

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.08

**ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ПРОТОКОЛА ПОЛУЧЕНИЯ
ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ
ЧЕЛОВЕКА**Д.К. Матвеева¹, Е.Р. Андреева^{1, *}, Л.Б. Буравкова^{1, 2}

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Россия, 123007, г. Москва,
Хорошевское ш., д.76А;

²Кафедра экологической и экстремальной медицины, факультет фундаментальной медицины,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва,
Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: andreeva1564@gmail.com

В современных исследованиях для нужд регенеративной медицины активно изучаются биологические скаффолды, состоящие из внеклеточного матрикса (ВКМ). Подложки из ВКМ получают путем децеллюляризации и используют для доставки клеток в участки поврежденных тканей. Нативные препараты ВКМ имеют преимущества перед биоинженерными конструкциями, поскольку сохраняют биологические сигналы, обеспечивающие эффективные репаративные функции клеток. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают мультипотентным потенциалом дифференцировки, а также секретируют широкий спектр биологически активных молекул. В связи с этим МСК являются важными посредниками для восстановления тканей. ВКМ как компонент ниши МСК модулирует их функциональную активность, в том числе миграцию, пролиферацию и дифференцировку, а также поддерживает их потенцию к самообновлению. Исследования *in vitro* позволяют продвинуться в понимании того, как биологические скаффолды могут влиять на репаративные функции МСК. Существует несколько различных протоколов децеллюляризации. В связи с тем, что ВКМ клеток различных типов отличается по качественным и количественным параметрам, эти протоколы должны быть оптимизированы в каждом конкретном случае. В настоящем исследовании при получении децеллюляризованных препаратов ВКМ (дцВКМ) МСК из жировой ткани человека (жтМСК) сравнивали эффективность гипотонического и изотонического вариантов подхода с использованием Triton X-100 в комбинации с NH_4OH , а также возможность использования дцВКМ после формирования сфероидов. Полученные препараты оценивали качественно с помощью иммуоцитохимии и сканирующей электронной микроскопии. жтМСК при длительном культивировании продуцировали хорошо развитый ВКМ, который после децеллюляризации с помощью изотонического раствора Triton X-100/ NH_4OH сохранял структуру, близкую к нативной. При использовании водного раствора Triton X-100/ NH_4OH не удалось получить однородного слоя дцВКМ, на сканирующей электронной микроскопии были выявлены единичные волокна ВКМ. При сборке клеточных сфероидов под действием RGD-пептидов, на подложке были обнаружены фрагменты матрикса и клеток, что не позволило признать этот метод эффективным для получения дцВКМ жтМСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки человека, внеклеточный матрикс, децеллюляризация, регенеративная медицина, иммуоцитохимия, сканирующая электронная микроскопия

МСК в настоящее время широко изучаются как перспективный источник клеток для регенеративной медицины и клеточной терапии, поскольку обладают высокой пролиферативной

активностью, мультилинейным потенциалом дифференцировки и продуцируют широкий спектр биологически активных молекул [1]. *In vivo* стволовые/стромальные клетки локализуются

в специфических нишах, образованных различными клеточными и неклеточными компонентами [2, 3]. Одним из важных факторов микроокружения МСК является ВКМ. Молекулы матрикса прямо или опосредованно вовлечены в регуляцию физиологической и репаративной активности клеток. Жесткость, топография, пористость, нерастворимость могут модулировать свойства клеток, связанные с адгезией, миграцией, пролиферацией и полярностью [4]. Взаимодействие МСК с ВКМ имеет двунаправленный характер. Клетки в ответ на сигналы из микроокружения ремоделируют ВКМ за счет активности соответствующих ферментов [5].

