

А.А. Кокорина¹, С.В. Кромский², А.В. Кривенцов¹,
Е.В. Михайлова², Н.В. Пак¹, А.А. Кондратенко¹,
Л.П. Сигарева², В.С. Сидорин¹, О.В. Костина¹,
Л.С. Онищенко¹, В.Н. Александров^{1,2}

Децеллюляризованный матрикс тонкой кишки. Технология получения, оценки и направления использования

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

Резюме. Матрикс (скаффолд, матрица, каркас, шаблон) – биорезорбируемый или небiorезорбируемый материал, который *in/ex vivo* может быть заполнен стволовыми или соматическими клетками с целью получения тканеинженерной конструкции для восстановления утраченного органа, части органа, ткани. Естественно, что для достижения конструкцией морфофункциональных свойств копируемого органа, части органа, ткани матрикс ее должен быть в необходимой степени прочным, неиммуногенным, биоактивным. Для того чтобы ткань могла прорасти в трех измерениях, матрица должна быть пористой. Причем пористость матрикса должна быть открытой, а диаметр пор должен превышать диаметр клеток, составляя около 100 мкм, то есть иметь размер, достаточный для миграции клеток по всему матриксу, их питания и ангиогенеза, а также выведения продуктов метаболизма. Более того, поверхность матрицы должна быть шероховатой, и, что особо важно, матрикс должен содержать эндо- или экзогенного происхождения факторы хемотаксиса, адгезии клеток, их пролиферации, дифференцировки. В этом контексте на примере создания персонафицированного децеллюляризованного матрикса тонкой кишки освещается ряд принципиальных вопросов. Прежде всего это вопросы, касающиеся выбора материала матрикса, технологии его получения, оценки матрикса в соответствии с критериями, отвечающими матрице для тканевой инженерии, и возможных направлений его использования. В конечном итоге методом детергентно-ферментной перфузионной децеллюляризации удалось получить персонафицированный неиммуногенный внеклеточный матрикс тонкой кишки, достаточный по своим характеристикам для использования в разных направлениях приложения тканевой инженерии, включая пластику дефектов кожных покровов, слизистых оболочек, тонкой кишки и пр.

Ключевые слова: тканевая инженерия, матрица, матрикс, скаффолд, тонкая кишка, синдром короткой кишки, бесклеточная матрица, децеллюляризация, биоматериалы.

Введение. На пороге нынешнего века развивающиеся биология и медицина выдвинули задачи, нацеленные на поиск материалов, способных заменить органы и ткани человека. Решение подобных задач сопряжено с глубоким пониманием основных положений медицины, цитологии, биофизики, химии, на стыке которых возникло такое направление современных клеточных технологий, как тканевая инженерия, ключевой задачей которой является разработка тканеинженерных конструкций – прообразов органов и тканей человека. Тканеинженерная конструкция включает матрицу-носитель, а также стволовые или соматические клетки. Получить матрицу можно методом децеллюляризации, то есть удалением клеток из исходной нативной ткани/органа, что делает ее неиммуногенной, а при использовании оптимального протокола децеллюляризации и идентичной по своим морфофункциональным свойствам матрице копируемого органа [3]. Методом децеллюляризации авторами ранее были получены каркасы кровеносного сосуда и трахеи [1].

Цель исследования. Разработать протокол получения децеллюляризованного матрикса (ДЦМ)

тонкой кишки, отвечающего свойствам матрицы для тканевой инженерии.

Материалы и методы. В работе использовали 12 крыс-самцов линии Вистар с массой тела 200–300 г из питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург). Крыс содержали в отдельных клетках со свободным доступом к воде, корму и при стандартном суточном режиме освещения. Работу с лабораторными животными осуществляли в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23.08.2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» [2].

Животных-доноров тонкой кишки (ТК) усыпляли летальной дозой эфира через 30 мин после интраперитонеальной инъекции гепарина (1250 МЕ). Выполняли тотальную срединную лапаротомию, ТК извлекали из брюшной полости и укрывали марлевой салфеткой, пропитанной физиологическим раствором. Верхнюю брыжеечную артерию (*arteria mesenterica cranialis* крысы – аналог *arteria mesenterica superior* человека) мобилизовали, в просвет ее вводили канюлю 26G, фиксировали шовным материалом (рис. 1).

Тонкую кишку с брыжейкой извлекали, в просвет ее вводили обрезанную пипетку Пастера, которую фиксировали шовным материалом. Через нее физиологическим раствором с гентамицином (50 мкг/мл) из кишки вымывали содержимое.

