Морфологическая оценка качества децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс

Е.А. Губарева [1], А.С. Сотниченко [1], И.В. Гилевич [1], П. Маккиарини [1,2]

[1] Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

Международный научно–исследовательский клинико–образовательный центр регенеративной медицины, Краснодар

[2] Каролинский институт, Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Швеция

Optimal decellularization of rat hearts and diaphragms and morphological evaluation

E.A. Gubareva [1], A.S. Sotnichenko [1], I.V. Gilevich [1], P. Macchiarini [1,2]

[1] International Research, Clinical and Education Center of Regenerative Medicine, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

[2] Advanced Center for Translational Regenerative Medicine (ACTREM), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Тканевая инженерия включает в себя разработку и модификацию биологических (природных) или искусственных каркасов (носителей), а также оценку и поддержание жизнеспособности клеток или тканей, взаимодействующих с ними. С целью исключения иммунных реакций биологические каркасы должны быть децеллюляризированы, но при этом сохранять исходную структуру ткани и внеклеточного матрикса. Основной целью данного исследования было изучение и оптимизация различных протоколов децеллюляризации сердца и диафрагмы крыс и определение наиболее надежной техники гистологического исследования (парафиновые и криосрезы) для оценки морфологии децеллюляризированных тканей. Сердце и диафрагма были децеллюляризированы с использованием протоколов, основанных на детергент-энзиматическом методе, подразумевающем использование деоксихолата и ДНКазы. В сравнении с протоколами децеллюляризации, представленными в литературе, в предложенных нами протоколах было уменьшено время воздействия детергентов и энзимов: продолжительность действия деоксихолата на сердце составило 3 ч и на диафрагму – 6 ч, а ДНКазы – 1 ч и 2 ч, соответственно, общая продолжительность выполнения каждого протокола была равна 24 ч. Результаты морфологических методов исследования показали отсутствие клеток и сохранность внеклеточного матрикса (ВКМ). При количественной оценке ДНК обнаружено, что при проведении децеллюляризации было удалено около 81% ядерного материала в сердце и 74% ядерного материала в диафрагме. В ходе проведенных исследований было установлено, что при использовании описанных протоколов децеллюляризации эффективно снижалось содержание ДНК и отсутствовало повреждение целостности ВКМ сердца и диафрагмы.

Ключевые слова: тканевая инженерия, децеллюляризация, сердце, диафрагма, парафиновые срезы, криосрезы.

Tissue engineering involves the design, evaluation, modification and maintenance of living cells or tissues embedded in biological (natural) or artificial scaffolds. Biological scaffolds need to be decellularized to become completely non-immunogenic while preserving the tissue structure and extracellular matrix. The primary goals of the present paper were to investigate and optimize different decellularization protocols of rats heart and diaphragm and establish the most reliable technique (paraffin vs. cryosections) to evaluate the morphology of the decellularized tissues. Hearts and diaphragm were decellularized with detergent-enzymatic based protocols, including deoxycholate and DNAse. Compared to published decellularization protocols, our was able to reduce exposure time (for heart: up to 3 hours – deoxycholate and 1 hour – DNAse; for diaphragm: up to 6 hours – deoxycholate and 2 hour – DNAse) of detergents and length (up to 24 hours). Results of morfological studies showed the absence of cells and preservation of the extracellular matrix. DNA quantification showed that about 81% and 74% of heart and diaphragm nuclear material, respectively, was removed by the decellularization process. Our results suggest that the investigated decellularization protocol was superior to others in removing DNA content and preserving the ECM of rats hearts and diaphragms.

Key words: tissue engineering, decellularization, heart, diaphragm, paraffin, cryosections.

В текущем столетии ожидается увеличение заболеваемости и инвалидизации среди людей трудоспособного возраста [1]. Трансплантация органов является эффективным методом лечения пациентов, страдающих рядом заболеваний в терминальной стадии. К сожалению, она связана с постоянным недостатком донорских органов, необходимостью пожизненной иммунносупрессивной терапии; с тем фактом, что пересадка органов не проводится во многих странах, а также сопряжена с высокой долей вероятности развития неблагополучных исходов [2]. Это вызывает потребность в новых, не требующих иммунносупрессивной терапии методах лечения для восстановления или замещения поврежденных тканей и органов, что позволит избежать сложностей, связанных с аллогенной трансплантацией.

Тканевая инженерия может стать альтернативным способом лечения и фокусируется на восстановлении, замене и восполнении клеточных популяций, тканей и органов при их утрате или существенном

e-mail:

нарушении функций. Она требует ряда ключевых компонентов, включая, но не ограничиваясь перечисленными ниже: каркасы или матриксы (биологические или искусственные), клетки (ауто-, алло-, ксеногенные), биореактор и биоактивные молекулы [2–7].

Известно, что децеллюляризация – это процесс, направленный на удаление клеток из ткани с сохранением ВКМ и трехмерности структуры органа [8, 9]. Исследования по созданию естественных каркасов методом децеллюляризации ведутся для следующих органов: трахеи, пищевода, сердца, легких, скелетной мышцы, диафрагмы и др. [7–12]. Подробное рассмотрение данной проблемы S.F. Badylak (2007) показало, что внеклеточные матриксы обладают всеми характеристиками, необходимыми для создания тканеинженерного каркаса [13].

