

А.В. Черных¹, Ю.В. Малеев^{1,2}, А.Н. Шевцов^{1,2}, А.Ю. Пульвер², Б.Е. Лейбович³

ПРИМЕНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНЫХ МАТРИКСОВ

A.V. Chernykh, Yu.V. Maleev, A.N. Shevtsov, A.Yu. Pulver, B.Ye. Leybovich

APPLICATION OF EXTRACELLULAR CRYOPROTECTANTS FOR OBTAINING ORGAN MATRIX

¹ ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», г. Воронеж

² ООО «Институт биологии старения», г. Воронеж

³ НУЗ «Дорожная областная клиническая больница на станции «Воронеж-1»», г. Воронеж

Цель исследования – оценить влияние внеклеточных криопротекторов на микроструктуру и состав внеклеточного матрикса (ВКМ) при перфузионной децеллюляризации целых органов. Эксперимент выполнен на 34 крысах-самцах. Установлено, что перед выполнением перфузионной децеллюляризации целесообразно подвергать орган циклу замораживания-оттаивания с предварительной перфузией 5%-м раствором трегалозы. Это способствует значительной презервации структур ВКМ при сохранении удовлетворительного качества децеллюляризации. Предложенная методика по ряду оцениваемых параметров является более эффективной, чем известные аналоги.

Ключевые слова: тканевая инженерия, печень, внеклеточный матрикс, децеллюляризация, замораживание, криопротекторы.

Purpose: to Assess the impact of extracellular cryoprotectants on the microstructure and composition of the extracellular matrix (ECM) in the perfusion decellularization of whole organs. The experiment was performed on 34 male rats. Prior to performing the perfusion decellularization is advisable expose the sample freeze-thaw cycles with pre-perfusion solution 5% trehalose. It promotes preserve the structure of the matrix at a satisfactory decellularization. The proposed method on a number of estimated is more efficient than conventional analogs.

Key words: tissue engineering, liver, extracellular matrix, decellularization, freezing, cryoprotective agents.

УДК 57.054:57.043:57.085.23
doi 10.17223/1814147/56/10

ВВЕДЕНИЕ

Дефицит донорских органов остается основной проблемой в клинической трансплантологии. Кроме того, не до конца решен вопрос иммуносовместимости органов донора с организмом реципиента. Одним из перспективных направлений решения указанных проблем является выращивание иммуносовместимых донорских органов посредством культивирования собственных стволовых клеток реципиента на каркасе внеклеточного матрикса (ВКМ) донорских органов [1, 2].

В тканевой инженерии ВКМ являются не только формообразующим фактором, но и контролируют функции клеток, стимулируют образование новых тканей [3]. При этом трехмерные каркасы должны быть биосовместимыми, биodeградируемыми, а также способными регулировать клеточную пролиферацию, морфогенез и дифференцировку клеток [4, 5].

Главным недостатком существующих методов получения ВКМ являются неблагоприятные

воздействия на состав, биологическую активность и биомеханические свойства ВКМ. Дальнейшие перспективы развития данного направления нам видятся в разработке методик децеллюляризации целых органов, оказывающих минимальное воздействие на химический состав и объемную структуру ВКМ, а также минимизации побочных эффектов, вызванных замораживанием органокомплексов [6–8].

Цель исследования: оценить влияние внеклеточных криопротекторов на микроструктуру и состав внеклеточного матрикса при перфузионной децеллюляризации целых органов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 34 крысах-самцах линии Long-Evans, средней массой тела (300 ± 50) г. Все животные были разделены на три группы по 10 крыс в каждой. Четыре крысы оставлены в группе контроля.

Под общей анестезией в стерильных условиях выполняли канюлирование нижней поллой и

воротной вен. Для предотвращения свертывания крови в сосудистую систему печени под постоянным давлением со скоростью 2 мл/мин нагнетался раствор гепарина (0,2 ЕД). Это значительно облегчало ход последующей децеллюляризации, обеспечивая ее равномерность.

