

УДК 611.24:611.018.6–073.584–092.9

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ  
И РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ  
МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ**

**Е. А. Губарева<sup>1</sup>, Е. В. Куевда<sup>1</sup>, А. Х. Каде<sup>1</sup>, И. М. Быков<sup>1</sup>,  
И. И. Павлюченко<sup>1</sup>, Т. В. Гайворонская<sup>1</sup>, А. Н. Сидоренко<sup>1</sup>, О. В. Цымбалов<sup>1</sup>,  
В. Г. Овсянников<sup>1</sup>, В. В. Мясникова<sup>1</sup>, Д. И. Шашков<sup>2</sup>, С. С. Джима<sup>2,\*</sup>**

Представлено академиком РАН В.А. Ткачуком 03.10.2018 г.

Поступило 15.10.2018 г.

Установлено, что показатели интенсивности хемилюминесценции в нативных и рецеллюляризованных тканях мышечных органов крыс, а также в их децеллюляризованных матриксах могут служить одним из экспресс-критериев, позволяющих наряду с ультраструктурным анализом осуществлять количественную оценку жизнеспособности клеточных структур в биологических образцах диафрагмы.

*Ключевые слова:* хемилюминесценция, внеклеточный матрикс, рецеллюляризация, диафрагма, свободные радикалы.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524846764-767>

Одной из многообещающих стратегий в современной трансплантологии может стать тканеинженерный подход для создания конструкций, способных структурно и функционально соответствовать нативным органам [1]. Оценка качества полученных каркасов, основанная на изучении жизнеспособности клеточных структур в децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриксах, является важнейшей задачей современной регенеративной медицины [2]. Известно значение реакций свободнорадикального окисления в регуляции биологических процессов, в том числе обеспечивающих жизнедеятельность клеток, их рост, дифференцировку и старение [3, 4]. В связи с этим исследование показателей интенсивности образования свободных радикалов в нативных и рецеллюляризованных тканях органов человека и животных, а также в децеллюляризованных матриксах может служить одним из экспресс-критериев, позволяющих осуществлять количественную оценку жизнеспособности клеточных структур. Указанные параметры позволят определять качество выполненных мероприятий при децеллюляризации тканей и после рецеллюляризации матрикса аллогенными или аутологичными клетками. В живых клетках при физиологических условиях стационарная концентрация

свободных радикалов достаточно низкая, тем не менее современные способы их обнаружения и идентификации позволяют выявлять их с высокой точностью [5]. Метод хемилюминесценции является весьма чувствительным для обнаружения свободных радикалов, так как определяет не стационарную их концентрацию, а скорость реакции, при которой они образуются [5–7], что расширяет возможности экспресс-изучения особенностей свободнорадикального окисления в нативных, децеллюляризованных и рецеллюляризованных тканях мышечных органов.

Цель настоящей работы — разработка нового эффективного биофизического способа оценки степени децеллюляризации внеклеточного матрикса и жизнеспособности клеточных структур рецеллюляризованных мышечных тканей, основанного на ультраструктурном анализе и количественной оценке интенсивности генерации в них свободных радикалов.

Протоколы экспериментальных исследований на животных на базе лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины Кубанского государственного медицинского университета были одобрены локальным Этическим комитетом (Краснодар, протокол № 21/1). Перед выполнением оперативных вмешательств животным внутрибрюшинно вводили летальную дозу барбитуратов (150 мг/кг), за час до операции инъекировали гепарин в дозе 100 ЕД. После эксплантации

<sup>1</sup> Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

<sup>2</sup> Кубанский государственный университет, Краснодар

\*E-mail: [jimack@mail.ru](mailto:jimack@mail.ru)

диафрагмы выполняли направленную децеллюляризацию детергент-энзиматическим методом по разработанным ранее протоколам [1, 8, 9]. Образцы нативной и децеллюляризированной диафрагмы крыс фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном фосфатами формалине, дегидратировали и заключали в парафин по стандартной методике с помощью автоматического гистопроцессора Leica TP1020 (“Leica Biosystems”, Германия) и модульной установки Leica EG1150H (“Leica Biosystems”). Белки внеклеточного матрикса визуализировали с помощью иммуногистохимического анализа. В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела против эластина (ab21610, “Abcam”, Великобритания), коллагена типа IV (ab6586, “Abcam”), коллагена типа I (ab34710, “Abcam”), ламинина (ab11575, “Abcam”), фибронектина (ab6328, “Abcam”). Полученные микропрепараты анализировали с помощью микроскопа Olympus IX51 (“Olympus”, Япония).