Для проведения децеллюляризации могут использоваться различные способы: физические, ферментативные и химические [8, 11]. Под физическими подразумеваются: механическое воздействие, циклы замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком. При ферментативном используются трипсин, эндонуклеазы, экзонуклеазы. Как было указано выше, каждый химический агент воздействует на орган определенным образом. Детергенты подразделяются на классы: кислоты и щелочи, ферменты, гипертонические и гипотонические растворы, ионные и неионные детергенты, хелатирующие агенты и бимодальные детергенты. Выбор действующего агента и метода децеллюляризации определяется структурой и свойствами исследуемого органа. При выборе правильной временной экспозиции детергентов, способа децеллюляризации мышечной ткани надо учитывать ее анатомо-гистологические особенности. Так, неудачно выбранный децеллюляризирующий агент способен привести к разрушению структуры матрикса и потере его механических и биологических свойств. Необходимо учитывать, что любой химический агент повреждает матрикс в той или иной степени, и речь идет только о минимализации последствий. Полученные таким образом каркасы способны стимулировать клеточную пролиферацию, хемотаксис, ответное ремоделирование тканей пациента, однако, при этом они не должны содержать продуктов деградации клеток, остатков химических детергентов, которыми их обрабатывали [11, 13, 14]. Перспективы применения децюллюляризированных естественных органов в качестве каркаов (скаффолдов) будут зависеть от выработки специфичных для каждой ткани методов ее получения и оценки. Именно поэтому так важен подбор правильного протокола децеллюляризации, при котором минимализируется структурное повреждение, даже в пределах родственных видов тканей.

Каркасы, биологические или искусственные, призваны воспроизводить структуру целевой ткани и обладать соответствующими физическими, химическими, механическими и структурными свойствами для обеспечения проникновения клеток и формирования трехмерного эквивалента (аналога) ткани при засеивании собственными клетками. Биологические каркасы необходимо децеллюляризировать, чтобы сделать их неиммунногенными. Однако данная процедура должна сохранять биохимический состав, архитектонику внеклеточного матрикса, а также механические свойства сохранившегося ВКМ на допустимом уровне.

Основными целями настоящего исследования стала оптимизация известных протоколов децеллюляризации сердца [8, 10, 11] и диафрагмы [10, 11] крыс; выработка алгоритма морфологической верификации децеллюляризации.

Материал и методы

Все эксперименты проводились после одобрения протокола исследования локальным этическим комитетом (Каролинский институт, Швеция). В работе использовалось 57 взрослых крыс-самцов линии Lewis весом 180±16 г. Децеллюляризации сердца была отработана на 20 органах, диафрагм – на 17; органы 20 животных составили группу нативного окнтроля. Животных выводили из эксперимента соблюдая правила проведения работ с использованием экспериментальных животных в соответствии с «Принципами ухода за лабораторными животными» (Рекомендации Национального общества по медицинским исследованиям, 2001, США; Руководство по уходу и использованию лабораторных животных, National Academy Press, пересмотр 1996 г., США).

Эксплантация органов. Перед выделением органокомплекса легкие-сердце и диафрагмы животные интраперитонеально получали летальную дозу барбитуратов (150 мг/кг). Крысам вводился гепарин в дозе 100 ЕД, и спустя 2 ч проводилась диссекция органов. После стернотомии выделяли органокомплекс сердце-легкие, передняя и задняя полые вены отсекались, аорта канюлировалась на расстоянии 2–2,5 см от сердца, затем ветви дуги аорты лигировались. Трахея также канюлировалась на расстоянии 2 см от киля. Диафрагма аккуратно отделялась от окружающих тканей с сохранением мышечной и сухожильной частей.

Децеллюляризация сердца. В оригинальном протоколе [10] проводилась децеллюляризация изолированного сердца, включающая в себя перфузию органа 100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 0,25 мг/мл амфотерицина Б в течение 20 мин, далее следовал 1% раствор додецилсульфата натрия (SDS) в течение 6 ч. После чего сердце промывалось в течение 1 часа деионизированной водой и в течение 12 ч раствором PBS, затем трижды промывали раствором PBS 500 мл не менее 24 ч, каждый раз используя насос для рециркуляции. На следующем этапе сердце перфузировалось 35 мл раствора ДНКзы (70 Ед/мл), применяя рециркуляцию вручную, после чего также трижды промывалось раствором PBS 500 мл в течение 24 ч, каждый раз используя насос для рециркуляции.

С целью оптимизации протокола, мы осуществляли следующую модификацию:

1) использовали не изолированное сердце, как в предыдущих методиках, а органокомплекс сердце-легкие, который помещался в специально разработанный биореактор для децеллюляризации (Harvard Apparatus, USA);

2) перфузия одинаковых растворов целого органокомплекса сердце-легкое проводилась одновременно через аорту (ретроградно) и трахею (антероградно) с использованием детергентов и энзимов (детергентно-энзиматический метод);

3) последовательность растворов, время их воздействия и вид были изменены: PBS 200 мл – 1 час, деионизированная вода 200 мл – 1 ч, дезоксихолат натрия 4% 200 мл – 3 ч, PBS 200 мл – 1 ч,

ДНКаза-I 2000 ЕД/мг – 1 ч, PBS 200 мл – 16 ч (рис. 1). Все растворы были стерильными.