Печень отделяли от фиксирующего ее связочного аппарата и выделяли вместе с иссеченным сухожильным центром диафрагмы. Перфузию печени выполняли с помощью специально разработанной системы, включающей роторный насос, обеспечивающий циркуляцию по замкнутой системе трубок. Печень помещали непосредственно в емкость с децеллюляризирующим раствором, который по заборной трубке с помощью роликового насоса через воздушную ловушку поступал в канюлю, введенную в воротную вену. Проходя сквозь сосудистое русло печени, перфузат естественным путем изливался обратно в емкость через просветы нижней полой вены и общей печенной артерии.

Стандартная схема перфузионной децеллюляризации включала в себя 24-часовую перфузию 1%-м раствором лаурилсульфата натрия (SDS, додецилсульфат натрия), приготовленным на основе фосфатного буфера с добавлением 0,02% ЭДТА, с частичной заменой раствора спустя 1, 8 и 16 ч. После окончания перфузии для очищения сосудистого русла органа от децеллюляризирующих агентов, литических ферментов и тканевого детрита, органокомплекс в течение 15 мин подвергался перфузии физиологическим раствором. В качестве контроля выполнена децеллюляризация двух органокомплексов по предложенной схеме без предварительного цикла замораживания-оттаивания органокомплекса, а также проведено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование двух свежеизъятых печеней, не подвергавшихся обработке.

В первой серии экспериментов органокомплексы после изъятия из раны подвергались 30-минутной перфузии фосфатным буфером для поддержания нормального кислотно-щелочного баланса. Затем органокомплексы замораживались при температуре -20°C . Спустя 24 ч после замораживания, органокомплекс подвергался размораживанию при температуре 37°C на водяной бане. Во второй серии экспериментов перед замораживанием органокомплексы перфузировались в течение 30 мин 10%-м раствором глицерина (проникающего криопротектора) в фосфатном буфере.

Третья серия экспериментов отличалась тем, что перед заморозкой органокомплексы перфузировались в течение 30 мин 5%-м раствором трегалозы (непроникающего криопротектора) в фосфатном буфере.

Во всех сериях экспериментов после размораживания выполнялась децеллюляризация по вышеописанной схеме.

Субъективно результаты перфузии оценивались по специально разработанному протоколу, включающему следующие параметры: окраска органа, прозрачность ткани, степень видимости сосудистого русла, сохранность объемной структуры органа. Для объективной оценки полученных результатов выполнялось гистологическое исследование препаратов, предварительно окрашенных гематоксилином, эозином и по Ван-Гизону. Это позволяло оценить степень децеллюляризации и сохранность структуры элементов ВКМ. При этом учитывались наличие клеток в срезе, сохранность структуры сети матрикса, наличие его разрывов, внутритканевого отека. Для определения степени презервации функционально важных гликопротеидов ВКМ (фибронектин, эластин, ламинин) на заключительном этапе работы было выполнено ИГХ исследование.

При выполнении исследований и оформлении результатов работы были учтены «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденные Приказом Минвуза СССР № 742 от 13.11.1984 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При выполнении гистологического исследования препаратов крыс контрольной группы установлено, что на фоне межклеточного отека отмечались локусы удовлетворительно децеллюляризированной ткани, расположенной преимущественно у ворот печени, а также участки с клеточным детритом и отдельные островки с сохранившимися гепатоцитами. Для контроля ИГХ исследования взяты две свежеизъятые печени. Отмечены хорошая экспрессия элементов матрикса, целостность сети, отсутствие разрывов.

В первой серии экспериментов перед децеллюляризацией органокомплексы подвергались циклу замораживания-оттаивания без предварительной перфузии криопротекторами. При визуальном осмотре обнаружено, что объем печени снижен, объемная структура нарушена; на поверхности долей при микроскопии выявлены повреждения (разрывы капсулы и паренхимы). Ткань печени в области ворот прозрачная, белая, в толще видны сосуды, однако дистальнее разрывов ткань печени светло-коричневая, непрозрачная, сосуды не видны, что свидетельствует о низком качестве децеллюляризации (рис. 1).

