

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-1-38-44

ОПЫТ ПЕРФУЗИОННОЙ РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО КАРКАСА ЛЕГКИХ КРЫСЫ

*Е.В. Кувевда¹, Е.А. Губарева¹, А.С. Сотниченко¹, И.С. Гуменюк¹, И.В. Гилевич^{1, 2},
И.С. Поляков², В.А. Порханов², С.Н. Алексеенко¹, П. Маккиарини¹*

¹ Международный научно-исследовательский клиничко-образовательный центр регенеративной медицины, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Российская Федерация

² ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Российская Федерация

Цель исследования – оценить перспективы использования процессов децеллюляризации и рецеллюляризации легких крысы как начального этапа создания тканеинженерных конструкций. **Материалы и методы.** Децеллюляризацию легких крысы выполняли перфузионным детергент-энзиматическим методом при сопутствующей вентиляции трахеи атмосферным воздухом. Качество проведенной децеллюляризации оценивали с использованием рутинных гистологических и иммуногистохимических методов исследования, количественное содержание ДНК определяли спектрофотометрически. Для статической рецеллюляризации и перфузионной рецеллюляризации целого органа в качестве модели для изучения поведения клеток на каркасе использовали мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки с последующей оценкой метаболической активности клеток колориметрическим методом и их жизнеспособности – путем окрашивания кальцеином и гомодимером этидия. Для качественной оценки матрикса легких после рецеллюляризации использовали иммуногистохимический анализ. **Результаты.** 92% аллогенной ДНК удалено при проведении децеллюляризации. Гистологическое окрашивание не выявило остаточных клеток и клеточных ядер при сохранности волокон внеклеточного матрикса, что подтверждалось иммуногистохимической реакцией матрикса с антителами к ламину, эластину, фибронектину, коллагенам I и IV типов до и после проведения децеллюляризации. Каркас при заселении клетками не проявляет токсических свойств, поддерживает жизнеспособность и метаболическую активность клеток. **Заключение.** Полученный опыт децеллюляризации и рецеллюляризации легких крысы является перспективной основой для разработки протоколов создания тканеинженерных легких.

Ключевые слова: децеллюляризация, рецеллюляризация, тканеинженерные легкие крысы.

EXPERIENCE OF PERFUSION RECELLULARIZATION OF BIOLOGICAL LUNG SCAFFOLD IN RATS

*E.V. Kuevda¹, E.A. Gubareva¹, A.S. Sotnichenko¹, I.S. Gumenyuk¹, I.V. Gilevich^{1, 2},
I.S. Polyakov², V.A. Porhanov², S.N. Alekseenko¹, P. Macchiarini¹*

¹ International Research, Clinical and Education Center of Regenerative Medicine, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

² Scientific Research Institution – S.V. Ochapovsky Regional Clinical Hospital № 1, Krasnodar, Russian Federation

Aim. The main aim of our research is to evaluate the process of rat lung decellularization and recellularization as the initial step of tissue-engineered organs creation. **Materials and methods.** Rat lung decellularization was performed by perfusion with detergents and enzymes with concomitant atmospheric air ventilation through the trachea. The quality of decellularization was analyzed with routine histological and immunohistochemical staining techniques, DNA content was determined quantitatively by spectrophotometer. For static and whole organ

Для корреспонденции: Кувевда Елена Вячеславовна. Адрес: 350063, г. Краснодар, ул. Седина, д. 4. Тел. 8 (918) 935-17-60. E-mail: elenakuevda@yandex.ru.

For correspondence: Kuevda Elena Vyacheslavovna. Address: 4, Sedin St., Krasnodar, 350063, Russian Federation. Tel. 8 (918) 935-17-60. E-mail: elenakuevda@yandex.ru.

reseeding as a model of cells' behavior mesenchymal multipotent stromal cells were used. Recellularization was followed by assessment of the cellular metabolic activity by colorimetric method; cell viability was analyzed by calcein and ethidium homodimer staining. Matrix qualitative evaluation after recellularization was performed using immunohistochemical staining methods. **Results.** 92% of allogeneic DNA was eliminated after decellularization. Histological staining revealed no residual cells and cell nuclei; preservation of the fibers of extracellular matrix was confirmed by immunohistochemical staining for laminin, elastin, fibronectin, collagen types I and IV before and after decellularization. The scaffold does not exhibit toxic properties after reseeding; cell viability and metabolic activity were proved after cultivation. **Conclusion.** The experience of rat lung decellularization and recellularization can be the prospective basis for protocols of organ recellularization and tissue engineered lungs creation.