Отдельные компоненты ВКМ активно применяются в лабораторной и клинической практике, однако это не позволяет полностью воссоздать клеточное микроокружение [6]. Децеллюляризованный ВКМ (дцВКМ) нативных тканей или культивируемых клеток широко внедряется в регенеративную медицину, как источник биологических скаффолдов для реконструкции тканей [7]. Главной целью децеллюляризации является удаление клеточных антигенов и других иммуногенных компонентов, таких как ДНК, чтобы минимизировать риск неблагоприятных иммунологических реакций. Решение этой задачи должно быть сбалансировано с сохранением целостности, состава и биоактивности полученного дцВКМ. По сравнению

с использованием биоинженерных скаффолдов, применение естественного ВКМ, полученного при удалении клеток, предполагает, помимо биосовместимости, сохранение архитектуры и биохимических свойств ткани, что может быть критичным для поддержания жизнеспособности клеток и их участия в физиологическом и репаративном ремоделировании [8].

Исследования *in vitro* позволяют оценить вклад отдельных типов клеток в продукцию и ремоделирование матрикса. МСК, как ключевые компоненты соединительной ткани, при культивировании синтезируют достаточное количество ВКМ с различными фибриллярными и растворимыми структурными элементами [9]. Удаление клеток различными агентами позволяет сохранить каркас из матрикса, в котором, как правило, преобладают фибриллярные компоненты, а также сохраняется толщина и механические свойства, характерные для нативного состояния [10].

Существуют различные варианты методов децеллюляризации с помощью физических, химических и биологических воздействий: циклы замораживания-размораживания, использование протеаз и нуклеаз, ультразвуковое воздействие, детергентная или кислотная экстракция клеток [10].

