

DOI: 10.15690/vramn723

Д.С. Барановский¹, А.Г. Демченко¹, Р.В. Оганесян¹, Г.В. Лебедев², Д.А. Берсенева²,
М.В. Балясин¹, В.Д. Паршин¹, А.В. Лյондуп¹¹ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций

Обоснование. Трансплантация тканеинженерной трахеи остается единственной надеждой для множества пациентов, страдающих тяжелыми рубцовыми стенотическими поражениями трахеи. Несмотря на существенное число выполненных исследований, окончательного решения проблемы пока не найдено. Вопрос о возможности создания функционально полноценной гиалиновой хрящевой ткани в трансплантате *in vitro* остается открытым, и ряд исследователей видят в нем ключ к успешному решению современных задач тканевой инженерии трахеи. **Цель исследования** — оценить способность комбинации детергентов и ДНКазы I к децеллюляризации хрящевой ткани трахеи человека при кратковременном воздействии для получения бесклеточного матрикса-носителя. **Методы.** В исследовании использовался нативный хрящ человека, выделяемый из трахеи трупного донора и децеллюляризуемый комплексом детергентов и энзимов, включающих Тритон X-100, DMSO и ДНКазу I. Свойства получаемого матрикса-носителя оценивались в ходе гистологических исследований, анализа содержания остаточной ДНК в препарате и колориметрического теста метаболической активности клеток при культивировании на фрагментах носителя. **Результаты.** Полученные матриксы-носители обладали пористой структурой, преимущественно представленной коллагеном и гликозаминогликанами, демонстрировали низкий уровень остаточной ДНК, лишены цитотоксичности и способны стимулировать пролиферативную клеточную активность. **Заключение.** Результаты данного исследования позволили предложить новый метод непродолжительной децеллюляризации гиалиновой хрящевой ткани с получением клеточных носителей, отвечающих основным требованиям тканевой инженерии.

Ключевые слова: тканевая инженерия, децеллюляризация, гиалиновый хрящ трахеи.

(Для цитирования: Барановский Д.С., Демченко А.Г., Оганесян Р.В., Лебедев Г.В., Берсенева Д.А., Балясин М.В., Паршин В.Д., Лյондуп А.В. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций. *Вестник РАМН*. 2017; 72 (4):254–260. doi: 10.15690/vramn723)

Обоснование

Первые попытки создания комбинированных тканеинженерных трансплантатов трахеи в эксперименте были сделаны Ваканти еще в 1994 г. Разработанная им

технология подразумевала использование синтетических материалов и имела множество недостатков: экспериментальное исследование завершилось развитием респираторного дистресс-синдрома у лабораторных животных и их гибелью [1]. В последствии множество других на-

D.S. Baranovsky¹, A.G. Demchenko¹, R.V. Oganessian¹, G.V. Lebedev², D.A. Berseneva¹,
M.V. Balyasin¹, V.D. Parshin¹, A.V. Lyundup¹¹ Sechenov First Moscow State Medical University Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russian Federation² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Acellular Tracheal Cartilaginous Scaffold Producing for Tissue-Engineered Constructs

Background: Tissue-engineered trachea transplantation remains the last chance for a variety of patients suffering from severe cicatricial tracheal stenosis. Despite the series of carried studies, the final solution hasn't been found. Creating a functionally complete hyaline cartilage graft *in vitro* still presents a fundamental problem, and a number of researchers consider it as the key to a successful tracheal tissue-engineering. **Aims:** The study aimed to investigate the capability of detergent complex and DNase I for human tracheal cartilage decellularization in short-time exposition for acellular scaffold obtaining. **Materials and methods:** Isolated from cadaveric trachea human native cartilage was used for decellularization by enzymatic-detergent complex including Triton X-100, DMSO, and DNase I. The scaffold was characterised by histological examinations, analysis of the residual DNA content, and cell metabolic activity colorimetric test with culture in the scaffold fragments. **Results:** The obtained scaffolds presented highly porous structure mostly composed of collagen and glycosaminoglycans with an insignificant residual DNA level, absence of cytotoxicity, and capability for cell proliferative activity stimulation. **Conclusions:** Thus, the study provides a new short-time technology for hyaline cartilage decellularization in order to achieve acellular scaffolds in step with the tissue engineering requirements.

Key words: tissue engineering, decellularization, tracheal hyaline cartilage.

