Заключение. Полученные данные позволяют говорить о наличии зависимости между уровнем гиалуронана в ротовой жидкости и индексом КПИ пациентов. Присутствие связи между уровнем ги-

луронана в РЖ и возрастом пациента, количеством гиалуронана в сыворотке крови свидетельствует о зависимости показателя гиалуронана в большей степени от состояния пародонтальных тканей.

Литература/References

1. Сигаева Н. Н., Колесов С. В., Назаров П. В. [и др.]. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применение в медицине. *Вестник Башкирского университета*. 2012;13(3):1220-1241. [Sigayeva N. N., Kolesov S. V., Nazarov P. V., Vildanova R. R. Chemical modification of hyaluronic acid and its application in medicine. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*. – *Bulletin of Bashkir University*. 2012;13(3):1220-1241. (in Russ.)]
2. Jiang D., Liang J., Noble P. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiological Reviews*. 2011;91(1):221-264. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2009>
3. Строителей В. В. Гиалуроновая кислота: зависимость некоторых свойств и эффектов от молекулярной массы. *Вестник новых медицинских технологий*. 2004;11(3):84-85. [Stroitelev V. V. Hyaluronic acid: dependence of certain properties and effects on its molecular mass. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. – *Journal of New Medical Technologies*. 2004;11(3): 84-85. (in Russ.)].
4. Хабаров В. Н., Бойков П. Я., Колосов В. А. [и др.]. Гиалуронан в артрологии. Комплексы гиалуроновой кислоты с низкомолекулярными биорегуляторами – новая страница в лечении суставных патологий. М.: ООО «Авансесд солюшнз», 2014. [Khabarov V. N., Boykov P. Ya., Kolosov V. A., Ivanov P. L. Gialuronan v artrologii. Kompleksy gialuronovoy kisloty s nizkomolekulyarnymi bioregulyatorami – novaya stranitsa v lechenii sustavnykh patologiy. Moscow: «Advanced solutions», 2014. (in Russ.)].
5. Pogrel M. A., Lowe M. A., Stern R. Hyaluronan (hyaluronic acid) in human saliva. *Archs. Oral. Biol.* 1996;41(7):667-671. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(96\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(96)00050-7)
6. Pogrel M. A., Lowe M. A., Stern R. Hyaluronan (hyaluronic acid) and its regulation in human saliva by hyaluronidase and its inhibitors. *Journal of Oral Science*. 2003;45(2):85-91. <https://doi.org/10.2334/josnurd.45.85>
7. Tishler M., Yaron I., Shirazi I., Yaron M. Salivary and serum hyaluronic acid concentrations in patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 1998;57: 506-508. <https://dx.doi.org/10.1136/ard.57.8.506>
8. Гринхальх Т. Основы доказательной медицины. М.: «ГЭОТАР-МЕД», 2006. [Greenhalgh T. Osnovy dokazatel'noy meditsiny. Moscow: «GEOTAR-MED», 2006. (in Russ.)].
9. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: «МедиаСфера», 2002. [Rebrova O. Yu. Statistichesky analiz meditsinskikh dannykh. Primeneniye paketa prikladnykh program STATISTICA. Moscow: «MediaSfera», 2002 (in Russ.)].

Сведения об авторах:

Самбулов Дмитрий Вячеславович, аспирант кафедры челюстно-лицевой хирургии; тел.: 89202253399; e-mail: sambulovstom@gmail.com

Харитонов Дмитрий Юрьевич, доктор медицинских наук, зав. кафедрой; тел.: 89038569209; e-mail: duhdoct@mail.ru

Морозов Алексей Николаевич, доктор медицинских наук, доцент, зав. кафедрой пропедевтической стоматологии; тел.: 89066780440; e-mail: anmorozov@vrgngmu.ru

Беленова Ирина Александровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной стоматологии; тел.: 89066759391; e-mail: i.belenova@vsmaburdenko.ru

Подопрюга Анна Владимировна, доктор медицинских наук, доцент кафедры челюстно-лицевой хирургии; тел.: 89056560017; e-mail: gora76@mail.ru

© Коллектив авторов, 2018

УДК 611-073.584:611.2

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13059>

ISSN – 2073-8137

ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ГЕНЕРАЦИИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЯХ С ПОМОЩЬЮ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

Е. А. Губарева¹, И. М. Быков¹, Е. В. Кувейда¹, А. С. Сотниченко¹,
И. С. Гуменюк¹, О. М. Лясота², С. Н. Болотин², С. С. Джимах²