Это подтверждено и результатами гистологического исследования. При микроскопии выявлены внеклеточный отек, наличие большого количества клеточного детрита и островки с гепатоцитами (рис. 2).



Рис. 1. Серия экспериментов № 1. Общий вид печени

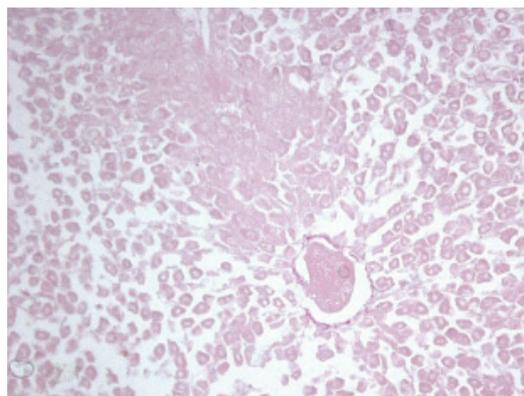
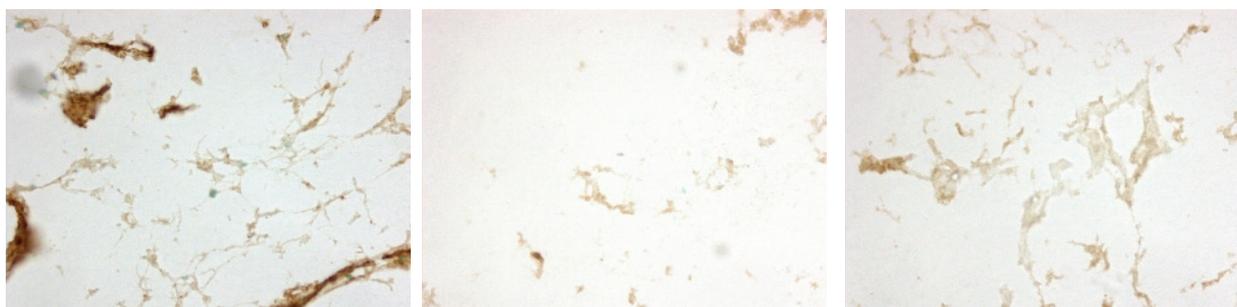


Рис. 2. Серия экспериментов № 1. Микрофотография. Окраска по Ван-Гизону. Ув. 20



а

б

в

Рис. 3. Серия экспериментов № 1. ИГХ реакция: *а* – на эластин (ув. 40); *б* – эндостатин (ув. 40); *в* – фибронектин (ув. 40)

При выполнении ИГХ исследования срезов на уровне ворот печени элементы ВКМ сохранены, однако его структура нарушена: матрикс значительно разрежен, отмечаются разрывы, нарушена объемная структура, что объясняется наличием внеклеточного тканевого отека и отсутствием презервации матрикса перед замораживанием (рис. 3).

Во второй серии экспериментов органокомплекс перед замораживанием перфузировали 10%-м раствором глицерина. При визуальном осмотре: ткань без разрывов, светло-коричневая, не прозрачная, сосуды не контурируются, что свидетельствует о низкой степени децеллюляризации (рис. 4).



Рис. 4. Серия экспериментов № 2

При микроскопии срезов, сделанных на уровнях светло-коричневой и неизменной ткани, на фоне интактных гепатоцитов присутствуют участки клеточного детрита, структура ВКМ сохранена, выражен межклеточный отек (рис. 5).

