

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-96-107

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОРТОТОПИЧЕСКАЯ ИМПЛАНТАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ТРАХЕИ, СОЗДАННОЙ НА ОСНОВЕ ЗАСЕЛЕННОГО МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ДЕВИТАЛИЗИРОВАННОГО МАТРИКСА

М.В. Балясин¹, Д.С. Барановский², А.Г. Демченко¹, А.Л. Файзуллин¹,
О.А. Красильникова¹, И.Д. Клабуков¹, М.Е. Крашенинников¹, А.В. Люндун¹,
В.Д. Паршин¹

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

² Университетский госпиталь Базеля, Базель, Швейцария

Цель. Изучить жизнеспособность тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе девитализированного трахеального матрикса (ДТМ), заселенного мезенхимальными стромальными и эпителиальными клетками, на модели оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии критического дефекта дыхательных путей у кроликов. Оценить потенциал ТИК к поддержанию стабильного просвета трахеи в области имплантации. **Материалы и методы.** Получены сингенные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ) и сингенные эпителиоциты легкого кролика. Морфологию и фенотип культуры МСК КМ подтверждали иммунофлюоресцентным окрашиванием на маркеры CD90 и CD271. Клетки легочного эпителия, полученные методом энзиматической обработки измельченной ткани легкого кролика, были окрашены на характерные для эпителиальных клеток маркеры СКРan, СК8/18 и СК14. Девитализация донорской трахеи проведена тремя последовательными циклами замораживания–оттаивания. Двухслойное заселение ДТМ клетками выполнено в условиях статичного и динамического культивирования. Проведена ортотопическая имплантация ТИК на место дефекта переднебоковой стенки трахеи кролика, сформированного в результате резекции трахеи на протяжении четырех колец. Оценка результатов выполнена методами компьютерной томографии, гистологического и иммуногистохимического анализов. **Результаты.** Получен имплантат ТИК на основе ДТМ с двухслойным заселением клеточными культурами МСК КМ и эпителиоцитов кролика. Через 3 мес. после имплантации отмечалось приживление ТИК, стенозирования стенки трахеи не наблюдалось, однако отмечалось незначительное сужение просвета в области имплантации. На 6-й мес. после имплантации жизнеспособность тканеинженерной конструкции подтверждалась гистологическим методом. Показана эпителизация и васкуляризация стенки трахеи, отсутствие признаков гнойного воспаления и асептического некроза. Определена причина небольшого сужения просвета трахеи – хроническое воспаление, вызванное раздражением слизистой шовным материалом. **Заключение.** Получена модель для оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии критического дефекта дыхательных путей. Разработанная ТИК на основе ДТМ, двухслойно заселенного эпителиоцитами легкого и МСК КМ, была успешно применена для замещения непротяженных дефектов трахеи в эксперименте *in vivo*. Минимальная тканевая реакция на ТИК трахеи была обусловлена биосовместимостью имплантата.

Ключевые слова: девитализация, имплантат, клеточная терапия, тканевая инженерия, тканевая терапия, торакальная хирургия, трансплантат, трахея.

Для корреспонденции: Балясин Максим Витальевич. Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 1.
Тел. (999) 772-58-69. E-mail: max160203@gmail.com

For correspondence: Balyasin Maksim Vitalievich. Address: 8/1, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russian Federation.
Тел. (999) 772-58-69. E-mail: max160203@gmail.com

EXPERIMENTAL ORTHOTOPIC IMPLANTATION OF THE TISSUE-ENGINEERED GRAFT OF TRACHEA BASED ON DEVITALIZED SCAFFOLD SEEDED WITH MESENCHYMAL AND EPITHELIAL CELLS

M.V. Balyasin¹, D.S. Baranovskii², A.G. Demchenko¹, A.L. Fayzullin¹, O.A. Krasilnikova¹, I.D. Klabukov¹, M.E. Krashenninikov¹, A.V. Lyundup¹, V.D. Parshin¹