(For citation: Baranovsky DS, Demchenko AG, Oganessian RV, Lebedev GV, Berseneva DA, Balyasin MV, Parshin VD, Lyundup AV. Acellular Tracheal Cartilaginous Scaffold Producing for Tissue-Engineered Constructs. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017; 72 (4):254–260. doi: 10.15690/vramn723)

учных коллективов трудились над созданием оптимального тканеинженерного трансплантата трахеи. Между тем трансплантация тканеинженерной трахеи остается единственной надеждой для множества пациентов, страдающих тяжелыми рубцовыми стенотическими поражениями трахеи после длительной интубации [2]. Однако, несмотря на значительное число экспериментальных и клинических исследований в данной области, окончательного решения проблемы пока не найдено. Исследование послеоперационных биоптатов, полученных из тканеинженерных трансплантатов трахеи, имплантированных пациентам, и оценка микрофотографий некоторыми независимыми экспертами демонстрируют наличие большого количества грануляционной ткани в зоне анастомозов и стенке тканеинженерного органа и признаки затяжного хронического воспаления с крайне небольшими и незначительными участками с элементами формирования эпителиального покрытия [3]. Вопрос о возможности создания функционально полноценной гиалиновой хрящевой ткани в трансплантате *in vitro* на сегодняшний день также остается открытым, несмотря на то, что ряд исследователей именно в нем видят ключ к успешному решению современных задач тканевой инженерии трахеи [4].

Данные наблюдения позволяют предположить, что существующие технологии получения матриц для тканевой инженерии трахеи и ее хрящевой ткани в частности не обеспечивают создания клеточных носителей, представляющих оптимальные условия для клеточной пролиферации и направленной дифференцировки.

Идеальный материал для такого трехмерного каркаса (или скаффолда) по своим свойствам должен максимально соответствовать межклеточному веществу, что необходимо для образования в рамках клеточного носителя искусственной клеточной ниши — непосредственного окружения клеток, создающего адекватные условия для их деления и взаимодействия, гисто- и морфогенеза, а также продукции межклеточного вещества.

Современные матрицы, как правило, имеют органическое происхождение и могут быть созданы искусственно на основе коллагена или полимеров молочной и/или гликолевой кислоты и др., или их гибридов. Все скаффолды, разрабатываемые в настоящее время, можно подразделить на резорбируемые и нерезорбируемые в зависимости от взаимодействия материала, из которого они изготовлены, с тканями реципиента.

В 80–90-х гг. прошлого столетия предпринимались попытки использования нерезорбируемых клеточных каркасов на основе пористого политетрафлуорэтилена, силикона и композитных материалов типа тефлоновой сетки. Однако в большинстве своем данные работы оказывались неудачными. Имплантация носителей из таких материалов приводила к большому числу тяжелых осложнений [5, 6].

Резорбируемые матрицы-носители способны метаболизироваться макрофагальной системой организма, со временем замещаясь межклеточным веществом, не оставляя в организме реципиента постоянного инородного тела [7]. В настоящее время в тканевой инженерии наиболее широко используются кадаверные аллотрансплантаты с последующей их децеллюляризацией и количественной контрольной оценкой остаточного ДНК в трансплантате [8–10]. Такая процедура позволяет избежать попадания антигенов донора в организм реципиента и, как следствие, предотвратить нежелательную реакцию иммунной системы [11–13]. Такие матрицы уже содержат соответствующие белки и факторы роста для первоначальной

адгезии, поверхностной пролиферации и клеточной дифференцировки, что облегчает создание клеточной ниши [14–16].

Для удаления клеточной составляющей нативного органа могут быть использованы различные методы воздействия на ткань — физические, ферментативные и химические [17, 18]. При этом следует отличать понятия децеллюляризации и девитализации: последняя только уничтожает живые клетки, сохраняя клеточное содержимое в структуре матрикса.

К физическим методам относятся механическое воздействие, циклы замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком.

При ферментативной децеллюляризации используются трипсин, эндо- и экзонуклеазы. Широко применяются и химические детергенты — кислоты и щелочи, ферменты, гипертонические и гипотонические растворы, ионные и неионные детергенты, хелатирующие агенты и бимодальные детергенты. Выбор действующего агента, метода децеллюляризации и продолжительности экспозиции действующих растворов определяется с учетом анатомо-гистологических особенностей, структуры и свойств исследуемого органа.

Неудачный выбор децеллюляризирующего агента может привести к разрушению структуры матрикса и потере его механических и биологических свойств. Необходимо учитывать, что любой химический агент повреждает матрикс в той или иной степени, и только правильно подобранные метод и длительность экспозиции способны минимизировать последствия данного воздействия, поэтому проблема поиска оптимальной технологии децеллюляризации тканей с сохранением межклеточного вещества максимально интактным остается открытой. Именно сохранность микроархитектоники и компонентов межклеточного вещества придает биоинженерным каркасам способность стимулировать клеточную пролиферацию, хемотаксис, ответное ремоделирование тканей пациента, и при этом они не должны содержать продуктов деградации донорских клеток и остатков химических детергентов, которыми их обрабатывали [18, 19].

Цель исследования — создание метода децеллюляризации хрящевой ткани трахеи с целью получения оптимального бесклеточного матрикса-носителя для создания тканеинженерных трансплантатов, обладающих широкими возможностями при решении задач реконструктивной хирургии трахеи и органоподобных моделей.

Методы

Дизайн исследования

План экспериментального исследования включал следующие этапы: медицинское вмешательство (забор биологического материала у трупного донора, определяемого в соответствии с критериями включения в исследование), выделение хрящевой ткани из стенки трахеи, децеллюляризация полученных образцов, оценку качества децеллюляризации и биосовместимости конечного продукта.