Key words: decellularization, recellularization, rat tissue-engineered lungs.

ВВЕДЕНИЕ

Органная трансплантация на настоящий момент остается методом выбора при лечении пациентов с заболеваниями легких в терминальной стадии. Невозможность обеспечить донорским материалом одновременно всех пациентов в листе ожидания и этические проблемы, связанные с пересадкой трупных органов, приводят к росту летальности, обусловленной патологией со стороны легких и дыхательной системы в целом. Более того, в настоящее время описаны эффекты развивающейся хронической дисфункции пересаженных органов, снижающих пятилетнюю выживаемость после проведенной операции почти у 50% прооперированных больных [1]. На фоне постоянного увеличения числа больных в терминальной стадии дыхательной недостаточности перспективным методом лечения является пересадка тканеинженерных легких, децеллюляризованных, а затем засеянных аутологичными клетками реципиента [2].

Техническая сложность выполнения процесса децеллюляризации с последующей рецеллюляризацией требует проведения продолжительных доклинических исследований на мелких и крупных животных моделях с соблюдением установленных этических норм и правил. На настоящий момент предпочтение отдается децеллюляризованным биологическим каркасам, полностью лишенным клеточного и ядерного материала, не обладающим иммуногенностью и не требующим применения пожизненной иммуносупрессивной терапии [3, 4]. В качестве клеточного ресурса для рецеллюляризации легких широко используются как эндотелиальные и эпителиальные клетки, так и эмбриональные стволовые клетки, мезенхимальные мультипотентные стромальные стволовые клетки (ММСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [5].

В данной статье представлен опыт проведения децеллюляризации и рецеллюляризации легких крысы в качестве доклинического этапа создания тканеинженерных легких на модели мелких лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Децеллюляризация легких крысы с последующей оценкой качества каркаса

Децеллюляризацию легких выполняли перфузионным детергент-энзиматическим методом в сочетании с вентиляцией атмосферным воздухом через трахею, согласно разработанной нами методике, на 30 взрослых беспородных крысах-самцах весом 200 ± 20 г. [3]. Процедуру забора органокомплексов «сердце-легкие» и последующие исследования на животных проводили в лаборатории Международного научно-исследовательского клиничко-образовательного центра регенеративной медицины на базе Кубанского государственного медицинского университета после одобрения протокола исследования локальным этическим комитетом (протокол № 21/1). После эксплантации органокомплекс очищали от жировой клетчатки, промывали раствором фосфатного буфера, канюлировали на расстоянии 2,5–3 см от устья легочной артерии и фиксировали в биореакторе для последовательной перфузии растворами детергентов и ферментов. Процесс децеллюляризации легких начинали с использования 1% раствора пенициллина-стрептомицина в фосфатном буфере в течение 1 часа; затем органокомплекс перфузировали деионизированной водой 1 час; 1% водным раствором дезоксихолата натрия с добавлением 0,002М натриевой соли ЭДТА – 2 часа; деионизированной водой – 30 мин; 0,1% раствором Тритона X-100 в течение 1 часа; 1% раствором пенициллина-стрептомицина в фосфатном буфере – 1 час, свиной панкреатической ДНКазой I (2000 ЕД фермента на 200 мл фосфатного буфера с добавлением кальция и магния) – 3 часа. Общая продолжительность децеллюляризации составила 23 часа [6]. Вентиляцию легких атмосферным воздухом через трахею выполняли одновременно с перфузией легочной артерии с помощью системы Harvard Inspira Advanced Safety Ventilator (Harvard Apparatus, Массачусетс, США). Качество проведенной децеллюляризации оценивали при проведении гистологи-

