

## Применение срезов органных внеклеточных матриц для 3D культивирования

*А.Ю. Пульвер<sup>1</sup>, Б.Е. Лейбович<sup>1</sup>, Р.А. Полтавцева<sup>2</sup>, Г.А. Давыдова<sup>3</sup>, А.Н. Шевцов<sup>1</sup>, И.И. Селезнева<sup>2,3</sup>, С.В. Павлович<sup>2</sup>, Н.А. Пульвер<sup>1</sup>, Е.А. Раскина<sup>1</sup>, А.В. Волков<sup>1</sup>, А.С. Сундеев<sup>1</sup>, С.Г. Путилин<sup>1</sup>, И.В. Савинцева<sup>3</sup>, Г.Т. Сухих<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> НПО ООО «Институт биологии старения», Воронеж, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино Московской области, Россия

**Актуальность:** в последние десятилетия децеллюляризация органов стала устоявшейся техникой в области регенеративной медицины для получения сложных биоскаффолдов. Кроме того, *in vitro* было продемонстрировано, что таковые сохраняют свою природную тканеспецифичность.

**Цель исследования:** разработка методики получения срезов внеклеточных матриц матки и яичников человека.

**Материалы и методы:** срезы внеклеточных матриц матки и яичников человека толщиной 50 мкм были получены на криомикротоме, после чего проходили последовательную обработку детергентами (1% раствор додецилсульфата натрия) и 10% эмбриональной телячьей сывороткой для удаления резидуальной ДНК и лиофильную вакуумную сушку с последующей патоморфологической оценкой сохранности и качества срезов после лиофилизации и оценкой влияния на жизнеспособность подсеяемых клеток посредством заселения клеточными культурами.

**Результаты:** описан способ получения полноценных тканеспецифичных субстратов для роста трехмерных клеточных культур большой плотности *in vitro*.

**Выводы:** разработанная методика получения срезов может быть применена для удобной и недорогой замены широко использующихся в фармакологии и токсикологии прецизионных срезов тканей.

**Ключевые слова:** 3D клеточные культуры, внеклеточный матрикс, гинекология и репродуктивная медицина, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, тканевая инженерия, эндометрий

**Для корреспонденции:** Борис Ефимович Лейбович. E-mail: bel.46@mail.ru

**Для цитирования:** А.Ю. Пульвер, Б.Е. Лейбович, Р.А. Полтавцева, Г.А. Давыдова, А.Н. Шевцов, И.И. Селезнева, С.В. Павлович, Н.А. Пульвер, Е.А. Раскина, А.В. Волков, А.С. Сундеев, С.Г. Путилин, И.В. Савинцева, Г.Т. Сухих. Применение срезов органных внеклеточных матриц для 3D культивирования. *Клин. эксп. морфология*. 2019; 8(2): 55-63. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-55-63

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила: 14.05.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

## Application of precision cut organ extracellular matrix slices for 3D cultivation

*A.Yu. Pulver<sup>1</sup>, B.E. Leibovich<sup>1</sup>, R.A. Poltavtseva<sup>2</sup>, G.A. Davydova<sup>3</sup>, A.N. Shevtsov<sup>1</sup>, I.I. Selezneva<sup>2,3</sup>, S.V. Pavlovich<sup>2</sup>, N.A. Pulver<sup>1</sup>, E.A. Raskina<sup>1</sup>, A.V. Volkov<sup>1</sup>, A.S. Sundeev<sup>1</sup>, S.G. Putilin<sup>1</sup>, I.V. Savintseva<sup>3</sup> and G.T. Sukhikh<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> R&B «Institute of Biology of Aging», LLC, Voronezh, Russia

<sup>2</sup> National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow Region, Russia

**Relevance:** in recent decades, the organ decellularization has become an established technique in the regenerative medicine for obtaining complex bioscaffolds. In addition, it was demonstrated *in vitro* that they retain their natural tissue specificity. The article describes the varieties and methods for producing tissue-engineered scaffolds that mimic natural extracellular matrices obtained by non-perfusion methods in most cases.

**Aim of the study:** development of methods for obtaining sections of extracellular matrices (ECM) of the uterus and human ovaries.

**Materials and methods:** 50 µm thick ECM human uterus and ovary slides have been obtained by cryomicrotome sectioning, followed by sequential detergent (1% sodium dodecyl sulfate solution, v/w) treatment and 10% w/w fetal calf serum application for residual DNA removal, accomplished by freeze-drying with subsequent pathological assessment of ECM slides preservation quality via cell viability evaluation by means of cell culture colonization.

**Research results:** we offer a method of precision cut human uterine and ovarian extracellular matrix scaffold slices preparation in the capacity of full-fledged *in vitro* tissue-specific media for three-dimensional high density cell culture.

