

Хасанов Р.Р.^{1,2}, Гумеров А. А.¹, Шефер К.Х.³, Вессель Л.М.²

Способ выращивания культуры клеток нервной системы кишечника пригодной для тканевой инженерии кишечника

¹Кафедра детской хирургии с курсом ИДПО, Башкирский государственный медицинский университет, 450015, г. Уфа, Россия ул. Ленина, д. 3;

²Клиника детской хирургии, университетская клиника Маннгейм, Университет Гейдельберг, Германия, Germany 68167 Mannheim Theodor-Kutzer-Ufer 1-3;

³Университет прикладных наук Кайзерслаутерн, Германия, Germany 66482 Zweibrücken Amerikastrasse 1

Лечение синдрома короткой кишки является сложной проблемой в современной медицине. У ряда пациентов существующие методы лечения неэффективны, а трансплантация кишечника показывает неудовлетворительные результаты. Тканевая инженерия тонкой кишки может быть инновационным методом лечения этих пациентов. Одним из ключевых элементов в создании кишки является выращивание нервной системы кишечника. До настоящего времени не описаны культуры нервных клеток, выделенных из нервной системы кишечника, выращенные в трёхмерном матриксе на основе гиалуроновой кислоты.

Цель исследования: разработать метод выращивания *in vitro* взаимодействующих друг с другом клеток нервной системы кишечника в трехмерной среде.

Методы: клетки нервной системы кишечника выделялись из кишечника крыс путём препарирования и ферментативного воздействия на мышечный слой тонкой кишки. Далее клетки помещались в трёхмерный матрикс и культивировались в нём в течении нескольких дней.

Результаты. Клетки нервной системы кишечника были выделены из крыс и культивировались в трёхмерном матриксе, помещённом в раствор для культур клеток с добавлением специфических факторов роста. Микроскопирование культур клеток на восьмые сутки показало, что нервные клетки активно растут, соединяясь с другими нервными клетками при помощи отростков. Конфокальная микроскопия в сочетании с иммуногистохимическим окрашиванием клеток специфичным маркером нервных клеток показала, что полученные культуры действительно состоят из нервных клеток.

Заключение. Разработанный метод позволяет вырастить *in vitro* живущие и взаимодействующие друг с другом клетки нервной системы кишечника в трехмерной среде. Полученная культура клеток может быть использована для моделирования стенки тонкой кишки путем тканевой инженерии.

Ключевые слова: тканевая инженерия; нервная система кишечника; энтеральная нервная система; синдром короткой кишки; нейрон.

Для цитирования: Хасанов Р.Р., Гумеров А.А., Шефер К.Х., Вессель Л.М. Способ выращивания культуры клеток нервной системы кишечника пригодной для тканевой инженерии кишечника. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 132-141.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.132-141

Для корреспонденции: Гумеров Аитбай Ахметович, Республиканская детская клиническая больница, e-mail: pedsurg@bk.ru

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.02.2019

Khasanov R.R.^{1,2}, Gumerov A.A.¹, Schaefer K.H.², Wessel L.M.²

A method for culturing of enteric nervous system cells suitable for tissue engineering of the intestine

Department of Pediatric Surgery, Bashkir State Medical University, Lenina Str. 3, Ufa 450015, Russia

Clinic of Pediatric Surgery, University Hospital Mannheim, University of Heidelberg; Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, Germany 68167 Mannheim, University of Applied Sciences, Kaiserslautern, Zweibrücken Amerikastrasse 1, Germany 66482

Background. Treatment of short bowel syndrome is a complex issue in modern medicine. Existing treatment methods are inefficient in some cases, and bowel transplantation shows unsatisfactory results. Tissue engineering of the small intestine can represent an innovative method of treatment for these patients. One of the key elements in creation of the gut is culturing of enteric nervous system cells. There is no description of the nerve cells culture extracted from the enteric nervous system and grown in a hyaluronic-acid based three-dimensional matrix so far.

Research objective: establishing an *in vitro* method for culturing of interacting enteric nervous system cells in a 3D environment.

Methods. The enteric nervous system cells used for these experiments were isolated from Sprague-Dawley rats. Hyaluronic-acid

based hydrogel HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, USA) was used as a 3D matrix. Enteric nervous system cells were isolated from 5- to 8-day-old newborn Sprague-Dawley rats. Animals were decapitated with a rodent guillotine (cervical spinal cord transection). After that they were laparotomized, and their intestines were isolated. The removed intestines were placed in a Petri dish filled with the MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with antibiotics (25 µl factory-produced solution of gentamycin (40 mg/ml) and 50 µl of metronidazole solution (5 mg/ml) per 50 ml of MEM).

The small intestine was then separated from the colon and mesentery under an optical microscope, and the muscular layer of small intestine was isolated from the submucosal layer. The isolated muscular layer was placed in a tube with the deoxyribonuclease and collagenase solution as well as Balanced Salt Solution and incubated for 2 h at 37°C and 5% CO₂. As a result, the intestinal muscle tissue was broken down completely in the produced solution, while areas of the myenteric plexus remained intact and were recognizable under the microscope as a network. These neural networks were treated with a trypsin solution. Further, after mechanical processing, a suspension of nerve cells was obtained. The hyaluronic-acid based gel HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, Inc., USA) with added collagen was used to produce a 3D matrix. The enteric nervous system cells were added to this three-dimensional matrix and stirred. Matrix had been hardening for 30 minutes. The cell cultures were fixed, stained and microscopied 10-21 days later. For immunofluorescence staining of cells we used a direct immunohistochemical method with the anti-β III Tubulin antibody conjugated with the fluorochrome Alexa 488 Flour (Merck Millipore). Anti-β III Tubulin is a specific antibody used for peculiar staining of neurons. The anthraquinone dye with a high affinity to double-stranded DNA - DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific) was applied in order to identify cell nuclei. Microscopy was conducted with Leica TCS SP8 (Leica, Germany).