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

² University Hospital Basel, Basel, Switzerland

Aim. To study the viability of the tissue-engineered graft (TEG) based on the devitalized tracheal scaffold (DTS), seeded by mesenchymal stromal and epithelial cells in the experiment on rabbits with the assessment of the cytocompatibility and biocompatibility *in vivo*. **Materials and methods.** Syngeneic mesenchymal bone marrow stromal cells (BMSCs) and lung epithelial cells of rabbit were obtained. Morphology and phenotype of the BMSCs culture were confirmed by immunofluorescent staining on CD90 and CD271 markers. Pulmonary epithelium cells obtained by enzymatic treatment of shredded lung tissue of rabbit were stained with CKPan, CK8/18 and CK14 markers of epithelial cells. The donor trachea was devitalized in three freeze-thawing cycles. Double-layer cell seeding of DTS was performed under static and dynamic culturing. Orthotopic implantation of TEG was performed at the site of the anterolateral wall defect in the rabbit trachea formed as a result of tracheal resection over four rings. The results were evaluated by computed tomography, histological and immunohistochemical analyses. **Results.** TEG implant based on DTS with two-layer cell cultures of rabbit BMSCs and epithelial cells was obtained. Three months after the implantation, TEG engraftment was observed, no tracheal wall stenosis was observed, but a slight narrowing of the lumen in the implantation area was observed. Viability of the tissue-engineered graft was confirmed by histological method 6 months after implantation. Epithelialization and vascularization of the tracheal wall, absence of signs of purulent inflammation and aseptic necrosis were shown. Small narrowing of the tracheal lumen was caused by chronic inflammation produced by irritation of the mucous suture material. **Conclusion.** The new model for evaluating the viability of a tissue engineering implant during critical airway defect closure was obtained. Two-layer vitalization of DTS with lung epithelial cells and BMSCs allows to create a tissue engineered structure for replacement of non-long tracheal defects in the experiment *in vivo*. The use of the tracheal tissue-engineered graft for orthotopic implantation showed a biocompatibility with minimal tissue reaction.

Key words: devitalization, implant, cell- and tissue-based therapy, tissue engineering, thoracic surgery, transplant, trachea.

ВВЕДЕНИЕ

Хронические стенозы трахеи, обусловленные онкологическими и неонкологическими процессами, при большом распространении обычно трудно поддаются лечению. Частота стенозирующих трахеальных повреждений составляет до 1% от всех интубаций [1] и достигает 20–25% при длительных интубациях [2]. Эндоскопическое стентирование пористыми эндопротезами не решает проблему по причине прорастания сетчатой структуры стента собственными тканями пациента или образования краевых рестенозов. Радикальные хирургические операции по типу циркулярной резекции пораженного участка органа имеют существенные ограничения, например, по протяженности дефекта, а также несут высокий риск осложнений [3]. Наиболее перспективным методом лечения подобных дефектов может стать использование тканеинженерных кон-

струкций (ТИК). Однако клиническое использование тканеинженерных конструкций трахеи на сегодняшний день сопровождается множеством проблем, такими как необходимость обеспечения достаточного кровоснабжения, формирования респираторного эпителия и препятствование размягчению трахеальной стенки [4, 5].

В настоящее время в эксперименте получен бесклеточный матрикс хряща трахеи при комбинированном воздействии детергентов и ДНКазы I [6], проведена рецеллюляризация дыхательных путей заселением мезенхимальных стромальных клеток (МСК) [7], установлено стимулирующее влияние МСК костного мозга (МСК КМ) на эпителизацию и формирование хрящевой ткани [8], а совокупность данных методов использовалась для получения ТИК трахеи.

В исследовании Go et al. (2010) оценивалось влияние эпителиальных клеток и хондроцитов, полученных в ходе дифференцировки из МСК, на эффективность ТИК при регенерации дыхательных путей у свиней [9]. Матрикса были получены методом детергентно-ферментативной децеллюляризации аллогенной трахеи. Аутологичные МСК были получены из костного мозга и дифференцированы в хондроциты. Аутологичные эпителиальные клетки были выделены из слизистой оболочки трахеи. Оба типа клеток высевали на матрикс с помощью двухкамерного биореактора при динамическом культивировании. Проводилось замещение участка трахеи длиной 6 см имплантацией ТИК. Показано, что заселение матрикса эпителием и полученными из МСК хондроцитами приводит к регенерации тканей трахеальной стенки.