К перистальтическому насосу «Minipuls 3» фирмы «Gilson» (Соединенные Штаты Америки – США) силиконовыми трубками подключали пипетку Пастера для промывания просвета кишки со скоростью 60 мл/мин. Шприцевый дозатор «MP-2003» фирмы «Армед» (Россия) и канюлю, введенную в верхнюю брыжеечную артерию, использовали для перфузии со скоростью 1 мл/мин. Протокол децеллюляризации включал последовательную обработку деионизированной водой, 1% Triton X-100 и 1% додецилсульфатом натрия. Обработка гипотоническим раствором, предшествующая протоколу, обеспечивала заключительную очистку кишки от дебриса и первичное разрушение клеток, а последний этап протокола способствовал отмывке матрикса от децеллюляризирующих агентов (табл. 1).

Таблица 1

Протокол децеллюляризации тонкой кишки крысы

Реагент	Длительность обработки, ч
Деионизированная вода	4
1% Triton X-100	15
Деионизированная вода	1
1% додецилсульфат натрия	8
Фосфорно-солевой буфер	16

Стерильность полученного матрикса оценивали визуально. В стерильную питательную Дульбекко модифицированную среду Игла (DMEM), содержащую феноловый красный, фирмы «Биолот» (Россия) помещали фрагмент каркаса массой до 0,1 г, который инкубировали 7 суток при 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали аналогичные пробирки с добавлением 1 мл стерильного физиологического раствора.

После децеллюляризации проводили гистологическое исследование разных участков матрикса (проксимального, дистального и срединного). Фрагменты помещали в 10% нормальный забуференный формалин и после стандартной гистологической проводки изготавливали парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм для окрашивания гематоксилином и эозином, а также 4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлоридом (DAPI) – тропным к нуклеиновым кислотам флуоресцентным красителем. Сравнение проводили с гистологическими препаратами нативной ТК крысы.

Количественное определение нуклеиновых кислот (НК) проводили по стандартной методике в нативной ТК крысы и в полученном ДЦМ. НК выделяли из сухого материала известной массы с использованием коммерческого набора «Genomic DNA Purification Kit» фирмы «Thermo scientific» (США). Оптическую плотность измеряли с использованием спектрофотометра «EPOCH2» фирмы «BioTek» (США) при длинах

волн 260 и 280 нм, результат вычисляли как частное этих значений.

Сохранность микроархитектоники каркаса исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа «Н-600» фирмы «Hitachi» (Япония). Материал фиксировали по стандартной методике. Полутонкие срезы (1–2 мкм) и ультратонкие срезы (30–70 нм) получали на ультратоме «Reichert-Jung» фирмы «Heidelberg» (Германия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца.

Оценку цитотоксичности матрикса проводили на дермальных фибробластах человека с использованием МТТ-теста (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид). Клетки культивировали в DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки фирмы «HyClone» (Новая Зеландия) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина фирмы «Gibco» (США) в монослое при 37°C и 5% CO₂, меняя среду каждые трое суток. Лунки 96-луночного планшета заполняли кусочками ДЦМ площадью примерно 0,75 мм². Затем в лунки вносили 4×10³ фибробластов, в качестве контроля использовали лунки, содержащие ДЦМ, но не клетки. Через двое суток проводили МТТ-тест: к DMEM добавляли МТТ до концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали 4 ч. Затем среду убирали, а формазан растворяли в диметилсульфоксиде, перемешивали на шейкере и оценивали оптическую плотность при длине волны 570 нм.

Оценку механической прочности ДЦМ проводили методом растяжения на испытательной машине «AGS-X» фирмы «Shumadzu» (Япония). Вычисляли максимальную нагрузку, при которой происходит разрыв ДЦМ в сравнении с интактной тканью ТК крысы.

Результаты и их обсуждение. Выбор агентов для децеллюляризации, а также использование перфузионного метода с одновременной перфузией сосудистой системы ТК и ее просвета позволили получить стерильный прозрачный цельный матрикс ТК с сохранной сосудистой системой (рис. 2).

Использование комбинации неионного и ионного детергентов, гипотонической жидкости, подбор оптимальной скорости подачи рабочих растворов способствовали сохранности микроархитектоники ТК, но не клеточного материала. Действительно, если слизистая нативной тонкой кишки имеет типичное для нее строение: бархатистый вид от покрывающих ее многочисленных кишечных ворсинок – отростков слизистой, покрытых цилиндрическим эпителием, то гистология децеллюляризированной кишки отличается от таковой нативной кишки только отсутствием клеточного материала и внутриклеточных структур, в частности НК (рис. 3).