ческого окрашивания и иммуногистохимического анализа, а также путем количественного определения содержания ДНК до и после проведения перфузии. Содержание гликозаминогликанов и эластических волокон внеклеточного матрикса (ВКМ) после децеллюляризации оценивали качественно после окрашивания срезов альциановым синим и пикрофуксином по Ван-Гизону. Содержание остальных белков ВКМ определяли при проведении иммуногистохимического анализа. Первичными антителами были выбраны мышинные моноклональные антитела к ламинину (1:100, ab 11575, Abcam, Англия), эластину (1:100, ab 21610, Abcam, Англия), фибронектину (1:100, ab 6328, Abcam, Англия) коллагену IV типа (1:100, ab 6586, Abcam, Англия), коллагену I типа (1:100, ab 34710, Abcam, Англия). Количественное определение содержания ДНК выполняли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием набора реагентов (Dneasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Швеция) по протоколу фирмы-изготовителя.

Рецеллюляризация легких крысы с последующей оценкой качества каркаса

Для оценки биосовместимости каркаса использовали статический метод рецеллюляризации с последующим выполнением ХТТ-теста через 48 часов культивирования в CO_2 -инкубаторе. Способность каркаса поддерживать клеточный рост также изучали при статическом заселении каркасов легких крысы после проведения дифференциального окрашивания живых и погибших клеток с использованием набора LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США) согласно инструкции производителя. Рецеллюляризацию целого органа проводили в модифицированном биореакторе Harvard Apparatus (Harvard Apparatus, Массачусетс, США), обеспечивающем стерильные условия для проведения процедуры. Однако указанный прибор не позволяет поддерживать постоянную концентрацию CO_2 на протяжении всей рецеллюляризации. В целях обеспечения необходимых условий для жизнедеятельности клеток биореактор помещали в CO_2 -инкубатор. Непосредственно перед перфузией питательной среды проводили асептическую обработку каркаса последовательной перфузией через легочную артерию 10% этанола в фосфатном буфере, собственно фосфатным буфером PBS +/- с 1% раствором антибиотика-антимикотика и средой для культивирования ММСК в течение 7 ч. Для моделирования поведения клеток на биологических каркасах легких были выбраны ММСК, полученные из костного мозга крыс. Указанные

клетки культивировали до получения 4-го пассажа, снимали с флакона, центрифугировали и получали суспензию клеток согласно стандартным методикам [7, 8]. Суспензию клеток вводили однократно в общем объеме 100 млн клеток. Смену среды производили каждые трое суток, общее время рецеллюляризации составило 7 дней. Принадлежность к ММСК клеток, использованных при заселении каркасов, была верифицирована путем индукции дифференцировки в три клеточные линии с помощью специализированных сред StemPro (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., США) по стандартному протоколу производителя с последующей качественной детекцией [9]. Адипогенную дифференцировку выявляли с помощью красителя Oil Red O, хондрогенную – при окрашивании толуидиновым синим сульфатированных гликозаминогликанов, кальцификацию ВКМ при остеогенной дифференцировке определяли при окрашивании ализариновым красным. Морфологическую характеристику рецеллюляризованного матрикса проводили после окрашивания гематоксилином и эозином и флуорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI. Иммуногистохимическое окрашивание с флюорохромной детекцией позволило качественно определить содержание эндотелиального маркера VEGF и актина в образцах засеянного матрикса легких. В качестве первичных были использованы антитела к VEGF (1:200, ab 46154, Abcam, UK) и актину (1:100, ab 14128, Abcam, UK), в качестве вторичных – поликлональные козы антитела к кроличьему иммуноглобулину (Alexa Fluor® 488, Life Technologies, NY, USA) в разведении 1:500 (ab 150077, Abcam, UK). Детекцию флуоресценции производили на микроскопе Olympus IX51 (Токио, Япония). Количество клеток, прикрепившихся к каркасу в процессе рецеллюляризации, определяли и верифицировали с помощью программы CellProfiler [10].