В основе проверки гипотезы исследования о возможности получения бесклеточного матрикса-носителя, обладающего надлежащими характеристиками, лежала оценка уровня остаточной ДНК в образцах конечного продукта децеллюляризации, гистологическое исследование образцов и оценка биосовместимости образцов *in vitro*.

Критерии соответствия

В качестве доноров хрящевой ткани для получения матрикс-носителей в ходе настоящего исследования использовались исключительно кадаверные доноры.

Критерии включения:

- 1) подписанная форма информированного согласия на посмертное использование тканей в научно-исследовательских целях на момент смерти;
- 2) возраст от 18 до 65 лет на момент смерти.

Условия проведения

Все этапы экспериментального исследования выполнялись в условиях чистых помещений (стерильные культуральные боксы), при ламинарном потоке воздуха. Транспортировка биологических образцов производилась квалифицированным персоналом в емкостях, содержащих стерильный изотонический солевой раствор, в специальных контейнерах.

Продолжительность исследования

Общая продолжительность экспериментального исследования составила 12 нед, в числе которых 21 день с момента получения донорского материала.

Описание медицинского вмешательства

Забор биологического материала у трупного донора производился квалифицированным персоналом с использованием общехирургического инструментария. При этом после послойного рассечения подлежащих тканей, выполнения верхней срединной стернотомии выполнялась мобилизация трахеи тупым и острым путем, производилась резекция участка трахеи между 2-м и 8-м кольцами без продольного рассечения передней стенки трахеи с целью сохранения хрящевых колец интактными. Резецированная часть помещалась в герметичную маркированную емкость со стерильным изотоническим солевым раствором для транспортировки.

Основной исход исследования

В качестве основного критерия удаления клеточной составляющей было предложено снижение уровня остаточной ДНК в полученном матриксе более чем на 90%, что является общепринятым показателем высокой эффективности децеллюляризации ткани.

Дополнительные исходы исследования

Дополнительным критерием подлежащего удалению клеточной составляющей стало отсутствие видимых клеточных фрагментов при световой микроскопии образцов в результате гистологического исследования.

В качестве критерия биосовместимости матрикс-носителей было предложено отсутствие цитотоксического эффекта образцов при исследовании *in vitro*.

Методы регистрации исходов

В качестве нативного материала для получения бесклеточного матрикса-носителя использовались фрагменты хряща, выделенного из участка трахеи трупного донора от перстневидного хряща до карины. Перед проведением децеллюляризации хрящ очищался от окружающих тканей и промывался физиологическим раствором с целью удаления сгустков крови или других биологических жидкостей, потенциальных посторонних частиц. Затем образцы тканей проходили обработку 6% раствором диметилсульфоксида (DMSO) с добавлением антибиотика и антимикотика 1% в течение 24 ч, и отмывались в стерильной дистиллированной и деионизированной

воде с антибиотиком-антимикотиком на протяжении 48 ч. После завершения отмывания ткани перемещались в 4% раствор дезоксихолата натрия на 4 ч для полного разрушения клеточных липидных оболочек. По истечении требуемого времени воздействия физиологический солевой баланс тканей восстанавливался сбалансированным раствором Хенкса в течение 30 мин для подготовки образцов к ферментации. С целью ферментации нуклеиновых кислот использовался раствор ДНКазы (20 ЕД/мл, Sigma, США), с добавлением 1 ммоль/л NaCl и 10% DMSO (Sigma, США) с 4-часовой экспозицией, после чего фрагменты тканей помещались в 1% раствор Тритона X-100 с добавлением CHAPS, Tris и 10% DMSO на 48 ч. Выполнялось контрольное повторение цикла. Процесс децеллюляризации завершался промыванием образца 1% раствором пенициллина-стрептомицина в фосфатном буфере в течение 72 ч с целью удаления из ткани остаточных количеств химических детергентов. Все представленные стадии децеллюляризации выполнялись при температуре +3–4°C, за исключением стадии ферментации ДНКазой, наибольшая активность которой достигалась при температуре +37°C.

Гистологическое исследование скаффолда

Полученные образцы ткани замораживали при температуре -80°C. С помощью криотома (Microm HM 505 E Cryostat, Германия) получали срезы толщиной 6 мкм, фиксировали в течение нескольких секунд в нейтральном растворе формальдегида с добавлением 95% этанола в отношении 1:1. Для изучения структуры полученного внеклеточного матрикса использовали гистохимическую окраску по методу Маллори и окраску сафранином-О (Biovitrum, Россия). Исследование микропрепаратов выполнялось методом трансмиссивной световой микроскопии с использованием микроскопа ECLIPSE TE2000-U (Nikon, Япония).