Целью нашей работы были подбор оптимального протокола для получения дцВКМ жтМСК

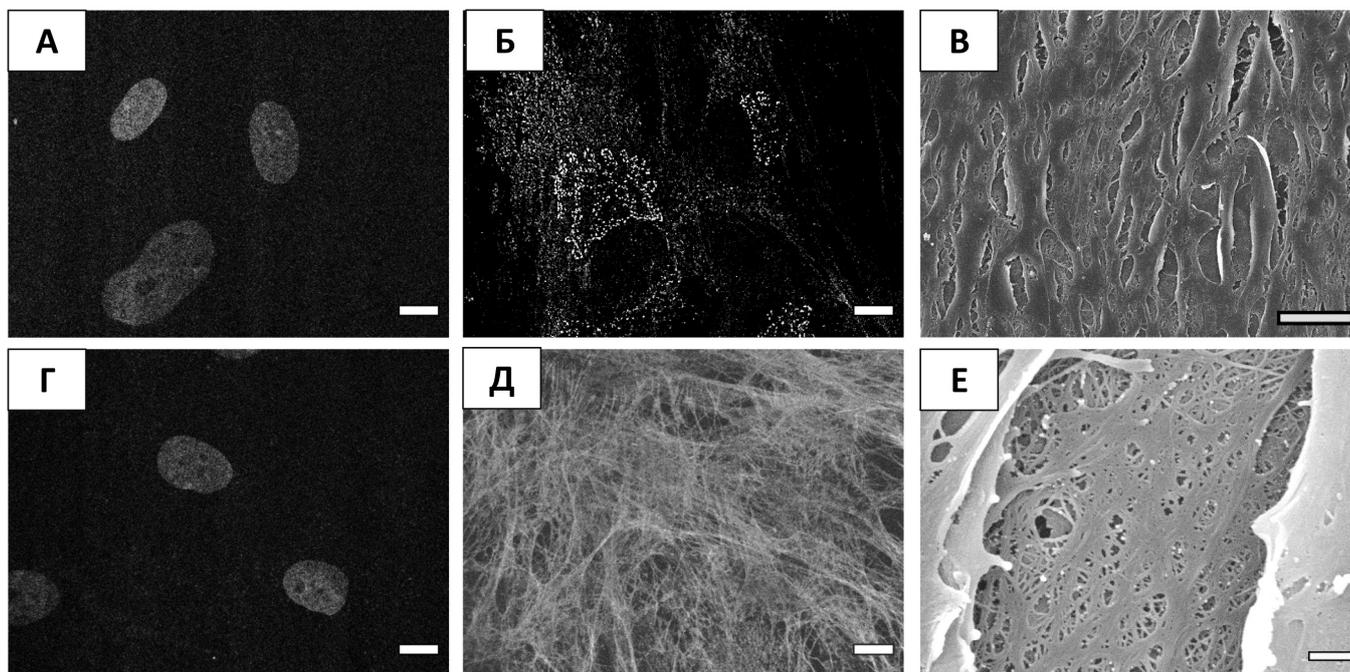


Рис. 1. Характеристика ВКМ, продуцируемого жтМСК в течение 14 сут. А, Б – иммуноцитохимическое выявление коллагена типа I; Г, Д – иммуноцитохимическое выявление фибронектина. А, Г – выявление нуклеиновых кислот с помощью красителя DAPI; Б, Д – антигены, меченные FITC. Конфокальная микроскопия LSM 780 Carl Zeiss. В, Е – сканирующая электронная микроскопия (CamScanZ2). В – монослой жтМСК; Е – ВКМ в промежутках между клетками. Масштабный отрезок 20 мкм (А, Б, Г, Д), 50 мкм (В), 1 мкм (Е).

и морфологическая характеристика полученного дцВКМ.

Материалы и методы

Культивирование клеток. жтМСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека культивировали в среде α -MEM (Gibco, Великобритания) с добавлением пенициллина/стрептомицина (100 ед/мл и 100 мг/мл соответственно, ПанЭко, Россия) и эмбриональной телячьей сыворотки (10% об./об.; NuClone, США) в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 , 95% воздуха; Sanyo, Япония). Полученные клетки проверяли на соответствие критериям жтМСК: способность к остеогенной и адипогенной дифференциров-

50 мкг/мл (Fluka, Германия).

Методы децеллюляризации. Культивируемые жтМСК, полученные по методике, описанной выше, трижды промывали 20 mM фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (ПанЭко, Россия) от остатков среды и готовили препараты дцВКМ, используя следующие подходы:

1) гипоосмотический протокол – жтМСК обрабатывали гипоосмотическим водным раствором 0,2% Triton X-100 (Fergas, Германия) 5 мин при комнатной температуре и далее 0,3% NH_4OH (Реахим, Россия) при комнатной температуре в течение 15 мин [11].

2) изоосмотический протокол – использовали изоосмотический раствор 0,5% Triton X-100