Изучение свободнорадикального окисления проводили с помощью аппаратно-программного комплекса Хемилюминометр Lum-5773 (МГУ, Россия) и программы PowerGraph 3.x Professional [5, 6]. При подготовке к исследованию регистрировали фоновое свечение (ФС) хемилюминометра при пустом кюветном отделении и далее определяли светосумму собственной хемилюминесценции (ССХ) биообъекта; светосумму индуцированной хемилюминесценции (СИХ), которую инициировали путём введения в кювету 0,3%-го раствора перекиси водорода в объёме 100 мкл; максимальную интенсивность индуцированной хемилюминесценции (МИИХ); восходящий и нисходящий наклоны вспышки индуцированной хемилюминесценции (вНВХ и нНВХ). Затем рассчитывали произведение вНВХ × нНВХ, полученные результаты выражали в условных единицах. При выполнении измерений использовали стеклянные кюветы диаметром 10 ± 1 мм и высотой от 30 до 70 мм. Диаметр исследуемых биологических образцов ткани составлял 6,0 ± 0,5 мм, толщина 4,0 ± 0,5 мм.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью методов вариационной статистики. Статистически достоверными полагали различия при  $p \leq 0,05$ .

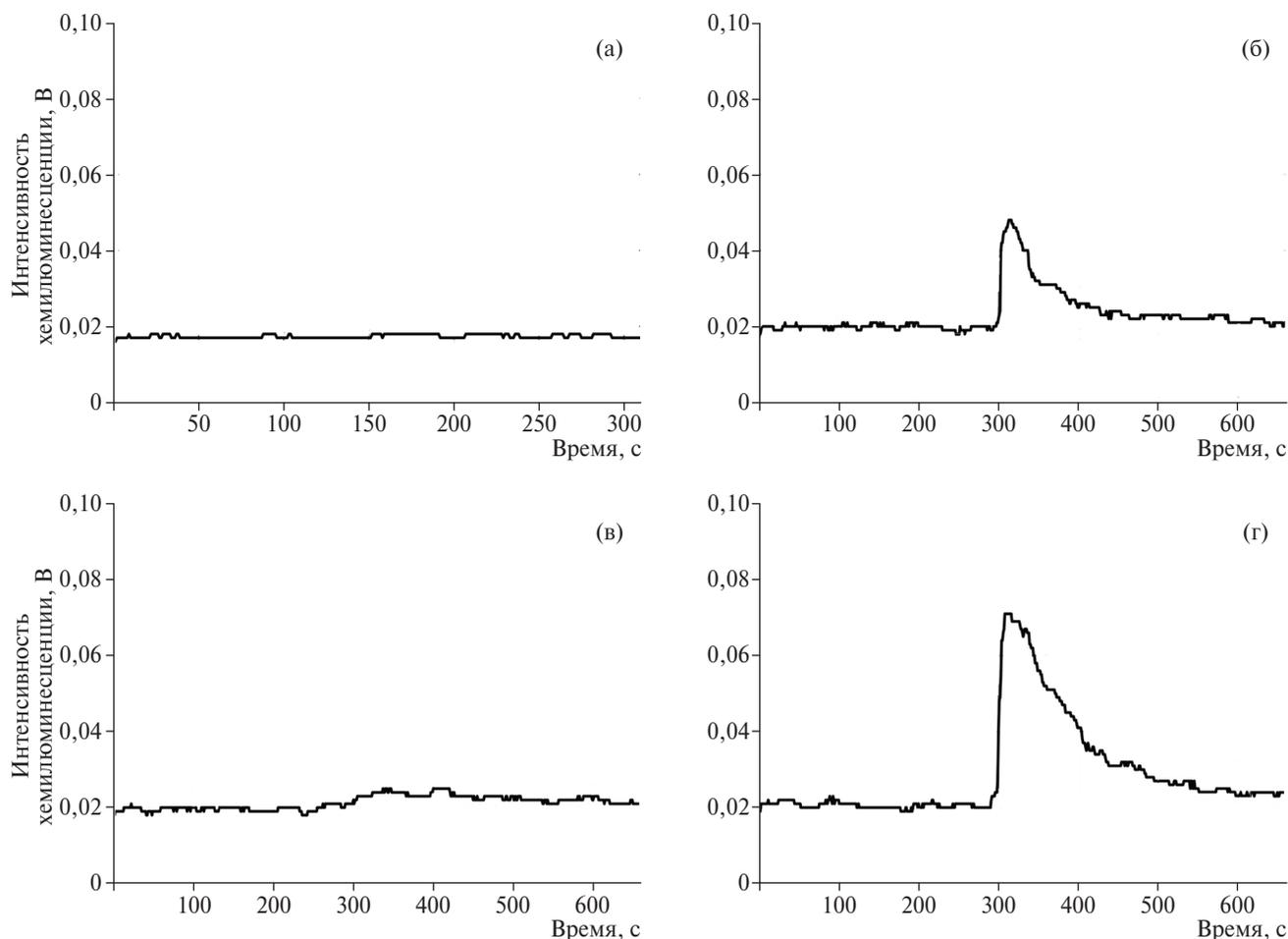
Имуногистохимическое исследование внеклеточного матрикса не показало выраженных качественных изменений его состава (данные не представлены). Показатель ССХ нативной ткани диафрагмы был в 1,75 раза меньше, чем для децеллюляризированной ткани, и был равен 1,137 усл. ед.

