синие стрелки – микрочастицы ДХс, зеленые стрелки – ВКМ, нарабатанный адгезированными и вновь образованными клетками, красные стрелки – нарабатанный клетками коллаген II типа. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 5. Immunohistochemical study of CECs for type II collagen. On day 28 of cultivation, CECs contained little type II collagen. Blue arrows indicate decellularized porcine articular cartilage microparticles, green arrows indicate ECM produced by adherent and newly formed cells, red arrows indicate type II collagen produced by cells. Scale bar = 100 μ m

ным ($3,07 \pm 0,61$ ГАГ, мкг/ДНК, мкг) по сравнению с другими протоколами (замораживание/оттаивание: $13,6 \pm 2,2$ ГАГ, мкг/ДНК, мкг, ск-СО₂: $7,1 \pm 1,2$ ГАГ, мкг/ДНК, мкг, УЗ: $8,4 \pm 1,6$ ГАГ, мкг/ДНК, мкг).

Эти результаты культивирования МСК ЖТч в составе КИК подтвердили, что при введении в протокол децеллюляризации предобработки трипсином/ЭДТА ДМХс-матрица более эффективно поддерживает адгезию клеток и рост пролиферации клеток по сравнению с другими протоколами, но способствует снижению наработки клетками ГАГ в ВКМ [28].

Аналогичные данные были получены и в других работах [31–33], где исследовалось влияние добавления в процесс децеллюляризации бычьего и свиного хряща стадии обработки трипсином на свойства полученного матрикса. При дополнительной обработке трипсином в них отмечалось значительное снижение содержания ГАГ, однако децеллюляризованная ткань сохраняла свои механические и биосовместимые свойства. Кроме того, из децеллюляризованного реберного хряща был получен биобезопасный и механически прочный матрикс, имеющий большой потенциал для клинического применения в ринопластике.

Трипсин применялся для децеллюляризации и других видов специализированных тканей, например ткани миокарда свиньи [34], где был показан рост и пролиферация эндотелиальных клеток на децеллюля-

ризованном матриксе при потере компонентов ВКМ и отсутствии экспрессии кардиомаккеров адгезированными клетками.

Деструктивное воздействие трипсина на биохимический состав ВКМ при децеллюляризации тканей путем снижения ГАГ и коллагена показано в полученных результатах и подтверждено литературными данными. Вместе с тем установлено, что частичная потеря основных компонентов ВКМ не оказывает негативного влияния на использование децеллюляризованных трипсином тканей в качестве биосовместимых каркасных имплантатов в таких областях, как ринопластика и трахеопластика [32, 33].

Ранее при разработке технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины для лечения патологических изменений хрящевой ткани нами было указано на два возможных способа применения КИК [35]: стимулирование физиологической регенерации поврежденных тканевых структур и частичная или полная временная замена функции поврежденных тканевых структур.

Нами было показано, что КИК на основе ДМХс (тканеспецифического миметика ВКМ), полученного по протоколу децеллюляризации, включающему в себя несколько способов обработки [28], способен формировать тканевой эквивалент хрящевой ткани более эффективно, чем гидрогелевый миметик ВКМ – биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ). Вместе с тем стимулирующее воздействие КИК на основе ДМХс на процессы физиологической регенерации оказалось ниже по сравнению с КИК, изготовленными на основе БМКГ [36].