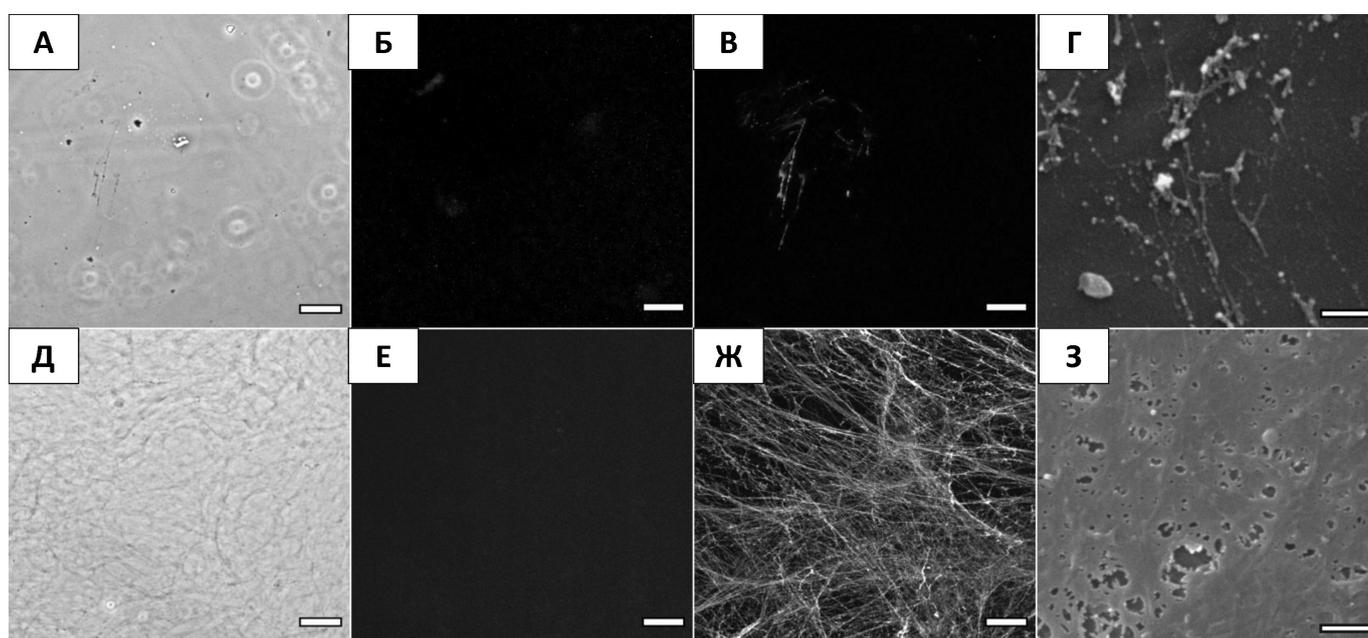


Рис. 2. Получение дцВКМ жтМСК с помощью Triton X-100 в сочетании с NH_4OH : А–Г – 0,2% Triton X-100 и 0,3% NH_4OH ; Д–З – 0,5% Triton X-100 в ФСБ, содержащий 20 mM NH_4OH . А, Д – дцВКМ жтМСК; Б, Е – выявление ДНК-контаминации с помощью красителя DAPI; В, Ж – иммуноцитохимическое выявление фибронектина на препаратах дцВКМ (FITC); А–В, Д – Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония); Е, Ж – конфокальная микроскопия LSM 780 Carl Zeiss; Г, З – визуализация дцВКМ с помощью сканирующей электронной микроскопии (CamScanZ2). Масштабный отрезок 20 мкм (А–Ж), 1 мкм (Г, З).

ке, экспрессию маркеров стромальных клеток CD73, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии маркера гемопоэтических клеток CD45 (данные не представлены). Плотность посадки составляла 3–3,5 тыс. клеток/см². Среду обновляли каждые 3–4 сут. В экспериментах использовали клетки 3–5 пассажей. Для анализа продукции ВКМ жтМСК рассеивали на культуральный пластик или покровные стекла в высокой плотности (7,5 тыс. клеток/см²) и культивировали в течение 14 сут. Для стимуляции продукции компонентов матрикса к клеткам в предмонослойном состоянии в среду культивирования добавляли 2-фосфо-L-аскорбат натрия в концентрации

в ФСБ (pH=7,2), содержащий 20 mM NH_4OH при 37 °C в течение 5 мин [12]. Лизис клеток в обоих случаях отслеживали с помощью фазово-контрастной микроскопии (рис. 2А, Д).

3) RGD-протокол – для получения препаратов дцВКМ использовали метод, который применяют для получения клеточных сфероидов с помощью пептида, содержащего RGD-домен (Arg-Gly-Asp) – цикло-RGDfK (TPP) (RGD-пептид) (по протоколу [13]). После 14 сут культивирования питательную среду заменяли средой, содержащей 80 mM RGD-пептида. После формирования сфероидов (в течение 3–4 сут), их аккуратно удаляли пипеткой.

После децеллюляризации препараты промывали ФСБ и использовали для анализа, как описано ниже.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Образцы клеток или дцВКМ дважды промывали ФСБ и фиксировали смесью 5%-ного глутаральдегида и 4%-ного параформальдегида в соотношении 1:1 (оба Merck, Германия) на ФСБ в течение ночи. Образцы были обезвожены в возрастающих концентрациях этанола (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 90% и 100%) с последующей заменой этанола на ацетон (Химмед, Россия). Образцы высушивали в критической точке, после чего напыляли золотом-палладием и исследовали в сканирующем электронном микроскопе CamScanZ2 (Cambridge Instruments, Великобритания). Микроскопия была выполнена в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии МГУ под руководством Г.Н. Давидовича.