**Conclusions:** the technique developed could be used for convenient and affordable surrogation of precision cut tissue slices widely applicable in pharmacology and poison control.

**Key words:** 3D cell cultures, extracellular matrix, gynecology and reproductive medicine, mesenchymal multipotent stromal cells, tissue engineering, endometrium

**Corresponding author:** Boris E. Leibovich. E-mail: bel.46@mail.ru

**For citation:** A.Yu. Pulver, B.E. Leibovich, R.A. Poltavtseva, G.A. Davydova, A.N. Shevtsov, I.I. Selezneva, S.V. Pavlovich, N.A. Pulver, E.A. Raskina, A.V. Volkov, A.S. Sundeev, S.G. Putilin, I.V. Savintseva, G.T. Sukhikh. Application of precision cut extracellular matrix slices for 3d cultivation. Clin. exp. morphology. (In Russ.). 2019; 8(2): 55-63. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-55-63

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 14.05.2019. Accepted 04.06.2019

Органные внеклеточные матриксы (ВКМ) больше всех остальных типов ВКМ (хотя это, конечно, главным образом зависит от протокола децеллюляции) напоминают тот орган, из которого были произведены. Тем не менее тканеспецифичные ВКМ, получаемые бесперфузионным способом (как правило, более длительным, но менее трудоемким и не требующим специального, зачастую дорогостоящего оборудования), из-за отсутствия сохранной циркуляторной сети нередко более удобны в исследовательской работе. Этим они напоминают широко используемые в фармакологии, токсикологии и патофизиологии прецизионные срезы тканей (ПСТ), в значительной степени сохраняющие архитектуру «родительского» органа, клеточную гетерогенность и связи клетка–клетка и клетка–ВКМ, обнаруженные *in vivo* [1–5].

Из-за небольшого линейного размера и толщины срезов, а также широко коммерчески доступного оборудования – микротомов, а лучше вибромикротомов легко производить большое количество срезов из одного органа за короткий промежуток времени. Работать с ними можно практически так же, как с обыкновенными 3D клеточными культурами. Это существенно упрощает, ускоряет и удешевляет работу, в большинстве случаев не слишком влияя на конечный результат.

### Получение и характеристика срезов ВКМ матки и яичников человека

В рамках научно-исследовательской работы нашими организациями были совместно проведены получение и характеристика ВКМ матки и яичников человека, адаптированных для использования *in vitro* наподобие упоминавшихся выше ПСТ, потенциально столь же удобных для практического применения. По сути дела, они представляют собой полноценные тканеспецифичные среды для роста трехмерных клеточных культур большой плотности.

Аутопсийный материал (матка с маточными трубами и яичниками), полученный от пациентки 50 лет, умершей от послеоперационной тромбоэмболии легочных артерий, в целом признан пригодными для получения ВКМ.

### Промывание сосудистого русла

Сосудистое русло отмыто 5 литрами гепаринизированного (20 ЕД/мл) изотонического раствора с добавлением 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), при перфузионном давлении 100–140 мм рт. ст. (скорость перфузии – 60–70 мл/мин) в течение ~1,5 часа. Визуально орган в процессе перфузии практически не менялся.

### Получение срезов ВКМ

Линейные размеры человеческих яичников (рис. 1, 4 А) вполне позволяют размещать их в шестилучных культуральных планшетах, поэтому яичники целиком фиксировали термостатом к рабочей площадке криомикротомы Cryostat Leica CM1510 (Германия), охлаждали до –18°C, и получали срезы толщиной 50 мкм (возможная максимальная толщина срезов, получаемых на этом криомикротоме).

Для стенки матки (эндометрий + миометрий – в силу малой толщины эндометрия изолировать таковой не представляется возможным) с целью максимально возможной унификации было решено получать срезы маточного ВКМ размерами, близкими к диаметру лунок 24-луночных культуральных планшетов.

В фиксированном термостатом к рабочей площадке образце ткани матки, охлажденном до –18°C, при помощи циркулярной алмазной фрезы высверливали цилиндр диаметром 16 мм на глубину примерно 10 мм. После этого делали серию срезов толщиной 50 мкм каждый. Вследствие недостаточно низкой температу-

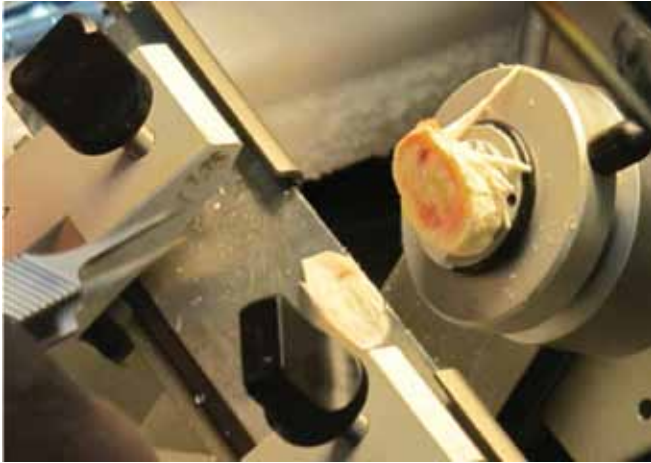


Рис. 1. 50 мкм срез яичника на криомикротоме  
Fig. 1. 50 µm ovarian cryomicrotome sectioning