Децеллюляризация диафрагмы. Диафрагма была очищена от жира и промыта стерильным раствором PBS. Для более щадящей ее децеллюляризации и уменьшения чрезмерного растяжения при фиксации, был разработан специальный биореактор, который включал в себя сменные емкости для различных детергентов и защищал ткань от повреждения (рис. 2). При децеллюляризации диафрагмы применялся стандартный ротационный метод с использованием модифицированного протокола [10] с изменением последовательности и уменьшением времени воздействия детергентов и энзимов: 2 цикла обработки детергент-энзиматической методом (деионизированная вода 200 мл – 30 мин; дезоксихолат натрия 4% 200 мл – 3 часа; PBS 200 мл – 10 мин; ДНКаза-I 2000 ЕД/мг – 1 ч; EDTA 800 мкл + 200 мл деионизированной воды – 30 мин); PBS 200 мл – 12 ч. Все растворы были стерильными.

Количественное определение содержания ДНК. Для количественной оценки содержания ДНК в нативных и децеллюляризированных органах на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) были использованы стандартные наборы реактивов (DneasyBlood and Tissue Kit, Qiagen, Sweden) по стандартным протоколам [14, 15]. В стерильных условиях в микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф помещались образцы ткани из одних и тех же участков, массой не более 25 мг, которые предварительно были пропитаны в 30% этаноле в течение 10 с. Затем последовательно добавляли 180 мкл лизирующего ALT буфера и 20 мкл протеиназы K. Далее после перемешивания на вортекс-миксере в течение 15 с пробирки с образцами были помещены в термостат при +57°C на ночь. Для обеспечения полного лизиса тканей перемешивание на вортекс-миксере повторялось несколько раз. Затем по очереди были добавлены 200 мкл AL буфера и 200 мкл 100% этанола. Полученный раствор был перемешан на мини-вортексе в течение 15 с, далее микроцентрифужные пробирки с образцами центрифугировали в течение 1 мин при 8000 rpm. Далее последовательно добавляли 500 мкл AW1 буфера, центрифугировали в течение 1 мин при 8000 rpm, далее 500 мкл AW2 буфера и центрифугировали в течение 3 мин при 14000 rpm. В заключении добавляли 200 мкл AE буфера и центрифугировали в течение 1 мин при 8000 rpm, эту процедуру повторяли дважды. Исследование материала осуществлялось на спектрофотометре.

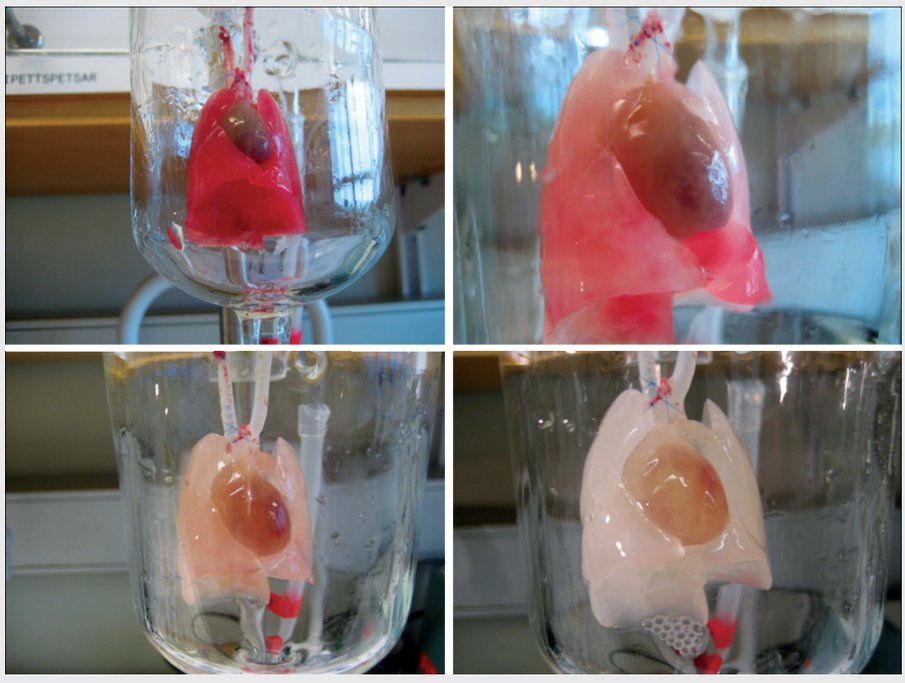

Рис. 1.
Органокомплекс сердце–легкие на различных этапах децеллюляризации:
А – перед началом процедуры;
Б – после перфузии деионизированной водой;
В – после 1 ч обработки 4% деоксихолатом натрия;
Г – после 3 ч обработки 4% деоксихолатом натрия

