

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-3-65-69

К ВОПРОСУ О МОРФОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЯХ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ

*А.С. Сотниченко, Е.А. Губарева, Е.В. Кувда, И.С. Гуменюк, И.В. Гилевич,
Р.З. Накохов, А.А. Славинский, С.Н. Алексеенко*

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Краснодар, Российская Федерация

Активное развитие тканевой инженерии способствует повышению интереса к получению различных децеллюляризованных органов и тканей. Ранее были определены минимальные оценочные критерии качества получаемых тканеинженерных конструкций. В дискуссионной статье авторский коллектив на примере децеллюляризации сердца рассматривает примененные различными исследователями морфологические методики исследования матриц. Анализ современной литературы и собственные исследования показали, что морфологическая оценка качества децеллюляризации должна быть комплексной и состоять из нескольких этапов, которые включают в себя как базовые, так и дополнительные методики оценки.

Ключевые слова: регенеративная медицина, тканевая инженерия, децеллюляризация, сердце.

MODERN OUTLOOK ON MORPHOLOGICAL CRITERIA OF ORGAN AND TISSUE DECELLULARIZATION

*A.S. Sotnichenko, E.A. Gubareva, E.V. Kuevda, I.S. Gumenyuk, I.V. Gilevich,
R.Z. Nakokhov, A.A. Slavinskiy, S.N. Alekseenko*

FSBEI HE «Kuban State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Krasnodar, Russian Federation

A rapidly growing development of tissue engineering promotes the increasing interest in the obtainment of various decellularized tissues and organs. Minimal quality evaluation criteria of obtained tissue engineered constructions have been previously specified. In the discussion paper the group of authors considers the morphological methods of matrix evaluation applied by various researchers on the model of heart decellularization. The analysis of modern literature and the authors' own researches have shown that morphological evaluation of decellularization quality has to be complex and should consist of several stages which include both basic and additional evaluation methods.

Key words: regenerative medicine, tissue engineering, decellularization, heart.

Сердечно-сосудистые заболевания – основная причина инвалидности и преждевременной смерти жителей экономически развитых стран. Рост заболеваемости, поражение людей все более молодого возраста делают эти болезни важнейшей медико-социальной проблемой здравоохранения [1, 2].

Трансплантация сердца – хирургический способ лечения терминальной стадии хронической сердечной недостаточности [3]. Ежегодно в мире проводится более 2500 операций по пересадке сердца. Организация донорства органов, сложность пра-

вового регулирования, острая нехватка донорских органов, сложность их доставки, необходимость консервации донорского сердца, трудность поиска иммунологически совместимых органов, выбор реципиентов для трансплантации, пожизненное назначение иммуносупрессивной терапии продолжают оставаться наиболее актуальными вопросами трансплантологии [4].

В связи с этим необходимо искать альтернативные источники донорских тканей и органов. Одним из перспективных методов решения данной проб-

Для корреспонденции: Сотниченко Александр Сергеевич. Адрес: 350063, Краснодар, ул. Седина, д. 4.
Тел. (962) 85-18-237. E-mail: alex24.88@mail.ru.

For correspondence: Sotnichenko Alexander Sergeevich. Address: 4, Sedin st., Krasnodar, 350063, Russian Federation.
Tel. (962) 85-18-237. E-mail: alex24.88@mail.ru

лемы является тканевая инженерия [5]. На фоне последних достижений в области биоматериаловедения и клеточных технологий это направление активно развивается. Однако в данной области существует много нерешенных проблем, связанных с выбором материала каркаса, получением различных клеточных линий, рецеллюляризацией матриц, васкуляризацией полученных тканеинженерных конструкций, и многие другие.

В последнее время кроме исследований по созданию синтетических каркасов уделяется много внимания развитию технологии децеллюляризации тканей и целых органов. Принято считать, что очищенная от клеток ткань теряет иммуногенность и ее можно использовать для алло- и даже ксеногенной трансплантации. При этом ацеллюлярные ткани имеют структуру экстрацеллюлярного матрикса, схожую с нативной, и прежде всего сохраняются коллагеновые волокна, в меньшей степени аморфное межклеточное вещество и даже сигнальные молекулы.