Results. The technique we represented allowed us to produce a culture of enteric nervous system cells isolated from rats in the three-dimensional matrix. Confocal microscopy combined with immunohistochemical staining with specific neuronal marker showed that the final cultures indeed consisted of nerve cells. Larger nerve cell clusters were encountered. Herewith, some neurons were arranged close to each other while others were located at a distance; however, all neurons were interconnected. Neurons also clearly showed wide processes morphologically similar to those of axons. In addition, many thin and branching processes resembling dendrites morphologically were visible. The use of confocal microscopy allowed to receive a series of images at different depths of the focal plane, which could then be reconstructed to a three-dimensional image. The 3D reconstruction of the nervous plexi clearly revealed neurons joined together in a complex network. For DRAQ5 stains all cell nuclei, not just those of neurons, the presence of stained cell nuclei just "hanging" on the reconstruction without cytosomes of nerve cells indicated that other cell types were also present in this texture. The present work showed a possibility for culturing interconnected enteric nervous system cells as well as nerve plexi within the three-dimensional medium *in vitro*. The key step in growing the enteric nervous system cells for both two-dimensional and three-dimensional medium claims to be the characteristics of functional cellular activity. Following stages of the study require observing of the cells' functionality, for example, by using the analysis of intracellular Ca²⁺ concentration (calcium imaging) and its variability. In addition, the study of cellular interactions within the enteric nervous system with other types of cells in the three-dimensional medium also encourages a great interest.

Conclusion. The developed method enables one to culture the interconnected cells of the enteric nervous system within the three-dimensional medium *in vitro*, which can be used to create the enteric nervous system when growing the small intestinal wall by means of tissue engineering. Further research is based on studying the functionality of cells grown in a three-dimensional medium as well as on co-culturing of enteric nerve cells with other types of cells in three-dimensional media.

Keywords: tissue engineering; enteric nervous system; short bowel syndrome; neuron.

For citation: Khasanov R.R., Gumerov A.A., Schaefer, K.H., Wessel L.M. A method for culturing of enteric nervous system cells suitable for tissue engineering of the intestine. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 132-141. (In Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.132-141

For correspondence: Gumerov Aytbai Akhmetovich, doctor of medical sciences, professor, head of the department of pediatric surgery with a course of the Institute of Additional Vocational Education of the Bashkir State Medical University, e-mail: pedsurg@bk.ru

Information about authors:

Gumerov A.A., <http://orcid.org/0000-0001-6183-8286>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21.02.2019

Синдром короткой кишки (СКК) — это заболевание, проявляющееся хронической кишечной недостаточностью, возникает в результате массивной резекции кишечника, реже бывает врожденного характера. Причинами развития СКК у детей чаще всего являются

заболевания, требующие обширной резекций кишечника: некротический энтероколит, атрезия кишечника, гастрошизис, заворот кишок и др. [1, 2]. У взрослых наиболее частыми причинами СКК являются мезентеральный тромбоз, болезнь Крона, злокаче-

ственные новообразования и т.д. [3, 4]. На сегодняшний день проблема выраженной мальабсорбции у детей с СКК решается при помощи парентерального питания (ПП), являющегося жизненно необходимым для таких пациентов [5]. Однако ПП вызывает такие опасные для жизни осложнения, как печеночная недостаточность у 40-70% пациентов, катетер-ассоциированный сепсис и катетер-индуцированный венозный тромбоз [6]. Было показано, что пятилетняя выживаемость пациентов с СКК, находившихся на ПП, составила лишь 52%, тогда как у детей, перешедших в течение 2,5 лет на полное энтеральное питание, отмечалось повышение показателя до 95% [7, 8]. Таким образом, для пациентов с СКК совершенно необходимым и обоснованным является сокращение длительности ПП и ранний переход на полное энтеральное питание. Хирургические методы лечения СКК направлены на улучшение кишечной абсорбции и тем самым на увеличение доли энтерального питания в нутритивном статусе пациента. Эффективность применения современных терапевтических и хирургических методов лечения достигает 70% [9].

Трансплантация кишечника является еще одним из способов лечения пациентов с короткой кишкой. Однако по данным крупнейшего европейского центра по трансплантации кишечника 5-летняя выживаемость трансплантата при пересадке кишечника у детей составляет лишь 44%-57%, а 10-летняя выживаемость трансплантата - 31%-44% [10]. Согласно данным отчета регистра по трансплантации кишечника, на основании данных о 2699, пациентов пятилетняя выживаемость пациентов составила лишь 56% [11].

Тканевая инженерия может стать принципиально новым подходом к лечению пациентов с СКК и хронической кишечной недостаточности [7]. В тканевой инженерии используется матрица, заменяющая внеклеточный матрикс тканей, которая заполняется необходимыми клетками, рост и развитие которых регулируется и стимулируется с помощью различных факторов роста. В последние годы исследователи достигли определенных результатов в моделировании отдельных компонентов кишки [12]. Для создания искусственного кишечника были изучены возможности использования различных тканей в роли матрикса, таких как бесклеточный кожный матрикс (Acellular dermal matrix), подслизистый слой тонкой кишки (small intestinal submucosa), коллагеновая губка заполненная мышечными клетками и др. [3, 13]. Исследовались также синтетические гидрогели на основе алината, l-pNIPAM - гидрогель, l-pNIPAM-co-DMAc гидрогель [14]. Матрикс исследовались с различными типами клеток, такими как энтеральные стволовые клетки, ор-

ганотипические культуры, Caco-2 and HT29-MTX, мышечные клетки и другие. Изучались модели *in vitro* и *in vivo* (животные модели). Авторы показывали преимущества тех или иных комбинаций матрикса и клеток для создания определённых тканей кишечника [12].

Было показано, что мезенхимальные клетки могут дифференцироваться в энтероциты [15]. Были созданы органотипические культуры с 4 типами клеток кишечника в которых обнаруживались глиальные клетки. Авторы считают, что для нормального функционирования кишки, созданной при помощи тканевой инженерии, необходимым условием является наличие энтеральной нервной системы [16]. Другие исследователи также сходятся во мнении, что способность иннервировать искусственно-выращенный мышечный слой является ключевым элементом для создания функционального кишечника [17, 18]. Однако до настоящего времени не описано наличие межмышечного или подслизистого сплетения, выращенных в трёхмерном матриксе при помощи тканевой инженерии [13, 17].