Рис. 2. Фрезерованный вырез в замороженном эксплантате D×8 мм  
Fig. 2. Frozen explant D×8 mm milled cut



Рис. 3. 50 мкм срез маточной стенки на криомикротоме  
Fig. 3. 50 µm uterine wall cryomicrotome sectioning

ры замораживания перед высверливанием цилиндра образцы получились с незначительными дефектами, но в целом пригодными для дальнейшей работы (рис. 2, 4 Б).

Из подготовленных образцов стенки матки так же, как в случае с яичниками, с помощью криомикротомы Cryostat Leica CM1510 получали срезы толщиной 50 мкм (рис. 3).

Полученные срезы немедленно помещали на дно лунок плоскодонных культуральных планшетов.

Срезы яичников (три штуки) помещали в полистироловые 6-луночные планшеты (Corning-Costar, США). Срезы маточной стенки (12 штук) помещали в аналогичные 24-луночные планшеты.

Срезы органных матриксов в каждом случае размещали в половину планшетных лунок (прочие оставались пустыми для возможности проведения в будущем

различных контрольных экспериментов). Все использованные планшеты имели поверхность, обработанную для оптимального прикрепления клеток (CellBIND). Это совершенно не требуется для матрикса, представляющего собой сплошную поверхность для клеточной адгезии (для него могут быть использованы планшеты с необработанной поверхностью для суспензионных культур), но для контрольных экспериментов адгезионные поверхности желательны.

#### Помещение срезов ВКМ в культуральных планшетах и децеллюляризация

Децеллюляризация срезов ВКМ проводилась по видоизмененной и переработанной методике [6]: после размещения срезов матриксов на дне лунок культуральных планшетов на них наслаивалось (с целью исключения съезживания/перекручивания матриксно-



Рис. 4. Размещение срезов органных ВКМ в культуральных планшетах.

А – срезы яичников в 6-луночном планшете, Б – срезы маточной стенки в 24-луночном планшете

Fig. 4. Placing precision cut ECM slices in culture plates.

А – ovarian sections in a 6-well plate, Б – uterine wall sections in a 24-well plate

го лоскута) по 15 мл (для 6-луночных) или по 2 мл (для 24-луночных) 1% раствора додецилсульфата натрия (AppliChem GmbH, Германия) в физиологическом растворе с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, БиолоТ, Россия). Планшеты инкубировались на орбитальном шейкере со скоростью 120 об/мин в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего жидкость осторожно аспирировали и матриксы трехкратно промывали таким же объемом физиологического раствора.

#### *Постпроцессинг срезов ВКМ (удаление остаточной ДНК и подготовка к лиофилизации)*

Во многих тканевоинженерных научных работах нарочито заостряется опасность остаточной ДНК [7, 8], на наш взгляд, несколько переоцененная [9]. В ЭТС, повсеместно используемой в культуре клеток, достаточно нуклеаз, чтобы расщепить все нуклеиновые кислоты уже при концентрации 2,5% [10]. С этой целью после отмывания матриксов от децеллюляризаторов состав жидкости сменялся на 10% ЭТС в физиологическом растворе с 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Планшеты ротировали на орбитальном шейкере с той же скоростью при +4°C в течение шести суток с ежедневной сменой раствора.

По завершении в целях подготовки к лиофилизации (для предохранения трехмерной структуры тканевых каркасов [9]) инкубационный раствор в лунках заменяли на 5% раствор трегалозы (Лабтех, Россия) на физиологическом растворе с добавлением с 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина.

#### *Сублимационная вакуумная сушка ВКМ*

Для возможности длительного (более 6 месяцев) хранения культуральные планшеты со срезами ВКМ после предварительного замораживания были подвергнуты сублимационной вакуумной сушке в лиофильной сушилке «ИНЕЙ-4» (ИБП РАН, Россия). Перед началом заморозки наружную поверхность планшетов и внутреннюю поверхность вакуумных пакетов обрабатывали 70% этиловым спиртом, после чего планшеты размещали в пакетах. Сразу после окончания лиофилизации пакеты вакуумировали при помощи бытового вакууматора.

#### *Контроль стерильности*

Трупные органы, изымаемые без соблюдения асептики в условиях патологоанатомического отделения, склонны к контаминации различными микроорганизмами.

