

ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО ПИЩЕВОДА НИЗШЕГО ПРИМАТА

Губарева Е.А.¹, Сотниченко А.С.¹, Кувда Е.В.¹, Сьоквист С.², Феллиу Торрес Н.²,
Орлов С.В.³, Гилевич И.В.¹, Гуменюк И.С.¹, Порханов В.А.⁴, Маккиарини П.^{1,2}

¹Международный научно-исследовательский клиничко-образовательный центр регенеративной медицины, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, e-mail: corpus@ksma.ru

²Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Каролинский институт, Стокгольм, Швеция, e-mail: info@ki.se

³НИИ медицинской приматологии РАМН, Сочи, Адлер, e-mail: mail@primatologia.ru

⁴ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, e-mail: kkb1@mail.ru

На настоящий момент единственным эффективным методом лечения больных в терминальном состоянии является трансплантация. Однако это сопряжено с постоянным дефицитом донорских органов и необходимостью пожизненного применения иммуносупрессивной терапии в послеоперационном периоде. Тканевая инженерия является перспективной альтернативой трансплантации: децеллюляризация органов с последующей рецеллюляризацией собственными клетками реципиента позволит избежать многих посттрансплантационных осложнений. Для создания тканеинженерного пищевода низших приматов на первом этапе использовался детергентно-энзиматический метод децеллюляризации, выполняемый путем постоянной перфузии. Оценку эффективности проведенной процедуры проводили количественными и качественными методами, такими как световая микроскопия препаратов после стандартного гистологического и иммуногистохимического окрашивания, спектрофотометрическое количественное определение остаточной ДНК в тканях. Полученные результаты позволяют сделать выводы о сохранности структуры внеклеточного матрикса и элиминации части ядерного материала. Однако необходимо продолжение исследований для создания функционально полноценного каркаса пищевода низших приматов.

Ключевые слова: децеллюляризация, пищевод, иммуногистохимические исследования

IMMUNOMORPHOLOGICAL CHARACTERISATION OF DECELLULARIZED NONHUMAN PRIMATE'S ESOPHAGUS

Gubareva E.A.¹, Sotnichenko A.S.¹, Kuevda E.V.¹, Sjoqvist S.², Feliu Torres N.²,
Orlov S.V.³, Gilevich I.V.¹, Gumenyuk I.S.¹, Porhanov V.A.⁴, Macchiarini P.^{1,2}

¹International Research, Clinical and Education Center of Regenerative Medicine, Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail: corpus@ksma.ru

²Advanced Center for Translational Regenerative Medicine (ACTREM), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, e-mail: info@ki.se

³FSBI "SRI MP" RAMS, Sochi, Adler, e-mail: mail@primatologia.ru

⁴SBIM "Research Institute - Regional Clinical Hospital № 1 n. a. professor S.V. Ochapovsky Ministry of Health of the Krasnodar region, Krasnodar, e-mail: kkb1@mail.ru

Transplantation is the only effective treatment for patients with diseases in terminal stage. However, this method is fraught with constant shortages of donor organs and the need for life-long immunosuppressive therapy after operation. Tissue engineering is a potential alternative to transplantation: decellularization with a following recellularization with recipient's autologous cells would avoid many post-transplant complications. Creation of tissue-engineered esophagus begins with detergent-enzymatic method of decellularization performed by continuous perfusion. Evaluation of the effectiveness of the performed procedures was carried out by quantitative and qualitative methods: light microscopy after standard histological preparations and immunohistochemical staining, the spectrophotometric quantification of residual DNA. The results allowed drawing conclusions about the preservation of the structure of the extracellular matrix and the elimination of the nuclear material, but further research is needed to create a functional scaffold of the nonhuman primate's esophagus.