Практическая цель децеллюляризации – максимально полное удаление клеток из тканей с минимальным повреждением внеклеточного матрикса [6]. Тканеинженерные органы, предварительно подвергшиеся децеллюляризации, не должны содержать клеток донора, включая такие клеточные компоненты, как цитоплазма и ядра. Их присутствие во внеклеточном матриксе может способствовать нарушению клеточной биосовместимости *in vitro* и вызывать побочные реакции в условиях *in vivo* при последующей рецеллюляризации.

Все существующие на сегодняшний день протоколы химической децеллюляризации заключаются в длительной инкубации в растворах детергентов и ферментов и отличаются друг от друга лишь составом и временем инкубации. Вместе с тем давно возникла проблема оценки качества ацеллюлярных матриц. В настоящее время не определен полный необходимый перечень морфологических методов исследования ацеллюлярных матриц. Поскольку при использовании различных методов децеллюляризации невозможно удалить 100% клеток, исследователи используют большое количество различных методов оценки содержания оставшихся компонентов клеток, таких как ДНК, митохондрии или мембран-ассоциированных молекул. Пороговая концентрация остаточного клеточного материала во внеклеточном матриксе, которая может быть достаточной для развития нежелательного эффекта, не была подробно изучена и может изменяться в зависимости от источника внеклеточного матрикса, типа ткани, в которую он был имплантирован, и иммунной системы реципиента.

Основываясь на результатах исследований, в которых изучалось развитие ремоделирующего эф-

фекта и возникновение побочных явлений на клеточном и организменном уровнях, были предложены следующие критерии для оценки эффективности децеллюляризации [7]: 1) <50 нг двухцепочечной ДНК в 1 мг сухого веса внеклеточного матрикса; 2) фрагменты ДНК длиной <200 пар нуклеотидов; 3) отсутствие видимого ядерного материала в срезах ткани, окрашенных 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) или гематоксилином и эозином.

Изучение резидуального количества ядер клеток заслуживает пристального внимания, так как от наличия ДНК зависит развитие неблагоприятных реакций со стороны организма-реципиента, поскольку многие децеллюляризованные ткани получают из ксеногенных источников и есть опасения, что эта ДНК может быть включена в клетки реципиента. Содержание в ткани нуклеиновых кислот легко оценить. Полученные данные в этом случае дают основания к формированию представлений об остаточном количестве клеток обработанной ткани.

Более поздние работы поставили эти критерии под сомнение, так как менее эффективно децеллюляризованные ткани показывали аналогичные результаты после имплантации при сравнении с эффективно децеллюляризованными тканями [8]. Хотя эти критерии дают много полезной информации, можно утверждать, что они определяют денуклеаризацию тканей, а не децеллюляризацию. Эти критерии используют ДНК в качестве ориентира концентрации других внутриклеточных или мембранных молекул, предполагая, что они удалены с той же эффективностью. Тем не менее внутриклеточные и мембранные компоненты являются антигенами, которые, как было показано, обладают возможностью инициировать иммунное отторжение при трансплантации, и требуется их определение в ацеллюлярных тканях. Кроме того, процесс децеллюляризации в зависимости от агрессивности сред и времени инкубации может существенно менять структуру экстрацеллюлярного матрикса и его биомеханические свойства, что тоже необходимо учитывать.

Указанные критерии являются базовыми и должны быть обязательно дополнены и расширены для более полной и подробной морфологической характеристики получаемых ацеллюлярных матриц.