¹ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

² Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

EVALUATION OF THE FREE RADICALS PRODUCTION RATE IN TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCTIONS USING EPR-SPECTROSCOPY

Gubareva E. A.¹, Bykov I. M.¹, Kuevda E. V.¹, Sotnichenko A. S.¹,
Gumenyuk I. S.¹, Lyasota O. M.², Bolotin S. N.², Dzhimak S. S.²

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

² Kuban State University, Krasnodar, Russia

Тканевая инженерия активно развивается в настоящее время и может стать перспективной альтернативой трансплантации органов и тканей, так как лишена основных недостатков трансплантологии – острой нехватки, сложности подбора, доставки и хранения донорского материала, пожизненной иммуносупрессивной терапии. Одним из наиболее известных методов получения биологических каркасов для последующего создания тканей-

женерных конструкций органов и тканей является децеллюляризация. На примере децеллюляризации пищевода и диафрагмы нечеловекообразных обезьян рассмотрены биофизические критерии децеллюляризации на основе определения интенсивности генерации свободных радикалов в нативных и децеллюляризованных тканях методом ЭПР-спектроскопии в комплексной оценке качества получаемых биологических матриц, а также возможности их криоконсервации для последующей транспортировки.

Ключевые слова: регенеративная медицина, тканевая инженерия, децеллюляризация, ЭПР-спектроскопия, каркас

Tissue engineering grows rapidly nowadays and may turn to a promising alternative to organs and tissues transplantation since it is devoid of the essential disadvantages of transplantology such as lack of donor material, complexity of its matching as well as its delivery and preservation, and life-long immunosuppressive therapy. Decellularization is one of the best known methods of biological scaffolds obtainment for the creation of tissue-engineered organs and tissues. In the present paper we considered biophysical criteria of decellularization on the nonhuman primates' esophagus and diaphragm decellularization based on the evaluation of the free radicals production rate in native and decellularized tissues using EPR-spectroscopy in a complex quality assessment of obtained biological matrices as well as the possibility of their cryopreservation for the following transportation.

Keywords: regenerative medicine, tissue engineering, decellularization, EPR-spectroscopy, scaffold

Для цитирования: Губарева Е. А., Быков И. М., Кувейда Е. В., Сотниченко А. С., Гуменюк И. С., Лясота О. М., Болотин С. Н., Джимаков С. С. ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ГЕНЕРАЦИИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЯХ С ПОМОЩЬЮ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2018;13(2): 391-394. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13059>

For citation: Gubareva E. A., Bykov I. M., Kuevda E. V., Sotnichenko A. S., Gumenyuk I. S., Lyasota O. M., Bolotin S. N., Dzhimak S. S. EVALUATION OF THE FREE RADICALS PRODUCTION RATE IN TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCTIONS USING EPR-SPECTROSCOPY. *Medical News of North Caucasus*. 2018;13(2):391-394. (In Russ.). DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2018.13059>

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ВКМ – внеклеточный матрикс

Вэкспериментальной медицине все большее значение приобретают методы, позволяющие непосредственно оценивать образование свободных радикалов в тканях внутренних органов, в частности метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР-спектроскопия) [1, 2, 3]. Одной из областей применения этого метода может стать регенеративная медицина – тканевая инженерия. Тканеинженерные конструкции образованы биологическими или синтетическими каркасами и аутологичными стволовыми клетками, способными к пролиферации как при направленной дифференцировке при стимуляции ростовыми факторами и биологически активными веществами, так и без нее [4, 5, 6]. Их применение со временем может способствовать восстановлению функции поврежденного в результате заболеваний или отсутствующего в результате врожденной или приобретенной патологии органа или ткани.

При создании тканеинженерной конструкции первостепенное значение уделяется оценке качества матрикса при помощи различных методов контроля, одним из которых является ЭПР-спектроскопия лиофилизированных тканей [5]. Выявляемые с помощью ЭПР парамагнитные частицы отражают интенсивность генерации продуктов свободнорадикальной природы в биосубстратах и позволяют исследовать прямую антирадикальную активность биологических образцов [7, 8], что характеризует этот метод как высокоэффективный при проведении подобного рода исследований [9]. Это особенно актуально для получения биологических каркасов методом децеллюляризации – процесса, направленного на удаление клеток с сохранением компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и трехмерной структуры органа или ткани. Определение интенсивности генерации свободных радикалов в нативных и децеллюляризованных тканях может служить одним из критериев наличия в их составе жизнеспособных клеток, что и явилось целью настоящей работы.