Это связано с высокой чувствительностью клеток нервной системы кишечника к микроокружению. Так, показано, что двухмерные культуры нервных клеток, выращенных как из нейронов центральной нервной системы [19], так и нейронов нервной системы кишечника [20] очень чувствительны к механическим повреждениям и воздействию факторов микроокружения. Трёхмерные культуры клеток имеют ещё более тесные и более сложные взаимосвязи с микроокружением, которые более сложно моделировать. Однако важным преимуществом трёхмерных культур клеток, вне зависимости от типа клеток, является то, что в данных культурах их можно наблюдать в более физиологических условиях [21]. Поэтому создание подобных культур является сложной задачей.

До сих пор не существует работ, в которых были бы сконструированы компоненты кишечной нервной системы, способные функционировать. Цель исследования – разработка метода выращивания *in vitro* клеток нервной системы кишечника, образующих взаимосвязи в трехмерной среде.

Методика

Описание метода. Исследование проводили в научной лаборатории медицинского факультета Мангейм (Германия) в соответствии с немецким законом о защите животных и с разрешения этического комитета по работе с животными медицинского Факультета Мангейм. В эксперименте использовались новорожденные крысы (Sprague–Dawley) в возрасте от 5 до 8

сут. Животных гильотинировали, затем проводили лапаротомию и изымали кишечник.

Кишечник помещали в стерильную одноразовую чашку Петри (диаметр 60, высота 15 мм), заполненную средой MEM (Minimum Essential Media) с добавками антибиотиков. В 50 мл среды MEM добавляли 25 мкл фабричного раствора гентамицина (40 мг/мл) и 50 мкл раствора метронидазола (5 мг/мл).

Под микроскопом с увеличением в 10–20 раз при помощи микропинцетов и микроножниц разделяли мышечный и подслизистый слои тонкой кишки (**рис. 1**).

Выделенный мышечный слой помещали в пробирку, содержащую 100 мкл раствора коллагеназы (10 мг/мл) и 10 мкл дезоксирибонуклеазы (10 мг/мл) в 900 мкл Hank's Balanced Salt Solution и инкубировали в инкубаторе при температуре 37 °С и 5% концентрации углекислого газа в течение 2 ч.

После этого раствор с расщеплённым мышечным слоем выливали в чашку Петри, заполненную средой MEM с добавками антибиотиков, в описанных выше концентрациях. В результате в полученном растворе мышечная ткань кишечника полностью расщеплялась, в то время как участки межмышечного сплетения нервной системы кишечника оставались неповрежденными и под микроскопом выглядели в виде сети (**рис. 2**). Для проведения эксперимента использовали клетки нервной системы кишечника крыс, полученные по методике описанной Schäfer с соавторами [22]. В качестве трёхмерного матрикса использовали гидрогель на основе гиалуроновой кислоты HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, USA).



Рис. 1. Препарирование тонкой кишки под микроскопом: отделения мышечного слоя кишки от слизистого. Световая микроскопия.

Эти участки межмышечного нервного сплетения собирали под световым микроскопом (ув. х 20–30) при помощи пипетки объемом 100 мкл и помещали в пробирку объемом 1,5 мл.

Собранные сети межмышечного нервного сплетения центрифугировали при 1000g при температуре 20 °С в течение 5 мин. В результате центрифугирования обрывки сети нервной системы кишечника оседали на дно пробирки. Раствор из пробирки удаляли при помощи пипетки объемом 1 мл. В пробирку добавляли 1 мл 0,25% раствора Trypsin-EDTA (трипсин с этилендиаминтетрауксусной кислотой). Далее пробирку ставили в инкубатор на 1 мин при 37 °С. Затем её снова центрифугировали при 1000 g при температуре 20 °С в течение 5 мин. Супернатант из пробирки убирал пипеткой объёмом 1 мл. В пробирке оставался осадок, после чего в нее добавляли 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Invitrogen, USA) и перемешивали. Полученную смесь несколько раз пропускали через тонкую иголку для получения гомогенного раствора. Таким образом получали суспензию нервных клеток. Раствор (10 мкл) помещали в камеру Горяева для подсчета количества клеток.

На следующем этапе формировали трёхмерный матрикс. Для его получения использовали гель на основе гиалуроновой кислоты с добавлением коллагена HyStem®-C (ESI BIO - A Division of BioTime, Inc., USA). В набор HyStem®-C входят 4 компонента: Gly-



Рис. 2. Сеть межмышечного сплетения нервной системы кишечника. Световая микроскопия.

cosil, Gelin-S, Extralink и DG-вода. Каждый из компонентов находится в отдельном флаконе и хранится при температуре -20°C . Glycosil, Gelin-S, Extralink представляют собой порошок, DG-вода – дистиллированная вода. Перед применением флаконы согревали до комнатной температуры. Затем во флаконы, содержащие порошок Glycosil и Gelin-S, вносили по 1 мл DG-воды для получения раствора. Флаконы аккуратно перемешивали без резких движений, чтобы избежать появления пузырей. Порошок, содержащийся во флаконах, постепенно растворялся в течение 30–40 мин с последующим получением прозрачного и не-сколькo вязкого раствора. Далее в флакон, содержащий порошок Extralink, добавляли 0,5 мл DG-воды и через 1 мин получали прозрачный раствор.

На следующем этапе нервные клетки инкапсулировали в матрикс.