Иммуноцитохимический анализ. Выявление основных белков ВКМ проводили на клеточных и децеллюляризованных препаратах с помощью непрямого иммуофлуоресцентного окрашивания. Клетки промывали дважды ФСБ и фиксировали 4%-ным параформальдегидом с 0,2%-ным Triton X-100 при 37 °С 15 мин (препараты дцВКМ фиксировали без добавления Triton X-100). После отмывки от фиксатора в ФСБ неспецифическое связывание антител блокировали с помощью 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА; Sigma, США) 15 мин при комнатной температуре. Далее клетки или дцВКМ инкубировали с первичными кроличьими антителами к коллагену типа I (5 мкг/мл) и фибронектину (20 мкг/мл) человека (ИМТЕК, Россия). Для негативного контроля вместо первичных антител добавляли а-МЕМ с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой. Затем проводили инкубацию с козьими антителами против кроличьих иммуноглобулинов, меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (10 мкг/мл) (ИМТЕК, Россия). Первую и вторую инкубации проводили в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. Между окрашиваниями промывали в растворе ФСБ/БСА 3 раза по 5 мин. Препараты заключали в монтирующую среду Fluoroshield, содержащую ядерный краситель DAPI (Sigma-Aldrich, США). Образцы анализировали на флуоресцентном фазово-контрастном микроскопе Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония), оснащенный лампой Nikon Intensilight C-HGFI, и на конфокальном микроскопе LSM 780 (Zeiss, Германия) совместно с д.м.н. С.В. Буравковым (ФФМ МГУ). В качестве иллюстраций представлены репрезентативные данные одного из трех

независимых экспериментов.

Обработка изображений. Обработку изображений производили с помощью программ ImageJ и Zeiss LSM Image Browser. На изображениях настраивали яркость и контраст, производили наложение каналов флуоресценции.

Результаты и обсуждение

Иммуноцитохимическая характеристика белков ВКМ жтМСК. Для идентификации основных коллагеновых (коллаген I) и неколлагеновых (фибронектин) белков был использован метод непрямого иммуноцитохимического мечения. Большая часть позитивно-окрашенных структур при использовании антител к коллагену типа I была локализована внутриклеточно (рис. 1А, Б). Как известно, коллаген типа I экскретируется из клеток в виде молекул проколлагена, а окончательная сборка коллагеновых фибрилл происходит во внеклеточном пространстве [14, 15], поэтому мы вправе заключить, что обнаруженное нами внутриклеточное окрашивание соответствует молекулам проколлагена I. Флуоресцентная микроскопия показала, что фибронектин в значительном количестве присутствует во внеклеточном пространстве, формируя сеть из тонких пересекающихся волокон (рис. 1Г, Д).

С помощью СЭМ была исследована ультраструктура ВКМ культивируемых жтМСК (рис. 1В). ВКМ занимал пространство под клетками и между ними, а также выявлялись единичные волокна на клеточной поверхности (рис. 1Е). Молекулы ВКМ, как правило, образовывали плотную мембраноподобную структуру без четкого разделения на отдельные фибриллы, а также присутствовали области с пересекающейся сетью фибрилл ВКМ.

Получение препаратов дцВКМ жтМСК при использовании детергирующего агента Triton X-100. Для получения препаратов дцВКМ жтМСК использовали две модификации метода с использованием детергента Triton X-100 в сочетании с NH_4OH (гипотонический водный раствор и изотонический раствор в ФСБ).

Протокол с использованием гипотонического раствора (водный раствор 0,2%-ного Triton X-100 и 0,3%-ного NH_4OH) предполагал две стадии [11]. Сначала к монослою жтМСК добавляли водный раствор 0,2% Triton X-100 и микроскопически контролировали лизис клеточной мембраны. Ядра клеток при этом оставались видны. Последующая инкубация с NH_4OH приводила к удалению белковых и нуклеиновых компонентов (рис. 2А, Б). Однако иммуноцитохимическое (рис. 2В) и электронно-микроскопическое (рис. 2Г) исследование препаратов дцВКМ показало,

