

МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ЕКСТРАЦЕЛЮЛЯРНОГО МАТРИКСУ ДЛЯ БІОІНЖЕНЕРІЇ НИРКИ

Прозор А.В., Луценко Т. М.

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», prozzora@gmail.com

Abstract

The creation of a kidney organoid begins with the preparation of a three-dimensional substrate for further colonization with cells. The native architecture of the kidney matrix is difficult to create, so it was decided to isolate it from the organ by removing cells. Decellularization can occur through physical, chemical, biological agents, perfusion, or soaking and stirring.

Keywords: *extracellular matrix (ECM), kidney, decellularization, scaffold.*

Вступ. Існують декілька варіантів створення функціонального органоїду нирки, що дозволить збільшити пул можливих нирок для трансплантації, а значить зменшити черги на трансплантацію. Створений органоїд нирки може бути використаний для модуляції середовища *in vitro* тестування лікарських засобів. Для вирощування органоїду, необхідно мати тривимірний каркас, який заселяється клітинами, зазвичай стовбуровими. Тривимірний каркас, або ж скафолд, може бути синтетичного або натурального походження, створений шляхом 3д-друку (біочорнилами або ж полімерним матеріалом), лиття, децелюляризації [1]. Однак, для якісної рецелюляризації скафолду, тривимірний субстрат повинен бути біосумісним, не цитотоксичним, зберігати автентичну морфологію нирки, в тому числі і васкулярну структуру, природні біохімічні сполуки, що спонукають диференціацію і ріст клітин. Через складність організації нирки, найбільш обґрунтованим методом створення скафолду є децелюляризація нирки, після якої залишається лише екстрацелюлярний матрикс (ЕЦМ) без клітинного вмісту та слідів ДНК, що можуть сприйматися реципієнтом як чужерідне тіло [2].

Метою роботи є пошук найбільш ефективної і безпечної методики для отримання цілісного екстрацелюлярного матриксу нирки.

Матеріали та методи. Робота створена методом наративного літературного огляду наявних джерел.

Результати та обговорення. Децелюляризація тканин і органів може відбуватися хімічними, фізичними, біологічними та комбінованими чинниками.

Фізичний чинник спричинений зміною температури, а саме заморожування-розморожування, який зазвичай поєднують з іонними або неіонними детергентами, нуклеазами [3]; суттєвого негативного впливу структурі ЕЦМ не завдає, але рекомендовано використовувати разом з кріопротекторами, наприклад, 5% трегалозою [4]. Можливе застосування тиску для лізису клітин у тканинах, що не є щільно заселеними. Доведено, що тиск може спричинити пошкодження ЕЦМ [5]. Також, в якості фізичних чинників використовують електропорацію [3], ультразвукову обробку [5], але ефективність цих методів не є абсолютною.

Серед біологічних чинників поширено використання ферментів протеаз, наприклад, трипсину, диспаза II. Трипсин діє при температурі 37 °С та показнику кислотності, що дорівнює 8 [5]. При довготривалому застосуванні, трипсин пошкоджує структурні компоненти ЕЦМ [6]. Диспаза II є початковим реагентом децелюляризації. Диспаза II діє шляхом розщеплення фібронектину та колагену IV, відділяє епітелій від субстрату [4]. Нуклеази є додатковим реагентом при недостатньо якісному видаленні залишків ДНК. Серед можливих негативних наслідків використання нуклеаз – це складність видалення сполук з матриксу. Окрім зазначеного недоліку, нуклеази є потенційним тригером імунної відповіді організму реципієнту [4,6].

Серед хімічних агентів найбільш розповсюдженими та вивченими є іонні і неіонні детергенти, зокрема додецилсульфат натрію (SDS) та Тритон X-100 відповідно. Неіонні детергенти вважаються м'якими, адже не порушують нативну структуру ЕЦМ, але і не видаляють весь клітинний матеріал з органу [4,5,6]. Іонні детергенти водночас ефективні для децелюляризації, але і мають потенціальний ризик пошкодження структури ЕЦМ за рахунок того, що SDS глибоко проникає в матрикс [3,4,5]. Серед інших хімічних детергентів є кислоти та луки, які потенційно вимивають фактори росту та пошкоджують колаген з матриксу [5,6]; цвіттер-іонні детергенти, які не повністю видаляють клітини зі скафолду; органічні розчинники зазвичай використовують як кінцевий етап промивання від нуклеїнових кислот [4]; гіпотонічні та гіпертонічні розчини викликають осмотичний шок, тим самим лізують клітини, самотійно розчини не застосовують, вони не впливають негативно на структуру матриксу [3,6]; хелатуючі агенти використовуються в комбінації з іншими детергентами, наприклад, трипсином [4,5].