Растворы Glycosil и Gelin-S перемешивали путём пипетирования в соотношении один к одному. Затем к раствору Glycosil + Gelin-S добавляли нервные клетки, полученные в ходе первого этапа эксперимента и вновь перемешивали смесь пипетированием. Для создания матрикса в полученную смесь добавляли Extralink и раствор Glycosil + Gelin-S + нервные клетки в соотношении 1:4, вновь перемешивали пипетированием. Далее 200 мкл матрикса пипетировали во вставку для 24 луночных планшетов. Вставки помещали в 24 луночные планшеты (BRAND GMBH, Германия). Преимущество использования планшетов со вставками является то, что дно вставки состоит из мембраны, проницаемой для клеточной среды. Кроме того, в стеклах вставки имеются отверстия, через которые клеточная среда также контактирует с матриксом.

Матрикс затвердевал в течение 30 мин.

Далее в каждую лунку добавляли 1,5 мл культуральной среды для нейрокультур. Культуральная среда изготавливалась следующим образом: в 100 мл Neurobasal medium (Gibco) добавляли 1 мл альбумина (Sigma-Aldrich), 100 мкл раствора метронидазола (5 мг/1 мл), 50 мкл раствора гентамицина (40 мг/мл), 250 мкл глутамина (Sigma-Aldrich) и 100 мкл меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 2 мл B27 Supplement (Gibco), 100 мкл GD-NF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (1 нг/мл), 100 мкл EGF (epidermal growth factor) (1 нг/мл) и 200 мкл bFGF (fibroblast growth factor-basic) (1 нг/мл).

Полученную культуру помещали в инкубатор HERAccl® (Kendro Laboratory Products) и выращивали в течение 10–21 сут при температуре 37°C и 5% концентрации CO_2 . Смена культуральной среды производилась каждые 48 ч.

Живые культуры клеток исследовали при помощи световой и фазово-контрастной микроскопии на ин-

версионном микроскопе Olympus IX 70 под увеличением 40x, 100x, 200x.

Через 10–21 сут культуры клеток фиксировали добавлением в каждую лунку 1,5 мл 4% раствора формалина. Через 10 мин раствор формалина отсасывали пипеткой и в каждую лунку добавлялся натрий-фосфатный буфера в количестве 1,5 мл.

Для иммунофлюоресцентного окрашивания клеток применяли прямой иммуногистохимический метод при помощи антитела anti- β III Tubulin, конъюгированного с флюорохромом Alexa Flour 488 (Merck Millipore). Anti- β III Tubulin – это специфичное антитело для специфичного окрашивания нейронов. Для идентификации ядер клеток использовался антрахиноновый краситель с высоким сродством к двухцепочечной ДНК – DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific). DRAQ5 работает при возбуждающем свете с длиной волны 488–647 нм. Эмиссия DRAQ5 длиной волны 633–710 нм. Выбор anti- β III Tubulin конъюгированного с Alexa Flour 488 и DRAQ5 был основан на том, что в использованном нами лазерном конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 (Leica, Германия) для возбуждения флюорохромов использовали лазеры длинной волны 488 нм (для Alexa Flour 488) и 638 нм (для DRAQ5).

Методика прямого иммунофлюоресцентного окрашивания. Окрашивание начинали с пермеабилзации клеток 0,5% Triton-X100 в течении 45 мин, потом матрикс с клетками промывали 3 раза в натрий-фосфатном буфере по 15 мин, далее матрикс инкубировали в течение 1 ч с 10% Normal Goat Serum (DAKO) при комнатной температуре. С этого момента все манипуляции выполняли в затемненных условиях. Матрикс с клетками инкубировали в 200 мкл раствора антител anti- β III Tubulin Conjugate Alexa Flour 488 (Merck Millipore) с TBST (Tris Buffered Saline with Tween) (DAKO) в разведении 1:500 при температуре 4°C в течении ночи. Матрикс с клетками промывали 3 раза в натрий-фосфатном буфере по 15 мин. На следующем этапе матрикс с клетками инкубировали с раствором DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific) с натрий-фосфатном буфером в разведении 1:1000 в течение 20 мин. Далее матрикс с клетками промывали трижды в натрий-фосфатном буфере по 15 мин, потом быстро промывали в дистиллированной воде, помещали на предметное стекло, и покрывали тонким слоем Fluorescence Mounting Medium. Пространство вокруг матрикса заливали толстым слоем Fluorescence Mounting Medium и покрывали покровным стеклом.

Результаты и обсуждение

Выделенные клетки нервной системы кишечника (рис. 3.) помещали в HyStem®-С матрикс в соотноше-

нии 100 000 клеток на 100 мкл HyStem®-С матрикса и перемешивали путём пипетирования.

Живую культуру клеток изучали под микроскопом в HyStem®-С матриксе на 8-е сут выращивания клеток нервной системы кишечника (**рис. 4**). В HyStem®-С матриксе были отчетливо видны клетки нервной системы кишечника, с сформировавшимися отростками. Клетки образовывали взаимосвязи как с другими

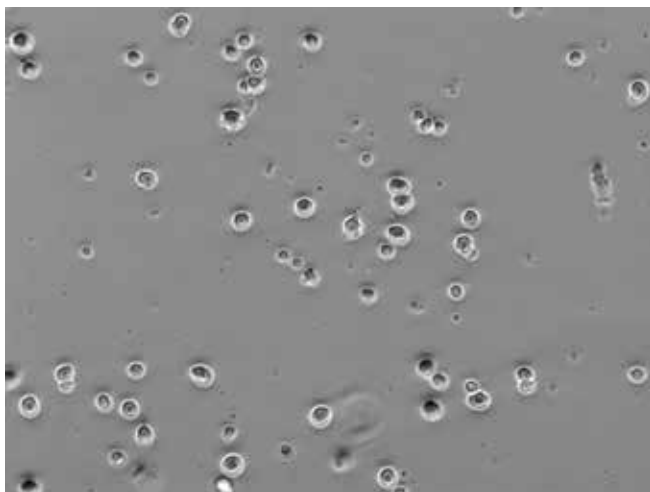


Рис. 3. Клетки нервной системы кишечника после получения из тонкой кишки до высаживания в трёхмерный матрикс.