Keywords: decellularization, esophagus, immunohistological studies

Тканевая инженерия представляет собой совершенно новую концепцию для восстановления, регенерации тканей и трансплантации органов, предлагает инновационный подход для восстановления поврежденных органов и тканей [4, 5]. Неспособность природных материалов полностью воспроизводить сложную структуру межклеточного матрикса привела к необходимости использовать децеллюляризированные естественные внеклеточные матриксы, полученные от доноров, либо матриксы, изготовленные из полимерных материалов и полностью воспроизводящие структуру нативного органа. Создание подходящего каркаса биоинженерного органа требует: во-первых, воссоздания структуры, сходной с нативной; во-вторых, развития сосудистой сети, способной обеспечить адекватную перфузию тканей; в-третьих, необходимо, чтобы клетки, используемые при рецеллюляризации, были способны к дифференцировке во все паренхиматозные и сосудистые клеточные элементы органа; в-четвертых, должна иметься возможность управления микроокружением клеток для воздействия на их функции; в-пятых, необходимо управлять дифференцировкой и созреванием клеток *in vitro* [5]. С учетом того факта, что реконструктивные операции при заболеваниях пищевода очень сложны, связаны со значительным количеством послеоперационных осложнений [7], а также высокой летальностью, необходимостью повторных операций с целью бужирования на фоне возникающих стриктур, создание тканеинженерного органа для замены поврежденного или отсутствующего является весьма перспективным. Основной целью данного исследования является получение децеллюляризированного матрикса пищевода низших приматов детергентно-энзиматическим методом, выполняемым путем перфузии децеллюляризирующими растворами с последующей иммуноморфологической оценкой сохранности внеклеточного матрикса (ВКМ) и отсутствия антигенности.

Материал и методы

Для создания децеллюляризированного матрикса тканеинженерного пищевода использовали органы 2 самцов макаки-резус (*Macaca mulatta*). Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с правилами проведения исследований с вовлечением экспериментальных животных (протокол локального этического комитета № 30/1). Материал был получен в условиях операционной ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» министерства здравоохранения Краснодарского края. Затем пищевод транспортировали в лабораторию в охлажденном растворе PBS +/- (Gibco, Англия) при температуре +4°C. Время доставки составило не более 2 ч. В стерильных условиях с помощью пинцета и ножниц пищевод был выделен из окружающей соединительной ткани. Один орган был использован для проведения децеллюляризации, второй являлся нативным контролем. Краниальная и

каудальная части пищевода были канюлированы пластиковыми катетерами в соответствии с их диаметром и фиксированы в специализированном биореакторе ORCA (HarvardApparatus, США). Децеллюляризацию пищевода низшего примата выполняли детергент-энзиматическим методом с проведением 2 циклов обработки стерильными растворами комнатной температуры: деионизированной водой – 1 ч; дезоксихолатом натрия 4%-ным + 2 mM раствором ЭДТА 1 ч; PBS +/- – 10 мин; свиной панкреатической ДНКазой-I 2000 ЕД /200 мл PBS +/- – 1 ч), PBS +/- 200 мл – 18 ч. Перфузию осуществляли со скоростью 150 мл/мин.

Полученные образцы нативного и децеллюляризованного пищевода фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине, дегидратировали и заключали в парафин по стандартной методике. С помощью микротомы получали срезы толщиной 5 мкм. Для общегистологической оценки препаратов проводили окраску срезов гематоксилином и эозином (Histolab, Швеция). Для проведения иммуногистохимического анализа в качестве первичных были выбраны поликлональные антитела к коллагену I типа (ab34710, Abcam, Англия), коллагену IV типа (ab6586, Abcam, Англия), ламинину (ab11575, Abcam, Англия), фибронектину (ab2413, Abcam, Англия), тропомиозину (ab133292, Abcam, Англия), панцитокератину (ab7753, Abcam, Англия). Препараты дополнительно докрасивались гематоксилином. Изучение микропрепаратов проводилось на микроскопе Olympus BX51 (Япония).

Количественную оценку содержания ДНК в нативных и децеллюляризованных органах выполняли по стандартным протоколам производителя (Dneasy Bloodand Tissue Kit, Qiagen, Швеция). Анализ результатов проводили количественным методом на спектрофотометре BioDrop μ LITE (Biochrom, Великобритания).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики на персональном компьютере. Анализ выборок производили с использованием программы GraphPadPrism 5 (GraphPadSoftware, США).

Результаты и их обсуждение

Для проведения децеллюляризации пищевода нами был использован детергент-энзиматический метод, как было показано в предыдущих исследованиях, в полной мере позволяющий удалять клетки из нативных тканей, но оказывающий щадящее воздействие на компоненты внеклеточного матрикса [1,2,3,6]. Перфузия пищевода децеллюляризирующими агентами приводила к тому, что орган в процессе проведения процедуры приобретал молочно-белую окраску, характерную для ацеллюлярных тканей, его просвет становился более широким за счет снижения эластичности ткани, характерной для нативного органа.