Статистический анализ

Статистическая обработка полученного материала произведена с использованием пакета программ MS Excel, v6.0, GraphPadPrism version 6.04 (источник www.graphpad.com). Результаты исследований оценены с использованием t-критерия Стьюдента. Доверительный интервал рассчитывался по таблице распределения Стьюдента. Достоверными признавались различия при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологическое исследование образцов децеллюляризованных легких не выявило значимого повреждения альвеолярной структуры после проведения децеллюляризации. При окраске гематок-

силином и эозином интактные клетки и клеточные ядра не визуализировались, что подтверждалось данными, полученными при окраске флуорофором DAPI. Окрашивание пикрофуксином по Ван-Гизону показало сохранность коллагеновых волокон ВКМ без патологических изменений структуры. Позитивное окрашивание срезов как нативных, так и децеллюляризованных легких свидетельствует о наличии слабокислых сульфатированных гликозаминогликанов даже после воздействия растворов детергентов. Иммуногистохимическое окрашивание не выявило качественных изменений структуры компонентов ВКМ по сравнению с нативными образцами: коллаген I типа и эластин выявлялись преимущественно в строме, в то время как коллаген IV типа, фибронектин и ламинин представлены в базальных мембранах сосудов и бронхов. Количественное определение содержания остаточной ДНК подтверждало высокое качество децеллюляризации: около 92% ДНК элиминируется в процессе обработки (от $581,03 \pm 18,42$ нг/мг в нативной ткани до $24,73 \pm 0,82$ нг/мг – в децеллюляризованных образцах, $p = 0,0467$).

Клетки, использованные для рецеллюляризации децеллюляризованных биологических каркасов легких, при культивировании в специализирован-

ных средах позитивно окрашивались красителями Oil Red O, толуидиновым синим и ализариновым красным, что характерно для морфологической характеристики прошедшей дифференцировки в три клеточные линии [11]. Указанная способность индуцированной дифференцировки является неотъемлемым признаком ММСК, что позволяет верифицировать принадлежность использованных в процессе рецеллюляризации клеток к мезенхимным клеткам (рис. 1).

Количественное определение наличия живых, метаболически активных клеток на засеянном каркасе выполнено с использованием набора для оценки пролиферации клеток, содержащего раствор соли 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолия-5-карбоксанилида (ХТТ). Каркас не является токсичным, поддерживает клеточный рост и пролиферацию ($p = 0,0024$) (рис. 2). Наличие жизнеспособных клеток после культивирования на децеллюляризованном каркасе также выявляли при дифференциальном окрашивании кальцеином (живые клетки) и гомодимером этидия (погибшие клетки) (рис. 3). Гистологические исследования после завершения процесса рецеллюляризации целого органа позволили оценить равномерность распределения клеток. Согласно результатам окрашивания