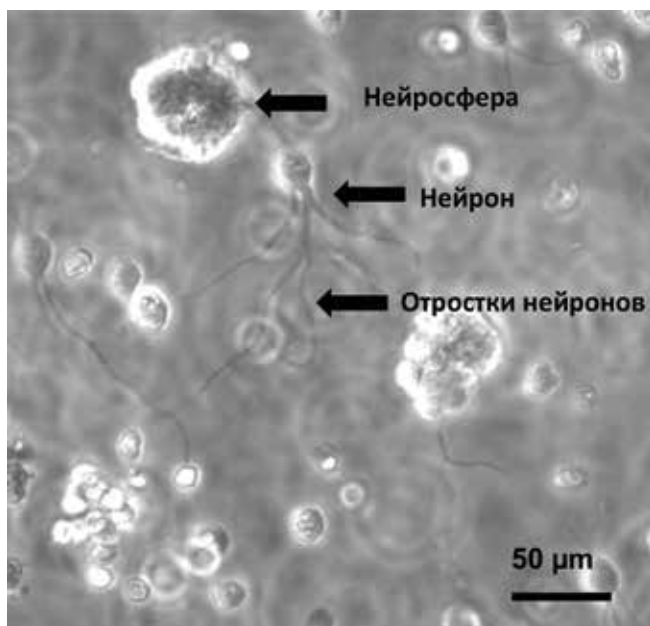


Рис. 4. Живая культура клеток нервной системы кишечника под световым микроскопом.

клетками, так и с нейросферами (скоплениями стволовых нервных клеток).

Для доказательства принадлежности клеток к нейронам, было произведено флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание фиксированных культур клеток.

Так как в отличие от обычных 2-х-мерных культур, полученные нами клетки, выращивались в трёхмерном матриксе, возникла необходимость характеристики еще одного параметра, а именно глубины. В связи с этим для определения оптических слоев в трёхмерной культуре клеток нами был использован конфокальный микроскоп. При микроскопировании культур клеток нервной системы кишечника окрашенных антителом в Tubulin III и DRAQ5, были обнаружены небольшие скопления близко расположенных друг к другу нейронов (**рис. 5**), где определяются ядра 4 нейронов. Некоторые отростки нейронов объединены в пучок, морфологически одни из них похожи на аксоны, другие, расходящиеся отдельно и ветвящиеся, похожи на дендриты (**рис. 5**).

Также были обнаружены более крупные скопления нейронов. При этом некоторые нейроны располагались близко друг к другу (**рис. 6**), а другие на некото-

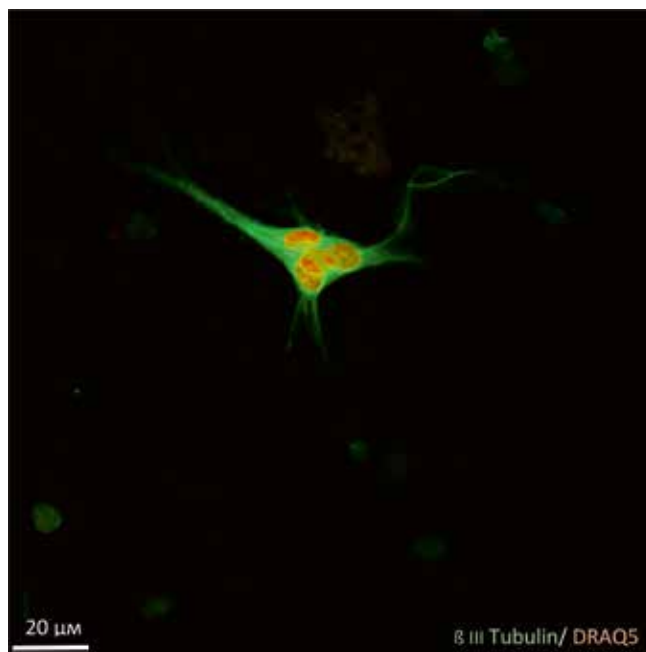


Рис. 5. Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Небольшое скопление нейронов. Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет (β III Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет (DRAQ5) – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

ром расстоянии, однако все нейроны были объединены между собой. У двух нейронов отчетливо видны широкие отростки, морфологически похожие на аксоны. Кроме того, видно множество тонких и ветвящихся отростков, морфологически напоминающих дендриты.

Были также обнаружены большие скопления нейронов, напоминающие сплетение. На **рис. 7** отчетливо видны только нейроны, находящиеся в центральной части сплетения, а нервные клетки в других плоскостях видны не отчетливо или совсем не видны.

Применение конфокальной микроскопии позволило получить серию изображений на различных глубинах фокальной плоскости и затем реконструировать из них трехмерное изображение (**рис. 8**). На трехмерной реконструкции сплетения отчетливо видны нейроны, сплетенные в сложную сеть. DRAQ5 окрашивает ядра всех клеток, а не только нейронов. Наличие окрашенных ядер клеток (красного цвета), просто «висящих» на реконструкции, без окружающей их тела нервной клетки (зеленого цвета) показывает, что в данном сплетении присутствуют и другие типы клеток, наиболее вероятно глиальные клетки.

Для оценки трёхмерности сплетения была проведена трёхмерная реконструкция серии изображений с цветовым кодированием клеток по глубине нахождения в сплетении. При цветовом кодировании глубины цвет клеток программно изменялся от темно-синего — для клеток находящихся наиболее глубоко, до темно-красного — для клеток находящихся более поверхностно (**рис. 9**). Высота сплетения была более 50 мкм.

Трёхмерная реконструкция серии изображений сплетения была также рассмотрена под углом (**рис. 10**). На данной реконструкции сплетение визуализируется в трёх осях пространства (x, y, z) без искусственного цветового кодирования глубины. Эта реконструкция, без программного кодирования глубины, показывает трёхмерность и сложность структуры выращенного в HyStem®-С матриксе сплетения нервных клеток кишечника, что позволяет лучше определить взаимное расположение нервных клеток и ядер в трёхмерном пространстве.