Исходя из распространенности сердечно-сосудистых заболеваний в мире, идет активная разработка подходов и методов по созданию тканеинженерного сердца. Существует несколько патентованных методик получения децеллюляризованного сердечного матрикса, базирующихся на различных детергентах и энзимах, позволяющих получать ацеллюлярные каркасы. Однако исследователи помимо базовых методик оценки качества получаемого матрикса используют разный набор дополнительных

методов исследования. Авторский коллектив работает над созданием тканеинженерных конструкций интраоракальных органов и тканей, таких как сердце, легкие, диафрагма, пищевод. На наш взгляд, значимой представляется разработка алгоритма более детальной характеристики ацеллюлярной ткани или органа и морфологических критериев оценки качества для использования в тканевой инженерии.

Так, Н.С. Ott и соавт. опубликовали перфузионный метод децеллюляризации сердца крысы с применением додецил сульфата натрия и тритона X-100 с общим временем процедуры около 135 часов. Для подтверждения качества децеллюляризации использовали методики рутинной гистологической оценки (окрашивание гематоксилином и эозином, флуорохромирование DAPI), количественный анализ содержания ДНК и сканирующую электронную микроскопию для оценки ультраструктур матрикса. Авторы производили качественную оценку содержания внутриклеточных молекул, обладающих антигенной активностью (гладкомышечный актин). Результаты иммуногистохимического внеклеточного матрикса ацеллюлярного сердца показали сохраненность коллагенов I и III типов, ламинина и фибронектина. Механическое тестирование образцов ацеллюлярных и нативных тканей показало высокий уровень анизотропии результатов, возрастание жесткости матрикса в процессе децеллюляризации. Оценка проходимости сосудов для растворов проводили перфузией красной смолы Мегсох [9].

J.M. Wainwright и соавт. впервые опубликовали методику децеллюляризации сердца свиньи путем ретроградной перфузии аорты детергентными растворами (р-р 0,02% трипсина/0,05%ЭДТА/0,05% NaN_3 ; 3% р-р Тритона X-100/0,05%ЭДТА/0,05% NaN_3 ; 4% р-р дезоксихолата натрия) с общей продолжительностью процедуры около 9 часов. Морфологический анализ полученных образцов включал в себя окрашивание гематоксилином и эозином, флуорохромирование DAPI для оценки сохранности клеток и клеточных ядер. Для анализа распределения клеточных ядер, эластических и коллагеновых волокон, а также гликозаминогликанов авторы использовали окрашивание пентахром по Мовату. Дифференциальное окрашивание коллагенов I и III типов проводилось по методике окрашивания Неговici. Иммуногистохимический анализ был применен только для определения содержания коллагена IV типа в нативных и децеллюляризованных тканях. Специфичных реакций с антителами к другим вне- и внутриклеточным компонентам тканей не проводили. Количественный анализ содержания ДНК проводили колориметрическим методом (PicoGreenassay). Для оценки сохранности ультраструктур ацеллюлярного матрикса сердца свиньи и отсутствия сохранных клеток проводили сканиру-

ющую электронную микроскопию. Дополнительно проведенное механическое тестирование образцов не показало существенных различий в прочностных характеристиках между нативным и ацеллюлярным образцами [10].

Опубликованные ранее авторским коллективом работы по децеллюляризации сердца крысы базировались на указанных выше исследованиях [11]. При работе с сердечной мышечной тканью мы столкнулись с проблемой выбора оптимальных протоколов децеллюляризации для минимизации структурных повреждений внеклеточного матрикса и эффективного удаления клеточного дебриса, что должно приводить к снижению антигенности каркаса. Использование высоких концентраций детергентов приводило к чрезмерному разрушению ткани каркаса, а также к невозможности адекватной отмывки от него матрикса, что делало его токсичным для стволовых клеток и не пригодным для создания тканеинженерного сердца в итоге. В то же время использование низких концентраций детергентов не позволяло адекватно децеллюляризовать сердечную мышечную ткань. Для получения ацеллюлярного сердечного матрикса использовали модифицированный детергент-энзиматический протокол с использованием 4% раствора дезоксихолата натрия и ДНКазы общей продолжительностью 28 часов [12].