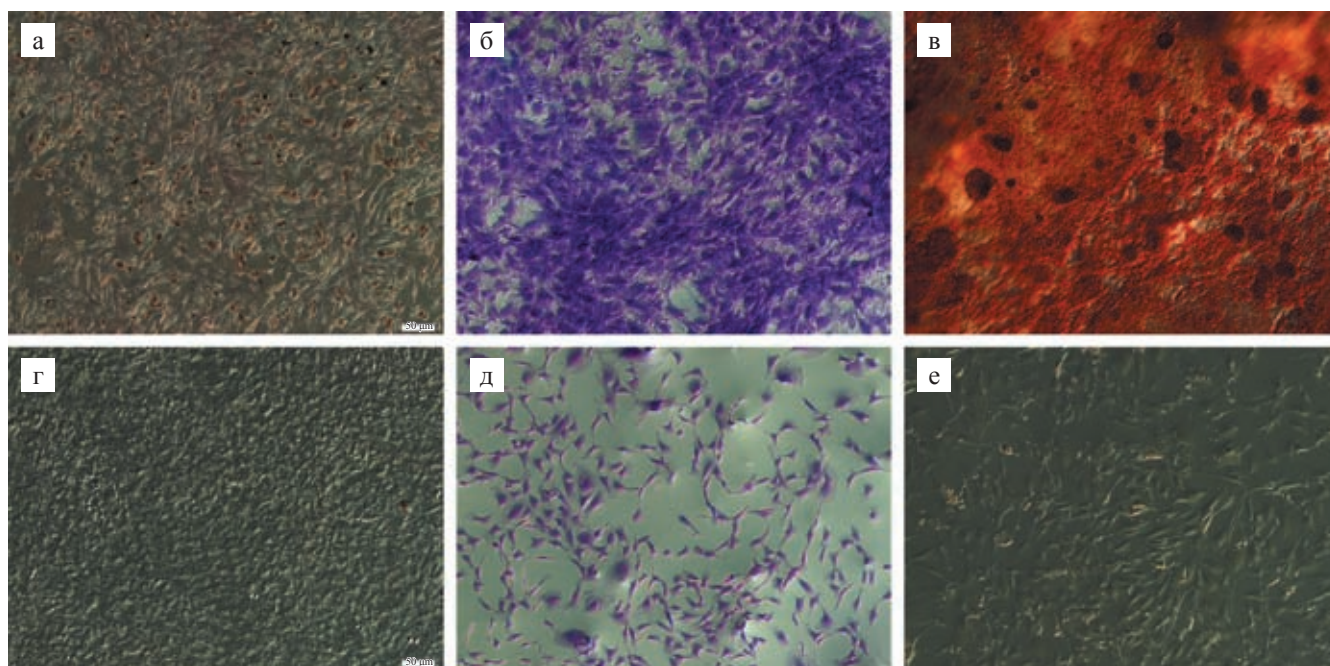


Рис. 1. Адипогенная, хондрогенная и остеогенная дифференцировка ММСК, пассаж 9. Липидные капли окрашены красным с использованием Oil Red O (а); толлуидиновый синий окрашивает ВКМ в фиолетовый цвет в процессе хондрогенной дифференцировки (б); кальциевые депозиты визуализируются ализариновым красным в виде красных пятен (в); контроль спонтанной дифференцировки в адипоциты (г), хондроциты (д), остеобласты (е). Увеличение: об. $\times 10$; ок. $\times 10$

Fig. 1. Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of MSCs, passage 9. The lipid droplets stained red with Oil Red O (a); toluidine blue stains ECM violet in chondrogenic differentiation (b); calcium deposits visualized as red spots with Alizarin red (v); control of spontaneous differentiation into adipocytes (g), chondrocytes (d), osteoblasts (e). Magnification $\times 10$

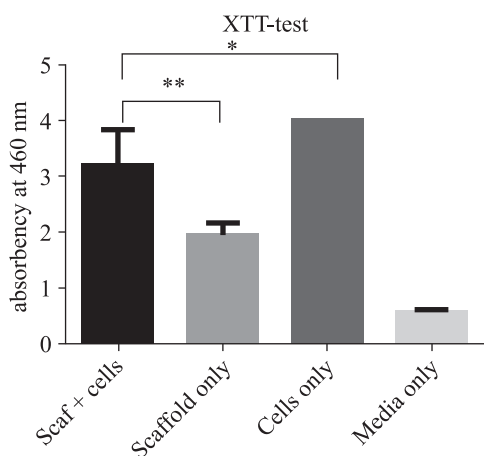


Рис. 2. Результаты ХТТ-теста. Метаболическая активность клеток, заселенных на каркас, сопоставима с пролиферацией клеток в контрольном образце и достоверно отличается от результатов исследования каркаса без клеток ($p = 0,0024$)

Fig. 2. Results of XTT assay. Metabolic activity of the cells seeded on the scaffold is comparable to the proliferation of cells in a control group and is significantly different from the results of the investigation of the scaffold without cells ($p = 0.0024$)

