

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-2-98-103

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ПИЩЕВОДА КРЫС

Р.З. Накохов¹, Е.А. Губарева¹, Е.В. Куведда¹, А.С. Сотниченко¹, И.С. Гуменюк¹, А.Х. Каде², Г.М. Могильная³, Д.П. Пузанов¹

¹ Лаборатория фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, Российская Федерация

² Кафедра общей и клинической патологической физиологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, Российская Федерация

³ Кафедра гистологии с эмбриологией ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар, Российская Федерация

Основной целью нашего исследования явились анализ и оптимизация существующих протоколов децеллюляризации пищевода на модели крысы, определение параметров, влияющих на качество децеллюляризации и на сохранность исходных свойств ВКМ пищевода. **Материалы и методы.** Децеллюляризацию пищевода крысы выполняли с использованием оригинального и модифицированного протоколов, детергент-энзиматическим методом с применением дезоксихолата натрия и ДНКазы. Качество децеллюляризации оценивали с помощью рутинных гистологических методов исследования. **Результаты.** Морфологические методы оценки полученного децеллюляризованного матрикса подтвердили отсутствие ядер и клеток при сохранности трехмерности, архитектоники каркаса и биомеханических свойств ВКМ. **Заключение.** Разработанный протокол децеллюляризации пищевода крысы является перспективной основой для получения тканеинженерных конструкций пищевода.

Ключевые слова: регенеративная медицина, пищевод, децеллюляризация, тканеинженерная конструкция, внеклеточный матрикс, каркас.

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF THE QUALITY OF DECELLULARIZED ESOPHAGUS IN RATS

R.Z. Nakokhov¹, E.A. Gubareva¹, E.V. Kuevda¹, A.S. Sotnichenko¹, I.S. Gumenyuk¹, A.Kh. Kade², G.M. Mogilnaya³, D.P. Puzanov¹

¹ Laboratory of fundamental research in the field of regenerative medicine, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

² Department of General and Clinical Pathophysiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

³ Department of Histology and Embryology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

The main aim of our investigation was analysis and optimization of the existing protocols of esophagus decellularization in rats, identification of parameters affecting the quality of decellularization and intactness of the native properties of esophageal extracellular matrix (ECM). **Materials and methods.** We developed a modified decellularization protocol based on detergent-enzymatic method using sodium deoxycholate and DNase. **Results.** Morphological evaluation of the obtained decellularized matrices demonstrated the absence of cells and

Для корреспонденции: Накохов Рамазан Заурбиевич. Адрес: 350063, Краснодар, ул. Седина, д. 4. Тел. (964) 916-97-63. E-mail: nrz000009@gmail.com.

For correspondence: Nakokhov Ramazan Zaurbievich. Address: 4, Sedin st., Krasnodar, 350063, Russian Federation. Tel. (964) 916-97-63. E-mail: nrz000009@gmail.com

cell elements while mechanical properties of ECM were preserved. **Conclusion.** The developed protocol of esophagus decellularization is a potential basis for obtaining of tissue-engineered esophagus scaffold constructions.

Key words: regenerative medicine, esophagus, decellularization, tissue-engineered construction, extracellular matrix, scaffold.

ВВЕДЕНИЕ

Перспективы применения биологических каркасов, полученных при децеллюляризации органов, опосредованы способами их получения и оценки, и как правило, специфичны для каждой ткани. Именно поэтому так важен подбор персонифицированного протокола децеллюляризации, при котором минимизируется структурное повреждение матрикса. Каркасы, биологические или искусственные, призваны воспроизводить структуру нативной ткани и должны обладать соответствующими физическими, химическими и биомеханическими свойствами для обеспечения прикрепления, пролиферации и направленной дифференцировки аутологичных клеток реципиента с целью формирования трехмерной тканеинженерной конструкции (ТИК). Однако после децеллюляризации биохимический состав, архитектура и биомеханические свойства внеклеточного матрикса (ВКМ) должны сохраняться [1]. К примеру, просвет биологического каркаса пищевода не должен зиять в состоянии покоя, но при этом сохранять эластичность для обеспечения прохождения пищевого комка [2]. После ортотопической имплантации рецеллюляризованный каркас должен выдерживать низкое значение pH желудочного сока и поддерживать перистальтические движения.