Тканевая инженерия органов и тканей является потенциально новым методом лечения многих заболеваний, связанных с недостаточностью или потерей органов и тканей, что позволит решать такие проблемы

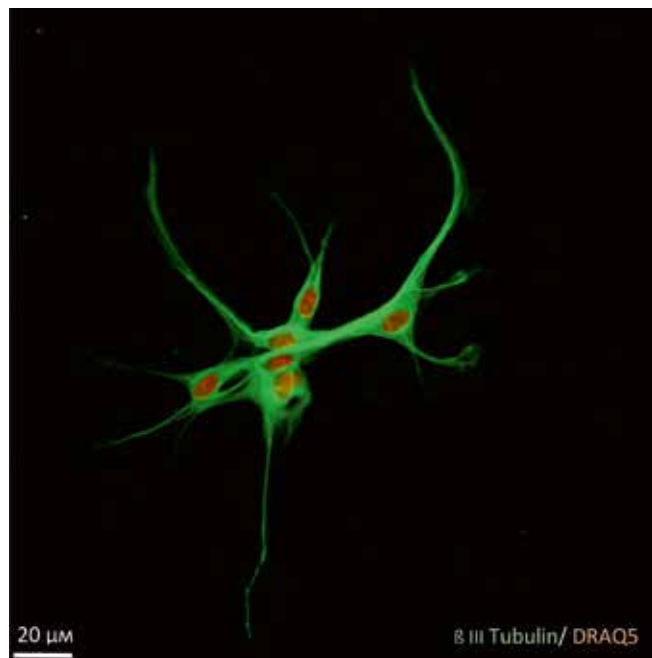


Рис. 6. Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Скопление нейронов. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет (β Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

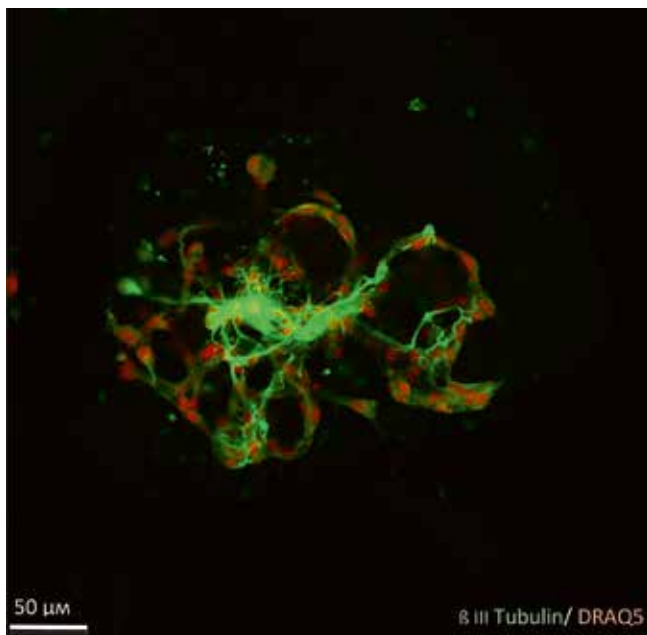


Рис. 7. Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Большие скопления нейронов, напоминающие сплетение. Флюоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет (β Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

трансплантации органов, как недостаток доноров и отторжение тканей.

Изучением возможности искусственного выращивания кишки занимаются многие исследователи [23]. Работы в этой области в основном сконцентрированы на создании слизистого или мышечного слоя тонкой кишки. При этом авторы утверждают, что создание

функциональной нервной системы кишечника является ключевым моментом для использования в тканевой инженерии [13, 17].

В доступной на настоящий момент литературе работ по выращиванию дифференцированных и взаимодействующих нервных клеток кишечника в трёхмерной среде для использования в тканевой инженерии отсутствуют. Методика по выделению нервных клеток кишечника, описанная Schäfer с соавторами [22], позволяет выращивать клетки нервной системы кишечника только на плоскости. Однако, для тканевой инженерии ключевым условием является культивирование клеток в трёхмерных средах, что, по нашему мнению, удалось выполнить в нашей работе, благодаря выбору оптимального матрикса и подбору определенных условий для выживания, размножения и роста клеток. Применение конфокальной микроскопии и иммуноспецифического окрашивания клеток позволило не только доказать, что выращенные клетки являются нейронами, но обнаружить взаимосвязи между клетками и выявить комплексную трёхмерную структуру сплетений клеток в трёхмерной среде. В представленной работе показана возможность выращивания клеток нервной системы кишечника, формирующих друг с другом связи, а также нервные сплетения *in vitro* в трёхмерной среде.

Характеристика функциональной активности клеток является ключевым этапом в выращивании клеток нервной системы кишечника, как в двумерных, так и трёхмерных средах. На следующих этапах исследова-

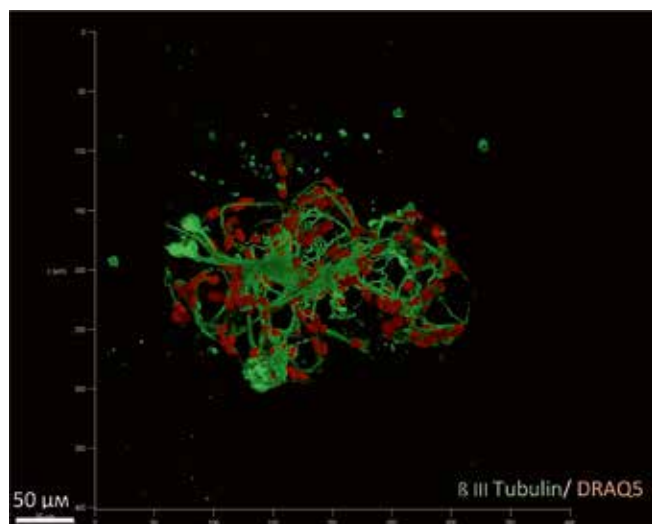


Рис. 8. Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Трёхмерная реконструкция большого скопления нейронов, напоминающие сплетение. Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет (β Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