Обобщая результаты проведенных нами исследований, можно предположить, что выявленное увеличение пролиферативной активности клеток при включении в протокол децеллюляризации МХс этапа предобработки трипсином, а также сохраняющаяся тканеспецифичность ДМХс-матрицы позволят продолжить исследования в направлении создания гидрогелевой формы матрикса, обладающей более высоким специфическим (хондрогенным) и пролонгированным стимулирующим регенераторным воздействием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предобработка трипсином позволяет достичь равномерной и полной децеллюляризации МХс. Однако изменения биохимического состава, возникающие в полученных ДМХс-матрицах, снижают способность адгезированных МСК ЖТч и вновь образованных клеток при их сокультивировании в составе КИК синтезировать ГАГ, коллаген II типа и формировать ВКМ – среду жизнедеятельности клеток. Между тем при включении в протокол децеллюляризации МХс

стадии предобработки трипсином/ЭДТА возрастает пролиферативная активность адгезированных МСК ЖТч. Увеличение пролиферативной активности, а также тканеспецифичность ДМХс-матрицы позволят продолжить исследования в направлении создания гидрогелевой формы матрикса, способной повысить специфический и стимуляционный регенерационный потенциал ВКМ в процессе сокультивирования с клетками того же фенотипа.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00251, <https://rscf.ru/project/21-15-00251/>.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Cramer MC, Badylak SF. Extracellular matrix-based biomaterials and their influence upon cell behavior. *Annals of Biomedical Engineering*. 2020; 48 (7): 2132–2153. doi: 10.1007/s10439-019-02408-9. PMID: 31741227.
2. Jambar Nooshin B, Tayebi T, Babajani A, Khani MM, Niknejad H. Effects of different perfusing routes through the portal vein, hepatic vein, and biliary duct on whole rat liver decellularization. *Cell journal*. 2023; 25 (1): 35–44. doi: 10.22074/cellj.2022.557600.1081. PMID: 36680482.
3. Hsu CY, Chi PL, Chen HY, Ou SH, Chou KJ, Fang HC et al. Kidney bioengineering by using decellularized kidney scaffold and renal progenitor cells. *Tissue and Cell*. 2022; 74: 101699. doi: 10.1016/j.tice.2021.101699. PMID: 34891081.
4. Tang-Quan KR, Mehta NA, Sampaio LC, Taylor DA. Whole cardiac tissue bioscaffolds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018; 1098: 85–114. doi: 10.1007/978-3-319-97421-7_5. PMID: 30238367.
5. Bölükbas DA, De Santis MM, Alsafadi HN, Doryab A, Wagner DE. The preparation of decellularized mouse lung matrix scaffolds for analysis of lung regenerative cell potential. *Methods in Molecular Biology*. 2019; 1940: 275–295. doi: 10.1007/978-1-4939-9086-3_20. PMID: 30788833.
6. Berger C, Bjørlykke Y, Hahn L, Mühlemann M, Kress S, Walles H et al. Matrix decoded – a pancreatic extracellular matrix with organ specific cues guiding human ipsc differentiation. *Biomaterials*. 2020; 244: 119766. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119766. PMID: 32199284.