Протоколы децеллюляризации пищевода, представленные в литературе, обладают как преимуществами, так и недостатками. Исследования показали, что каркасы, полученные методом децеллюляризации с использованием мягкого детергента дезоксихолата натрия и фермента ДНКазы, являются перспективной основой для получения ТИК пищевода [2]. Предложенные протоколы воздействия химических агентов способствуют сохранению биомеханических свойств матрикса, однако продолжительность агрессивного химического воздействия при этом увеличивается [3–6], угрожая разрушением компонентов внеклеточного матрикса и развитием бактериальной контаминации. В то же время сокращение времени протокола путем повышения давления перфузируемого раствора неизбежно приводит к ухудшению механических свойств каркаса.

Целью настоящего исследования явилась разработка оптимального протокола децеллюляризации пищевода на модели крыс с учетом имеющихся на настоящий момент достижений тканевой инженерии в этой области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты на животных проводили после одобрения протоколов исследования локальным этическим комитетом (протокол № 21/1) в лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины на базе Кубанского государственного медицинского университета. В работе использовали 20 взрослых крыс-самцов линии Wistar весом 230 ± 35 г. Животные были разделены на 2 группы:

- 1) группа нативного контроля ($n = 10$), результаты которой использовались для дальнейшей стандартизации проводимых морфологических исследований;
- 2) опытная группа ($n = 10$), разделенная на две подгруппы в зависимости от протокола проведения децеллюляризации: исходный протокол ($n = 5$) и модифицированный ($n = 5$).

Эксплантация органов

Эвтаназию животных проводили интраперитонеальным введением летальной дозы барбитуратов (150 мг/кг). За 2 часа до операции вводили 100 ЕД гепарина, после чего выделяли органокомплекс единым блоком с последующей диссекцией пищевода. Отсечение пищевода производилось как можно ближе к глотке (проксимальная часть) и пищеводно-желудочному переходу (дистальная часть) для выделения участка пищевода наибольшей протяженности. Проксимальную и дистальную часть пищевода канюлировали для фиксации в биореакторе (Harvard Apparatus, Массачусетс, США).

Децеллюляризация пищевода

Оригинальный протокол децеллюляризации тонкого кишечника свиньи детергент-энзиматическим методом [3] был модифицирован авторами с изменением времени воздействия, состава и порядка перфузии децеллюляризирующими растворами для получения ацеллюлярного матрикса пищевода. После промывания раствором фосфатного буфера с добавлением 1% раствора пенициллина-стрептомицина следовал цикл перфузии деионизированной водой (1 ч), затем 4% дезоксихолатом натрия с добавлением 800 мкл ЭДТА (2 ч), фосфатным буфером (10 мин), фосфатным буфером с добавлением 2000 ЕД/мг свиной панкреатической ДНКазы-I (1 ч), после чего пищевод промывали раствором

фосфатного буфера с добавлением 1% раствора пенициллина-стрептомицина (17 ч). Все растворы были стерильными, комнатной температуры. Скорость подачи растворов составила 6 мл/мин.

Морфологический анализ

Образцы нативных и децеллюляризованных тканей пищевода для морфологического анализа фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, дегидратировали с последующим заключением в парафин при помощи гистопроцессора Leica TP1020 (Германия) по стандартной методике. Заливку в парафин выполняли на модульной установке EG1150H (Leica, Германия). Для общегистологической оценки препаратов при помощи ротационного микротома RM2235 (Leica, Германия) получали парафиновые срезы толщиной 5 мкм с последующей депарафинизацией, гидратацией, окрашиванием гематоксилином и эозином (Histolab, Швеция) и флуорофором (4',6-диамидино-2-фени-

линдола) DAPI (Sigma Aldrich, США). Качественную оценку компонентов внеклеточного матрикса проводили после окрашивания срезов микрофуксином по Ван Гизону (Первая лабораторная компания, Санкт-Петербург). Сохранность эластических свойств каркаса после децеллюляризации оценивали путем вычисления площади просвета пищевода до и после децеллюляризации на микрофотографиях поперечных срезов, полученных на микроскопе Olympus BX51 (Токуо, Япония). При анализе изображений использовали метод подсчета числа пикселей зоны просвета пищевода с последующим переводом в мм², согласно коэффициенту пропорциональности для данного микроскопа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Окраска гематоксилином и эозином препаратов нативного пищевода (рис. 1, а, б) показала, что слизистая оболочка органа представлена многослойным плоским неороговевающим эпителием,