Процесс химической децеллюляризации в силу токсичности применяемых веществ сам по себе имеет антисептический характер, однако наш собственный опыт свидетельствует (неопубликованные данные) о невозможности 100% исключения бактериальной контаминации, что обычно вынуждает использовать антисептические агенты (вплоть до ионизирующего излучения),

которые могут дополнительно повреждать функционально важные гликопротеины и мукополисахариды ВКМ. Вакуумная сублимация (лиофилизация) позволяет не только длительно хранить органные матриксы при комнатной температуре, но и стерилизовать их, убивая вегетирующие микроорганизмы. К сожалению, покоящиеся споры таким способом полностью уничтожить невозможно, поэтому исключить вероятность роста грибов нельзя. Для борьбы с грибами можно использовать различные добавки в состав культуральной среды (чаще всего применяется амфотерицин В в концентрации 2,5 мг/л вместе с пенициллином и стрептомицином).

#### *Патоморфологическая оценка сохранности и качества срезов ВКМ после лиофилизации*

На макроуровне срезы выглядят полупрозрачными, однородными, объемная структура ткани в целом сохранена, признаков отека нет (рис. 4–6).

Структура матрикса несколько нарушена из-за микрорастрескивания (рис. 6 А, Д), так как перед нарезкой он замораживался в отсутствие внеклеточных криопротекторов, предохраняющих трехмерную структуру тканевых каркасов. Впрочем, для культурального применения это даже может являться преимуществом, так как такого характера повышение пористости субстрата может облегчать клеточную миграцию в толщу подложки.

При гистологическом окрашивании гематоксилином и эозином (рис. 6) определяется полное отсутствие клеточных ядер и тканевого детрита.

#### *Заселение полученных ВКМ клеточными культурами*

Сравнительный цитоморфометрический анализ пролиферации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), растущих на срезах органных внеклеточных матриксов матки и яичников человека, проводили в сравнении с ростом МСК на поверхности культурального пластика без покрытия.

В эксперименте использовали трансгенную культуру стволовых клеток пульпы зуба на 2-м пассаже, трансдуцированных лентивектором LVT-TagGFP2 (Евроген, Россия) по протоколу Moffat et al. [11], тем самым получая трансгенную клеточную культуру DPSC, несущую ген флуоресцентного зеленого белка (GFP-DPSC).

Клеточную культуру 2-го пассажа помещали в 24-луночный планшет в количестве  $10^4$  клеток на лунку. Через сутки культивирования в ростовую среду вносили  $10^5$  лентивирусных частиц, далее через сутки меняли культуральную среду. На третьи сутки после заражения в клетках наблюдали развитие экспрессии GFP по уровню флуоресценции, добавляли антибиотик пуромидин 2 мкг/мл (Santa Cruz, США) и производили селекцию клеток на антибиотике в течение пяти дней. Полученную культуру клеток (GFP-DPSC) использовали для исследования образцов материалов.