Материал и методы. Для создания тканеинженерных конструкций производили эксплантацию диафрагмы и пищевода у 3 самцов макаков-резусов (*Macaca mulatta*). Все манипуляции с животными осуществляли при соблюдении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (протокол локального этического комитета № 30/1). Материал получали в условиях операционной на базе НИИ медицинской приматологии РАН (Сочи, Россия). Органы помещали в охлажденный раствор PBS –/– (Gibco, Англия) при температуре +4 °С и транспортировали в лабораторию фундаментальных исследований в области регенеративной медицины Кубанского государственного медицинского университета. Общее время доставки составило не более 24 часов. В зависимости от протоколов децеллюляризации, специфичных для каждого органа, проводили подготовку к последующему воздействию растворами детергентов. Так, пищевод в стерильных условиях канюлировали пластиковыми катетерами, фиксировали перистальтическому насосу посредством соединительных трубок и помещали в специализированный биореактор ORCA (Harvard Apparatus, США). Для децеллюляризации пищевода был использован детергент-энзиматический метод, включающий 2 цикла обработки (деионизированная вода – 1 час; дезоксихолат натрия 4 % (Sigma Aldrich, США) + 2mM раствор ЭДТА (Sigma Aldrich, США) – 1 час; PBS –/– (Gibco, Life Technologies, США) – 10 мин; бычья панкреатическая ДНКаза-I (Sigma Aldrich, США) 2000 ЕД, разведенная в 200 мл PBS +/- (Gibco, Life Technologies, США), – 1 час. Заключительный этап децеллюляризации заключался в перфузии раствором PBS –/– (Gibco, Life Technologies, США) в течение 24 часов. Диафрагма была очищена от жира и соединительных тканей, промыта стерильным раствором PBS –/– (Gibco, Life Technologies, США) с добавлением антибиотиков и антимикотиков (Gibco,

Life Technologies, США). Для более щадящей ее децеллюляризации и уменьшения чрезмерного растяжения при фиксации был разработан специальный биореактор, который включал сменные емкости для различных детергентов и защищал ткань от повреждения. Децеллюляризацию проводили растворами детергентов и энзимов по модифицированному протоколу, состоящему из 2 циклов (деионизированная вода – 1 час; дезоксихолат натрия 4 % (Sigma Aldrich, США) + 2mM раствор ЭДТА (Sigma Aldrich, США) – 24 часа; PBS –/– (Gibco, Life Technologies, США) – 12 часов; бычья панкреатическая ДНКаз-1 (Sigma Aldrich, США) 2000 ЕД, разведенная в 200 мл PBS +/+ (Gibco, Life Technologies, США), – 12 часов. В заключение отмывали полученный матрикс в растворе PBS –/– (Gibco, Life Technologies, США), в течение 24 часов.

Морфологическое исследование нативных и децеллюляризованных образцов проводили после фиксации в 10 % нейтральном забуференном формалине, дегидратации и парафинизации по стандартной методике с использованием автоматического гистопроцессора «Leica TP1020» (Германия) и модульной установки «Leica EG1150H» (Германия). Морфологический контроль качества децеллюляризации оценивали после окрашивания гематоксилином и эозином и флуорофором DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол).

ЭПР-спектроскопию осуществляли на спектрометре «JES FA 300» (JEOL, Япония) при температуре 24 °C в X-диапазоне (мощность сверхвысокочастотного излучения составляла 1 мВт, частота микроволнового излучения – 9144 МГц, амплитуда высокочастотной модуляции – 0,1 мТл [3]). Исследуемые образцы пищевода и диафрагмы предварительно подвергали лиофилизации в сушилке «ЛС-1000» (Проинтех, Россия) [10], перед непосредственным проведением ЭПР-спектроскопии взвешивали образцы с точностью до 0,01 мг (весы Ohaus, КНР). ЭПР-сигнал образца измеряли в навеске, масса которой в зоне резонатора составляла 0,03 г (в кварцевой ампуле, имеющей диаметр 5 мм), интегральную интенсивность сигнала ЭПР вычисляли путем двойного численного интегрирования. Указанную процедуру выполняли путем сравнения полученного сигнала с ЭПР-сигналом стандартного образца 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил оксиданила (TEMPO [11]), содержащего $6,4 \cdot 10^{-7}$ моль парамагнитных центров, и определения концентрации парамагнитных центров в каждом из изученных образцов.