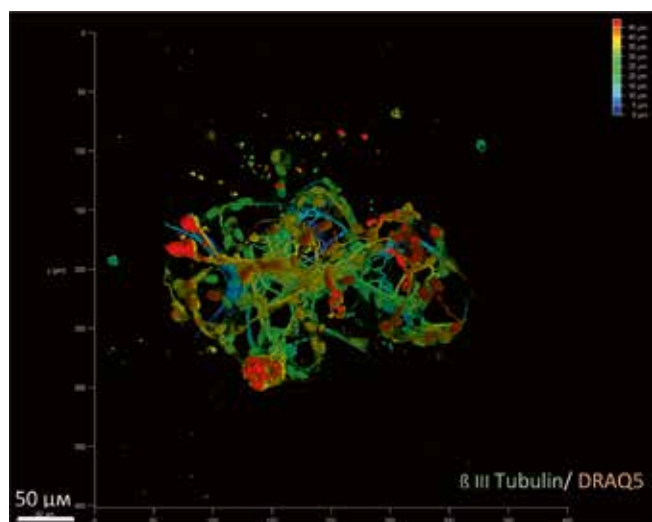


Рис. 9. Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Трёхмерная реконструкция сплетения нейронов с программным цветовым кодированием глубины. Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание.

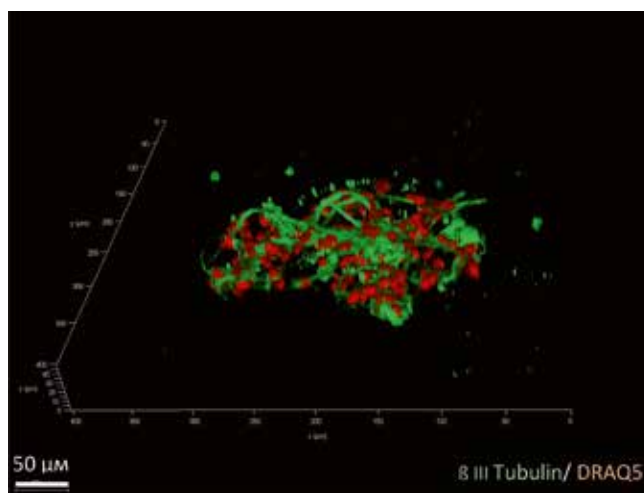


Рис. 10. Нейроны нервной системы кишечника в HyStem®-С матриксе. Трёхмерная реконструкция сплетения нейронов, рассмотренная под углом в трёх осях пространства (x, y, z). Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание. Зеленый цвет (β Tubulin III) – тела и отростки нейронов, красный цвет – ядра клеток. Конфокальная микроскопия.

ния необходимо изучение функциональности клеток, например, при помощи анализа изменений внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Calcium imaging) на стимуляцию рецепторов. Кроме того, интересным является изучение взаимодействия клеток нервной системы кишечника с другими типами клеток в трёхмерных средах.

Заключение

Разработанный метод позволяет выращивать клетки нервной системы кишечника, формирующие связи друг с другом в трёхмерной среде *in vitro*, что может быть использовано для получения нервных сплетений кишечника при выращивании кишки путем тканевой инженерии. Дальнейшие исследования лежат в плоскости изучения функциональности выращенных в трёхмерных средах клеток и совместного выращивания клеток нервной системы кишечника с другими типами клеток в трёхмерных средах.

Литература

1. Pakarinen, M.P. Autologous intestinal reconstruction surgery as part of comprehensive management of intestinal failure. *Pediatr Surg Int*. 2015; 31(5): 453-64.
2. Хасанов Р.Р., Гумеров А.А., Вессель Л.М. Причины развития синдрома короткой кишки. *Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии*. 2017; 7(3): 8-12.
3. Wales, P.W. and E.R. Christison-Lagay, Short bowel syndrome: epidemiology and etiology. *Semin Pediatr Surg*. 2010; 19(1): 3-9.
4. Тимербулатов В.М., Тимербулатов Ш.В., Асманов Д.И., Асманов Д.И., Султанбаев А.У. Диагностика ишемических повреждений кишечника при некоторых острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости. *Креативная хирургия и онкология*. 2017; 7(3): 12-9.
5. Gargasz, A. Neonatal and pediatric parenteral nutrition. *AACN Adv Crit Care*. 2012; 23(4): 451-64; quiz 465-6.
6. Reinshagen, K., et al. The chronic liver disease in patients with short bowel syndrome: etiology and treatment. *Minerva Pediatr*. 2009; 61(3): 273-81.
7. Weih, S., et al. Current practice and future perspectives in the treatment of short bowel syndrome in children—a systematic review. *Langenbecks Arch Surg*. 2012; 397(7): 1043-51.
8. Nucci, A., et al. Interdisciplinary management of pediatric intestinal failure: A 10-year review of rehabilitation and transplantation. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2008; 12(3): 429-35.
9. Belza, C., et al. *Predicting Intestinal Adaptation in Pediatric Intestinal Failure: A Retrospective Cohort Study*. *Ann Surg*. 2017.
10. Lacaille, F., et al. Twenty-eight years of intestinal transplantation in Paris: experience of the oldest European center. *Transpl Int*. 2017; 30(2): 178-86.
11. Grant, D., et al. Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *Am J Transplant*. 2015; 15(1): 210-9.
12. Dosh, R.H., et al. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018; 24(2): 98-111.