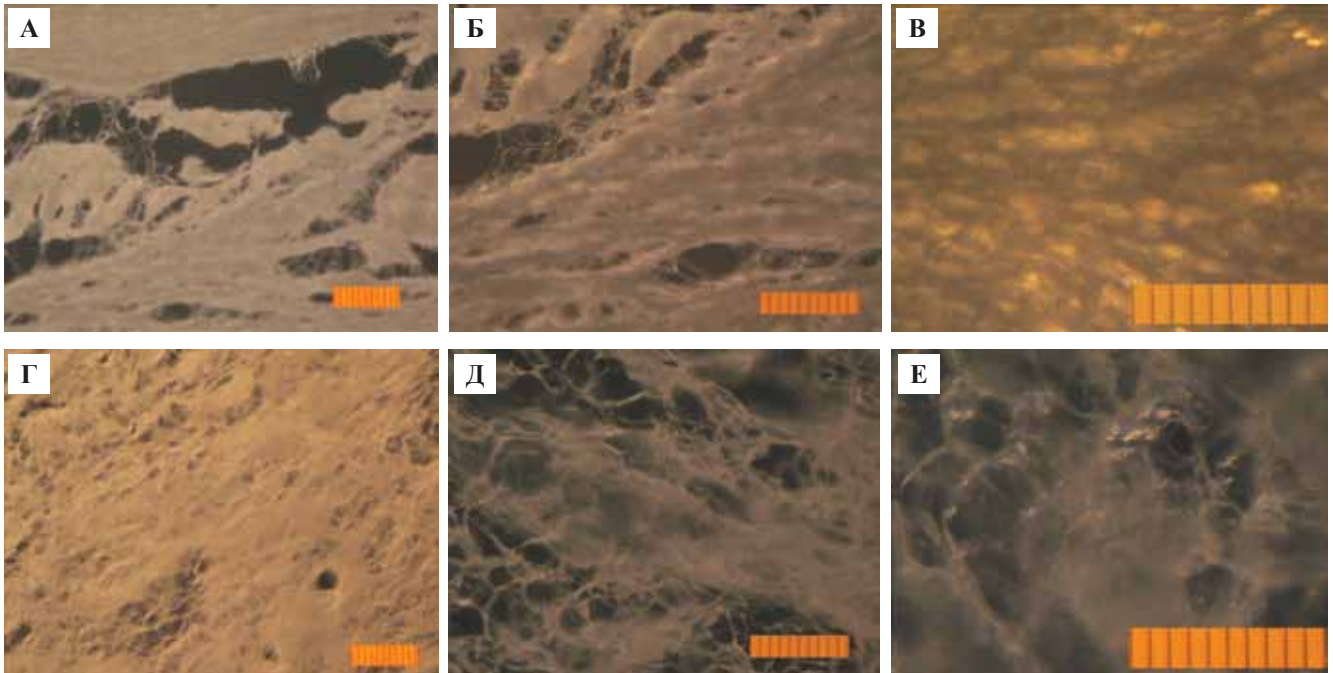


Рис. 5. Срезы органных ВКМ под разным увеличением (фазовый контраст)

А, Б, В – миометриальный/эндометриальный ВКМ, В, Г, Д – овариальный ВКМ (размер деления шкалы – 1 мкм)

Fig. 5. Precision cut ECM slices under different magnification settings (phase contrast)

А, Б, В – myometrial/endometrial ECM, В, Г, Д – ovarial ECM (scale bar division is 1  $\mu$ m)

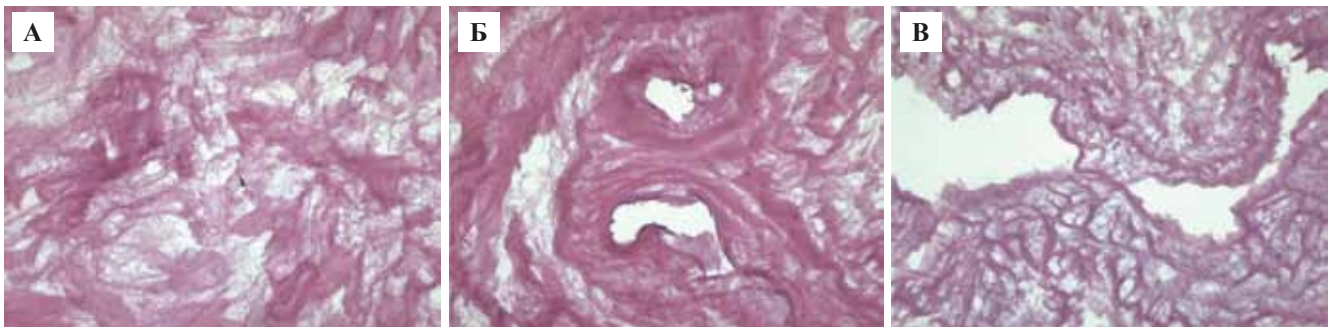


Рис. 6. Срезы органных ВКМ, окраска гематоксилином и эозином,  $\times 630$  (толщина 50 мкм).

А, Б – миометриальный/эндометриальный ВКМ, В – овариальный ВКМ

Fig. 6. Precision cut ECM organ slices, hematoxylin-eosin stain,  $\times 630$  (50  $\mu$ m thickness)

А, Б – myometrial/endometrial ECM, В – ovarial ECM

#### Определение цитотоксичности и оценка влияния ВКМ на жизнеспособность клеток

Оценку жизнеспособности клеток, культивируемых в присутствии исследуемых веществ проводили на микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Микроскопию клеток с фотографией осуществляли через 24 часа, 72 часа и 168 часов (одни сутки, трое суток и семь суток) от начала инкубации. На седьмые сутки для проведения анализа применяли метод флуоресцентного окрашивания клеток, используя набор L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Великобритания), в который входят два флуоресцентных красителя: SYTO 9 и иодид пропидия (рис. 7). Флуоресцентный краситель SYTO 9 в режиме исследования  $\lambda_{\text{возб}} = 450\text{--}490$  нм,

$\lambda_{\text{эмисс}} = 515\text{--}565$  нм окрашивает в зеленый цвет ДНК и РНК живых и мертвых клеток. Интеркалирующий реагент иодид пропидия в режиме исследования  $\lambda_{\text{возб}} = 546$  нм,  $\lambda_{\text{эмисс}} = 575\text{--}640$  нм окрашивает в красный цвет ядра погибших клеток.