Флуоресцентная микроскопия

Качество децеллюляризации в образцах определяли по наличию нуклеиновых кислот. Срезы фиксировали, отмывали 10 мин в фосфатно-солевом буфере (Gibco, США). Окрашивали бромистым этидием (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид, Sigma, США) в концентрации 5 мкг/мл в течение 5 мин, промывали фосфатно-солевым буфером и заключали под покровное стекло в 80% глицерине на фосфатно-солевом буфере. Микроскопию проводили на флуоресцентном микроскопе ECLIPSE TE2000-U при возбуждении флуоресценции лазером зеленого спектра.

Оценка содержания остаточной ДНК

Анализ материала осуществлялся по стандартному протоколу [20]. Для анализа использовали пять предварительно гомогенизированных проб материала, взятых не с поверхности образца. Оценка содержания ДНК в растворе производилась методом флуорометрического анализа (Quantus Fluorometer, США). С учетом концентрации ДНК в полученном растворе, объема данной пробы и массы образца оценивалось процентное содержание ДНК в пробе. В качестве положительного контроля использовали пробы нативного образца хрящевой ткани трахеи человека, не подвергавшийся децеллюляризации.

Оценка биосовместимости

С целью оценки цитотоксичности (биосовместимости) децеллюляризованного хряща использовался колориметрический тест метаболической активности клеток

(МТТ-тест) с применением клеточной линии фибробластов мыши 3Т3.

Фибробласты засевали на кусочки стерильного децеллюляризованного хряща трахеи размером 1×2 мм в количестве 24 000 клеток в объеме 600 мкл. Культивирование проводилось в полнокомпонентной питательной среде Игла, модифицированной по Дюльбекко (Invitrogen, США), содержащей 10% телячью фетальную сыворотку (HyClone Defined, HyClone, США), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, США). Культивирование осуществляли в пробирках объемом 1,8 мл (Corning, США) при непрерывном вращении в CO₂-инкубаторе (Thermo) с 5% концентрацией CO₂, 95% атмосферного воздуха и с повышенной влажностью при температуре 37°C. По истечении 4 сут проводился МТТ-тест по методу Мосмана [21]. Показания оптической плотности считывали на планшетном фотометре (Multiskan FC, Thermo Scientific, США).

Оценка содержания ДНК производилась методом флуориметрического анализа раствора после гомогенизации всех образцов с использованием аппарата Quantus Fluorometer (США).

Этическая экспертиза

Протокол настоящего исследования рассмотрен Локальным комитетом по этике ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (протокол заседания Локального комитета по этике № 07-15 от 15.07.2015, протокол исследования № ЦКПРМТИТ 3/2015).

Статистический анализ

Статистический анализ не проводился в связи с особенностями плана экспериментального исследования, в т.ч. с отсутствием групп, подлежащих сравнению.

Результаты

Основные результаты исследования

Гистохимическая окраска тканей по Маллори показала, что гиалиновый хрящ децеллюляризованных экземпляров и образцов нативного хряща трахеи от трупного донора окрашен различными оттенками синего, характерными для коллагена, — более светлыми в препаратах децеллюляризованного хряща. Слизистая оболочка и подслизистая основа децеллюляризованного фрагмента трахеи была представлена в виде единичных рыхлых волокон, сохранившихся после механического удаления окружающих хрящ тканей. В децеллюляризованной ткани не наблюдалось сохраненных клеток эпителия, хондроцитов и хондробластов, в глубоких слоях матрикса отмечены единичные фрагменты клеточных оболочек. Микроархитектоника полученного матрикса без патологических изменений. Результаты окраски срезов нативного образца позволили визуализировать сохранную стенку трахеи, представленную слизистой оболочкой и подслизистой основой, фиброзно-хрящевой оболочкой, надхрящницей и адвентициальной оболочкой (рис. 1).

Окраска срезов децеллюляризованного хряща сафранином-О продемонстрировала насыщенную розово-красную окраску межклеточного матрикса, соответствующую высокому содержанию гликозаминогликанов в материале (рис. 2).

Окрашивание на нуклеиновые кислоты показало отсутствие характерной флуоресценции ядер и цитоплазмы