Электронные фотографии ДЦМ дают также возможность отметить его полную сохранность – отсутствие явных повреждений – деформаций, разрывов и, кроме того, каких-либо остатков внутриклеточных структур, включая ДНК (рис. 4).

НК считаются основными компонентами децеллюляризированной ткани, способными вызвать иммун-

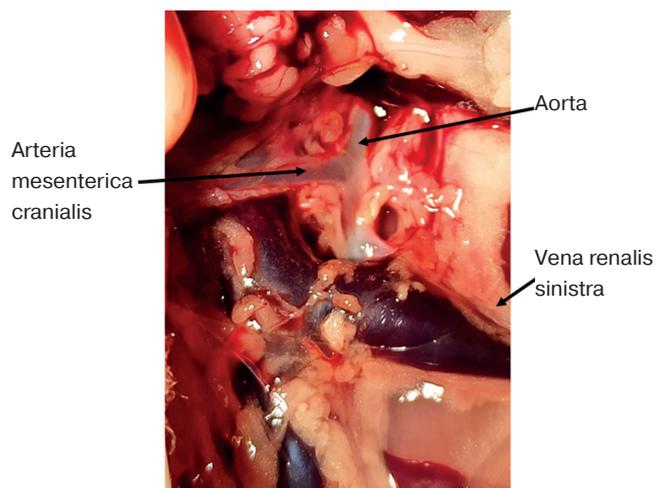


Рис. 1. Канюлирование a. mesenterica cranialis



Рис. 2. Внешний вид тонкой кишки на разных этапах эксперимента: а – нативная ТК крысы, б – ДЦМ, в – окрашивание сосудистой сети трипановым синим

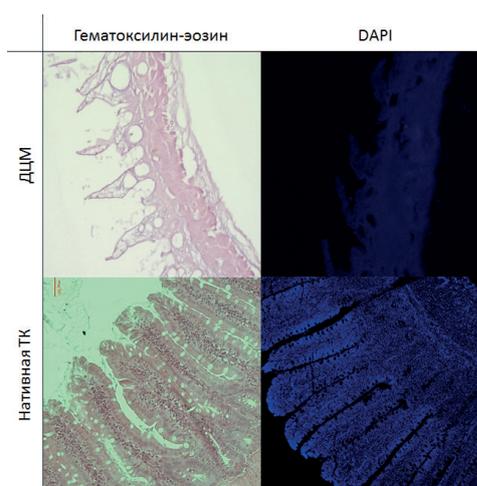


Рис. 3. Морфология ДЦМ и нативной ТК, ув. $\times 100$

ную реакцию с риском отторжения трансплантата. Содержание ее в продуктах подобного рода должно быть менее 50 нг/мг сухой массы или менее 30% от

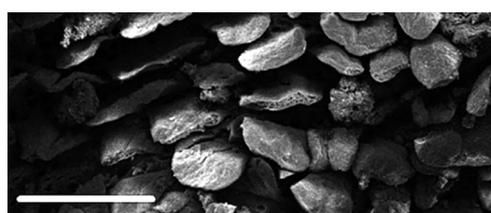


Рис. 4. Сохранность кишечных ворсинок в децеллюляризованном матриксе тонкой кишки, масштабный отрезок – 500 мкм

исходного количества [4]. Нативная ТК крысы, согласно нашим данным, содержала 215 ± 58 нг/мг НК. Этот показатель для бесклеточного матрикса составил $13,8 \pm 0,5$ нг/мг, демонстрируя тем самым, что протокол позволяет элиминировать почти 94% НК (рис. 5).

Наконец, принципиальными являются еще два обстоятельства. Во-первых, протокол децеллюляризации ТК, представленный нами, не влияет на биосовместимость матрикса. Фибробласты человека,

