

**Получение децеллюляризованных матриксов для создания
микроокружения инсулинпродуцирующих клеток**

Научный руководитель – Кашина Александра Викторовна

Богомолова Александра Юрьевна

Выпускник (магистр)

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Nizhny Novgorod,
Россия

E-mail: baleksandra@icloud.com

Введение. Трансплантация островков Лангерганса (ОЛ) – наиболее перспективный метод лечения инсулин-дефицитных состояний, возникающих при патологической дисфункции поджелудочной железы. Основной проблемой является непродолжительность выживания и функциональной активности островков из-за деструкции внеклеточного матрикса (ВКМ) при выделении клеток и нарушение васкуляризации и оксигенации при их трансплантации. Необходимо использование тканеинженерных подходов для повышения эффективности трансплантации ОЛ. В настоящее время активно используются тканеинженерные конструкции (ТИК) различных тканей и органов как на основе созданных материалов - носителей (искусственных и природных), так и полученных из нативных органов (1). Наибольшим преимуществом обладают ТИК на основе децеллюляризованных (ДЦЛ) матриксов, поскольку именно эти матриксы обладают необходимой архитектоникой и сохранностью нативных белков ВКМ (3). На сегодняшний день не создано эффективного ТИК поджелудочной железы (ПЖ) на основе инсулин-продуцирующих клеток и ДЦЛ матрикса. Кроме того, из-за нехватки донорских органов поджелудочной железы остается актуальным не только поиск альтернативных органов для получения дВКМ, но и источника органов, в частности ксеногенного материала (2). Целью нашей работы являлось получение ДЦЛ матриксов органов свиньи, оптимизация наиболее удачной методики децеллюляризации и сравнительный анализ сохранности жизнеспособности ОЛ на разных типах матриксов. В качестве объектов исследования использованы следующие органы: легкие и ПЖ свиньи породы Визинау. Было апробировано несколько протоколов децеллюляризации для каждого из органов. Параллельно, несколько фрагментов легкого, размером не более 1x1 см, последовательно выдерживались в 0,5% растворе Triton X-100 – 1 час, 0,5% растворе SDS (додецилсульфат натрия) – 1 час, 1% растворе SDC (дезоксихолат натрия) – 1 час и 0,075% растворе SDS – 41 час, оставшиеся фрагменты легкого, размером не более 1x1 см, находились в перенасыщенном солевом в растворе, содержащим 1,19M KCl, 1,74M NaCl, 0,86M CaCl₂, в течение 96 часов. В случае поджелудочной железы использовались следующие протоколы: несколько фрагментов поджелудочной железы, размером не более 0,5x0,5 см, последовательно выдерживались в 0,1% растворе SDS в dH₂O – 1 час, 0,1 % растворе SDS в 1N NaCl dH₂O – 1 час, 0,1% растворе SDS в PBS – 18 часов, оставшиеся фрагменты поджелудочной железы, размером не более 0,5x0,5 см, находились в перенасыщенном солевом в растворе, содержащим 1,19 M KCl, 1,74 M NaCl, 0,86 M CaCl₂, в течение 96 часов. Структуру матрикса и качество удаления клеточного компонента оценивали путем приготовления гистологических препаратов по методике окрашивания гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Остаточную ДНК в ДЦЛ матриксах анализировали с использованием набора реагентов ExtractDNA Blood & Cells на спектрофотометре NanoDrop ND-2000. Был поставлен и отработан протокол получения жизнеспособных и функционально активных островков Лангерганса. Проводилась оценка жизнеспособности островков Лангерганса при помощи окрашивания live/dead на 3 и 7 сутки инкубации, как без матрикса,

так и на ДЦЛ матриксе легкого и ПЖ. Получены бесклеточные органные матриксы органов свиньи. Установлено, что для проведения ДЦЛ легкого подходит методика с использованием SDS и SDC, а для ПЖ – с использованием SDS. Как в случае легкого, так и в случае ПЖ, показано высокое сохранение коллагеновых и эластиновых волокон, не наблюдаются клетки или остаточные ядра. Концентрация ДНК статистически значимо снижается до 8% в дВКМ легкого и до 6% в дВКМ ПЖ по отношению к контрольным образцам, соответственно. На 7-й день инкубации процент жизнеспособных ОЛ статистически значимо увеличивается при инкубации на ДЦЛ матриксах по сравнению с ОЛ находящимися в питательной среде (с 60% для ОЛ в питательной среде до 95% на дВКМ легкого и до 83% на дВКМ ПЖ). Легкое может быть использовано в качестве альтернативного органа для получения дВКМ. В дальнейшем полученные ДЦЛ матриксы легкого и ПЖ могут быть использованы в качестве конструкта при формировании микроокружения инсулин-продуцирующих клеток для создания ТИК поджелудочной железы. Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава РФ №720000Ф.99.1.БН62АБ30000 “Технология компенсации инсулинодефицита аутологичными островками Лангерганса у больных с новообразованиями поджелудочной железы после радикального хирургического лечения”.

Источники и литература

- 1) Crapo M.P., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // *Biomaterials*. 2011. V. 32(12). P. 3233-3243.
- 2) Petersen T.H., Calle E.A., Zhao L., et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation // *Science*. 2010. V. 329(5991). P. 538-541.
- 3) Ruud K.F., Hiscox W.C., Yu L., et al. Distinct phenotypes of cancer cells on tissue matrix gel // *Breast Cancer Research*. 2020. V. 22(1). P. 1–22.