В работе Jungebluth et al. (2012) исследовалась ТИК на основе децеллюляризованной трахеи свиньи, заселенной аутологичными мононуклеарными клетками из костного мозга с внешней стороны и эпителиальными клетками из биопсии слизистой оболочки полости рта с внутренней стороны [10]. Полученные конструкции были имплантированы свиньям в 6-см дефект трахеи. Через 60 сут после имплантации не наблюдалось различий механических свойств в сравнении с нативной тканью, а внутренняя поверхность трахеи была выстлана эпителием, и при этом не было выявлено признаков отторжения имплантата или выраженного воспалительного ответа.

В работе Shin et al. (2015) для восстановления дефекта трахеи кролика использовали ТИК на основе МСК КМ и матрикса, сформированного из измельченного децеллюляризованного суставного хряща свиньи [11]. Гистологическое исследование показало, что хрящ был образован с минимальным воспалением или грануляцией ткани.

Однако ранее не проводилась оценка в эксперименте *in vivo* жизнеспособности ТИК на основе девитализированной трахеальной стенки с большим остаточным содержанием экзогенных маркеров при заселении такого матрикса комбинацией из двух типов клеток. Кроме того, в литературе отсутствует описание использования полноценной экспериментальной модели для оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии критического дефекта дыхательных путей, которая бы позволяла делать выводы о биологической и физиологической совместимости и стабильности использованной конструкции.

Цель. Изучить жизнеспособность тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе девитализированного трахеального матрикса (ДТМ), заселенного мезенхимальными стромальными и эпителиальными клетками, на модели оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии крити-

ческого дефекта дыхательных путей у кроликов. Оценить потенциал ТИК к поддержанию стабильного просвета трахеи в области имплантации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лабораторные животные

Экспериментальные работы выполнены на линейных кроликах породы «Серый великан» ($n = 3$) с исходной массой тела 3,5–4,5 кг в возрасте 0,5–1 год, выращенных в питомнике Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России (пос. Светлые Горы, МО). Животных содержали в условиях Центрального вивария Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России при свободном доступе к пище и воде.

Все манипуляции с лабораторными животными были одобрены Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России и выполнялись с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005 г.), и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010 г.

Получение культуры МСК КМ

МСК КМ получали в соответствии с протоколом, применяемым в ЦКП «Регенеративная медицина» Сеченовского университета. Сингенные МСК кролика выделяли из костного мозга, который получали путем перфузии бедренной кости. Аспират костного мозга помещали в стерильную пробирку, содержащую 50 ЕД/мл гепарина и 0,25 мг/л гентамицина в PBS, и доставляли в лабораторию при температуре +20–24 °С. Выделение клеток и работу с ними проводили в чистой зоне 5-го класса по ISO. Аспират костного мозга объемом 10 мл был помещен в центрифужную пробирку и осажден при 350 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в 20 мл лизирующего буфера (114 мМ NH_4Cl , 7,5 мМ KHCO_3 , 0,1 мМ EDTA) в течение 3–5 мин. Затем повторно центрифугировали, клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде для культивирования МСК КМ на основе питательной среды DMEM/F12 (Invitrogen, США), содержащей 10% FBS (Invitrogen, США), 0,4 мкМ инсулина, 20 нг/мл bFGF, 10 нМ дексаметазона, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Суспензию клеток высевали в количестве $1,0\text{--}1,5 \times 10^6$ кл/мл в культуральные флаконы и помещали в CO_2 -инкубатор с концентрацией CO_2 5%, атмосферного воздуха 95% при температуре +37 °С и с повышенной влажностью. Замену культуральной

среды производили каждые 72 ч. При достижении 90% конфлюэнтности клетки отмывали раствором DPBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , затем снимали с культурального пластика раствором TrypLe (Invitrogen, США), центрифугировали при 350 g в течение 5 мин, отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в питательной среде и помещали $\frac{1}{3}$ клеточной суспензии на новую культуральную посуду.