Для определения цитотоксичности материалов для клеток использовали метод прямого контакта. Образцы матриц помещали стерильно в лунки 24-луночного планшета, добавляли 1 мл среды DMEM (ПанЭко, Россия) со 100 ЕД/мл пенициллин и 100 мкг/мл стрептомицина и помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор при температуре  $37^\circ\text{C}$ , содержании  $\text{CO}_2$  5% на семь суток с ежедневной сменой среды. Через 72 часа проводили смену среды и на поверхность матриц вносили клетки в концентрации 25 тыс. клеток/ $\text{cm}^2$  в среде DMEM/F12 (ПанЭко

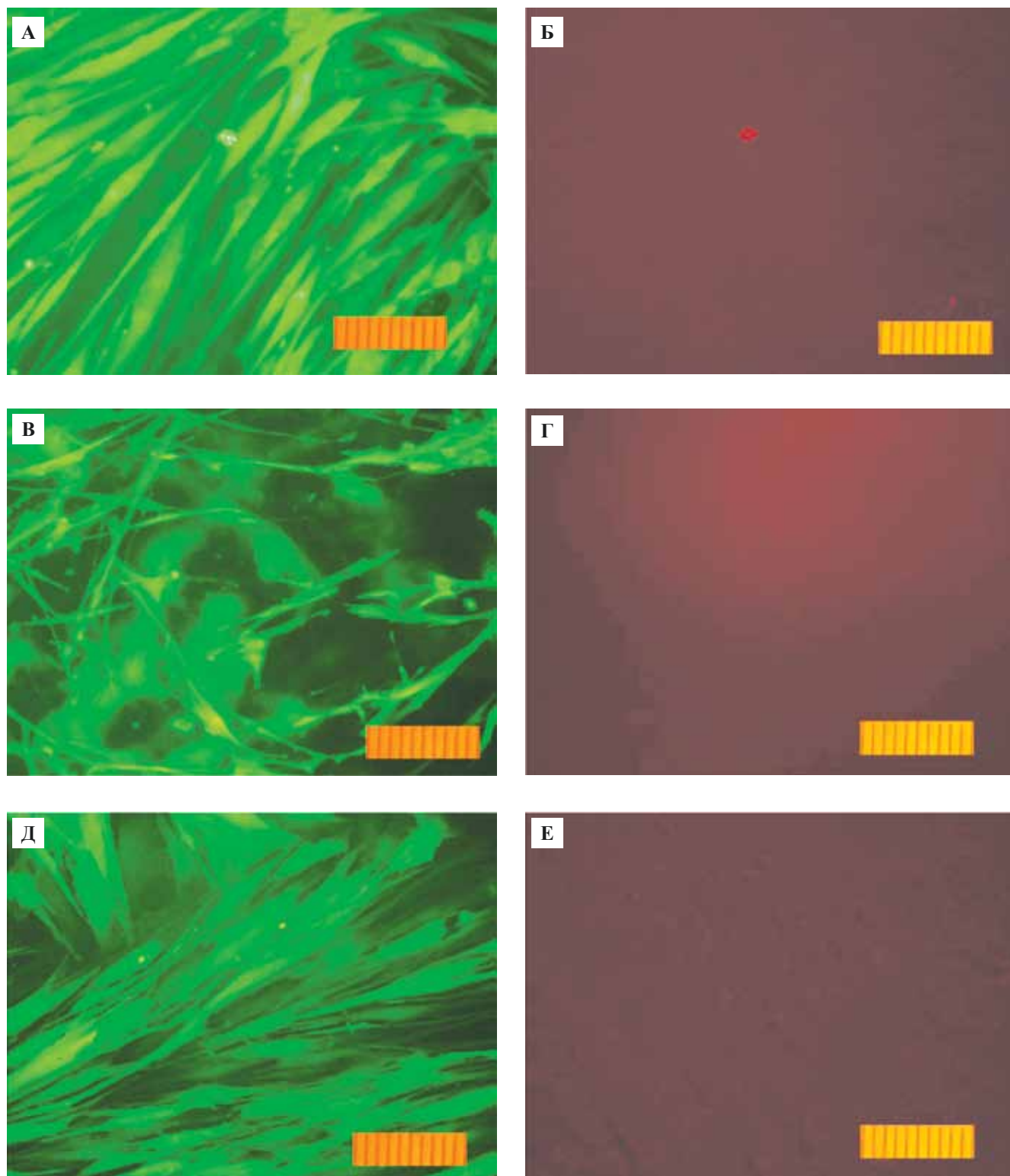


Рис. 7. Микропрепараты 3D клеточных культур DPSC на седьмые сутки (168 часов) инкубации на различных субстратах. А – контроль (культуральный пластик), SYTO 9, Б – контроль, йодид пропидия, В – миометриальный/эндометриальный ВКМ, SYTO 9, Г – миометриальный/эндометриальный ВКМ, йодид пропидия, Д – овариальный ВКМ, SYTO 9, Е – овариальный ВКМ, йодид пропидия. Размер деления шкалы – 1 мкм