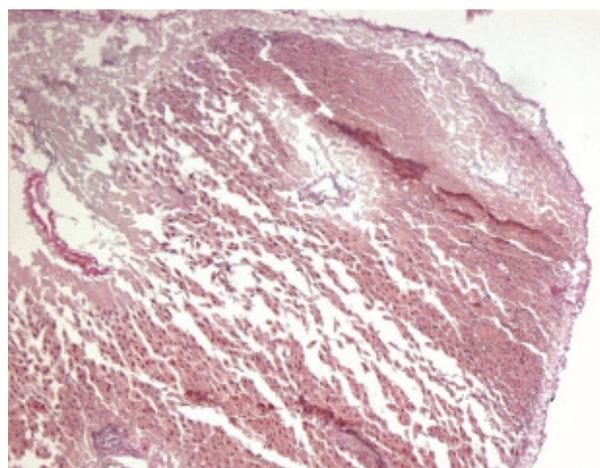


Рис. 5. Серия экспериментов № 2. Микрофотография. Окраска по Ван-Гизону. Ув. 10

При ИГХ исследовании выявлена сниженная экспрессия гликопротеидов (рис. 6). Вероятно, при децеллюляризации ВКМ был значительно поврежден.

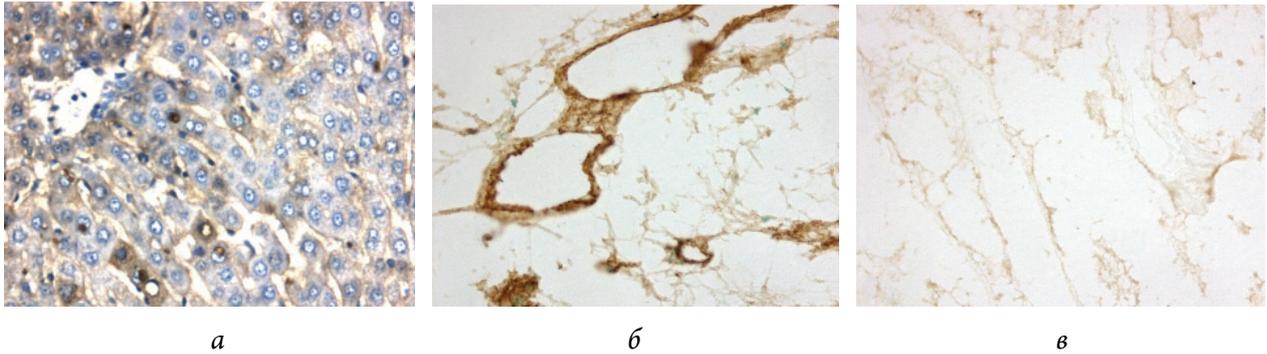


Рис. 6. Серия экспериментов № 2. ИГХ реакция: *а* – на фибронектин, гепатоциты окрашены гематоксилином (ув. 20); *б* – эластин (ув. 40); *в* – эндостатин (ув. 40)

В третьей серии экспериментов перед выполнением перфузии по стандартной схеме печень подвергалась циклу замораживания-оттаивания с предварительной перфузией 5%-м раствором трегалозы. Визуально ткань печени белая, прозрачная, однородная. В толще ткани контурируются сосуды. Объемная структура органа сохранена (рис. 7).

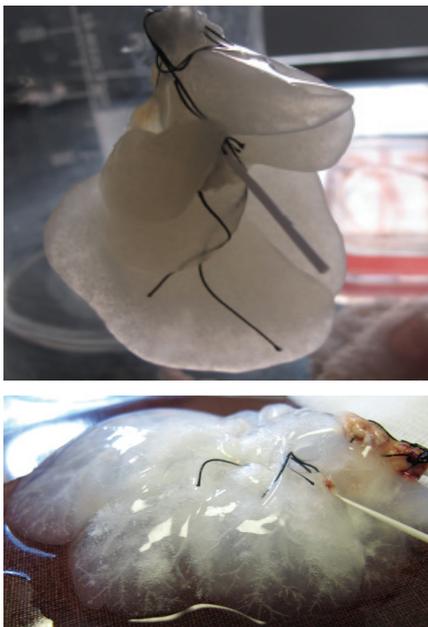


Рис. 7. Серия экспериментов № 3

При микроскопии срезов, выполненных на нескольких уровнях, установлено, что структура ВКМ сохранена, отмечаются единичные микро-разрывы структуры матрикса. Отек не выражен (рис. 8). Обращает на себя внимание полное отсутствие гепатоцитов и тканевого детрита, что позволяет оценить степень децеллюляризации как хорошую.