Получение культуры эпителиальных клеток

Сингенные эпителиальные клетки выделяли из нативного легкого кролика. Легкое отмывали от компонентов крови методом длительной перфузии малого круга кровообращения физиологическим раствором с непрерывной подачей последнего в правый желудочек сердца кролика-донора с помощью роликового насоса. Очищенная ткань легкого осветлялась, приобретая белую окраску. Легкое мобилизовалось, отделялось от окружающих тканей и после пересечения магистральных сосудов помещалось в контейнер с транспортной средой, состоящей из DMEM/F12 с добавлением 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и доставлялось в лабораторию при температуре +20...24 °С. В условиях чистой зоны легкие измельчали на кусочки объемом $4 \pm 2 \text{ мм}^3$ и обрабатывали раствором диспазы в концентрации 5 ед/мл на протяжении 45 мин при +37 °С. Полученную суспензию фильтровали через сито 70 мкм для отделения фрагментов легочной ткани от клеточной взвеси. Фильтрат центрифугировали при 1200 об/мин и ресуспендировали осадок полной питательной средой KSFM (Invitrogen, США) с саплементом Keratinocytes Supplements (Invitrogen, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Полученную суспензию высевали на дно 24-луночного культурального планшета, предварительно покрытого коллагеном I типа. Культивирование клеток проводили в условиях CO_2 -инкубатора с заменой культуральной среды каждые 72 ч.

Оценка фенотипа МСК КМ и эпителия трахеи

Получение культур МСК КМ и эпителия трахеи кролика подтверждали с помощью иммуофлюоресцентного анализа с использованием антител: CD90, CD271, CDH, SOX2, COL1, Vimentin для МСК КМ и СК8/18, СК14, СКPan для эпителия соответственно. Для этого МСК КМ первого пассажа и эпителии трахеи нулевого пассажа трижды отмывали в PBS и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в PBS (рН 7,4) в течение 10 мин при 25 °С. Далее клетки трижды отмывали в PBS с 0,05% Tween 20 (PBS-T) по

5 мин, пермеабелизировали с помощью метанола при -20 °С и блокировали неспецифическое связывание антител раствором 2% BSA в PBS-T в течение 20 мин при +25 °С. Раствор удаляли и наносили первичные моноклональные антитела в разведении 1:100 anti-CDH, anti-COL2, anti-CD90, anti-SOX2, anti-Vimentin для культуры МСК и anti-СК8/18, anti-СК14, anti-СКPan для культуры эпителиальных клеток трахеи в растворе 2% BSA в PBS-T и инкубировали в течение 12 ч при +4 °С. Затем клетки трижды отмывали в PBS по 5 мин и наносили вторичные поликлональные антитела в разведении 1:500, конъюгированные с биотином к первичным антителам CD90, CD271, SOX2, СКPan, разведенные в PBS-T с добавлением 2% BSA. Инкубацию проводили в течение 60 мин при +25 °С. Клетки снова отмывали PBS трижды по 5 мин и наносили в PBS-T с добавлением 2% BSA: стрептавидин-Alexa Fluor 488 ко вторичным поликлональным антителам, конъюгированным с биотином; вторичные поликлональные антитела Alexa Fluor 594 к первичным антителам CDH, Vimentin и биотинилированные антитела к CD90, CD271, SOX2, СКPan, СК-8/18, СК-14. В качестве отрицательного контроля вторичных антител к исследуемым культурам не добавляли первичные антитела. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +25 °С в темноте. Клетки отмывали PBS трижды по 5 мин. Ядра окрашивали Hoechst-33342 в концентрации 1 мкг/мл.