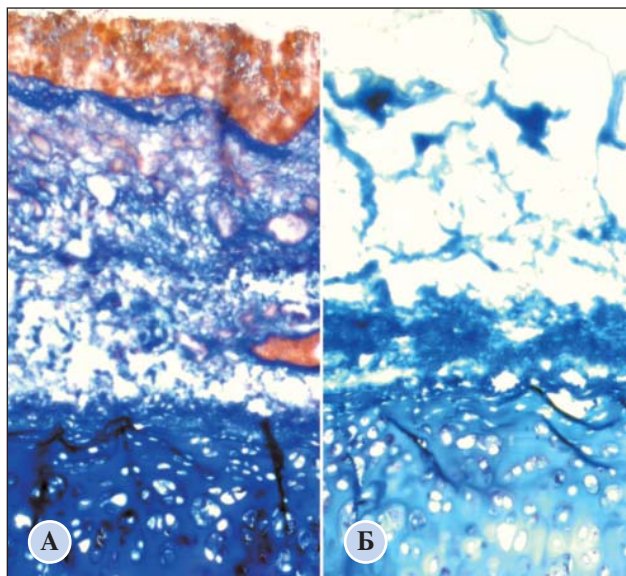


Рис. 1. Окраска по методу Маллори, световая микроскопия, ×100

Примечание. А — препарат интактной стенки трахеи человека: визуализируется слизистая оболочка и подслизистая основа с залегающими белково-слизистыми железами, надхрящница (перихондриум) и гиалиновый хрящ, содержащий лакуны с сохранными хондроцитами; Б — препарат гиалинового хряща трахеи человека после химической децеллюляризации: слизистая оболочка и подслизистая основа представлены в виде отдельных рыхлых волокон; в толще хрящевой ткани визуализируются пустые клеточные лакуны, глубоко в структуре ткани отмечаются единичные фрагменты клеточных оболочек.

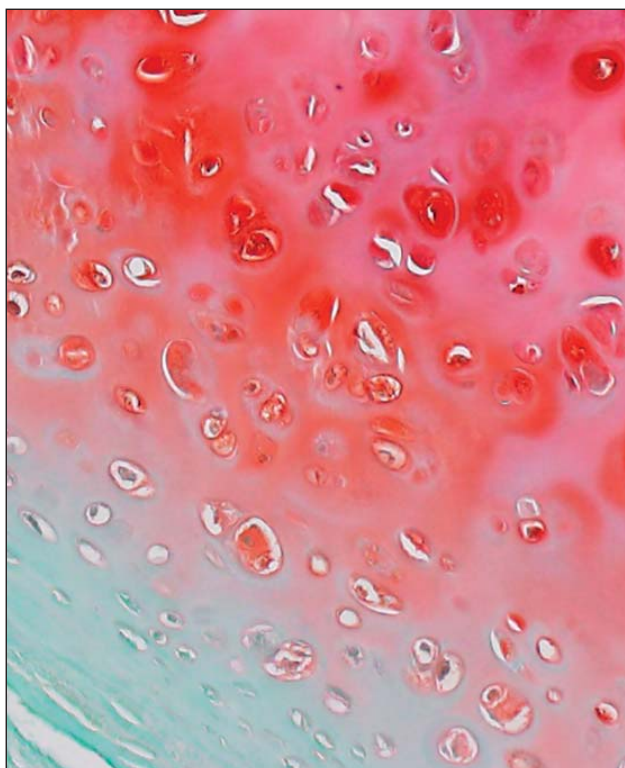


Рис. 2. Препарат гиалинового хряща трахеи человека после химической децеллюляризации, световая микроскопия, сафранин-О

Примечание. Гликозаминогликаны в толще хрящевой ткани окрашены оттенками красного и розового цветов, более насыщенными в глубоких структурах образца и области клеточных лакун, что соответствует более высокому содержанию гликозаминогликанов.

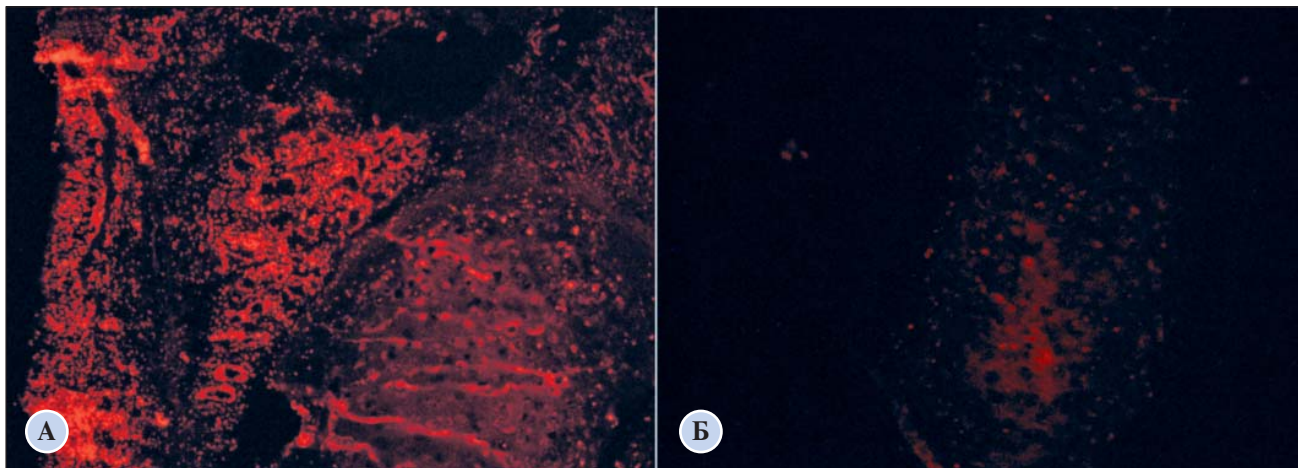


Рис. 3. Окраска нуклеиновых кислот бромистым этидием, флуоресцентная микроскопия, $\times 40$

Примечание. А — препарат интактной стенки трахеи человека: визуализируется интенсивная ярко-красная флуоресценция нуклеиновых кислот; Б — препарат стенки трахеи человека после химической децеллюляризации: визуализируется снижение интенсивности флуоресценции нуклеиновых кислот, наблюдается слабое свечение клеток в глубине хрящевой ткани.