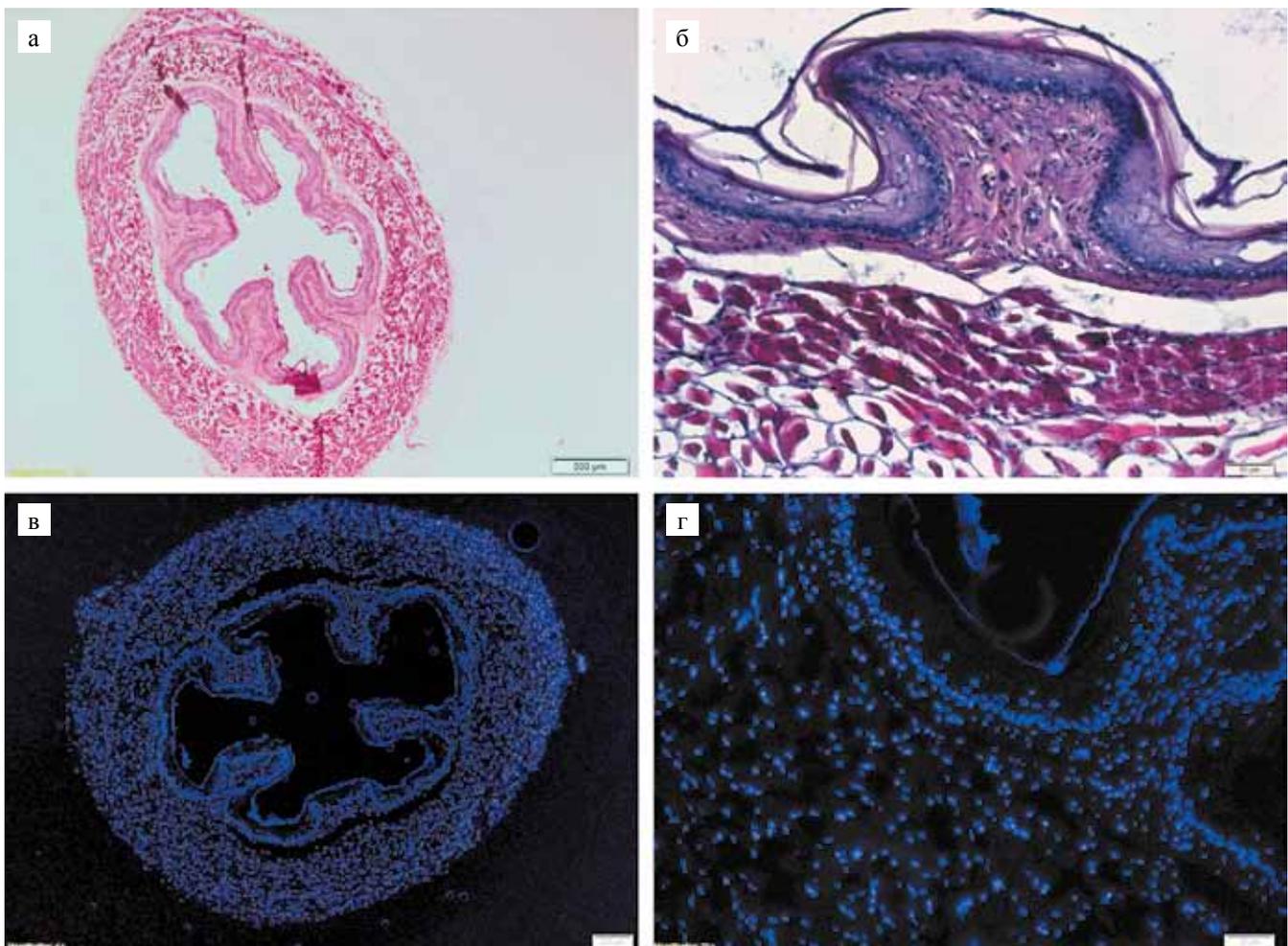


Рис. 1. Нативный пищевод. Окраска гематоксилином и эозином (а, б). При окрашивании DAPI (в, г), отмечается интенсивное свечение ядерных структур во всех слоях пищевода. Парафиновые срезы; а, в – $\times 4$; б, г – $\times 20$

Fig. 1. Native esophagus. Hematoxylin-eosin staining (a, б). After DAPI staining (в, г) there is an intense luminescence of nuclear structures in all layers of esophagus. Paraffin sections; а, в – $\times 4$; б, г – $\times 20$