После добавления к тканям 0,3%-го раствора перекиси водорода мы наблюдали изменение площади хемилюминесценции: СИХ децеллюляризованного матрикса диафрагмы была ниже на 47% по сравнению с такой нативной ткани (59,8 усл. ед.). Значение МИИХ нативных тканей диафрагмы достоверно не отличалось от МИИХ децеллюляризированной ткани.

Таким образом, в образцах рецеллюляризированной диафрагмы мы обнаружили выраженный рост всех исследуемых показателей, что может свидетельствовать о наличии в рецеллюляризованных тканях значительного количества жизнеспособных клеток (рис. 1), обладающих повышенной биохимической активностью [10]. Весьма вероятно, что в децеллюляризованной ткани диафрагмы происходит генерация свободных радикалов в большем количестве, чем в клетках нативных тканей. Это приводит к превалированию прооксидантных факторов в регенерированных тканях, что является, по-видимому, одной из причин меньшей устойчивости рецеллюляризованных клеток по сравнению с аналогичными нативными клетками к неблагоприятным внешним воздействиям в процессе их хранения.

Мы также выявили достоверные изменения показателей хемилюминесценции нативных, децеллюляризованных и рецеллюляризованных тканей мышечных органов при изучении формы индуцированной вспышки хемилюминесценции. Для нативных и рецеллюляризованных тканей, в отличие от децеллюляризованных тканей, во всех без исключения изученных в настоящей работе случаях было характерно резкое нарастание вНВХ, а затем выраженное снижение нНВХ (табл. 1). Произведение вНВХ × нНВХ было всегда достоверно выше (на 99%) у нативных тканей диафрагмы такого децеллюляризованных тканей. Ещё более высокое значение этого показателя было характерно для рецеллюляризованных тканей: он был больше вНВХ × нНВХ нативных тканей на 568%. Таким образом, используемый в работе параметр вНВХ × нНВХ позволяет достаточно объективно контролировать эффективность децеллюляризации и рецеллюляризации в мышечных органах с помощью хемилюминесценции.

Итак, на основании полученных результатов мы установили, что хемилюминесценция является методом, позволяющим наряду с ультраструктурным анализом дифференцировать нативные, децеллюляризованные и рецеллюляризованные ткани мышечных органов. Мы также впервые обнаружили,



**Рис. 1.** Показатели хемилюминесценции нативной (б), децеллюляризованной (в), рецеллюляризованной (г) ткани диафрагмы крысы, измеренные после регистрации фонового значения (а) хемилюминесценции.