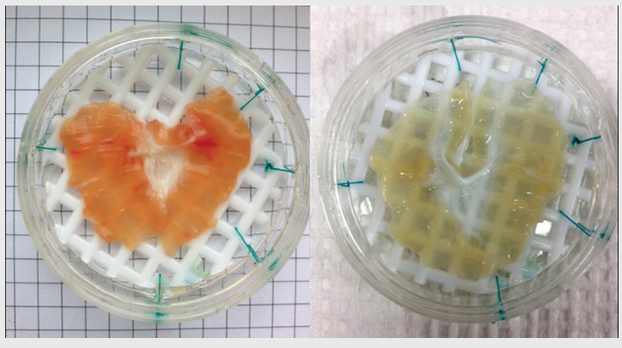

Рис. 2.
Диафрагма крысы до (А) и после (Б) проведения децеллюляризации

Морфологический анализ. Для морфологической оценки часть образцов тканей сердца (левый желудочек) и диафрагмы (мышечная часть) после фиксации в 10% нейтральном забуференном формалине и гистологической проводки были заключены в парафин. Другая часть была погружена в криосреду (OCT CrioMount, Histolab, Sweden). Все полученные срезы толщиной 5 мкм – парафиновые и 8 мкм – криосрезы были окрашены с помощью стандартных методик: гематоксилином и эозином, флуорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI (Sigma-Aldrich, USA). Микрофотографии были сделаны на микроскопе Olympus BX51 (Tokyo, Japan).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Для оценки сохранности ультраструктуры ВКМ был применен метод сканирующей электронной микроскопии. Образцы ткани фиксировали в 2,5% растворе глютарового альдегида (Merk, Germany) в 0,1 М какодилатном буфере (Prolabo, France) на 2 ч при комнатной температуре, затем промывали и дегидратировали с помощью спиртов возрастающей концентрации. В дальнейшем образцы были высушены в течение ночи и подвергнуты напылению золотом. Исследование проводилось на сканирующем электронном микроскопе JSM6490, JEOL (Japan).

Статистика. Статистическую обработку полученных данных количественного определения ДНК осуществляли методами вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программного обеспечения Excel for Office. Полученные результаты выражали в виде средних значений (M) и ошибки среднего (m). При сравнении средних значений изучаемых групп процент возможной ошибки находили по таблице t-критерия Стьюдента для парных сравнений, выражаемый в виде значений достоверности различия – «p», где $p<0,05$ считалось статистически достоверным.

Результаты

Опытным путем установлено, что модифицированные протоколы децеллюляризации требовали значительно меньшего времени воздействия детергентами и энзимами: 1% раствор дезоксихолата натрия для сердца около 3 ч, для диафрагмы – 6 ч и 2000 ЕД/мг ДНКазы в течение 1 и 2 ч для сердца и диафрагмы, соответственно; применялся 1% раствор дезоксихолата натрия вместо 1% раствора додецилсульфата натрия. Результатом модификации стало более эффективное удаление ДНК и менее выраженное повреждение структуры ВКМ. Таким образом, наш окончательный модифицированный протокол децеллюляризации включал 2 цикла обработки детергентно-энзиматическим методом (дезоксихолат натрия – ДНКаза-I) для диафрагмы и 1 цикл обработки детергентно-энзиметическим методом (дезоксихолат натрия – ДНКаза-I) для сердца, общая продолжительность воздействия для каждого органа составила 24 ч (табл. 1). При этом сердце и диафрагма сохраняли свою форму, макро- и микроскопическую структуры.

Количественный анализ ДНК. Количественный анализ показал, что в процессе децеллюляризации сердца было удалено около 81% ДНК (30,10±13,77 нг/мг по сравнению с 153,27±30,38 нг/мг), это свидетельствовало о том, что матрикс децеллюляризированного сердца (после 1 цикла обработки детергентно-энзиматическим методом) был в значительной степени ($p<0,05$) очищен от ДНК (табл. 2, рис. 3). Что касается децеллюляризации диафрагмы, то после 2 циклов обработки детергентно-энзиматическим методом (44,76±23,25 нг/мг в сравнении с 175,32±46,92 нг/мг) было удалено 74% ДНК (см. табл. 2, рис. 3). Эти результаты также следует считать статистически достоверными ($p<0,05$).

Таблица 1. **Алгоритм проведения децеллюляризации сердца и диафрагмы по различным протоколам**

Орган	Протокол децеллюляризации	Продолжительность
Сердце[1]	PBS → 1% SDS в деионизированной воде → Деионизированная вода → PBS → DNAse → PBS	~ 152 ч
Сердце[2]	PBS → Деионизированная вода → Деоксихолат натрия → PBS → DNAse → PBS	~ 24 ч
Диафрагма[3]	PBS → Деионизированная вода → Деоксихолат натрия → DNAse → PBS	~ 72 ч
Диафрагма[4]	PBS → Деоксихолат натрия → PBS → DNAse → EDTA → PBS	~ 24 ч

Примечания: [1] – Ott H., Taylor D. Regents of the University of Minnesota, assignee. Decellularization and recellularization of organs and tissues. US patent 20090202977, 2009; [2, 4] – авторский протокол; [3] – Conconi M.T., De Coppi P., Bellini S. et al. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. Biomaterials 2005; 26: 2567–74.

Таблица 2. **Содержание ДНК (нг/мг) в нативных и децеллюляризированных тканях сердца и диафрагмы**

	Нативный образец	Децеллюляризированный образец
Сердце	153,27 ±30,38	30,10 ±13,77 *
Диафрагма	175,32 ±46,92	44,76 ±23,25 *

Примечание: * – P<0,05 между показателями до и после децеллюляризации.