7. Khajavi M, Hashemi M, Kalalinia F. Recent advances in optimization of liver decellularization procedures used for liver regeneration. *Life Sciences*. 2021; 281: 119801. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119801. PMID: 34229008.
8. Sevastianov VI, Ponomareva AS, Baranova NV, Kirsanova LA, Basok YB, Nemets EA et al. Decellularization of human pancreatic fragments with pronounced signs of structural changes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24 (1): 119. doi: 10.3390/ijms24010119. PMID: 36613557.
9. Qian H, He L, Ye Z, Wei Z, Ao J. Decellularized matrix for repairing intervertebral disc degeneration: fabrication methods, applications and animal models. *Materials Today Bio*. 2022; 18: 100523. doi: 10.1016/j.mt-bio.2022.100523. PMID: 36590980.
10. Басок ЮБ, Кириллова АД, Григорьев АМ, Курсанова ЛА, Немец ЕА, Севастьянов ВИ. Получение микродисперсного тканеспецифического децеллюляризованного матрикса из суставного хряща свиньи. *Перспективные материалы*. 2020; 5: 51–60. Basok YuB, Kirillova AD, Grigoriev AM, Kirsanova LA, Nemets EA, Sevastianov VI. Fabrication of microdispersed tissue-specific decellularized matrix from porcine articular cartilage. *Perspektivnye materialy*. 2020; 5: 51–60. [In Russ, English abstract]. doi: 10.30791/1028-978x-2020-5-51-60.
11. Немец ЕА, Лажко АЭ, Басок ЮБ, Курсанова ЛА, Кириллова АД, Севастьянов ВИ. Особенности получения тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного хряща свиньи. *Сверхкритические флюиды: теория и практика*. 2020; 15 (2): 3–13. Nemets EA, Lazhko AE, Basok YuB, Kirsanova LA, Kirillova AD, Sevastianov VI. Features of obtaining a tissue-specific matrix from decellularized porcine cartilage. *Sverhkriticheskie flyuidy: teoriya i praktika*. 2020; 15 (2): 3–13. [In Russ, English abstract]. doi: 10.34984/SCFTP.2020.15.2.001.
12. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and *in vivo* relevance. *Methods*. 2015; 84: 25–34. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005. PMID: 25791470.
13. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057. PMID: 21296410.
14. Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *BioMed Research International*. 2017; 2017: 9831534. doi: 10.1155/2017/9831534. PMID: 28540307.
15. Gailit J, Ruoslahti E. Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *Journal of Biological Chemistry*. 1988; 263 (26): 12927–12932. doi: 10.1016/s0021-9258(18)37650-6. PMID: 2458338.
16. Maurer P, Hohenester E. Structural and functional aspects of calcium binding in extracellular matrix proteins. *Matrix Biology*. 1997; 15 (8–9): 569–580. doi: 10.1016/S0945-053X(97)90033-0. PMID: 9138289.
17. Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK et al. Optimization of amniotic membrane (am) denuding for tissue engineering. *Tissue Engineering – Part C: Methods*. 2008; 14 (4): 371–381. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0315. PMID: 18821842.
18. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhauer KJ et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *Journal of Structural Biology*. 2003; 143 (3): 201–208. doi: 10.1016/j.jsb.2003.08.002. PMID: 14572475.