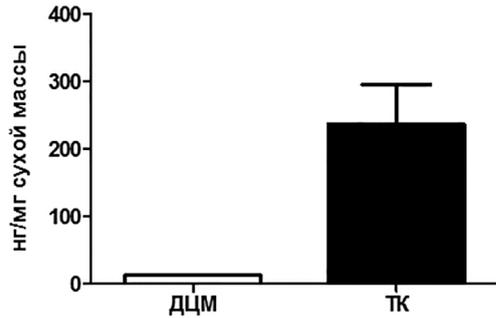


Рис. 5. Количество ДНК в интактной ТК крысы и в ДЦМ

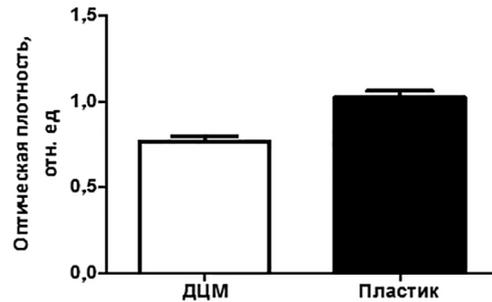


Рис. 7. Прочность на растяжение ДЦМ и нативной ТК

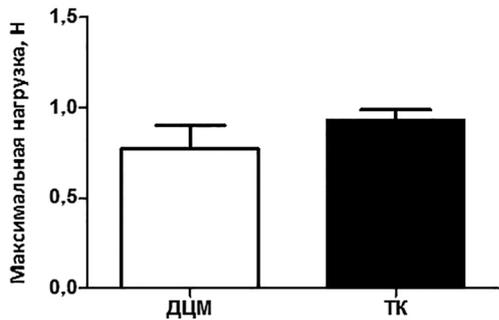


Рис. 6. Сравнение количества жизнеспособных фибробластов, посеянных на ДЦМ и на специализированный адгезивный пластик

на нем культивируемые, через двое суток сохраняли свою жизнеспособность и пролиферировали (рис. 6).

Количество жизнеспособных дермальных фибробластов человека на ДЦМ и специализированном адгезивном пластике статистически не различалось, хотя и замечена тенденция к более быстрому росту клеток на пластике.

Во-вторых, протокол децеллюляризации тонкой кишки, как отмечено выше, не повреждает матрикс и не влияет на его прочность на растяжение. Разрыв образца ткани нативной ТК при растяжении происходил при нагрузке $0,93 \pm 0,06$ Н, ДЦМ – $0,77 \pm 0,13$ Н, что свидетельствует о

сохранности механических свойств ДЦМ (рис. 7).

Заключение. В соответствии с разработанным оригинальным протоколом перфузионной децеллюляризации ТК получена матрица со свойствами, необходимыми и достаточными для тканевой инженерии дефектов кожных покровов, слизистых оболочек и ряда трубчатых, а возможно, и солидных органов.

Собственно, разработанный протокол получения ДЦМ ТК несет в себе потенциальную возможность получения неиммуногенных матриксных частей органов и тканей для тканевой инженерии.

Литература

1. Александров, В.Н. Тканевая инженерия трубчатых органов / В.Н. Александров [и др.] // Сборник статей II Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии». – Анапа, 2020. – С. 171–179.
2. Добровольская, И.П. Полимерные матрицы для тканевой инженерии / И.П. Добровольская [и др.] – СПб.: Издательско-полиграфическая ассоциация университетов России, 2016. – 224 с.
3. Миней, Е.Дж. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Е.Дж. Миней [и др.] // Техносфера. – М., 2007. – С. 22–33.
4. Сотниченко, А.С. К вопросу о морфологических критериях децеллюляризации органов и тканей / А.С. Сотниченко [и др.] // Вестн. трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – № 19 (3). – С. 65–69.

A.A. Kokorina, S.V. Kromsky, A.V. Kriventsov, E.V. Mikhailova, N.V. Pak, A.A. Kondratenko, L.P. Sigareva, V.S. Sidorin, O.V. Kostina, L.S. Onishchenko, V.N. Aleksandrov

Decellularized matrix of the small intestine. Technology for obtaining, evaluating and using directions

Abstract. Matrix (scaffold, matrix, framework, template) is a bioresorbable or non-bioresorbable material that can be filled with stem or somatic cells in/ex vivo in order to obtain a tissue-engineering structure for restoration of a lost organ, part of an organ, tissue. Scaffold must be to the extent necessary strong, non-immunogenic, bioactive. The porosity of the matrix must be open, the surface is rough and, most importantly, the matrix must contain factors of chemotaxis of endo- or exogenous origin, cell adhesion of their proliferation, differentiation. In this context, on the example of creating a decellularized small intestine matrix, a number of fundamental issues are highlighted regarding the choice of matrix material, its production technology, matrix evaluation in accordance with the criteria that correspond to the matrix for tissue engineering, and possible directions for its use. As a result, a non-immunogenic extracellular matrix of the small intestine was obtained by the method of detergent-enzymatic perfusion decellularization, which was sufficient in characteristics for use in various areas of tissue engineering, including plasty of defects of the skin, mucous membranes, small intestine, etc.

Key words: tissue engineering, matrix, graft, scaffold, small intestine, short bowel syndrome, acellular matrix, decellularization, biomaterials.

Контактный телефон: +7-965-039-2154; e-mail: vmeda-nio@mil.ru