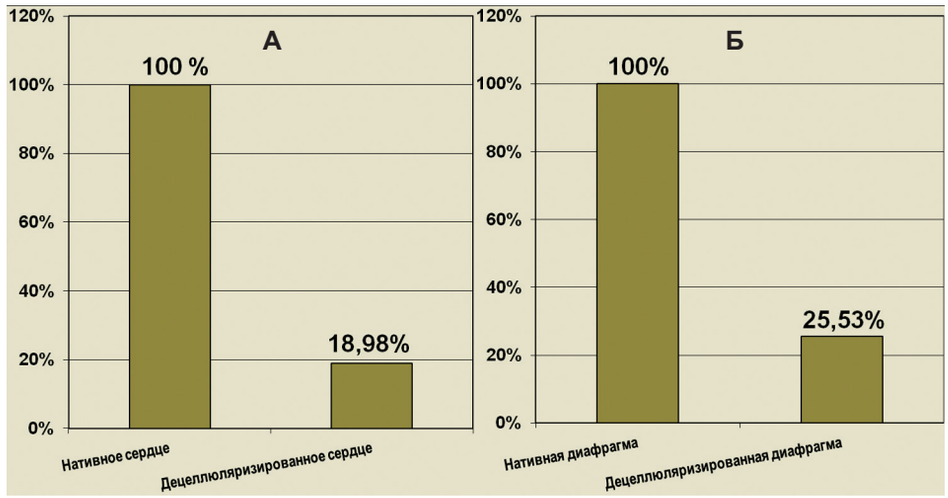

Рис. 3 Относительное содержание ДНК в децеллюляризированных тканях сердца (А) и диафрагмы (Б)

Морфологический анализ. Гистологическая оценка парафиновых срезов нативной сердечной и поперечно-полосатой мышечной ткани диафрагмы выявила известные структурные особенности данных тканей. В тоже время, при исследовании криосрезов пришлось констатировать значительные изменения в структуре нативной ткани, нарушение ее гистоархитектоники вследствие низкого качества сохранности структуры, что выражалось в появлении артифициальных пространств между отдельными клетками и (или) волокнами, дискомплексация, фрагментация.

Окраска гематоксилином и эозином не показала наличия ядер и других клеточных элементов в децеллюляризированных тканях сердца и диафрагмы при морфологическом исследовании парафиновых срезов (рис. 4, 5). Более того, взаимная ориентация волокон ВКМ не отличилась от контроля (нативные органы), отсутствовали признаки деградации коллагена.

Морфологический анализ парафиновых срезов мышечной ткани после децеллюляризации показал отсутствие клеток и ядер. Архитектоника межволокнистой соединительной ткани оставалась неизменной, сохранялась адвентициальная оболочка мелких сосудов. Децеллюляризированная ткань в сравнении с нативной фактически не окрашивалась как оксифильным, так и базофильным красителями. Исследование криосрезов также показало отсутствие ядер в децеллюляризированной ткани, но не давало достоверных сведений о сохранности ее гистоархитектоники, что затрудняло выбор и оценку протокола децеллюляризации (рис. 6, 7).

При окрашивании флуорофором DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндолом) в парафиновых и замороженных срезах нативных органов отмечалось интенсивное свечение ядерных структур, в децеллюляризированных – свечение полностью отсутствовало, как в сердце, так и в диафрагме.

Исследование ультраструктуры. В образцах нативных тканей изученных как со стороны перимизия, так и со стороны поперечных срезов мышечной ткани визуализировалась структура миокарда и диафрагмы, отмечалось наличие клеток и межклеточного вещества. В децеллюляризированных органах при сохранности пористой структуры ВКМ клетки не обнаруживались, был обнажен волокнистый матрикс (рис. 8, 9).

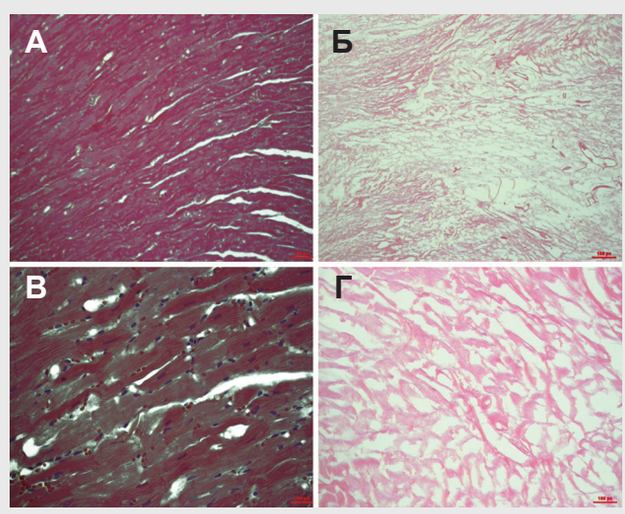

Рис. 4. Сердечная мышечная ткань до (А, В) и после (Б, Г) децеллюляризации, парафиновые срезы. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А, Б ×10, В, Г ×40