19. Waldrop FS, Puchtler H, Meloan SN, Younker TD. Histochemical investigations of different types of collagen. *Acta histochemica Supplementband*. 1980; 21: 21–31. PMID: 6808564.
20. Lin CH, Kao YC, Ma H, Tsay RY. An investigation on the correlation between the mechanical property change and the alterations in composition and microstructure of a porcine vascular tissue underwent trypsin-based decellularization treatment. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2018; 86: 199–207. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.06.029. PMID: 29986294.
21. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, Van Munsteren CJ, Gittenberger-De Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2005; 27 (4): 566–571. doi: 10.1016/j.ejcts.2004.12.052. PMID: 15784352.
22. Merna N, Robertson C, La A, George SC. Optical imaging predicts mechanical properties during decellularization of cardiac tissue. *Tissue Engineering – Part C: Methods*. 2013; 19 (10): 802–809. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0720. PMID: 23469868.
23. Giraldo-Gomez DM, García-López SJ, Tamay-de-Dios L, Sánchez-Sánchez R, Villalba-Caloca J, Sotres-Vega A et al. Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3d scaffold for organ engineering. *Materials Science and Engineering C*. 2019; 105: 110142. doi: 10.1016/j.msec.2019.110142. PMID: 31546345.
24. Rahman S, Griffin M, Naik A, Szarko M, Butler PEM. Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction. *Scientific Reports*. 2018; 8 (1): 3097. doi: 10.1038/s41598-018-20592-x. PMID: 29449572.
25. Vernice NA, Berri N, Bender RJ, Dong X, Spector JA. Production of a low-cost, off-the-shelf, decellularized cartilage xenograft for tissue regeneration. *Annals of Plastic Surgery*. 2022; 88 (3): S296–S301. doi: 10.1097/SAP.0000000000003185. PMID: 35513335.
26. Дмитриева ЕГ, Хацко СЛ, Якимов АА. Способ гистологической окраски артерий сердца. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2022; 42 (3): 47–51. Dmitrieva EG, Khatsko SL, Yakimov AA. Staining method for coronary arteries. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal*. 2022; 42 (3): 47–51. [In Russ, English abstract]. doi: 10.18699/SSMJ20220305.
27. Gilbert T, Sellaro T, Badylak S. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27 (19): 3675–3683. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014. PMID: 16519932.
28. Sevastianov VI, Basok YB, Grigoriev AM, Nemets EA, Kirillova AD, Kirsanova LA et al. Decellularization of cartilage microparticles: effects of temperature, supercritical carbon dioxide and ultrasound on biochemical, mechanical, and biological properties. *Journal of Biomedical Materials Research – Part A*. 2023; 111 (4): 543–555. doi: 10.1002/jbm.a.37474. PMID: 36478378.
29. Семенычева ЛЛ, Егорихина МН, Часова ВО, Валетова НБ, Митин АВ, Кузнецова ЮЛ. Эффективность протеаз панкреатина и трипсина при ферментативном гидролизе коллагена. *Вестник ЮУрГУ. Серия «Химия»*. 2020; 12 (1): 66–75. Semenicheva LL, Egorihina MN, Chasova VO, Valetova NB, Mitin AV, Kuznetsova YuL. Efficacy of pancreatin and trypsin proteases in enzymatic hydrolysis of collagen. *Bulletin of the South Ural State University series «Chemistry»*. 2020; 12 (1): 66–75. [In Russ, English abstract]. doi: 10.14529/chem200108.
30. Tsvetkova AV, Vakhrushev IV, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Lupatov AY et al. Chondrogenic potential of msc from different sources in spheroid culture. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021; 170 (4): 528–536. doi: 10.1007/s10517-021-05101-x. PMID: 33725253.
31. Ghassemi T, Saghatoleslami N, Mahdavi-Shahri N, Martin MM, Gheshlaghi R, Moradi A. A comparison study of different decellularization treatments on bovine articular cartilage. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019; 13 (10): 1861–1871. doi: 10.1002/term.2936. PMID: 31314950.
32. Lin S, He Y, Tao M, Wang A, Ao Q. Fabrication and evaluation of an optimized xenogenic decellularized costal cartilage graft: preclinical studies of a novel biocompatible prosthesis for rhinoplasty. *Regenerative Biomaterials*. 2021; 8 (6): rbab052. doi: 10.1093/rb/rbab052.
33. Giraldo-Gomez DM, Leon-Mancilla B, Del Prado-Audelo ML, Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Garciadiego-Cazares D et al. Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: morphological and biophysical characterization. *Materials Science and Engineering C*. 2016. doi: 10.1016/j.msec.2015.10.094. PMID: 26652450.
34. Perea-Gil I, Uriarte JJ, Prat-Vidal C, Gálvez-Montón C, Roura S, Llucilà-Valldeperas A et al. In vitro comparative study of two decellularization protocols in search of an optimal myocardial scaffold for recellularization. *American Journal of Translational Research*. 2015; 7 (3): 558–573. PMID: 26045895.
35. Басок ЮБ, Севастьянов ВИ. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины в лечении дефектов хрящевой ткани суставов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2016; 18 (4): 102–122. Basok YuB, Sevastianov VI. Tissue engineering and regenerative medicine technologies in the treatment of articular cartilage defects. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2016; 18 (4): 102–122. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2016-4-102-122.
36. Sevastianov VI, Basok YuB, Kirsanova LA, Grigoriev AM, Kirillova AD, Nemets EA et al. A comparison of the capacity of mesenchymal stromal cells for cartilage regeneration depending on collagen-based injectable biomimetic scaffold type. *Life*. 2021; 11 (8): 756. doi: 10.3390/life11080756.

Статья поступила в редакцию 15.04.2023 г.
The article was submitted to the journal on 15.04.2023