При обзорном окрашивании тканей пищевода гематоксилином и эозином не было выявлено сохранных клеток и клеточных ядер, в то же время сохранялась

гистоархитектоника, свойственная нативной ткани: микроскопически выделяли эпителиальный, подслизистый и мышечный слои, состоящие соответственно из денуклеаризированных эпителиальных и мышечных клеток, эозинофильных волокон рыхлой волокнистой соединительной ткани. Оставались сохранными упорядоченная структура и преимущественно параллельное расположение коллагеновых волокон в матриксе. Отчетливо визуализировались неизменные базальные мембраны сосудов. Набухания либо иных патологических изменений структуры, архитектоники, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было (рис. 1).

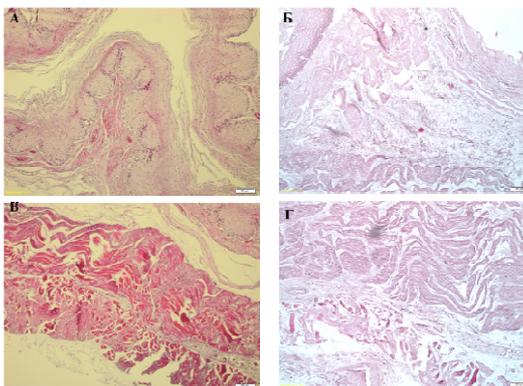


Рис. 1. Нативный (А, В) и децеллюляризованный (Б, Г) пищевод низшего примата.

Гематоксилин и эозин. Увеличение: об. x10, ок. x10 (А, Б), об. x40, ок. x10 (В, Г)

Данные окрашивания гематоксилином и эозином не давали полного представления о составе и строении полученного матрикса, а также о качестве проведенной децеллюляризации. Так как при световой микроскопии препаратов децеллюляризованного пищевода изменений во внеклеточном матриксе не было выявлено, потребовалось изучение его белкового состава до и после проведения децеллюляризации. Иммуногистохимическая реакция с антителами к белкам внеклеточного матрикса проходила как в испытуемых образцах, так и в контролях.

В нативном пищеводе были определены основные белки внеклеточного матрикса – коллаген I типа, коллаген IV типа, ламинин, фибронектин (рис. 2-3). Указанные белки в нативной ткани преимущественно локализовались в составе базальной мембраны эпителия и сосудах, а также в составе рыхлой волокнистой соединительной ткани, находящейся в мышечных слоях пищевода и адвентиции. В децеллюляризованной ткани пищевода низшего примата сохранялась исходная локализация данных белков внеклеточного матрикса.

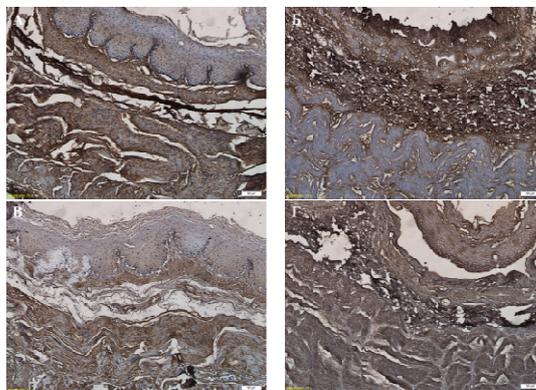


Рис. 2. Содержание коллагена I типа (А, Б) и IV типа (В, Г) во внеклеточном матриксе нативного (А, В) и децеллюляризованного (Б, Г) пищевода низшего примата.

Иммуногистохимическое окрашивание. Увеличение: об. x10, ок. x10

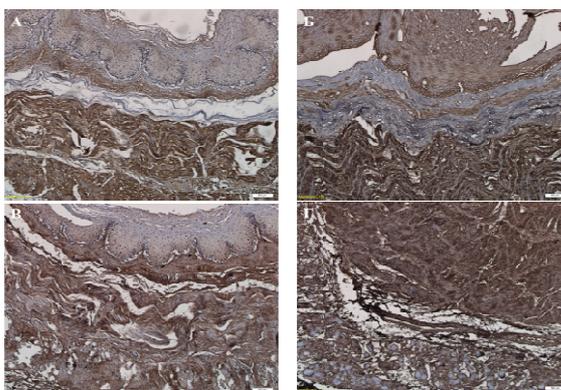


Рис. 3. Содержание ламинина (А, Б) и фибронектина (В, Г) во внеклеточном матриксе нативного (А, В) и децеллюляризованного (Б, Г) пищевода низшего примата.