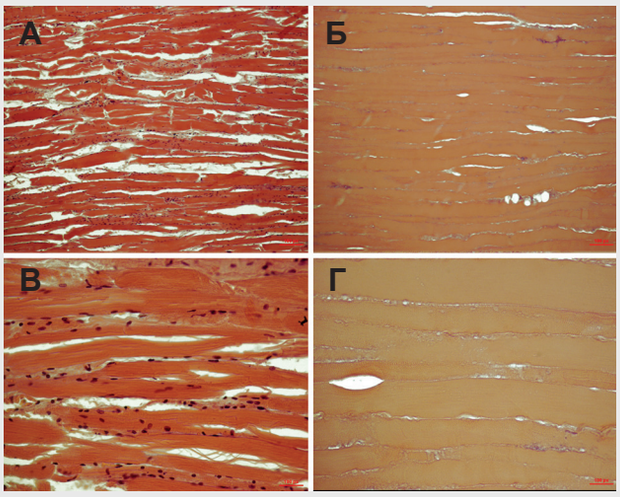

Рис. 5. Поперечно-полосатая мышечная ткань диафрагмы до (А, В) и после (Б, Г) децеллюляризации, парафиновые срезы. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А, Б ×10, В, Г ×40

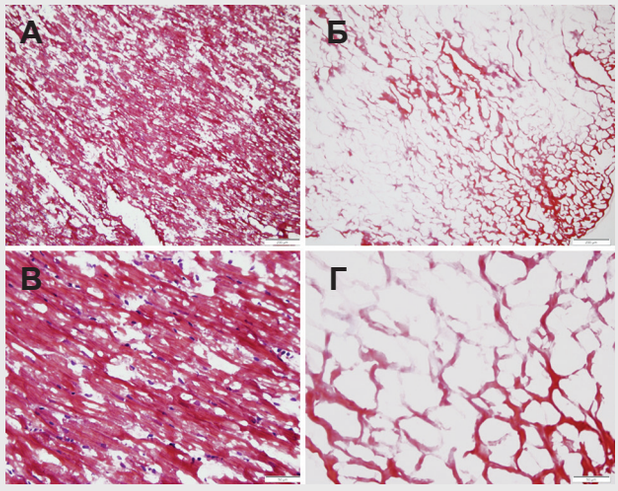

Рис. 6. Сердечная мышечная ткань до (А, В) и после (Б, Г) децеллюляризации, криосрезы. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А, Б ×10, В, Г ×40

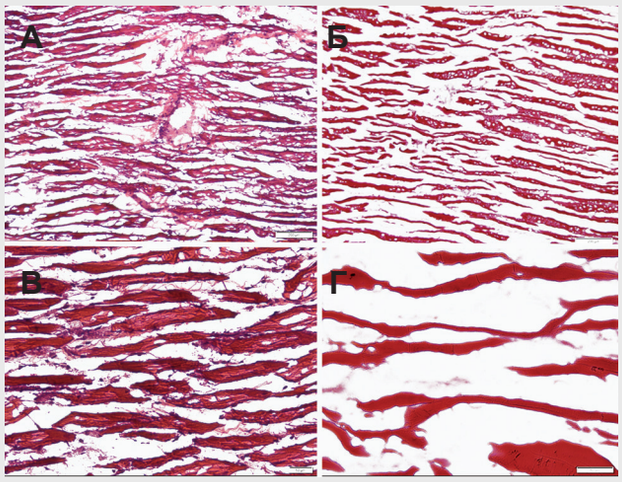

Рис. 7. Поперечно-полосатая мышечная ткань диафрагмы до (А, В) и после (Б, Г) децеллюляризации, криосрезы. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А, Б ×10, В, Г ×40