Серед самих способів децелюляризації, або ж донесення біологічного, хімічного агенту до органу є кілька: перфузія розчином, занурення у розчин та перемішування, градієнтний тиск [3]. Вибір методики децелюляризації залежить від типу органу, його розміру і поставлених задач, створення органоїду для трансплантації чи для перевірки лікарських речовин. Нирка – це складний орган, з розвинутою дифузною кровоносною системою, тому для неї більш логічно обрати децелюляризацію шляхом перфузії розчину детергенту через кровоносну систему. Перфузія детергентів крізь кровоносні судини органу, допомагає розчинам рівномірно проникнути в тканини і досягти максимального відсотку вимивання клітин. Найбільш досліджувальними речовинами для перфузії цілої нирки є Тритон X-100, SDS та їхня комбінація [7,8,9,10,11]. Головними критеріями якісної децелюляризації є вміст ДНК менше 50 нг/мг тканини та залишковими фрагментами ДНК розміром менше за 200 пар нуклеотидів [12]. Додатковими критеріями є збереження позаклітинних компонентів (колагену [7], ламініну [7], фібронектину [7], еластину [3], фібриліну [3], тенасцину [13], факторів росту [13], вітронектину [6], тромбоспондіну [6]) та природньої структури. Вміст ДНК, збереження позаклітинних компонентів, цільної структури матриксу необхідно перевіряти відповідними тестами. Наприклад, рентгеноскопія може бути використана для візуалізації васкулярних шляхів.

Якість вимивання клітин з матриксу, можна перевірити фарбуванням гематоксилін-еозином. Очевидно, що при якісному видаленні клітин, розчини гематоксиліну та еозину не повинні залишитися на дослідному зразку. Були досліджені різні концентрації розчину SDS (1%, 0,5%, 0,25%), 1% розчин Тритону X-100, виявилось, що ефективним детергентом є саме 0,5% SDS. Варто зазначити, що чим більше концентрація SDS, тим краще він видаляє клітинні залишки, але і його залишок у матриксі збільшується [14]. Протокол створений для децелюляризації нирки щура [15] використовує в якості реагентів 1% розчин Тритону X-100, 1% розчин SDS, дистильовану воду, фосфатний буфер та пропонує почергову заморозку та розморозку нирки, що вже частково лізує клітини та спрощує доставку органу до лабораторії. В даному випадку, Тритон X-100 змиває залишки SDS зі скафолду, тому ця методика об'єднує позитивні сторони обох детергентів: видаляє всі клітинні залишки, не залишає руйнівний детергент в ЕЦМ, тому морфологічна структура скафолду зберігається, кровоносні шляхи залишаються цільними і незмінними.

Варто додати, що методики перфузії нирок різних тварин можна масштабувати, відповідно до їхнього розміру [3,14,17]. Найчастіше, використовуються нирки щурів, мишей та свиней. Можливість масштабування протоколів децелюляризації робить експерименти в області створення децелюляризованих екстрацелюлярних матриць різних органів, включаючи нирки, більш гнучкими.

При перфузії крізь кровоносну систему нирки досягається найкращий показник децелюляризації. Однак необхідно зважати на фізіологічний тиск органу і яким потоком подаються детергенти в нього. Сильний потік рідини може спричинити механічні пошкодження скафолду. Варто використовувати постійний низький фізіологічний тиск, щоб дозволити нативному матриксу більш поступово адаптуватися до змін судинного опору і потоку, а також обмежити ймовірність пошкодження ЕЦМ через надмірні механічні зусилля при максимальній доставці децелюляризуючих агентів. При виборі децелюляризуючих агентів, необхідно детально досліджувати їхнє застосування для різних типів тканини та органів, зважати яким способом детергент доноситься до органу (перфузією, зануренням та перемішуванням), звертати увагу на те чи ставили автори досліди на маленьких зразках чи на цілих органах, якого виду тварин. Для перевірки якості створеного скафолду, а саме його структурної цілісності, збереження нативної організації кровоносної системи, біохімічного складу та вимиття клітинних залишків необхідні подальші тести. При рецелюляризації утвореного екстрацелюлярного матриксу можна отримати повноцінний органод, що можна використати для дослідження препаратів та медичних виробів. В залежності від типу клітин, що заселятимуть скафолд, можна змодельовати різні стани нирки: здорову, фіброзну, з пухлинним ураженням тощо.