Работа выполнена в рамках государственного задания МЗ РФ (от 28.01.2015) «Разработка экспериментальных образцов тканеинженерных конструкций на основе децеллюляризованных матриц для применения в регенеративной медицине», государственного задания Министерства образования и науки РФ, проект № 6.5882.2017/8.9.

Результаты и обсуждение. Установлено, что децеллюляризованные матрицы диафрагмы и пищевода теряли характерный темно-красный цвет и приобретали молочно-белую окраску, присущую всем децеллюляризованным тканям, что соотносится с литературными данными [1, 2, 12, 13, 6, 14]. Окрашивание гематоксилином и эозином, а также флуорофором DAPI не выявило клеток и ядер в децеллюляризованных матриксах. Архитектоника межволоконистой соединительной ткани диафрагмы оставалась неизменной, сохранялась адвентициальная оболочка мелких сосудов. Децеллюляризованная ткань в

сравнении с нативной не окрашивалась гематоксилином, что позволило судить об отсутствии ядер и их фрагментов, и менее интенсивно окрашивалась эозином, так как мышечные волокна отсутствовали. Патологических изменений структуры, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было. Сохранялась свойственная нативной ткани пищевода гистоархитектоника. Выявляли эпителий при отсутствии ядер в клетках, базальную мембрану, подслизистый слой, состоящий из рыхлой волокнистой соединительной ткани. Мышечный слой также оказался ацеллюлярным, сохранялись единичные поврежденные мышечные волокна наружного мышечного слоя, не содержащие ядер.

Исследование интенсивности генерации свободных радикалов нативных и децеллюляризованных тканей органов, имеющих скелетную мускулатуру, выявило присутствие парамагнитных центров, соответствующих концентрации до 10^{-8} моль/г в нативной лиофилизированной ткани, где был зафиксирован сигнал ЭПР с g-фактором 2.008, что указывало на наличие семихинонного радикала убихинона (рис. 1) и подтверждало присутствие клеток, в отличие от децеллюляризованных тканей, в которых отсутствовал ЭПР-сигнал с g-фактором в диапазоне от 2.005 до 2.012. Полученные результаты указывают на целесообразность использования ЭПР-спектроскопии для оценки жизнеспособности клеточных структур в нативных тканях, в которых функционирование системы переносчиков электронов, прежде всего в митохондриях, является причиной образования свободных радикалов, участвующих также в обеспечении жизнедеятельности клеточных структур [4, 15].

Рис. 1. ЭПР-спектры нативного (1) и децеллюляризованного (2) образцов лиофилизированной диафрагмы. Здесь и на рисунке 2 по оси ординат – первая производная величины высокочастотного излучения к напряженности магнитного поля, поглощенного изучаемым образцом, по оси абсцисс – напряженность магнитного поля

Учитывая литературные данные, согласно которым замораживание является одним из этапов физической децеллюляризации тканей [9], были оценены перспективы использования ЭПР-спектроскопии как биофизического метода оценки качества получаемого матрикса после замораживания образцов диафрагмы и пищевода при -30 °C.

Оценка сохранности нативных образцов диафрагмы и пищевода после криоконсервации показала, что замораживание их до -30 °C в течение 7 суток приводит к значительному уменьшению интенсивности ЭПР-сигнала с g-фактором в диапазоне от 2.005 до 2.012 (рис. 2), который значимо не отличался от нуля и напоминал ЭПР-спектры децеллюляризованных органов (рис. 2).

Рис. 2. ЭПР-спектр нативного образца лиофилизированного пищевода после криоконсервации при -30°C (в течение 7 суток)

Заклучение. Можно говорить об установлении критериев применения и пределах чувствительности метода ЭПР-спектроскопии для оценки степени разрушения клеток на биоматриксах, например, при проведении протокола децеллюляризации, а также при криоконсервации нативных тканей внутренних органов. В целом выполнение качественной и количественной оценки интенсивности свободнорадикальных процессов в тканях диафрагмы и пищевода возможно только с помощью прецизионных методов, в том числе ЭПР-спектроскопии, позволяющей изучать завершенность этапа подготовки тканевого матрикса для создания биокаркасов интраторакальных органов.