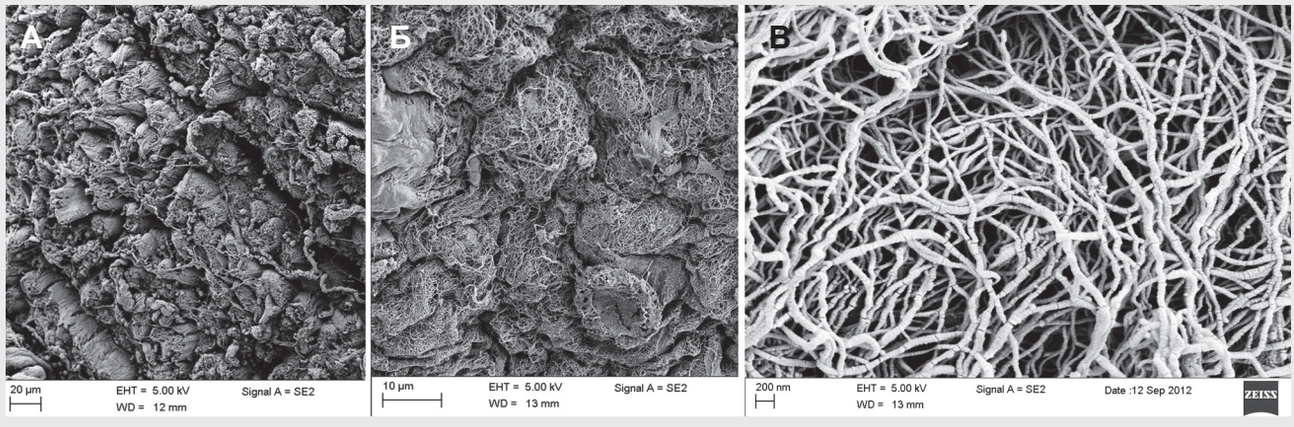

Рис. 8. Сердце до (А) и после (Б, В) децеллюляризации. СЭМ

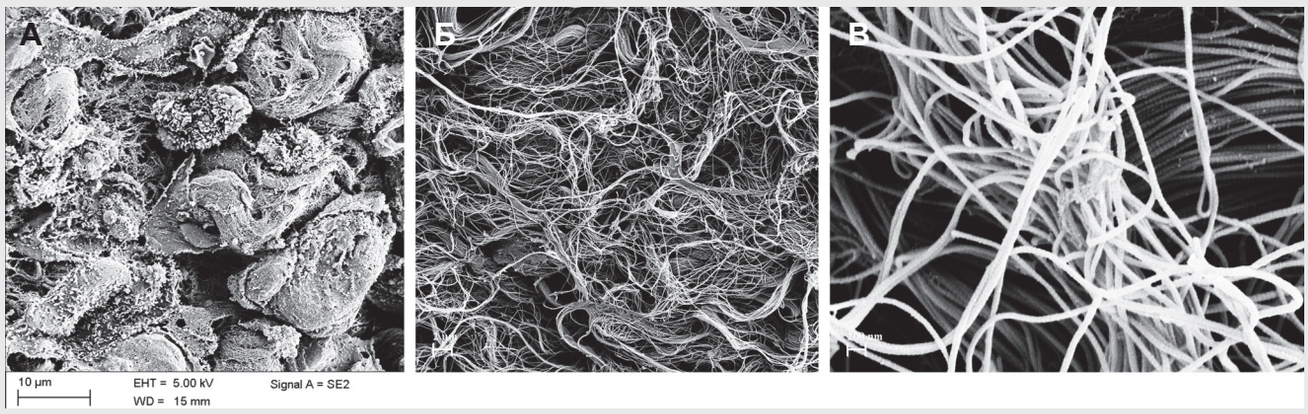

Рис. 9. Диафрагма до (А) и после (Б, В) децеллюляризации. СЭМ

Обсуждение

Децеллюляризированные донорские органы не должны содержать клеток, включая клеточные компоненты: цитоплазму и ядра. Их присутствие в ВКМ может способствовать нарушению клеточной биосовместимости in vitro и вызывать побочные реакции в условиях in vivo при последующей рецеллюляризации [16, 17]. Поскольку при методах децеллюляризации невозможно удалить 100% клеток, существуют различные методы количественной оценки оставшихся компонентов клеток, таких как ДНК, митохондрии или мембран-ассоциированные молекулы, например, фосфолипиды. Пороговая концентрация остаточного клеточного материала в ВКМ, которая может быть достаточной для развития нежелательного эффекта, не была подробно изучена и может изменяться в зависимости от источника ВКМ, типа ткани, в которую он был имплантирован, и иммунной системы реципиента. В настоящее время не определены количественные критерии эффективности децеллюляризации. Основываясь на результатах исследований, в которых изучалось развитие ремоделирующего эффекта и возникновение побочных явлений на клеточном и организменном уровнях, были предложены следующие минимальные критерии для оценки эффективности децеллюляризации [11]:

1) <50 нг двухцепочечной ДНК в 1 мг сухого веса внеклеточного матрикса;

2) фрагменты ДНК длиной <200 пар нуклеотидов [18, 19];

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 [16, 20]. Содержание в ткани нуклеиновых кислот легко оценить; полученные данные в этом случае дают основания к формированию представлений об остаточном количестве клеток обработанной ткани. Данные критерии вычисляются с помощью коммерчески доступных интеркаляторов, таких как PicoGreen [21], пропидий йодид, бисбензимид или гелевый электрофорез. Третий критерий оценивается путем рутинных морфологических методов исследования, которые служат качественной проверкой первых двух критериев.

При работе с родственными видами тканей мы столкнулись с проблемой выбора оптимальных протоколов децеллюляризации для минимизации структурных повреждений ВКМ и эффективного удаления клеточного дебриса, что должно приводить к снижению антигенности каркаса. Нами применялись различные подходы к выбору протоколов (метод перфузии для сердца и ротационный метод для диафрагмы), времени экспозиции детергентов и энзимов для проведения децеллюляризации, последовательности их применения. Мы также выбирали протоколы, которые были бы наиболее применимы к внедрению в клинику.

Количественное определение ДНК в тканях сердца и диафрагмы, децеллюляризированных по используемым нами протоколам, показало существенное снижение ее содержания. При работе с новыми протоколами нам удалось уменьшить содержание ДНК до уровня ниже порогового, равного 50 нг/мг, который считается [20] необходимым критерием хорошей децеллюляризации и отсутствия иммуногенности. Проведенный нами анализ количественного содержания ДНК продемонстрировал, что ее уровень после децеллюляризации составил 30,10±13,77 нг/мг в ткани сердца и 44,76±23,25 нг/мг в диафрагме. Морфологическая оценка парафиновых срезов децеллюляризированного ВКМ сердца и диафрагмы показала отсутствие клеток. Сохранность архитектоники позволяла выявлять отличительные гистологические особенности, характерные как для сердечной, так и для скелетной мышцы.