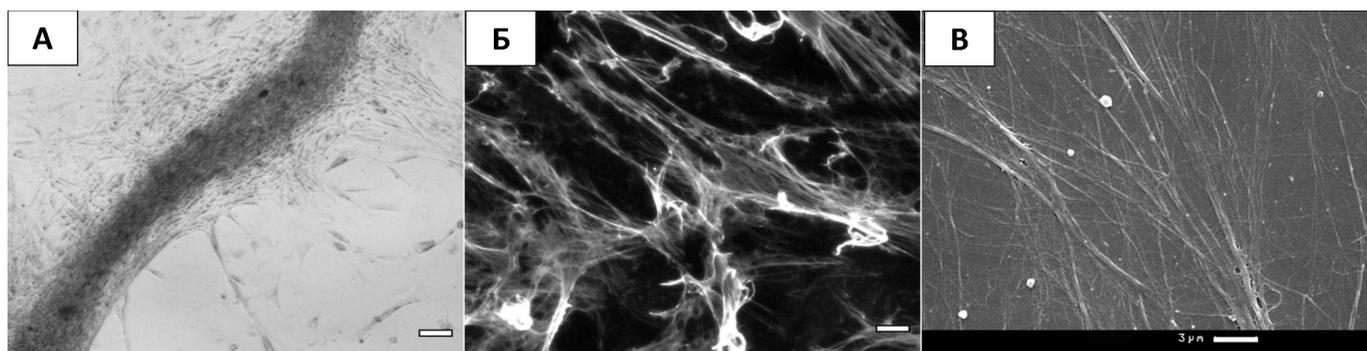


Рис. 3. Получение дцВКМ жтМСК с помощью RGD-пептида. А – формирование сфероидов, 96 ч инкубации с пептидом; Б – иммуноцитохимическое выявление фибронектина после удаления сфероидов (FITC); А, Б – Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония); В – визуализация дцВКМ с помощью сканирующей электронной микроскопии (CamScanZ2). Масштабный отрезок 40 мкм (А), 20 мкм (Б), 3 мкм (В).

что ВКМ не сохраняет своей структуры, остаются одиночные волокна и остатки клеточных мембран. Данные результаты повторились в трех независимых экспериментах, поэтому гипотонический протокол в дальнейшем не использовали.

С помощью изотонического раствора 0,5%-ного Triton X-100 в ФСБ с 20 мМ NH_4OH при 37 °С удалось получить однородные препараты дцВКМ. Слой ВКМ был хорошо виден даже при фазово-контрастной микроскопии (рис. 2Д). Иммуноцитохимический анализ выявил густую сеть фибронектина без ДНК-контаминаций, о чем свидетельствовало отсутствие окрашенного DAPI ядерного материала (рис. 2Е, Ж). Подобные результаты были получены в работе Харриса с коллегами на эмбриональных фибробластах мыши [16]. Молекулы коллагена в составе дцВКМ не выявлялись, что соотносится с данными, полученными на клеточных препаратах, когда иммуноцитохимически был обнаружен коллаген типа I, локализованный внутриклеточно в форме проколлагена. СЭМ-анализ подтвердил однородность слоя дцВКМ. Полученный после децеллюляризации ВКМ несколько отличался от того, что мы видели на нативных препаратах, но структурные особенности, описанные для интактного клеточного монослоя, были сохранены (рис. 23).

В классическом протоколе после использования лизирующих агентов препараты дцВКМ дополнительно обрабатываются ДНКазой I для удаления ДНК-контаминации. Однако существуют работы, в которых не использовали фермент и получали чистые препараты, пригодные для последующей рецеллюляризации [17–19], что делает этот этап факультативным.

Получение препаратов дцВКМ с использованием RGD-пептида. Помимо наиболее часто используемых протоколов децеллюляризации мы опробовали метод, применяемый для получения клеточных сфероидов. Для этого монослойные

жтМСК обрабатывали RGD-пептидом. Аминокислотная последовательность RGD (Arg-Gly-Asp) содержится в доменах белков ВКМ, таких как коллаген типа I и фибронектин, и является лигандом для связывания с интегринами при адгезии [20]. Пептиды, растворенные в среде, являются конкурентами за клеточные интегринны, что способствует откреплению клеток от подложки и образованию сфероидов из клеток [21, 22]. Мы предположили, что после удаления полученных сфероидов на подложке останется дцВКМ.