258

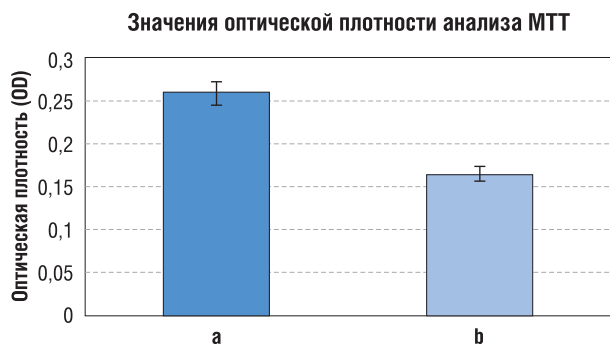


Рис. 4. Диаграмма показателей МТТ-теста клеточной активности на 4-е сут культивирования на исследуемых образцах

Примечание. а — фрагменты стерильного децеллюляризованного хряща, б — клеточный носитель-цитодекс (контроль)

в образцах после децеллюляризации и наличие интенсивного свечения в нативных образцах (рис. 3).

Оценка остаточной ДНК методом флуоресцентного анализа подтвердила удаление большей части ДНК в процессе децеллюляризации: так, содержание ДНК в нативном образце составило $2,442 \pm 0,114$ нг/мкг, в то время как в децеллюляризованной хрящевой ткани — только $0,101 \pm 0,030$ нг/мкг, что соответствует $4,12 \pm 1,22\%$ относительного количества ДНК в нативном образце.

Результаты МТТ-теста выявили более высокую оптическую плотность в исследуемых образцах (0,26 OD) в сравнении с контрольным стандартным клеточным носителем (0,16 OD): таким образом, полученные матриксы-носители на основе децеллюляризованной ткани хряща трахеи не обладают выраженной цитотоксичностью и способны стимулировать пролиферативную клеточную активность (рис. 4).

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

В основе предложенного процесса децеллюляризации гиалиновой хрящевой ткани лежит эффективное комплексное воздействие детергентов и энзимов на донорскую ткань. Новая технология позволяет получать материалы, отвечающие основным критериям, предъявляемым к клеточным носителям в тканевой инженерии, в т.ч. низкому содержанию остаточной донорской ДНК.

Обсуждение основного результата исследования

Задача максимально полного удаления донорской ДНК является ключевой в трансплантологии тканеинженерных органов, однако достичь ее можно лишь при очень тонкой подборке используемых детергентов и времени экспозиции. В работах S. Vaiguera и соавт. исследователи сообщают о $\sim 90\text{--}99\%$ очистке трахеального матрикса при остающихся нескольких видимых хондроцитах в поле зрения при микроскопическом исследовании хрящевой части трахеи [22, 23]. A. Batioglu-Karaaltin и соавт. получили матриксы, на 90% очищенные от донорской ДНК [24].

Использование комбинации ДНКазы и детергентов, разработанной в результате настоящего исследования, обеспечивает более полное удаление клеточных компонентов из нативной ткани, максимально сохраняя структуру и архитектуру внеклеточного матрикса. Незначительный уровень остаточного ДНК в получаемых носителях обеспечивает им низкую иммуногенность, что может иметь определяющее значение при имплантации. Метод количественной оценки остаточной ДНК, использованный в настоящем исследовании, позволяет представить наиболее точный, объективный и репрезентативный результат в дополнение к качественным оценкам, получаемым при микроскопии отдельных срезов матрикса.

Обработка биологического материала 1% раствором Тритон X-100 с добавлением CHAPS способствует достижению максимальной экстракции клеточных белков и ферментов, включая протеины цитоплазматических мембран (в т.ч. и молекул главного комплекса гистосовместимости) [25, 26]. Качество элиминации внутриклеточных высокомолекулярных соединений существенно повышается за счет впервые предложенной комбинации дезоксихолата натрия и диметилсульфоксида, липолитическая активность которых позволяет быстро разрушать фосфолипидный бислой клеточной мембраны. Способность DMSO дестабилизировать структуру белков и увеличивать проницаемость клеточной оболочки доказывалась неоднократно [27, 28]. Уже на первом этапе девитализации растворенный DMSO обеспечивает быстрое поступление воды в клетку, осмотический лизис подавляющего большинства клеток и элиминацию клеточных органелл. На последующих этапах детергентно-энзиматического воздействия добавлением DMSO достигается быстрое проникновение активных компонентов раствора в подлежащие слои плотной ткани и сквозь цитоплазматические мембраны, повышая каче-

ство децеллюляризации и сокращая время, затрачиваемое на процедуру. Вместе с тем на завершающих этапах подготовки клеточного носителя удаление диметилсульфоксида солевыми растворами из внеклеточного матрикса не представляет технических трудностей. Приведенные выше результаты гистологического исследования и количественного анализа остаточной ДНК в носителях, полученных с применением DMSO, указывают на надлежащий эффект децеллюляризации. Отсутствие потенциального цитотоксического эффекта следовых количеств детергентов подтверждается представленными результатами анализа метаболической активности клеток, находящихся в непосредственном контакте с фрагментами скаффолда.