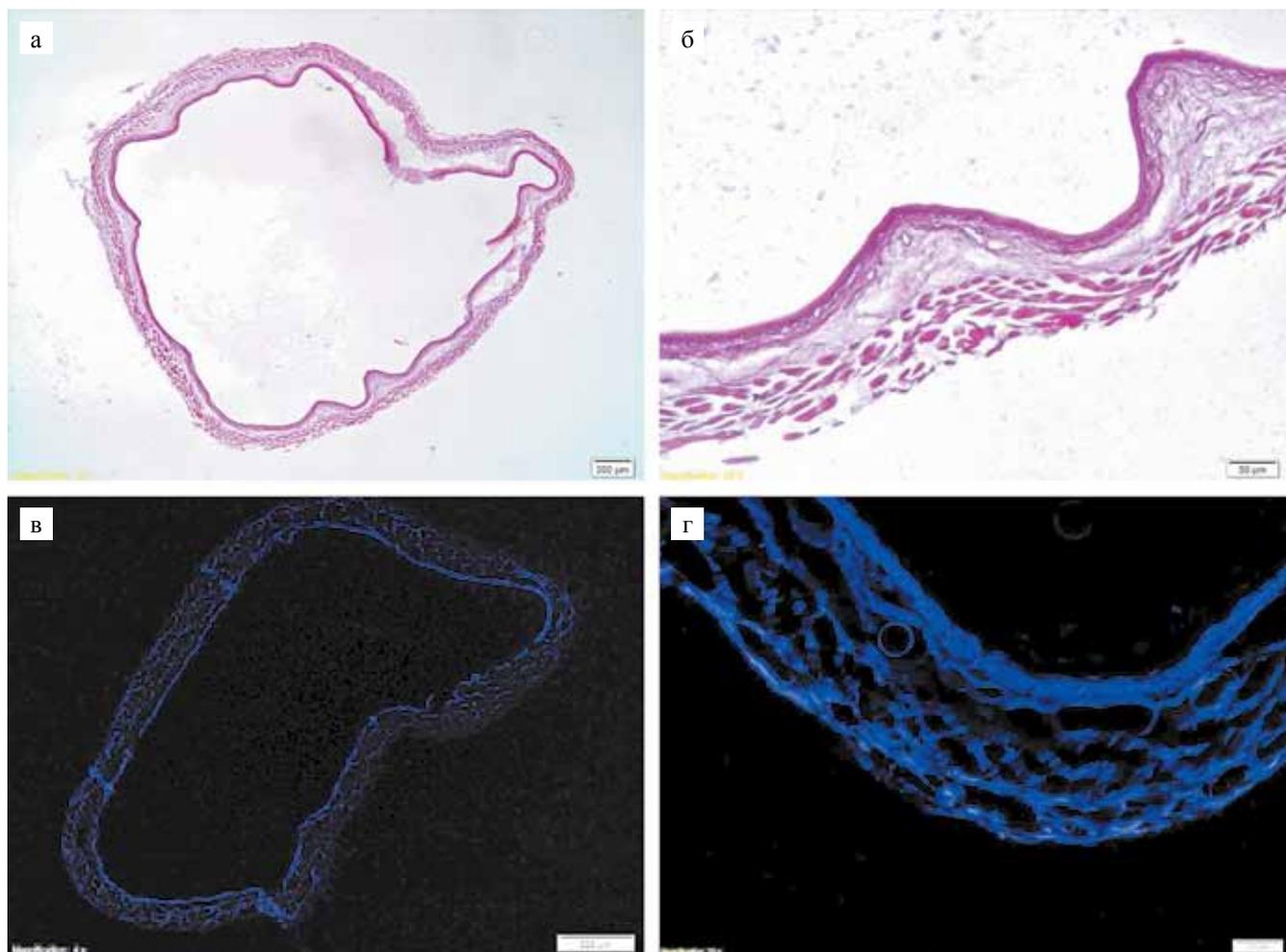


Рис. 2. Децеллюляризованный пищевод. Окраска гематоксилином и эозином (а, б). Окраска DAPI (в, г), свечение ядер отсутствует; аутофлуоресценция компонентов внеклеточного матрикса. Парафиновые срезы; а, в – $\times 4$; б, г – $\times 20$

Fig. 2. Decellularized esophagus. Hematoxylin and eosin staining (а, б). After DAPI staining (в, г), there is no nuclei luminescence; autofluorescence of extracellular matrix components. Paraffin sections; а, в – $\times 4$; б, г – $\times 20$

подслизистая основа – рыхлой волокнистой соединительной тканью, мышечная оболочка представлена двумя слоями мышечной ткани (внутренний циркулярный и наружный продольный). Окрашивание гематоксилином и эозином децеллюляризованной по оригинальной и модифицированной методике ткани пищевода не выявило наличия ядер и клеток (рис. 2, а, б; данные представлены для модифицированного протокола). При окрашивании флуорофором DAPI в парафиновых срезах нативных органов отмечалось интенсивное свечение ядерных структур, в децеллюляризованных – свечение ядер отсутствовало (рис. 1, в, г; рис. 2, в, г).