**Таблица 1.** Показатели восходящего и нисходящего наклонов индуцированной  $H_2O_2$  вспышки хемилюминесценции нативных, децеллюляризованных и рецеллюляризованных тканей диафрагмы

Объект	$P_{25}$	$M$	$P_{75}$
вНВХ диафрагмы (нативная, $n = 5$ )	$2,993 \cdot 10^{-3}$	$3,164 \cdot 10^{-3}$	$3,743 \cdot 10^{-3}$
вНВХ диафрагмы (децеллюляризованная, $n = 5$ )	$2,899 \cdot 10^{-3}$	$3,016 \cdot 10^{-3}$	$3,132 \cdot 10^{-3}$
вНВХ диафрагмы (рецеллюляризованная, $n = 4$ )	$1,115 \cdot 10^{-2}$	$1,337 \cdot 10^{-2}$	$1,559 \cdot 10^{-2}$
нНВХ диафрагмы (нативная, $n = 5$ )	$-1,466 \cdot 10^{-4}$	$-1,396 \cdot 10^{-4}$	$-1,341 \cdot 10^{-4}$
нНВХ диафрагмы (децеллюляризованная, $n = 5$ )	$-7,080 \cdot 10^{-5}$	$-6,665 \cdot 10^{-5}$	$-6,251 \cdot 10^{-5}$
нНВХ диафрагмы (рецеллюляризованная, $n = 4$ )	$-2,523 \cdot 10^{-4}$	$-2,137 \cdot 10^{-4}$	$-1,751 \cdot 10^{-4}$

Примечание.  $M$  — средняя арифметическая,  $P$  — перцентиль.

что графики хемилюминесценции нативных и рецеллюляризованных тканей диафрагмы достоверно отличались от графиков хемилюминесценции тех же мышечных тканей после децеллюляризации. Наиболее показательной в этом отношении была регистрация параметра вНВХ  $\times$  нНВХ. По этому признаку исследуемые ткани диафрагмы можно расположить в следующий ряд: децеллюляризованные ткани < нативные ткани < рецеллюляризованные ткани, что позволяет рекомендовать

вНВХ  $\times$  нНВХ в качестве основного критерия оценки эффективности проведения как децеллюляризации, так и рецеллюляризации.

**Источники финансирования.** Работа выполнена при поддержке комплексной НИР “Клеточные механизмы регенерации интрапаторакальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов” и государственного задания Министерства образования и науки РФ, проект № 6.5882.2017/БЧ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gubareva E.A., Sjöqvist S., Gilevich I.V., et al. // *Bio-materials*. 2016. V. 77. P. 320–335.
2. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. // *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2011. V. 13. P. 27–53.
3. Скулачев В.П. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. № 7. С. 827–846.
4. Джатдоева А.А., Полимова А.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // *Вестн. Рос. гос. мед. ун-та*. 2016. № 1. С. 54–60.
5. Sozarukova M.M., Polimova A.M., Proskurnina E.V., Vladimirov Y.A. // *Biophysics*. 2016. V. 61. № 2. P. 284–290.
6. Izmailov D.Y., Proskurnina E.V., Shishkanov S.A., et al. // *Biophysics*. 2017. V. 62. № 4. P. 557–564.
7. Bykov I.M., Basov A.A., Malyshko V.V., et al. // *Bull. Exp. Biol. and Med.* 2017. V. 163. № 2. P. 268–271.
8. Kuevda E., Gubareva E., Gilevich I., et al. // *Proc. World Conf. on Regenerative Medicine // Regenerative Medicine*. 2013. V. 8. Suppl. 6. P. 21.
9. Sotnichenko A.S., Gubareva E.A., Gilevich I.V., et al. // *Cell. Transplant. and Tissue Eng.* 2013. V. 8. № 3. P. 86–94.
10. Psaltis P.J., Peterson K.M., Xu R., et al. // *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013. V. 6. № 7. P. 795–802.

**QUALITY ASSESSMENT OF DECELLULARIZATION  
AND RECELLULARIZATION OF TISSUE-ENGINEERING CONSTRUCTIONS  
BY THE CHEMILUMINESCENCE METHOD**

**E. A. Gubareva, E. V. Kuevda, A. Kh. Kade, I. M. Bykov, I. I. Pavlyuchenko,  
T. V. Gaivoronskaya, A. N. Sidorenko, O. V. Tsymbalov, V. G. Ovsyannikov,  
V. V. Myasnikova, D. I. Shashkov, S. S. Dzhimak**

Presented by Academician of the RAS V.A. Tkachuk October 3, 2018

Received October 15, 2018

It has been established that indicators of the intensity of chemiluminescence in the native and muscle cellized tissues of rat muscular organs, as well as in their decellularized matrices, can serve as one of the express criteria that allows, along with ultrastructural analysis, to quantify the viability of cell structures in biological samples of the diaphragm.

*Keywords:* chemiluminescence, extracellular matrix, recellularization, diaphragm, free radicals.