Висновки. Отримання екстрацелюлярного матриксу нирки має практичне значення у вирішенні проблеми відторгнення трансплантантів, створення моделі фізіологічно функціонального органу для перевірки медичних виробів та

лікарських засобів. Були оглянуті дослідження по децелюляризації цілісної нирки та її часток. Для якісної децелюляризації цілого органу найкраще підходить перфузія децелюляризуючими агентами. Серед можливих агентів – це Тритон X-100 та додецилсульфат натрію (SDS) різних концентрацій. Обов'язковим етапом є перевірка якості створеного продукту на біохімічний склад, морфологічну організацію, залишки ДНК.

Список використаної літератури:

1. Decellularized tissue engineered constructs and tissues : patent US6962814B2 United States : A61L27/3839. Applied on 16.08.2001 ; published on 22.08.2002. 28 p. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/a8/08/58/8e2a9756c54fde/US6962814.pdf>
2. Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering / R.-H. Fu et al. Cell Transplantation. 2014. Vol. 23, no. 4-5. P. 621–630. URL: <https://doi.org/10.3727/096368914x678382>
3. Gupta S. K., Mishra N. C., Dhasmana A. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. Methods in Molecular Biology. New York, NY, 2017. P. 1–10. URL: https://doi.org/10.1007/7651_2017_34
4. Keane T. J., Swinehart I. T., Badylak S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. Methods. 2015. Vol. 84. P. 25–34. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005>
5. Gilbert T., Sellaro T., Badylak S. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials. 2006. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>
6. Kabirian F., Mozafari M. Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future. Methods. 2020. Vol. 171. P. 108–118. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.04.019>
7. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives / A. Porzionato et al. International Journal of Molecular Sciences. 2018. Vol. 19, no. 12. P. 4117. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms19124117>
8. Destefani A. C., Sirtoli G. M., Nogueira B. V. Advances in the Knowledge about Kidney Decellularization and Repopulation. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2017. Vol. 5. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00034>
9. Decellularization with triton X-100 provides a suitable model for human kidney bioengineering using human mesenchymal stem cells / S. Shahraki et al. Life Sciences. 2022. Vol. 295. P. 120167. URL: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120167>
10. Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects / A. A. Golebiowska et al. Bioactive Materials. 2024. Vol. 32. P. 98–123. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.09.017>
11. Embryonic Stem Cells Proliferate and Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds / E. A. Ross et al. Journal of the American Society of Nephrology. 2009. Vol. 20, no. 11. P. 2338–2347. URL: <https://doi.org/10.1681/asn.2008111196>
12. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system / D. C. Sullivan et al. Biomaterials. 2012. Vol. 33, no. 31. P. 7756–7764. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.023>
13. Kular J. K., Basu S., Sharma R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. Journal of Tissue Engineering. 2014. Vol. 5. P. 204173141455711. URL: <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>
14. Decellularization of porcine kidney with submicellar concentrations of SDS results in the improved retention of ECM proteins required for the adhesion and maintenance of human adult renal epithelial cells. / T. Bongolan et al. Biomaterials Science. 2022. URL: <https://doi.org/10.1039/d1bm01017d>
15. Epithelial Cell Repopulation and Preparation of Rodent Extracellular Matrix Scaffolds for Renal Tissue Development / J. S. Uzarski et al. Journal of Visualized Experiments. 2015. No. 102. URL: <https://doi.org/10.3791/53271>
16. Londono R., Badylak S. F. Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling. Annals of Biomedical Engineering. 2014. Vol. 43, no. 3. P. 577–592. URL: <https://doi.org/10.1007/s10439-014-1103-8>