Девитализация трахеи кролика

В качестве нативного материала для получения бесклеточного матрикса носителя применяли образец трахеи кролика-донора, выделенный на протяжении от второго кольца трахеи до бифуркации. Под девитализацией понимали гибель живых клеток в ткани при сохранении в материале клеточного содержимого и межклеточного матрикса. Перед проведением девитализации образец трахеи очищали от окружающих тканей и промывали буфером PBS для удаления сгустков крови. Затем образец помещали в пробирку с буфером PBS и замораживали в течение 15 мин в жидком азоте. После заморозки образцы размораживали в водяной бане при +37 °С в течение 30 мин, проводили замену буфера PBS и затем дважды повторяли циклы замораживания–оттаивания. Процесс девитализации завершался промыванием образцов трахеи в 70% растворе этилового спирта в течение 1,5 ч. Затем образцы помещали в PBS с добавлением 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина на 72 ч при +4 °С с целью удаления остаточных количеств этилового спирта и предотвращения возможности контаминации.

Оценка качества девитализации матрикса

Для качественной оценки девитализации образцы ДТМ фиксировали в 10% растворе формалина в PBS, отмывали проточной водой в течение часа, дегидратировали (Microm STR 120) и заключали в парафиновые блоки по стандартному протоколу. С блоков делали срезы толщиной 4 мкм (Microm HM 355s), помещали на непокрытые предметные стекла. Затем срезы адгезировали при +56 °С в течение 30 мин. Полученные срезы депарафинизировали, окрашивали гематоксилином и эозином, дегидратировали и просветляли в ксилоле (Microm HMS 70). Срезы заключали под покровные стекла в синтетической монтирующей среде. Полученные препараты оцифровывали при помощи автоматической установки Pannogamic DESK, затем проводили морфологическое исследование.

Оценка цитотоксичности ДТМ

Оценку цитотоксичности ДТМ проводили экстракционным методом на культуре МСК КМ кролика. Экстракты ДТМ кролика получали следующим способом: образцы ДТМ кролика с площадью поверхности 3 см² помещали в 1 мл питательной среды для МСК КМ и инкубировали в течение 72 ч при +37 °С. МСК КМ четвертого пассажа засеивали в 96-луночный планшет в концентрации 5×10^3 клеток/лунка и культивировали в условиях CO₂-инкубатора. Подсчет клеток проводили на автоматическом приборе подсчета клеток Countess II FL Automated Cell Counter. Через 24 ч к клеткам добавляли полученные экстракты ДТМ, раститровывая экстракт шесть раз методом последовательных разведений ($n = 3$) в питательной среде для МСК КМ, и культивировали в течение 48 ч.

Оценку цитотоксичности экстрактов ДТМ проводили методом оценки метаболической активности клеток с применением реагента PrestoBlue [12]. Для проведения теста на цитотоксичность после 48 ч культивирования проводили смену питательной среды на 90 мкл/лунка HBSS с Ca²⁺ и Mg²⁺ с добавлением реагента 10 мкл/лунка PrestoBlue и инкубировали в течение 30 мин в условиях CO₂-инкубатора. Затем для остановки реакции добавляли раствор SDS до финальной концентрации в лунке 1%. Измерение поглощения проводили при длине волны 540 нм с референсом 630 нм на планшетном фотометре Multiskan FC. В качестве контроля использовали МСК КМ в питательной среде без добавок экстракта ($n = 3$). Фоновое значение учитывали добавлением реагента в HBSS с Ca²⁺ и Mg²⁺ ($n = 3$).

Создание ТИК методом заселения клеточных культур

Получение ТИК проводили с помощью последовательного заселения мезенхимальными клетками всей поверхности образцов ДТМ кролика и эпителиальными клетками внутренней поверхности ДТМ. Для этого на поверхность образцов трахеи заселяли МСК КМ кролика второго пассажа при вращении 3–4 об/мин в течение 48 ч в концентрации 0,25 млн клеток в 10 мкл среды для культивирования МСК КМ на 1 мм² поверхности ДТМ. Затем, за 24 ч до имплантации, внутреннюю поверхность ТИК заселяли эпителиальными клетками трахеи кролика первого пассажа в концентрации 60×10^3 клеток/см² и культивировали статичным методом в полной питательной среде KSFМ.