Иммуногистохимическое окрашивание. Увеличение: об. x10, ок. x10

В качестве маркера мышечной ткани использовали выявление белка тропомиозина. В нативном пищеводе тропомиозин выявлялся как во внутреннем циркулярном мышечном слое, так и в наружном продольном, слои были разделены между собой тонкой прослойкой межмышечной рыхлой волокнистой соединительной ткани. В децеллюляризованной ткани тропомиозин во внутреннем мышечном слое выявлен не был, в то время как в наружном была обнаружена экспрессия указанного белка (рис. 4 А, Б).

Белок панцитокератин, являющийся элементом цитоскелета эпителиальных клеток, использовали в качестве маркера наличия их фрагментарных остатков при проведении иммуногистохимического исследования. Положительная экспрессия искомого антигена была выявлена как в нативной, так и в децеллюляризованной ткани (рис. 4 В, Г).

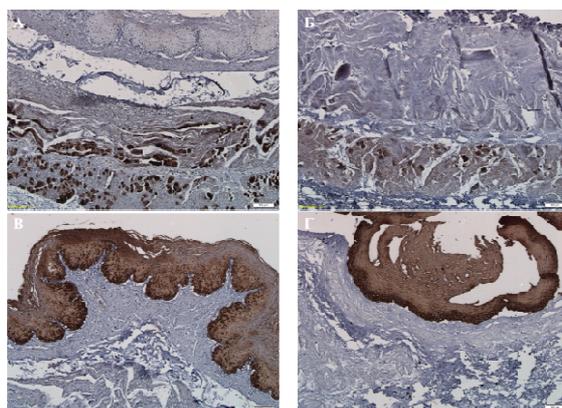


Рис. 4. Содержание тропомиозина (А, Б) и панцитокератина (В, Г) во внеклеточном матриксе нативного (А, В) и децеллюляризованного (Б, Г) пищевода низшего примата..

Иммуногистохимическое окрашивание. Увеличение: об. $\times 10$, ок. $\times 10$

Анализ содержания ДНК показал снижение количества ядерного материала в децеллюляризованном пищеводе до 29% от исходного уровня ($293,59 \pm 27,09$ нг/мг в нативном пищеводе и $75,49 \pm 7,46$ нг/мг – в децеллюляризованном). Полученные результаты свидетельствовали об эффективности проведенной децеллюляризации, после которой матрикс был в значительной степени ($p = 0,0011$) очищен от ядерного материала.

В заключение хочется отметить, что результаты обзорных методов гистологического окрашивания тканей, а также данные иммуногистохимического анализа позволяют сделать вывод о том, что перфузионный детергент-энзиматический метод не позволяет полностью децеллюляризовать полый трубчатый орган, каким является пищевод, однако приводит к полной денуклеаризации ткани и существенному уменьшению содержания ДНК в ней. Таким образом, изучение возможностей и перспектив создания внеклеточного матрикса пищевода низших приматов необходимо продолжить, а также провести оптимизацию и модификацию протокола его децеллюляризации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда для проведения фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований международными научными группами (номер проекта 14-45-00018 от 15.10.2014 года).

Список литературы

1. Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гилевич И.В., Маккиарини П. Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. — Т. 7, № 4.— С. 38–45.

2. Кувейда Е.В., Губарева Е.А., Сотниченко А.С. и соавт. Децеллюляризация легких низших приматов: оптимизация протокола // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2015. — № 8 (2). — С. 244–248.
3. Сотниченко А.С., Губарева Е.А., Гилевич И.В. и соавт. Децеллюляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2013. — Т. VII, № 3. — С. 86–94.
4. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds // Annu Rev. Biomed. Eng. 2011. Vol. 13. P. 27–53.
5. Ott H.C, Taylor D., inventors; Regents of the University of Minnesota, assignee. Decellularization and recellularization of organs and tissues. US patent 20090202977. 2009 Aug 13.
6. Sjöqvist S., Jungebluth P., Lim M. L. et al. Experimental orthotopic transplantation of a tissue-engineered oesophagus in rats. Nature communications. 2014; 5: 3562.
7. Smithers B. M., Gotley D. C., Martin I. et al. Comparison of the outcomes between open and minimally invasive esophagectomy. Ann. Surg. 2007; 245: 232–40.

Рецензенты:

Гуменюк С.Е., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургии педиатрического и стоматологического факультетов ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар.

Каде А.Х., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, г. Краснодар.