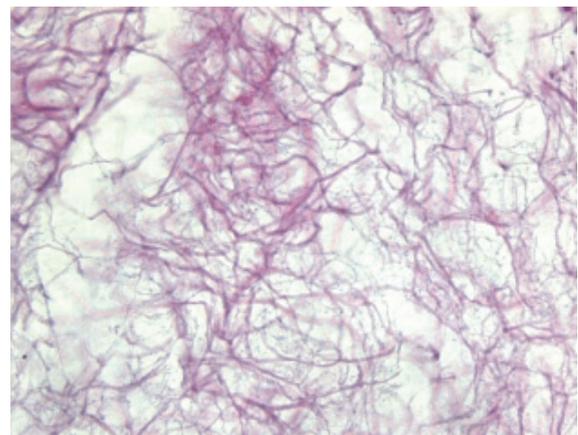


Рис. 8. Серия экспериментов № 3. Микрофотография. Окраска по Ван-Гизону. Ув. 63

Степень презервации гликопротеинов, образующих ВКМ, оценивали при помощи ИГХ реакции. При визуальном сравнении с контрольным образцом установлено, что фибронектин и эндостатин сохранились (рис. 9, *а*, *б*).

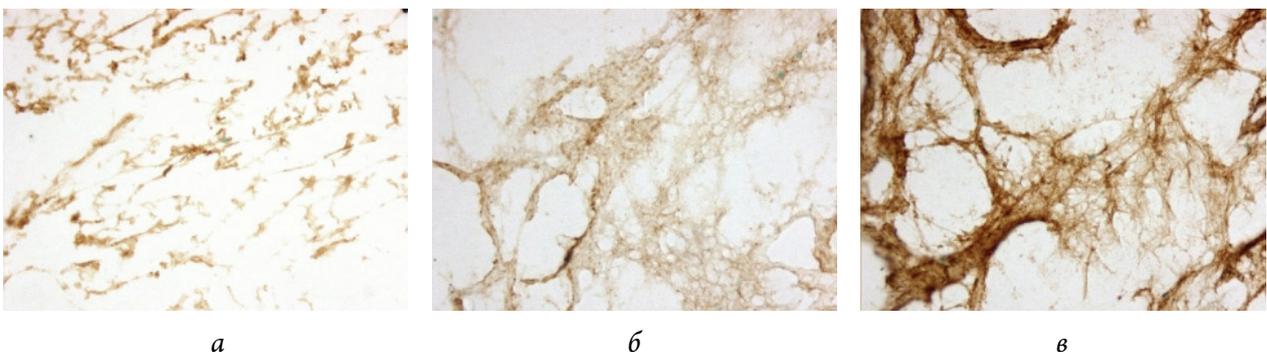


Рис. 9. Серия экспериментов № 3. ИГХ реакция: *а* – на фибронектин; *б* – эластин; *в* – эндостатин. Ув. 40

Эластин при ИГХ исследовании обнаружен в гораздо меньших количествах, чем в контрольном образце, однако нарушения трехмерной структуры образуемой им сети не выявлено (рис. 9, в).

ОБСУЖДЕНИЕ

На наш взгляд, факт наличия большого количества клеточного детрита и островков с гепатоцитами в образцах первой серии обусловлен тем, что децеллюляризирующий раствор не попадает на периферию долей печени из-за нарушения целостности сосудов в области повреждений ткани печени. Низкая степень децеллюляризации во второй серии эксперимента предположительно объясняется защитным действием глицерина на клетки образца на стадии замораживания; для компенсации этого может потребоваться пролонгирование перфузии децеллюляризирующим агентом. С целью подтверждения гипотезы, вне рамок эксперимента, перфузия была продолжена до 36 ч от начала опыта. Полученные результаты в целом повторяют результаты третьей серии эксперимента, что свидетельствует о положительном влиянии на результаты децеллюляризации предварительной перфузии органокомплекса любыми криопротекторами. Тем не менее, основываясь на результатах эксперимента, можно утверждать, что преддецеллюляризация перфузией раствором непроницающего криопротектора (трегалозы) увеличивает скорость децеллюляризации примерно в 1,5 раза по сравнению с методикой, в которой используется проникающий криопротектор (глицерин). Это объясняется различиями в механизмах действия внеклеточных