Гистохимическая окраска тканей по Маллори указывает на незначительную потерю коллагеновых волокон в межклеточном веществе хряща при химическом воздействии детергентов. Гиалиновый хрящ децеллюляризованных образцов и нативный хрящ трахеи от трупного донора окрашены различными оттенками синего, более светлыми в периферической части препаратов децеллюляризованного хряща, что объясняется неизбежно более высокой концентрацией активных химических веществ в этой области при проведении процедуры обескелочивания. Внеклеточный матрикс обнаруживает пористую структуру, представленную преимущественно коллагеном и гликозаминогликанами, надлежащая сохранность последних при этом подтверждается при специальной окраске срезов сафранином-О. Наличие компонентов межклеточного вещества, необходимых для формирования естественной клеточной ниши в рамках носителя, и пористая структура матрикса позволяют предполагать возможность его успешной последующей ревитализации хондроцитами или мезенхимальными стволовыми клетками реципиента. Естественная органическая природа скаффолда делает возможным постепенное замещение межклеточного вещества скаффолда новыми компонентами, синтезируемыми аутогенными клетками, что не допускает пожизненного присутствия инородного материала в организме реципиента, существенно снижает риск развития хронического воспаления и фиброзирующих деформаций.

Сохраняющаяся высокая клеточная пролиферативная активность в протестированных образцах подтверждает биосовместимость носителя и указывает на отсутствие цитотоксических свойств скаффолда, что возможно лишь в случае надлежащей элиминации детергентов и энзимов после завершения процесса децеллюляризации.

Особенностью предложенной технологии остается непродолжительное время, затрачиваемое на обработку донорских тканей. Возможность быстрой подготовки плотных хрящевых матриксов-носителей, обладающих всеми вышеописанными качествами, позволяет рассматривать их в качестве оптимальных кандидатов для потенциального использования в хирургическом лечении пациентов. Благодаря предложенной технологии становится возможной персонализированная подготовка скаффолда с заданными морфометрическими параметрами, что тем не менее не приведет к существенному увеличению времени ожидания оперативного лечения пациентом или продолжительности лечебного процесса. Применение матриксов-носителей в создании тканеинженерных кон-

струкций для клинической практики предполагает ужесточение критериев включения для потенциальных доноров тканей. Так, должны быть исключены кадаверные доноры, имевшие на момент смерти любые инфекционные (в т.ч. ВИЧ, гепатит) и онкологические заболевания.

Перспектива клинического внедрения предлагаемой технологии также подразумевает выполнение исследований безопасности и эффективности готовых трансеинженерных конструкций *in vivo* с моделированием соответствующей патологии на лабораторных животных.

Ограничения исследования

Ограниченные возможности использования клеточного материала не позволяют непосредственно оценить способность матрикса к стимуляции клеточной миграции и глубокой колонизации носителя. Данное направление должно стать темой отдельного экспериментального исследования в рамках доклинического тестирования тканеинженерных конструкций.

Методы, использованные для оценки межклеточного вещества, подразумевают лишь качественную оценку матрикса и не позволяют сделать выводы о количественном содержании его компонентов.

Заключение

В результате данного исследования был предложен новый метод децеллюляризации хрящевой ткани на основе поэтапного непродолжительного комплексного воздействия комбинаций детергентов и энзимов. Эффективность метода оценивалась на примере децеллюляризации гиалиновой хрящевой ткани трахеи человека с получением обескелоченных матриксов-носителей, отвечающих основным современным требованиям тканевой инженерии. Главным преимуществом метода становится малое количество времени, затрачиваемое на подготовку продукта, что особенно важно для пациентов, ожидающих заместительной трансплантации участка дыхательных путей тканеинженерным графтом.

Таким образом, метод может найти применение в создании тканеинженерных трансплантатов дыхательных путей нового поколения, при этом естественная органическая природа матрикса-носителя создает возможности для постепенного замещения его межклеточного вещества новыми компонентами, синтезируемыми аутогенными клетками реципиента, и существенно снижает риск развития хронических воспалительных процессов и фиброзирующих деформаций полого органа.

Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 15-1500132).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, et al. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg.* 1994;29(2):201–205. doi: 10.1016/0022-3468(94)90318-2.
2. Stein AA, Quebral R, Boba A, Landmesser C. A post mortem evaluation of laryngotracheal alterations associated with intubation. *Ann Surg.* 1960;151(1):130–138.