Нам не удалось получить полностью сформированные клеточные сфероиды, клетки откреплялись целым пластом (рис. 3А). По-видимому, это было связано с тем, что обычно сфероиды получают после достаточно коротких сроков культивирования из клеток, рассеянных изначально в высокой плотности, которые очень быстро (в течение нескольких дней) образуют монослой. Используемый нами протокол предполагал 14-суточное культивирование жтМСК с использованием аскорбата натрия для усиления продукции ВКМ, в результате чего клетки оказались «замурованными» в матрикс. Можно предположить, что крепкие связи жтМСК с матриксом препятствовали формированию сфероидов. С этим же, по-видимому, было связано и то, что после удаления клеток не оставалось чистого слоя дцВКМ (рис. 3Б). На изображении, полученном с помощью СЭМ, видны участки клеток, которые длинными отростками удерживаются на подложке. В пространствах, свободных от клеток, удалось выявить единичные тонкие нити матрикса и фрагменты сети фибронектина (рис. 3В).

Таким образом, иммуноцитохимически идентифицированы белки ВКМ жтМСК и выявлена ультраструктура ВКМ в пространстве между клетками в монослое. Наиболее эффективным для получения дцВКМ жтМСК является

использование изотонического раствора Triton X-100 в сочетании с NH_4OH , который позволяет получить однородный слой дцВКМ без контаминаций. Полученные данные перспективны с точки зрения последующего изучения влияния ВКМ на функциональную активность жтМСК и применения дцВКМ в качестве источника биосовместимых покрытий для получения скаффол-

дов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы Президиума РАН № 19.

Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parekkadan B., Milwid J.M. Mesenchymal stem cells as therapeutics // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2010. Vol. 12. P. 87–117.
2. Schraufstatter I.U., Discipio R.G., Khaldoyanidi S. Mesenchymal stem cells and their microenvironment // *Front. Biosci.* 2011. Vol. 16. P. 2271–2288.
3. Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. Vol. 1840. N 8. P. 2506–2519.
4. Lu H., Hoshiba T., Kawazoe N., Chen G. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32. N 10. P. 2489–2499.
5. Hynes R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils // *Science.* 2010. Vol. 326. N 5957. P. 1216–1219.
6. Joddar B., Hoshiba T., Chen G., Ito Y. Stem cell culture using cell-derived substrates // *Biomater. Sci.* 2014. Vol. 2. N 11. P. 1595–1603.
7. Hoshiba T., Lu H., Kawazoe N., Chen G. Decellularized matrices for tissue engineering // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010. Vol. 10. N 12. P. 1717–1728.
8. Nöth U., Rackwitz L., Steinert A.F., Tuan R.S. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2010. Vol. 62. N 7–8. P. 765–783.
9. Bornstein P., Duksin D., Balian G., Davidson J.M., Crouch E. Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions *in vitro* and *in vivo* // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1978. Vol. 312. P. 93–105.
10. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32. N 12. P. 3233–3243.
11. Harvey A., Yen T., Aizman I., Tate C., Case C. Proteomic analysis of the extracellular matrix produced by mesenchymal stromal cells: implications for cell therapy mechanism // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 11: e79283.
12. Lin H., Yang G., Tan J., Tuan R.S. Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential // *Biomaterials.* 2012. Vol. 33. N 18. P. 4480–4489.
13. Akasov R., Gileva A., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Chevalot I., Guedon E., Markvicheva, E. 3D *in vitro* co-culture models based on normal cells and tumor spheroids formed by cyclic RGD-peptide induced cell self-assembly // *Biotechnol. Lett.* 2016. Vol. 39. N 1. P. 45–53.
14. Myllyharju J., Kivirikko K.I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms // *Trends. Genet.* 2004. Vol. 20. N 1. P. 33–43.
15. Myllyharju J. Prolyl-4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis // *Matrix Biol.* 2003. Vol. 22. N 1. P. 15–24.
16. Harris G.M., Raitman I., Schwarzbauer J.E. Cell-derived decellularized extracellular matrices // *Methods Cell Biol.* 2018. Vol. 2. N 143. P. 97–114.
17. He F., Chen X., Pei M. Reconstruction of an *in vitro* tissue-specific microenvironment to rejuvenate synovium-derived stem cells for cartilage tissue engineering // *Tissue Eng. Part A.* 2009. Vol. 15. N 12. P. 3809–3821.
18. Sun Y., Li W., Lu Z., Chen R., Ling J., Ran Q., Jilka R.L., Chen X.D. Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix // *FASEB J.* 2011. Vol. 25. N 5. P. 1474–1485.
19. Prewitz M.C., Seib F.P., von Bonin M., Friedrichs J., Stijzel A., Niehage C., Werner C. Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments // *Nat. Methods.* 2013. Vol. 10. N 8. P. 788–794.
20. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996. Vol. 12. P. 697–715.
21. Zhang L., Hum M., Wang M., Li Y., Chen H., Chu C., Jiang H. Evaluation of modifying collagen matrix with RGD peptide through periodate oxidation // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2005. Vol. 73. N 4. P. 468–475.
22. Lam J., Segura T. The modulation of MSC integrin expression by RGD presentation // *Biomaterials.* 2013. Vol. 34. N 16. P. 3938–3947.