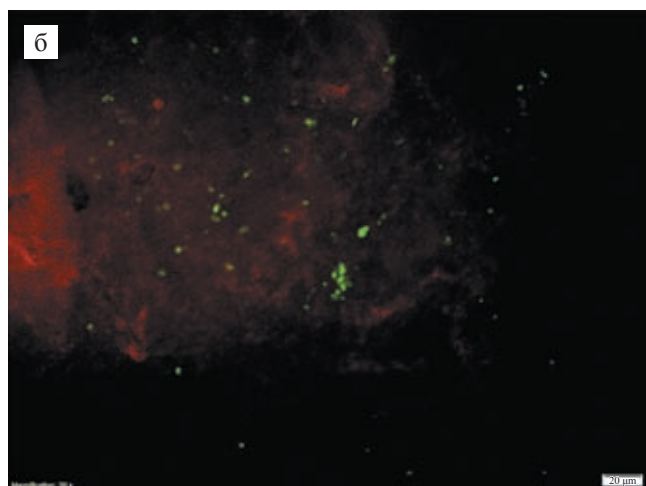
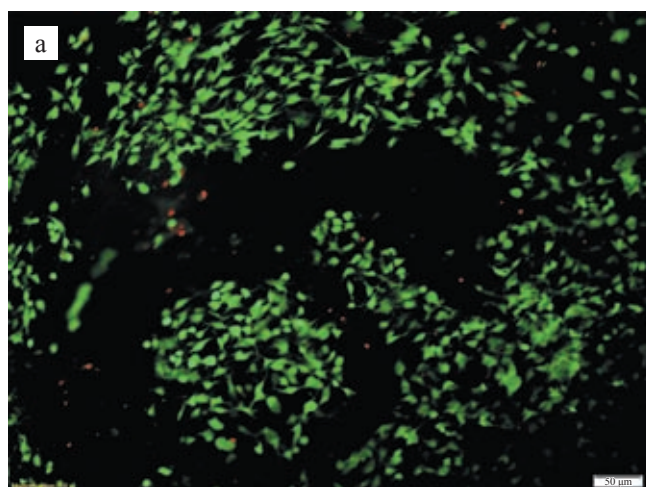


Рис. 3. Оценка жизнеспособности клеток на биологическом каркасе легкого крысы. Окрашивание кальцеином (зеленый) и гомодимером этидия (красный). Увеличение: а – об. $\times 10$; ок. $\times 10$; б – об. $\times 20$; ок. $\times 10$

Fig. 3. Estimation of cell viability on rat lung biological scaffold. Calcein staining (green) and ethidium homodimer staining (red). Magnification: a – об. $\times 10$; ок. $\times 10$; б – об. $\times 20$; ок. $\times 10$

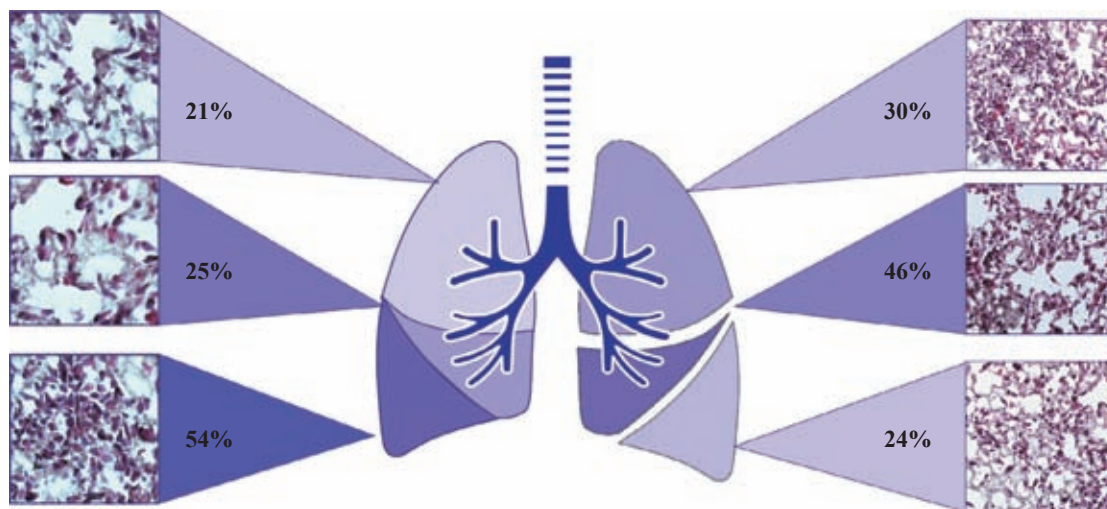


Рис. 4. Распределение клеток при заселении целого органа после 7 дней культивирования

Fig. 4. Cells distribution in whole organ reseeding process after 7 days of cultivation