Окраска пикрофуксином по Ван Гизону, тропная к соединительно-тканым волокнам, в нативной ткани позволила подробнее визуализировать волокна внеклеточного матрикса, их архитектонику и локализацию. Окрашенные соединительно-тканые волокна преимущественно локализовались в

области базальной мембраны эпителия, в подслизистом, а также в мышечном слоях (рис. 3, а). В децеллюляризованной по оригинальной и модифицированной методике ткани внеклеточный матрикс, состоящий преимущественно из коллагена, оставался неизменным. Упорядоченная структура и преимущественно параллельное расположение коллагеновых волокон в матриксе были сохранены. Визуализировались неизменные базальные мембраны сосудов. Набухания либо иных патологических изменений структуры, нарушений ориентации волокон, изменения тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было (рис. 3, б).

В контрольной группе площадь просвета пищевода составила $1,019 \pm 0,043 \text{ мм}^2$. Перфузия растворов через просвет пищевода приводила к растяжению и снижению эластичности органа, и соответственно, к увеличению площади просвета биологического каркаса. Площадь просвета при

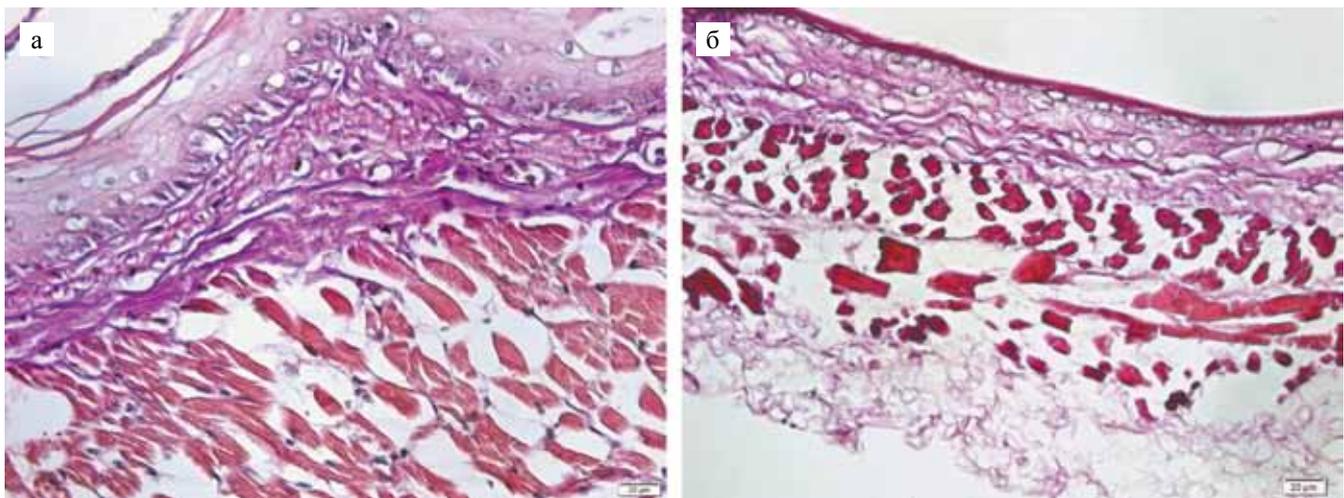


Рис. 3. Окраска по Ван Гизону: а – нативный пищевод; б – децеллюляризованный пищевод. Клетки и ядра отсутствуют. Упорядоченная структура и преимущественно параллельное расположение волокон внеклеточного матрикса сохранены. Парафиновые срезы. $\times 40$

Fig. 3. Van Gieson staining: а – native esophagus; б – decellularized esophagus. There are no cells and nuclei. The ordered structure and predominantly parallel arrangement of the fibers of extracellular matrix are preserved. Paraffin sections. $\times 40$

использовании оригинального протокола составила $5,716 \pm 0,256 \text{ мм}^2$, модифицированного – $2,401 \pm 0,037 \text{ мм}^2$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Децеллюляризация – это процесс, направленный на удаление клеток из ткани с сохранением ВКМ и трехмерной структуры органа, с использованием различных методов воздействия на клетки. Подробное рассмотрение данной проблемы показало, что внеклеточные матрицы обладают всеми характеристиками, необходимыми для создания естественного каркаса тканеинженерного органа или ткани [1].