Поступила в редакцию 20.06.2019 г.
После доработки 16.09.2019 г.
Принята в печать 23.09.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

SELECTION OF THE OPTIMAL PROTOCOL FOR PREPARATION OF DECELLULARIZED EXTRACELLULAR MATRIX OF HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS

D.K. Matveeva^{1, 2}, E.R. Andreeva^{1, *}, L.B. Buravkova^{1, 2}

¹*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Horoshevskoe sh. 76A Moscow, 123007, Russia;*

²*Department of Ecological and Extreme Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*
**e-mail: andreeva1564@gmail.com*

Currently, biological scaffolds composed of extracellular matrix (ECM) are being examined actively for the needs of regenerative medicine. ECM substrates are prepared by decellularization and used to deliver cells to damaged tissue. Native scaffold of ECM have an advantage over bioengineered ones because ECM retains natural biologic cues that provide efficient reparative cell functions. Mesenchymal stromal cells (MSCs) have multipotent potential of differentiation and secrete a wide range of bioactive molecules. In this regard, MSCs are important intermediaries for tissue repair. The ECM as a critical component of the MSC niche modulating their functional activity, including migration, proliferation and differentiation, as well as supports their potential for self-renewal. *In vitro* investigations would be useful in elucidation of how biological scaffolds can affect the reparative functions of MSCs. There are several different protocols for decellularization. Since ECM of various cell types differs qualitatively and quantitatively, these protocols should be optimized for each specific case. In the present study we compared the effectiveness of approach to prepare decellularized ECM (dcECM) of adipose-derived MSC (adMSC): Triton X-100/NH₄OH solution in phosphate buffered solution or H₂O, and the possibility of using dcECM after spheroids were formed. ECM-derived substrates were analyzed with immunocytochemistry and scanning electron microscopy. During long-term cultivation MSCs produced a well-developed ECM, which after treatment with phosphate buffered solution of Triton X-100/NH₄OH maintaining the structure close to native one. It was impossible to receive a uniform dcECM layer, when water solution of Triton X-100/NH₄OH was used. On the scanning electron microscopy images single fiber of ECM were revealed in this case. We detected fragments of ECM and cells after spheroids formation upon of RGD peptides treatment. Therefore, this method was not effective for obtaining dcECM of adMSCs.

Keywords: *human mesenchymal stromal cells, extracellular matrix, decellularization, regenerative medicine, immunocytochemistry, scanning electron microscopy*

Сведения об авторах

Матвеева Диана Константиновна — аспирант лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-65-44; e-mail: *matveeva.dajana@yandex.ru*

Андреева Елена Ромуальдовна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-63-01; e-mail: *andreeva1564@gmail.com*

Буравкова Людмила Борисовна — чл.-корр. РАН, докт. мед. наук, зав. лабораторией клеточной физиологии ИМБП РАН; проф. кафедры экологической и экстремальной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-499-195-68-76; e-mail: *buravkova@imbp.ru*