Fig. 7. DPSC 3D cell culture slide mounts on the 7th day (168 hours) of incubation period with various substrates: А – control (culture plastic), SYTO 9, Б – propidium iodide control, В – myometrial/endometrial ECM, SYTO 9, Г – myometrial/endometrial ECM, propidium iodide, Д – ovarian ECM, SYTO 9, Е – ovarian ECM, propidium iodide (scale bar division is 1 μm)

Россия), содержащей 5% ЭТС и 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор при температуре 37°C. В качестве контроля клетки были помещены на культуральный пластик. Каждые 48 часов проводили смену среды.

Следует отдельно отметить необходимость обязательного неоднократного отмывания образцов лиофилизованного ВКМ от избытка трегалозы, способного вызывать закисление культуральной среды и клеточную гибель.

Выводы – цитотоксичность ВКМ при правильной подготовке практически отсутствует: клетки по жизнеспособности не отличаются от контроля (жизнеспособность близка к 100%). Скорость клеточной пролиферации также практически не отличается от контроля. Как видно на рисунках 7 А, В и Д, клеток достаточно, они хорошо распластаны, характер роста немного отличается, отражая разницу в строении клеточных подложек (в частности, на маточном ВКМ (рис. 7 В) особенно отчетливо видны клетки, выходящие за предел фокуса резкости, распространяющиеся вглубь субстрата).

### Перспективы и практические выводы

Разработанная нами методика срезов может быть использована в качестве удобной альтернативы прецизионных срезов тканей, широко практикующихся в областях фармакологии и токсикологии, а также как субстраты для тканеспецифической 3D культуры клеток. До настоящего времени в таком качестве они не применялись – единственным аналогом предложенной методики может считаться работа [3], в которой внеклеточные матриксы, полученные из участков почек макак-резус, диаметром 8 мм и толщиной 5 мм использовались для изучения сравнения эффективности способов децеллюляризации почечных ВКМ для их последующей рецеллюляризации.

Тканеспецифичные ВКМ человека представляют собой удобные *in vitro* модели для комплексных исследований иммунологических свойств, культивирования и дифференцировки культур стволовых клеток из разных источников в стандартизированных экспериментальных условиях. Трехмерные культуры на основе тканеспецифичных ВКМ позволяют культивировать клетки в условиях, максимально приближенных к таковым *in vivo*, используя стандартные культуральные методы.

При помощи данной методики можно изготавливать стерильные срезы ВКМ практически любых органов и тканей в культуральных планшетах с последующей лиофилизацией способом, предотвращающим повреждение функционально значимых гликопротеидов и мукополисахаридов при вакуумной сушке.

Наряду с этим в процессе получения и манипуляций со срезами ВКМ были сделаны выводы, с учетом которых можно будет оптимизировать дальнейшую работу с ними.

1. Отмывание матки с яичниками от крови лучше всего проводить до извлечения, канюлируя брюшную аорту (в крайнем случае – внутренние подвздошные артерии, причем до извлечения органа), предварительно перевязав все артерии, кроме маточных и яичниковых.

2. Давление перфузии не следует увеличивать более 100–110 мм рт. ст.

3. Нужно выделять яичниковые артерии, яичники децеллюляризовать отдельно.

4. Маточные трубы следует отсекают ближе к основанию, культю перевязывать.

5. Для изготовления качественных срезов материал перед вырезанием тканевого цилиндра с помощью циркулярной фрезы необходимо подвергать более глубокому замораживанию, желательнее жидким азотом (–18°C недостаточно).

6. При перекручивании/сжимании матриксного лоскута (среза) планшет при смене среды следует поместить на орбитальный шейкер (10–15 минут, 70–120 об/мин), в результате чего лоскут расправится.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.А.Д., Б.Е.Л., С.В.П., А.Ю.П., Р.А.П., Н.А.П., Г.Т.С., А.Н.Ш.

Сбор и обработка материала – А.В.В., Б.Е.Л., А.Ю.П., Н.А.П., С.Г.П., Е.А.Р., И.В.С., А.С.С., А.Н.Ш.

Статистическая обработка данных – Г.А.Д., Р.А.П.

Написание текста – Г.А.Д., Б.Е.Л., А.Ю.П., Р.А.П., Г.Т.С.

Редактирование – Г.А.Д., Б.Е.Л., С.В.П., Р.А.П., А.Ю.П., Н.А.П., И.И.С., Г.Т.С., А.Н.Ш.