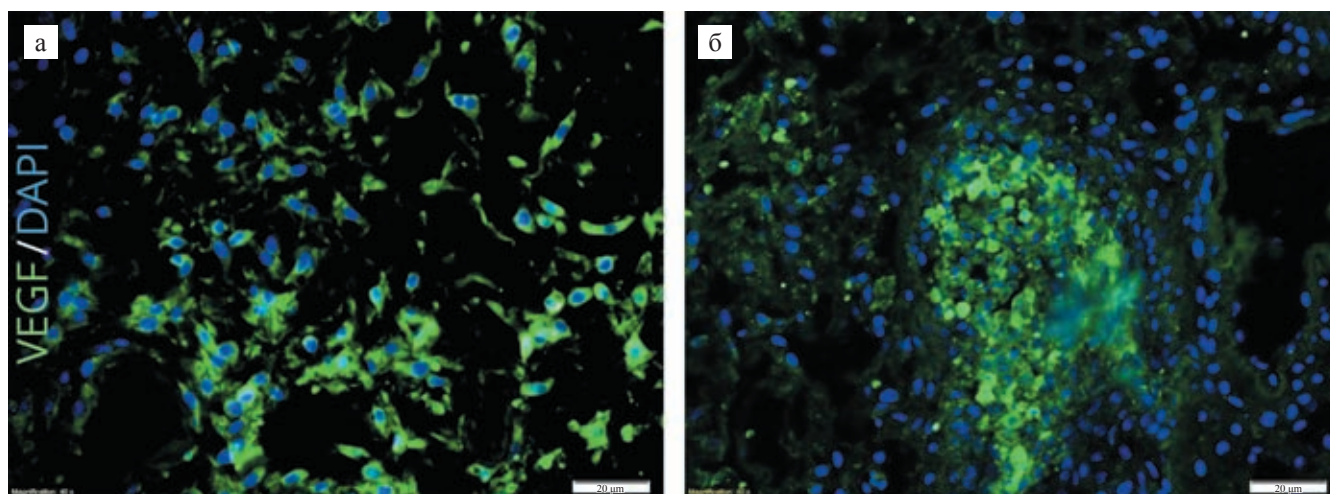


Рис. 5. Содержание VEGF в левом (а) и правом (б) легком после 7 суток рецеллюляризации. Увеличение: об. $\times 40$; ок. $\times 10$

Fig. 5. VEGF content in the left (a) and right (б) lungs after recellularization. Magnification $\times 40$

гематоксилином и эозином, клетки проникли вглубь каркаса с преимущественным заселением базальных отделов легких (рис. 4). Распределение клеток верифицировано подсчетом количества клеточных ядер в программе CellProfiler. Флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание цитоскелета после рецеллюляризации позитивно для актина и маркера ангиогенеза VEGF.

ОБСУЖДЕНИЕ

Создание тканеинженерного органа основывается на децеллюляризации биологического каркаса с последующей рецеллюляризацией аутологичными клетками реципиента. Обязательным результатом первого этапа является максимально полное удаление клеток с целью снижения иммуногенности каркаса при сохранении биохимического состава, морфо-биомеханических свойств и трехмерной структуры [12]. Рутинные гистологические и иммуногистохимические методы окрашивания, а также количественное определение содержания ДНК в нашем исследовании подтверждают отсутствие клеточных ядер и ядерного материала в децеллюляризованном матриксе легких крысы. Основные структурные белки ВКМ (ламинин, фибронектин, эластин и коллагены I и IV) сохраняются после обработки детергентами без качественного изменения состава. Статистически значимое снижение содержания ДНК в образцах после децеллюляризации полностью соответствует предложенным критериям оценки качества полученного каркаса (содержание остаточной ДНК – менее 50 нг/мг ткани) [13].