Оценивать эффективность протоколов децеллюляризации на криосрезах было сложно. При окраске гематоксилином и эозином в децеллюляризированных органах ядра отсутствовали, однако структура была повреждена. Это могло быть воспринято, как следствие воздействия используемых детергентов, но, вероятнее всего, было связано с несовершенством метода подготовки ткани к гистологическому исследованию, агрессивным ее замораживанием-размораживанием, сопровождающимся значительным повреждением, кроме того, получаемые криосрезы были толще по сравнению с парафиновыми. Данный метод применим для проведения экспресс-диагностики, так как прост в использовании и не

требует длительной кропотливой работы, но для оценки качества протоколов децеллюляризации не является идеальным. Таким образом, использование криосрезов усложняло визуализацию и не объясняло, что является причиной повреждения ткани: действие детергента или перепада температур. Необходимо добавить, что отсутствие традиционных морфологических ориентиров в структуре децеллюляризированных органов затрудняло проведение анализа как на замороженных, так и на парафиновых срезах, поскольку рутинные методы гистологической окраски более адаптированы к исследованию нативной ткани. Поэтому данные микроскопической оценки важно подтверждать результатами молекулярно-биологического анализа и СЭМ.

Заключение

Использованы модифицированные протоколы, которые позволяли сокращать время воздействия детергентов и энзимов, включали в себя различные реагенты и ускоряли процесс децеллюляризации в целом. Криосрезы не позволяли достаточно подробно охарактеризовать децеллюляризированный ВКМ. Для более полной морфологической оценки эффективности протоколов децеллюляризации необходимо использовать парафиновые срезы, а также СЭМ, поскольку полученные нами результаты продемонстрировали, что криосрезы, существенно разрушая ткань, не могут дать полное представление о ее гистоархитектонике. Не менее важным является и количественное определение уровня остаточного содержания ДНК в тканях после децеллюляризации, который не должен превышать 50 нг/мг [20].

Использование только лишь этих методов не может дать полное представление обо всех свойствах, которыми обладает ВКМ децеллюляризированного органа, таких как механические и иммунологические. Таким образом, следует продолжать изучение каркасов с помощью других методов исследования, таких как, иммуногистохимического исследования с изучением содержания ламинина, фибронектина, коллагена, эластина, MHC-I, MHC-II; проведения биомеханического теста, показывающего сохранность механических свойств каркаса и, конечно, проверки ответной реакции целостного организма на введение децеллюляризированной ткани сердца и диафрагмы при выполнении теста подкожной имплантации; проведения исследования активных форм кислорода для оценки оксидативного стресса и анализа результатов хорионаллантоисного теста для in vivo оценки проангиогенных свойств матриксов децеллюляризированных сердца и диафрагмы.

Благодарности

Работа частично финансирована грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в Российских образовательных учереждениях высшего профессионального образования от 19 октября 2011 г. №11. G34.31.0065. Работа выполнена на оборудовании Ведущего центра трансляционной регенеративной медицины (ACTREM) Каролинского Института (Швеция).

Литература:

1. Мировая статистика здравоохранения. ВОЗ. 2011. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics.
2. Fuchs J.R., Nasseri B.A., Vacanti J.P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. Ann. Thorac. Surg. 2001; 72: 577–91.
3. McIntire L.V., Greisler H.P., Griffith L. et al., WTEC Panel Report on Tissue Engineering Research. Final report. Baltimore, MD: International Technology Research Institute. 2002 Jan.
4. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Science.1993; 260: 920–6.
5. Skalak R., Fox C., editors. NSF Workshop, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. 1988.
6. Amulya S. Tissue engineering: Present concepts and strategies. Journal of Indian Association of Pediatric Surgery. 2005; 10: 14-9.
7. Atala A. Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends Expert opinion on biological therapy. 2005; 5: 879.
8. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds, Annu. Rev. Biomed. 2011; 13: 27–53.
9. Ott H., Taylor D., inventors; Regents of the University of Minnesota, assignee. Decellularization and recellularization of organs and tissues. US patent 20090202977. 2009 Aug 13.
10. Conconi M.T., De Coppi P., Bellini S. et al. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. Biomaterials. 2005; 26: 2567–74.
11. Macchiarini P., Jungebluth P., Go T. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. Lancet. 2008; 372: 2023–30.
10. Ott H.C., Matthiesen T.S, Goh S.K. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nat. Med. 2008; 14: 213–21.
11. Badylak S.F., Crapo P.M., Gilbert T.W. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011; 32: 3233–43.
12. Andrew P. P., England K.A., Matson A.M. et al. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. Tissue engineering. Part A. 2010; 16: 2581–91.
13. Badylak S.F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Biomaterials. 2007; 28: 3587–93.
14. http://www.nanodrop.com
15. http://www.qiagen.com
16. Nagata S., Hanayama R., Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. Cell. 2010; 140(5): 619–30.
17. Zhang Q., Raoof M., Chen Y. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature 2010; 464(7285): 104–7.
18. Brown B.N., Barnes C.A., Kasick R.T. et al. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. Beer-Stolz D. Biomaterials. 2010; 31: 428–37.
19. Brown B.N., Valentin J.E., Stewart-Akers A.M. et al. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. Biomaterials. 2009; 30(8): 1482–91.
20. Zheng M.H., Chen J., Kirilak Y. et al. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation. J Biomed. Mater. Res. 2005; 73(1): 61–7.
21. Ahn S.J., Costa J., Emanuel J.R. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. Nucleic Acids Res. 1996; 24(13): 2623–5.

Поступила