В качестве базовых методик определения качества полученного каркаса также использовали окрашивание гематоксилином и эозином, флуорохромирование DAPI, количественный анализ содержания ДНК и сканирующую электронную микроскопию согласно установленным ранее базовым критериям оценки [7]. Оценка состояния внеклеточного матрикса нативного сердца крысы на ультраструктурном уровне, а также его сохранность после проведения децеллюляризации проводилась при помощи сканирующей электронной микроскопии, позволившей визуализировать на увеличении в 5000 раз мышечные клетки, на увеличении в 15 000 раз – тончайшие волокна внеклеточного матрикса сердца, их ход, структуру и диаметр.

На дальнейшем этапе возникла целесообразность проводить расширенный иммуногистохимический анализ с определением как внутриклеточных (тропомиозин), так и мембранных (МНС I и II типа, десмин, фактор Виллебранда) молекул, обладающих антигенной активностью. Указанные маркеры в децеллюляризованном сердце полностью отсутствовали. Далее мы проводили как качественный, так и количественный иммуногистохимический анализ структурных белков сердечного матрикса и факторов роста, не обладающих видовой специфичностью и антигенной активностью, таких как коллаген I типа (коэффициент соотношения со-

держания белка в ацеллюлярной и нативной ткани – 0,75), коллаген IV типа (0,71), ламинин (0,74), эластин (0,71), фибронектин (0,23), VEGF (0,38).

Проведение ретроградной перфузии через аорту 0,4% раствора трипанового синего показало проходимость коронарных артерий в децеллюляризованном сердце и позволило визуализировать сосуды вплоть до артерий третьего-четвертого порядков. По результатам дополнительного механического тестирования образцов установлено, что децеллюляризованное сердце имеет основные механические характеристики выше, чем нативное, в 1,8–1,9 раза [11]. Такое различие связано с тем, что децеллюляризованный матрикс представляет собой набор высокопрочных коллагеновых волокон, в то время как в исходных образцах значительный объем занимают «слабые» клеточные агрегаты. Процесс децеллюляризации «освобождает» волокна коллагена от них, что приводит к частичному коллапсу (стенка сердечной мышцы сокращается примерно на 30% по толщине), и как следствие, увеличению плотности, что и приводит, в конечном счете, к повышению уровня механических характеристик. Механическое тестирование децеллюляризованного правого желудочка сердца крысы, проведенное Witzenburg и соавт. (2012), также показало, что децеллюляризованные ткани имели значительно более высокую жесткость, чем нативные, что, по мнению авторов, свидетельствовало о низком вкладе мышечных клеток в жесткость каркаса, при этом секущий модуль упругости тканеинженерных образцов и контроля отличался значительно [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ современной литературы и собственные исследования показали, что морфологическая оценка качества децеллюляризации на примере сердечной ткани должна состоять из нескольких этапов исследований, которые включают в себя как базовые методики оценки, такие как:

- окрашивание гематоксилином и DAPI для оценки сохранности клеток и клеточных ядер;
 - определение уровня остаточного ДНК – ориентирами служат уровень 30% от исходного либо количественный показатель менее 50 нг/мг ткани;
 - сканирующую электронную микроскопию;
- так и дополнительные методы исследования:
- иммуногистохимический анализ децеллюляризованных тканей с обязательным определением внутриклеточных (актин, тропомиозин – для мышечных тканей) и мембранных (МНС I типа, десмин, фактор Виллебранда) молекул-антигенов;
 - количественную и качественную оценку сохранности белков внеклеточного матрикса (коллаген

нов I, III и IV типов, ламинина, эластина, фибронектина);

- определение механических свойств децеллюляризованного матрикса.

Проведение всех этапов анализа децеллюляризованных матриксов является обязательным и должно выполняться наиболее полным образом.

Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (от 28.01.2015 г. ч. 1, раздел 1) «Разработка экспериментальных образцов тканеинженерных конструкций на основе децеллюляризованных матриксов для применения в регенеративной медицине» и комплексной НИР «Клеточные механизмы регенерации интраорганальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Зайратьянц ОВ, Кактурский ЛВ. Медико-демографические показатели России за столетие (1907–2007 гг.). *Здравоохранение*. 2009; 12: 27–44. Zajrat'janc OV, Kakturskij LV. Mediko-demograficheskie pokazateli Rossii za stoletie (1907–2007 gg.). *Zdravooohranenie*. 2009; 12: 27–44. [In Russ]
2. Howard PA. Treating Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: A Challenge for Clinicians. *Hospital pharmacy*. 2015; 50 (6): 454. doi: 10.1310/hpj5006-454.
3. Gass AL et al. Cardiac transplantation in the new era. *Cardiology in review*. 2015; 23 (4): 182–188. doi: 10.1097/CRD.0000000000000066.
4. Бокерия ЛА, Колоскова НН. Критерии отбора больных для формирования листа ожидания на трансплантацию сердца (обзор литературы). *Новости науки и техники. Серия: Медицина. Сердечно-сосудистая хирургия*. 2012; (1): 31–41. Bokerija LA, Koloskova NN. Kriterii otbora bol'nyh dlja formirovanija lista ozhidaniya na transplantaciju serdca (obzor literatury). *Novosti nauki i tehniki. Serija: Medicina. Serdechnososudistaja hirurgija*. 2012; (1): 31–41. [In Russ]
5. Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends. *Expert opinion on biological therapy*. 2005; 5 (7): 879–892. doi: 10.1517/14712598.5.7.879.
6. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*. 2007; 28 (25): 3587–3593. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.043.
7. 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.
8. Keane TJ et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 2012; 33 (3): 1171–1781. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.054.

9. Ott HC et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*. 2008; 14 (2): 213–221. doi: 10.1038/nm1684.
10. Wainwright JM et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2009; 16 (3): 525–532. doi: 10.1089=ten.tec.2009.0392.
11. Сотниченко АС, Губарева ЕА, Гилевич ИВ, Кувда ЕВ, Крашенинников СВ, Григорьев ТЕ, Чвалун СН, Маккиарини П. Децеллюляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013; 8 (3): 86–94. Sotnichenko AS, Gubareva EA, Gilevich IV, Kuevda EV, Krashe-ninnikov SV, Grigoriev TE, Chvalun SN, Macchiarini P. Decellularized rat heart matrix as a basis for creation of tissue engineered heart. *Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija*. 2013; 8 (3): 86–94. [In Russ, English abstract]
12. Патент РФ на изобретение № 2550286/ 03.06.14. Маккиарини П, Губарева ЕА, Сотниченко АС, Гилевич ИВ, Юнгеблут Ф. Способ моделирования биоинженерного каркаса сердца в эксперименте на крысе. Patent RF № 2550286/ 03.06.14. Macchiarini P, Gubareva EA, Sotnichenko AS, Gilevich IV, Jungebluth P. Sposob modelirovaniya bioinzhenernogo karkasa serdca v jeksperimente na kryse // Patent Rossii № 2550286. 03.06.2014. [In Russ]
13. Witzenburg C et al. Mechanical changes in the rat right ventricle with decellularization. *Journal of biomechanics*. 2012; 45 (5): 842–849. doi: 10.1016/j.jbiomech.2011.11.025.

Статья поступила в редакцию 19.04.2017 г.

The article was submitted to the journal on 19.04.2017

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

Подписной индекс нашего издания в каталоге «Газеты и журналы» – **80248**



Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	80248 (индекс издания)																								
		количество комплектов																								
на 2017 год по месяцам																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td> </tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
Куда _____ (почтовый индекс) _____ (адрес) _____																										
Кому _____ (фамилия, инициалы) _____																										

Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	80248 (индекс издания)																								
		количество комплектов																								
на 2017 год по месяцам																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td> </tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
Куда _____ (почтовый индекс) _____ (адрес) _____																										
Кому _____ (фамилия, инициалы) _____																										