3. Delaere PR, Van Raemdonck D. The trachea: the first tissue-engineered organ? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;147(4):1128–1132. doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.12.024.
4. Kojima K, Vacanti CA. Tissue engineering in the trachea. *Anat Rec (Hoboken).* 2014;297(1):44–50. doi: 10.1002/ar.22799.
5. Cull DL, Lally KP, Mair EA, et al. Tracheal reconstruction with polytetrafluoroethylene graft in dogs. *Ann Thorac Surg.* 1990;50(6):899–901. doi: 10.1016/0003-4975(90)91116-s.
6. Bottema JR, Wildevuur CH. Incorporation of microporous Teflon tracheal prostheses in rabbits: evaluation of surgical aspects. *J Surg Res.* 1986;41(1):16–23. doi: 10.1016/0022-4804(86)90003-x.
7. Ziegelaar BW, Aigner J, Staudenmaier R, et al. The characterisation of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement. *Biomaterials.* 2002;23(6):1425–1438. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00264-2.
8. Lim ML, Jungebluth P, Sjoqvist S, et al. Decellularized feeders: an optimized method for culturing pluripotent cells. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(12):975–982. doi: 10.5966/sctm.2013-0077.
9. Carbognani P, Spaggiari L, Solli P, et al. Experimental tracheal transplantation using a cryopreserved aortic allograft. *Eur Surg Res.* 1999;31(2):210–215. doi: 10.1159/000008641.
10. Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, et al. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol.* 2010;29(8):690–700. doi: 10.1016/j.matbio.2010.08.007.
11. Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer.* 2010;46(7):1181–1188. doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.027.
12. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:287–309. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315.
13. Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006;20(1):9–22. doi: 10.1096/fj.05-4682rev.
14. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562–573. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002.
15. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585–601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.
16. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):608–616. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00361-7.
17. 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. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124743.
18. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2008;372(9655):2023–2030. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61598-6.
19. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials.* 2007;28(25):3587–3593. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.043.
20. Nishiguchi MK, Doukakis P, Egan M, et al. *DNA isolation procedures.* In: DeSalle R, Giribet G, Wheeler W, editors. *Techniques in molecular systematics and evolution.* Birkhäuser Basel; 2002. pp 249–287. doi: 10.1007/978-3-0348-8125-8_12.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
22. Baiguera S, Jungebluth P, Burns A, et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials.* 2010;31(34):8931–8938. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.005.
23. Baiguera S, Del Gaudio C, Kuevda E, et al. Dynamic decellularization and cross-linking of rat tracheal matrix. *Biomaterials.* 2014;35(24):6344–6350. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.070.
24. Batioglu-Karaaltin A, Karaaltin MV, Ovali E, et al. In vivo tissue-engineered allogenic trachea transplantation in rabbits: a preliminary report. *Stem Cell Rev.* 2015;11(2):347–356. doi: 10.1007/s12015-014-9570-8.
25. Sui X, Zhao B, Lu S, et al, inventors. Cartilage cell epimatrix three-dimensional porous sponge stent for tissue engineering. Patent CN 200810057373. 2008 Jan 31.
26. Jiahuan D, Xianchang S, Song G, et al, inventors. Biological type cartilage repair material and preparation method. Patent CN 201310192619. 2013 May 22.
27. Gordeliev VI, Kiselev MA, Lesieur P, et al. Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures. *Biophys J.* 1998;75(5):2343–2351. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77678-7.
28. Jackson M, Mantsch HH. Beware of proteins in DMSO. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1078(2):231–235. doi: 10.1016/0167-4838(91)90563-f.

260

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Барановский Денис Станиславович, научный сотрудник Института регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **e-mail:** doc.baranovsky@gmail.com, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-6154-9959>, **SPIN-код:** 6913-6361

Оганесян Рубен Вагеевич, студент 5-го курса Института регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **e-mail:** oganesyan.rv@gmail.com, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8967-5597>, **SPIN-код:** 8106-3394

Лебедев Георгий Владиславович, студент 2-го курса Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 1, **e-mail:** lebedev.george12@gmail.com, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8493-3390>, **SPIN-код:** 2050-4004

Берсенева Дарья Артемовна, студентка 2-го курса Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 1, **e-mail:** berseneva1410@rambler.ru, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5970-2240>, **SPIN-код:** 8005-4028

Демченко Анна Гасымовна, студент-лаборант 3-го курса Института регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **e-mail:** demchenkoann@yandex.ru, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-4460-7627>, **SPIN-код:** 3779-9060

Балясин Максим Витальевич, студент-лаборант 3-го курса Института регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **e-mail:** max160203@gmail.com, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-3097-344X>, **SPIN-код:** 9738-4520

Паршин Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, заведующий отделением торакальной хирургии Университетской клинической больницы № 1 Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **тел.:** +7 (495) 609-14-00, **e-mail:** vdparshin@yandex.ru, **SPIN-код:** 8024-0178

Людуп Алексей Валерьевич, кандидат медицинских наук, заведующий отделением клеточных технологий Института регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, **тел.:** +7 (495) 609-14-00, **e-mail:** lyundup@gmail.com, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0102-5491>, **SPIN-код:** 4954-3004