Успешное завершение первого этапа исследования позволило приступить к рецеллюляризации

полученного биологического каркаса легких как в статичных условиях (тестирование токсических свойств каркаса и способности поддерживать пролиферативную активность клеток), так и при заселении целого органа с использованием аллогенных ММСК костного мозга крыс. Результаты ХТТ-теста и исследования пролиферативной способности клеток на каркасе позволили сделать вывод об отсутствии цитотоксических свойств полученного матрикса. Более того, клетки не только прикрепляются к волокнам ВКМ, но и сохраняют жизнеспособность в процессе культивирования, проявляя метаболическую активность. Рецеллюляризация целого органа демонстрирует относительную равномерность распределения клеток на каркасе с некоторым преобладанием в базальных отделах легких. Результаты иммуногистохимического окрашивания позволяют говорить о некотором увеличении содержания маркера VEGF после рецеллюляризации каркаса, что говорит о его проангиогенных свойствах (рис. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный опыт децеллюляризации легких крысы подтверждает перспективность использования данного метода получения для биологических каркасов, потенциально не обладающих иммуногенностью, но сохраняющих трехмерную структуру, качественный и количественный состав ВКМ нативных органов. Успешная рецеллюляризация децеллюляризованных легких свидетельствует о биосовместимости и способности указанных каркасов обеспечивать надлежащее микроокружение и поддерживать клеточный рост на примере заселения их ММСК. Представляется целесообразным

продолжить исследование с использованием дифференцированных клеточных линий или индукцией клеточной дифференцировки для воссоздания структуры нативных легких.

Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (от 28.01.2015 г., ч. 1, раздел 1) «Разработка экспериментальных образцов тканеинженерных конструкций на основе децеллюляризованных матриц для применения в регенеративной медицине».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Gilpin SE, Ott HC. Using Nature's Platform to Engineer Bio-Artificial Lungs. *Annals ATS*. 2015; 12 (1): 45–49.
2. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev. Biomed. Eng.* 2011; 13: 27–53.
3. Кувда ЕВ, Губарева ЕА, Сотниченко АС, Гилевич ИВ, Гуменюк ИС, Поляков ИС и др. Детергентно-энзиматический метод децеллюляризации легких крысы. Морфологическая оценка матрикса. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 3; URL: www.science-education.ru/123-17759. Kuevda EV, Gubareva EA, Sotnichenko AS, Gilevich IV, Gumenyuk IS, Polyakov IS et al. Detergent-enzymatic method of rat lung decellularization. Matrix morphological evaluation. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education*. 2015; 3; URL: www.science-education.ru/123-17759. [In Russ, English abstract].
4. O'Neill JD. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann Thorac Surg*. 2013; 96: 1046–1056.
5. Tsuchiya T, Sivarapatna A, Rocco K, Nanashima A, Nagayasu T, Niklason LE. Future prospects for tissue engineered lung transplantation. Decellularization and recellularization-based whole lung regeneration. *Organogenesis*. 2014; 10 (2): 196–207.
6. Patent RF № 2547799 / 16.03.2015. P Macchiarini, EA Gubareva, EV Kuevda, IV Gilevich, Ph Jungebluth. Sposob sozdaniya bioinzhenernogo karkasa legkogo krysy // Patent Rossii № 2547799. 24.12.2013.
7. Jungebluth Ph, Haag JC, Sjöqvist S, Gustafsson Y, Rodríguez AB, Del Gaudio C et al. Tracheal tissue engineering in rats. *Nature protocols*. 2014; 9 (9): 2164–2179.
8. Baiguera S, Del Gaudio C, Lucatelli E, Kuevda E, Boierrri M, Mazzanti B et al. Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2014; 35: 1205–1214.
9. Shachpazyan NR, Astrelina TA, Yakovleva MV. Mesenchymal stem cells from various human tissues: biological properties, assessment of quality and safety for clinical use. *Kletochnaja transplantologija i tkanevaja inzhenerija = Cells transplantation and tissue engineering*. 2012; 7 (1): 23–33. [In Russ, English abstract].
10. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*. 2007; 42 (1): 71–75; PMID: 17269487.
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8 (4): 315–317; doi:10.1080/14653240600855905; PMID: 16923606.
12. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675–3683.
13. Gilbert TW. Strategies for tissue and organ decellularization. *J. Cell Biochem*. 2012; 113 (7): 2217–2222.

*Статья поступила в редакцию 25.11.2015 г.
The article was submitted to the journal on 25.11.2015*