Многочисленные попытки создания биоинженерного трансплантата для замены ткани пищевода не привели к решению всех проблем тканевой инженерии данного полого органа. Снижение иммуногенных свойств аллотрансплантата сопровождалось возникновением новых проблем, связанных непосредственно с процессом децеллюляризации. Успех ортотопической трансплантации тканеинженерного пищевода напрямую зависит от иммуногенных свойств каркаса, но одной из первостепенных задач тканевой инженерии также является минимизация нежелательных эффектов процесса децеллюляризации органа. Стремление к полному удалению клеточного материала в каркасе с использованием жестких параметров децеллюляризации приводит к значительному повреждению архитектоники и состава ВКМ. Биомеханическая прочность является чрезвычайно важным параметром, поскольку

пищевод постоянно подвергается растяжению и должен быть эластичным. Следовательно, тканеинженерный пищевод должен иметь характеристики, аналогичные нативному органу. Подбор наиболее щадящих параметров децеллюляризации способствует сохранению состава ВКМ, что благоприятно влияет на биомеханические свойства каркаса.

Результатом модификации протокола стало сокращение времени воздействия детергента и менее выраженное растяжение пищевода после децеллюляризации. Сохранение физических свойств каркаса, в частности эластичности, является одной из ключевых задач тканевой инженерии пищевода, так как имплантат должен спадаться в состоянии покоя и при этом быть эластичным для обеспечения прохождения пищевого комка [2]. Необходимо отметить, что при использовании авторского протокола децеллюляризации общая продолжительность процедуры составила 21 ч 10 мин, в том числе время агрессивного воздействия детергента – 2 ч. Именно продолжительность активного воздействия децеллюляризирующих агентов является решающим фактором для сохранения структуры ВКМ. Максимальное сохранение гистологической структуры ВКМ пищевода и обеспечение щадящего режима обработки биологического материала являются ключевыми моментами при создании тканеинженерного пищевода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование позволило разработать протокол с возможностью решения одной из важ-

ных проблем тканевой инженерии пищевода – сохранение свойств ВКМ после завершения децеллюляризации.

Работа проводилась при поддержке комплексной НИР «Клеточные механизмы регенерации интраоракальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Губарева ЕА, Сотниченко АС, Гилевич ИВ, Маккиарини П. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012; 7 (4): 38–45. Gubareva EA, Sotnichenko AC, Gilevich IV, Macchiarini P. Optimal decellularization of rat hearts and diaphragms and morphological evaluation. *Cellular Transplantation & Tissue Engineering*. 2012; 7 (4): 38–45. [In Russ, English abstract].
2. 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.
3. Syed O, Walters NJ, Day RM, Kim HW, Knowles JC. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomater*. 2014; 10 (12): 5043–5054. doi: 10.1016/j.actbio.2014.08.024.
4. Totonelli G, Maghsoudlou P, Fishman JM, Orlando G, Ansari T, Sibbons P et al. Esophageal tissue engineering: a new approach for esophageal replacement. *World J. Gastroenterol*. 2012; 21; 18 (47): 6900–6907. doi: 10.3748/wjg.v18.i47.6900.
5. Турсуналиев СТ, Наханов АК, Кыдырбаев ЖК, Гоцкина НМ, Ногойбаева РС. Получение бесклеточного матрикса пищевода овец для тканевой инженерии. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2015; 2: 500–503. Tursunaliyev ST, Nakhanov AK, Kydyrbayev ZhK, Gotskina NM, Nogoybayeva RS. Polucheniye beskлетochnogo matriksa pi-shchevoda ovets dlya tkanevoy inzhenerii. *Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo meditsinskogo universiteta*. 2015; 2: 500–503.
6. Totonelli G, Maghsoudlou P, Georgiades F, Garriboli M, Koshy K, Turmaine M et al. Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration. *Pediatr. Surg. Int*. 2013; 29 (1): 87–95. doi: 10.1007/s00383-012-3194-3.

*Статья поступила в редакцию 20.01.2017 г.
The article was submitted to the journal on 20.01.2017*