(непроницающих) и внутриклеточных (проницающих) криопротекторов. Внутриклеточные криопротекторы, проникая сквозь клеточную мембрану, образуют водородные связи с молекулами воды, препятствуя как вне-, так и внутриклеточному формированию кристаллов льда. Внеклеточные криопротекторы действуют только в межклеточном пространстве, не предохраняя клетки от образования внутриклеточного льда, что обеспечивает более быструю децеллюляризацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и применена на практике оценка результатов децеллюляризации, позволяющая определить качество получаемых в лабораторных условиях ВКМ каркасов. Установлено, что предварительная заморозка органокомплекса, перфузированного раствором криопротектора, положительно влияет на результаты децеллюляризации. При этом преддецеллюляризация перфузией внеклеточными криопротекторами сокращает время последующей перфузии примерно в 1,5 раза. Предложен способ перфузионной децеллюляризации печени крыс, основанный на использовании в качестве действующего агента 1%-го раствора додецилсульфата натрия с предварительной заморозкой органа, перфузированного 5%-м раствором трегалозы. Предложенная методика по ряду оцениваемых параметров является более эффективной, чем известные аналоги, позволяя в короткие сроки получать качественные внеклеточные матричные каркасы с максимальной презервацией матричных гликопротеидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Griffith L.G., Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities // *Science*. – 2002. – № 295. – P. 1009–1023.
2. Langer R. Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine // *Adv. Mater.* – № 21. – 2009. – P. 3235–3241.
3. Badyak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function // *Acta Biomater.* – 2009. – № 5. – P. 1–13.
4. Giancotti F.G. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 1997. № 9. – P. 691–700.
5. Giancotti F.G., Ruoslahti E. Integrin signaling // *Science*. 1999. – № 285. – P. 1028–1032.
6. Ott H.C. [et al.] Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart // *Nat. Med.* – 2008. – № 14. – P. 213–234.
7. Ott H.C. [et al.] Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung // *Nat. Med.* – 2008. – № 16. – P. 927–933.
8. Petersen T.H. [et al.] Tissue-engineered lungs for in vivo implantation // *Science*. – № 329. – P. 538–541.

REFERENCES

1. Griffith L.G., Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science*, 2002, no. 295, pp. 1009–1023.
2. Langer R. Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv. Mater.*, 2009, no. 21, pp. 3235–3241.

3. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.*, 2009, no. 5, pp. 1–13.
4. Giancotti F.G. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1997, no. 9, pp. 691–700.
5. Giancotti F.G., Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*, 1999, no. 285, pp. 1028–1032.
6. Ott H.C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.*, 2008, no. 14, pp. 213–234.
7. Ott H.C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat. Med.*, 2008, no. 16, pp. 927–933.
8. Petersen T.H. et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*, no. 329, pp. 538–541.

Поступила в редакцию 08.02.2016
Утверждена к печати 02.02.2016

Авторы:

Черных Александр Васильевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой оперативной хирургии с топографической анатомией ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» (г. Воронеж).

Малеев Юрий Валентинович – д-р мед. наук, доцент кафедры оперативной хирургии с топографической анатомией ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», врач-хирург ООО «Институт биологии старения» (г. Воронеж).

Шевцов Артём Николаевич – канд. мед. наук, ассистент кафедры оперативной хирургии с топографической анатомией ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», науч. сотрудник ООО «Институт биологии старения» (г. Воронеж).

Пульвер Александр Юрьевич – директор ООО «Институт биологии старения» (г. Воронеж).

Лейбович Борис Ефимович – зав. отделением патологической анатомии НУЗ «Дорожная областная клиническая больница на станции «Воронеж-1»» (г. Воронеж).

Контакты:

Шевцов Артём Николаевич

тел.: +7 (920) 456-20-51

e-mail: shan-87@yandex.ru