13. Nakase, Y., et al. Endocrine cell and nerve regeneration in autologous *in situ* tissue-engineered small intestine. *J Surg Res*. 2007; 137(1): 61-8.
14. Dosh, R.H., et al. Use of hydrogel scaffolds to develop an *in vitro* 3D culture model of human intestinal epithelium. *Acta Biomater*. 2017; 62: 128-43.
15. Markel, T.A., et al. Stem cells as a potential future treatment of pediatric intestinal disorders. *J Pediatr Surg*. 2008; 43(11): 1953-63.
16. Levin, D.E., et al. Human tissue-engineered small intestine forms from postnatal progenitor cells. *J Pediatr Surg*. 2013; 48(1): 129-37.
17. Dunn, J.C. Is the tissue-engineered intestine clinically viable? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008; 5(7): 366-7.
18. Bitar, K.N., S. Raghavan, and E. Zakhem. Tissue engineering in the gut: developments in neuromusculature. *Gastroenterology*. 2014; 146(7): 1614-24.
19. Лисина О. Ю., Московцев А. А., Кубатиев А. А., Сурин А. М. Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(2): 11-23.
20. Hagl, C.I., et al. Enteric neurons from postnatal Fgf2 knockout mice differ in neurite outgrowth responses. *Auton Neurosci*. 2012; 170(1-2): 56-61.
21. Сабурин И. Н., Кошелева Н. В., Зурина И. М., Горкун А. А., Пулин А. А., Еремин И. И. и др. Динамика изменения миогенного потенциала стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки рта в 2D и 3D культуре. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 111-9.
22. Schafer, K.H., et al. A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1997; 1(2): 109-13.
23. Dosh, R.H., et al. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017.

References

1. Pakarinen, M.P. Autologous intestinal reconstruction surgery as part of comprehensive management of intestinal failure. *Pediatr Surg Int*. 2015; 31(5): 453-64.
2. Khasanov R.R., Gumerov A.A., Wessel L.M. The causes of the short bowel syndrome. *Rossiyskiy vestnik detskoy khirurgii, anesteziologii i reanimatologii*. 2017; 7(3): 8-12. (in Russian)
3. Wales, P.W. and E.R. Christison-Lagay, Short bowel syndrome: epidemiology and etiology. *Semin Pediatr Surg*. 2010; 19(1): 3-9.
4. Timerbulatov V.M., Timerbulatov S.V., Sagitov R.B., Sultanabaev A.U., Asmanov D.I. Diagnostics of the intestine ischemic damages in some acute surgical diseases of abdominal cavity. *Kreativnaya khirurgiya i onkologiya*. 2017; 7(3): 12-9. (in Russian)
5. Gargasz, A., Neonatal and pediatric parenteral nutrition. *AACN Adv Crit Care*. 2012; 23(4): 451-64; quiz 465-6.
6. Reinshagen, K., et al. The chronic liver disease in patients with short bowel syndrome: etiology and treatment. *Minerva Pediatr*. 2009; 61(3): 273-81.
7. Weih, S., et al. Current practice and future perspectives in the treatment of short bowel syndrome in children—a systematic review. *Langenbecks Arch Surg*. 2012; 397(7): 1043-51.
8. Nucci, A., et al. Interdisciplinary management of pediatric intestinal failure: A 10-year review of rehabilitation and transplantation. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2008; 12(3): 429-35.

9. Belza, C., et al. Predicting Intestinal Adaptation in Pediatric Intestinal Failure: A Retrospective Cohort Study. *Ann Surg*. 2017.
10. Lacaillie, F., et al. Twenty-eight years of intestinal transplantation in Paris: experience of the oldest European center. *Transpl Int*. 2017; 30(2): 178-86.
11. Grant, D., et al. Intestinal transplant registry report: global activity and trends. *Am J Transplant*. 2015; 15(1): 210-9.
12. Dosh, R.H., et al. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018. 24(2): 98-111.
13. Nakase, Y., et al. Endocrine cell and nerve regeneration in autologous in situ tissue-engineered small intestine. *J Surg Res*. 2007; 137(1): 61-8.
14. Dosh, R.H., et al. Use of hydrogel scaffolds to develop an in vitro 3D culture model of human intestinal epithelium. *Acta Biomater*. 2017; 62: 128-43.
15. Markel, T.A., et al. Stem cells as a potential future treatment of pediatric intestinal disorders. *J Pediatr Surg*. 2008; 43(11): 1953-63.
16. Levin, D.E., et al. Human tissue-engineered small intestine forms from postnatal progenitor cells. *J Pediatr Surg*. 2013; 48(1): 129-37.
17. Dunn, J.C. Is the tissue-engineered intestine clinically viable? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008; 5(7): 366-7.
18. Bitar, K.N., S. Raghavan, and E. Zakhem. Tissue engineering in the gut: developments in neuromusculature. *Gastroenterology*. 2014; 146(7): 1614-24.
19. Lisina O.Y., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A., Surin A.M. Dynamics of changes in neuronal network morphology and development of mitochondria in mechanically damaged primary neuronal culture. *Patologicheskaya Fiziologya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2018; 62(2): 11-23. (in Russian)
20. Hagl, C.I., et al. Enteric neurons from postnatal Fgf2 knockout mice differ in neurite outgrowth responses. *Auton Neurosci*. 2012; 170(1-2): 56-61.
21. Saburina I.N., Kosheleva N.V., Zurina I.M., Gorkun A.A., Pulin A.A., Eremin I.I., et al. The dynamics of changes in myogenic potential of stromal cells from alveolar oral mucosa in 2D and 3D culture. *Patologicheskaya Fiziologya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2018; 62(4): 111-9. (in Russian)
22. Schafer, K.H., et al. A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1997; 1(2): 109-13.
23. Dosh, R.H., et al. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017.

Сведения об авторах:

Хасанов Расуль Риантович, канд. мед. наук, доцент каф. детской хирургии с курсом ИДПО Башкирского государственного медицинского университета, Уфа, Россия; науч. сотр. клиники детской хирургии университетской клиники Маннгейм университета Гейдельберга, Германия;

Гумеров Айтбай Ахметович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. детской хирургии с курсом ИДПО Башкирского государственного медицинского университета, e-mail: pedsurg@bk.ru;

Шефер Карл-Херберт, проф., вице-президент рабочей группы «Энтеральная нервная система», Университет прикладных наук Кайзерслаутерн, кампус Цвайбрюкен, Германия, Germany 66482 Zweibrücken Amerikastrasse;

Весель Лукас Мариа, доктор мед. наук, проф., директор клиники детской хирургии университетской клиники Маннгейм университета Гейдельберга, Германия.