### Литература/References

1. *Rojkind LM, Gatmaitan Z, Mackensen S, Giambone MA, Ponce P, Reid LM.* Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol.* 1980;87(1):255–63. doi: 10.1083/jcb.87.1.255
2. *Martin H, Bournique B, Sarsat JP, Albaladejo V, Lerche-Langrand C.* Cryopreserved rat liver slices: a critical evaluation of cell viability, histological integrity, and drug-metabolizing enzymes. *Cryobiology.* 2000;41(2):135–44. doi: 10.1006/cryo.2000.2275.
3. *Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF.* Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue engineering. Part A,* 2010;16(7):2207–16. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0602
4. *Przygodzka E, Lopinska M, Ziecik AJ.* Precision-cut luteal slices: a promising approach for studying luteal function in pigs. *Reprod Biol.* 2014;14(3):243–7. doi: 10.1016/j.repbio.2014.04.001. Epub 2014 Apr 18.
5. *Lyons-Cohen MR, Nakano H, Thomas SY, Cook DN.* Imaging Precision-Cut Lung Slices to Visualize Leukocyte Localization and Trafficking. *Methods Mol Biol.* 2018;1799:237–46. doi: 10.1007/978-1-4939-7896-0\_18.
6. *Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J et al.* Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis.* 2002;11(4):457–62.

7. *Langer R.* Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Mater.* 2009;21(32–33):3235–6. doi: 10.1002/adma.200902589.
8. *Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF.* An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233–43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
9. *Pulver A, Shevtsov A, Leybovich B, Artyuhov I, Maleev Y, Peregodov A.* Production of organ extracellular matrix using a freeze-thaw cycle employing extracellular cryoprotectants. *Cryo letters.* 2014;35(5):400–6.
10. *Gui L, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE.* Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue engineering. Part C, Methods.* 2010;16(2):173–84. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0120.
11. *Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G et al.* A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell.* 2006;124(6):1283–98. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.040.

### Информация об авторах/Author information

Александр Юрьевич Пульвер – генеральный директор, заведующий лабораторией НПК ООО «Институт биологии старения». Alexander Yu. Pulver – General Director, Head of the Laboratory, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0001-6673-1859>.

Борис Ефимович Лейбович – патологоанатом, гистолог, НПК ООО «Институт биологии старения». Boris Ye. Leibovich – pathologist, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0003-2259-7656>.

Римма Алексеевна Полтавцева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. Rimma A. Poltavtseva – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, NMRC OGP named after V.I. Kulakov. <https://orcid.org/0000-0001-8625-9205>.

Галина Анатольевна Давыдова – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Galina A. Davydova – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Senior Researcher, Cell and Tissue Growth Laboratory, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS. <https://orcid.org/0000-0003-4215-7084>.

Артем Николаевич Шевцов – старший научный сотрудник НПК ООО «Институт биологии старения». Artyom N. Shevtsov – Senior Researcher, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0001-8641-2847>.

Ирина Ивановна Селезнева – кандидат физико-математических наук, заведующая лабораторией роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН; младший научный сотрудник НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. Irina I. Selezneva – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Head of the Cell and Tissue Growth Laboratory, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS; Junior Researcher, NMRC OGP named after V.I. Kulakov. <https://orcid.org/0000-0003-0316-9883>.

Станислав Владиславович Павлович – кандидат медицинских наук, ученый секретарь НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. Stanislav V. Pavlovich – Candidate of Medical Sciences, Scientific Secretary, NMRC OGP named after V.I. Kulakov. <https://orcid.org/0000-0002-1313-7079>.

Наталья Александровна Пульвер – ассистент, НПК ООО «Институт биологии старения». Natalya Aleksandrovna Pulver – Assistant, R&B «Institute of Biology of Aging», Voronezh, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4549-54764>.

Екатерина Александровна Раскина – ассистент, НПК ООО «Институт биологии старения». Ekaterina A. Raskina – Assistant, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0002-2195-4116>.

Алексей Владимирович Волков – ассистент, виварийный работник, НПК ООО «Институт биологии старения». Alexey V. Volkov – Assistant, Vivarium Technician, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0002-1030-5073>.

Артем Сергеевич Сундеев – ассистент, НПК ООО «Институт биологии старения». Artyom S. Sundeev – Assistant, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0002-3846-2046>.

Сергей Геннадьевич Путилин – ассистент, НПК ООО «Институт биологии старения». Sergey G. Putilin – Assistant, R&B «Institute of Biology of Aging». <https://orcid.org/0000-0001-7104-2599>.



Ирина Викторовна Савинцева – научный сотрудник лаборатории роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Irina V. Savintseva – Researcher, Cell and Tissue Growth Laboratory, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS.  
<https://orcid.org/0000-0002-4162-0375>.

Геннадий Тихонович Сухих – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Gennady T. Sukhikh – Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the NMRC OGP named after V.I. Kulakov.  
<https://orcid.org/0000-0002-7712-1260>.