Литература/References

1. Басов А. А., Быков И. М., Барышев М. Г. [и др.]. Концентрация дейтерия в пищевых продуктах и влияние воды с модифицированным изотопным составом на показатели свободнорадикального окисления и содержания тяжелых изотопов водорода у экспериментальных животных. *Вопросы питания*. 2014;83(5):43-50. [Basov A. A., Bykov I. M., Baryshev M. G., Dzhimak S. S., Bykov M. I. The concentration of deuterium in food and the effect of water with a modified isotope composition on free radical oxidation and the content of heavy hydrogen isotopes in experimental animals. *Voprosy pitaniia. - Problems of nutrition*. 2014;83(5):43-50. (In Russ.)].
2. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю. Кинетическая хемилюминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов. *Биофизика*. 2011;56(6):1081-1090. [Vladimirov Yu. A., Proskurnina Ye. V., Izmaylov D. Yu. Kinetic chemiluminescence as a method of studying free radical reactions. *Biofizika. - Biophysics*. 2011;56(6):1081-1090. (In Russ.)].
3. Baryshev M. G., Bolotin S. N., Dzhimak S. S. NMR, EPR, and mass spectroscopy estimates of the antiradical activity of water with modified isotope composition. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2012;76(12):1349-1352.
4. Badylak S. F., Taylor D., Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2011;(13):27-53.
5. Conconi M. T., Coppi P. D., Bellini S. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. *Biomaterials*. 2005;26(15):2567-2574.
6. Ott H. C., Clippinger B., Conrad C. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nature Medicine*. 2010;16(8):927-933.
7. Vedeau N. S., Magdas D. A., Bolojan L., Damian G. Antioxidant potential and authenticity of some commercial fruit juices studied by EPR and IRMS. *Chemical Papers*. 2012;66(6):612-616.
8. Wainwright J. M., Czajka C. A., Patel U. B. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Engineering Part C. Methods*. 2009;16(3):525-532.
9. Dzhimak S. S., Basov A. A., Fedulova L. V. Correction of metabolic processes in rats during chronic endotoxemia using isotope (D/H) exchange reactions. *Biology Bulletin*. 2015;42(5):440-448.
10. Басов А. А., Быков И. М., Федуллова Л. В. Коррекция окислительного метаболизма в крови и тканях внутренних органов у лабораторных животных с помощью реакций изотопного D/H обмена. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016;11(1):103-107. [Basov A. A., Bykov I. M., Fedulova L. V., Dzhimak S. S., Baryshev M. G. Correction of oxidative metabolism in blood and tissues of internal organs in laboratory animals by reactions of isotopic D/H metabolism. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza. - Medical News of North Caucasus*. 2016;11(1):103-107. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11010>
11. Sellaro T. L., Ravindra A. K., Stolz D. B. Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds. *Tissue Engineering*. 2007;13(9):2301-2310.
12. Braga P. C., Dal Sasso M., Lattuada N. Antioxidant activity of hyaluronic acid investigated by means of chemiluminescence of equine neutrophil bursts and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2015;38(1):48-54.
13. Gubareva E. A., Sjöqvist S., Gilevich I. V. Orthotopic transplantation of a tissue engineered diaphragm in rats. *Biomaterials*. 2016;77:320-335.
14. Ott H. C., Matthiesen T. S., Goh S. K. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*. 2008;14(2):213-221.
15. Gubareva E. A., Kuevda E. V., Dzhimak S. S. EPR spectroscopy solutions for assessment of decellularization of intrathoracic organs and tissues. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016;467(1):113-116.

Сведения об авторах:

Быков Илья Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальной и клинической биохимии; тел.: 89182125530; e-mail: ilya.bh@mail.ru

Губарева Елена Александровна, кандидат медицинских наук, зав. лабораторией фундаментальных исследований в области регенеративной медицины; тел.: 89181327857; e-mail: g_lena82@list.ru

Кувда Елена Вячеславовна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник; тел.: 89189351760; e-mail: elenakuevda@yandex.ru

Сотниченко Александр Сергеевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник; тел.: 89628518962; e-mail: alex24.88@mail.ru

Гуменюк Иван Сергеевич, научный сотрудник; тел.: 89183924111; e-mail: meklon@gmail.com

Лясота Оксана Михайловна, аспирант кафедры радиофизики и нанотехнологий; тел.: 89284098789; e-mail: arcybasheva@mail.ru

Болотин Сергей Николаевич, кандидат химических наук, доцент кафедры геоэкологии; тел.: 89054083612; e-mail: jimack@mail.ru

Джимак Степан Сергеевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры радиофизики и нанотехнологий; тел.: 89054083612; e-mail: jimack@mail.ru