Оценка жизнеспособности клеток, заселенных на ДТМ

Для определения жизнеспособности МСК КМ, заселенных на поверхность ДТМ, проводили конфокальную микроскопию с окраской клеток флуоресцентными красителями по методу Live/Dead. Для этого заселенные на ДТМ клетки окрашивали в инкубаторе растворами кальцеина-АМ и этидиума гомодимера в течение 20 мин в питательной среде для культивирования МСК КМ. Визуализацию проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 710 с объективом Plan-Apochromat 10x/0.45 M27.

Проведение ортотопической имплантации ТИК

Хирургические операции проводили в асептических условиях под комбинированной анестезией (внутримышечное введение комбинации препаратов «Ксила» в дозе 0,1 мл/кг и «Золетил-100» в дозе 0,1 мл/кг, дополненное локальной анестезией операционного поля раствором новокаина 0,5%). Для ортотопической имплантации ТИК получали доступ к шейному отделу трахеи через продольный разрез по средней линии шеи протяженностью до 1 см и разделением мышц и фасций шеи тупым и острым путем. Тупым путем мобилизовывались передняя и боковые стенки трахеи. Переднебоковую стенку трахеи резецировали на протяжении четырех колец ниже второго кольца трахеи с формированием окна. Размеры ТИК корректировали интраоперационно под размер дефекта, фиксировали в области имплантации инертным нерезорбируемым материалом «Пролен 6-0» с закрытием дефекта переднебоковой стенки, проверяли герметичность шва трахеи, послойно ушивали рану. За животным проводили наблюдение до выхода из наркоза и в течение 5 сут

после операции проводили антибиотикотерапию и вводили «Кетанов» (30 мг/мл) в дозе 0,5 мл в сут.

Мультиспиральная компьютерная томография

Через 3 мес. после имплантации ТИК для промежуточной оценки приживления ТИК и просвета трахеи в области имплантации животным проводили мультиспиральную компьютерную томографию (КТ) под седацией (внутримышечное введение растворов тилетамина и золазепам). КТ проводили на томографе Siemens Magnetom Verio и получали изображения в формате DICOM. Для наглядной оценки состояния дыхательных путей и просвета трахеи создавали 3D-модель дыхательных путей в формате STL при помощи метода волюметрического сегментирования в программе 3D Slicer.

Морфологический анализ

Животных выводили из эксперимента спустя 6 мес. препаратом «Ксила» (1,0 мл на 1 кг массы тела животного). Аутопсийный материал забирали в границах интактной трахеи, отступая не менее 5 мм от краев имплантата. Трахея с участком ТИК извлекалась и разрезалась на две части вдоль, в сагиттальной проекции.

Для морфологической оценки результатов проведенной имплантации ТИК образцы трахеи фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина в течение 24 ч, проводили через гистологическую проводку и заключали в парафиновые блоки по стандартному протоколу. Срезы толщиной 4 мкм (Microm HM 355s) помещали на предметные стекла и стекла, покрытые поли-L-лизин, а затем адгезировали при +56 °С в течение 30 мин. Полученные срезы депарафинизировали, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали под покровные стекла в монтирующей среде (Shandon-Mount). Полученные препараты оцифровывали при помощи автоматической установки Pannogamic DESK, затем проводили морфологическое исследование.

Срезы, покрытые поли-L-лизин, подготавливали к иммуофлюоресцентному окрашиванию для дополнительного подтверждения эпителизации ТИК. Для этого вначале проводили депарафинизацию, затем проводили демаскировку антигена в Tris-EDTA (pH 10.0) буфере в микроволновой печи при мощности 100 W в течение 10 минут, охлаждали до комнатной температуры и отмывали в PBS. Проводили блокировку неспецифического связывания антител раствором 2% BSA в PBS-T в течение 20 мин при +25 °С. Раствор удаляли и наносили первичные моноклональные антитела anti-CDH, anti-СКPan, anti-Ki67 в растворе 2% BSA в PBS-T и инкубировали в течение

12 ч при +4 °С. Затем клетки трижды отмывали в PBS по 5 мин и наносили вторичные поликлональные антитела, конъюгированные с биотином к первичным антителам CDH, СКPan, разведенные в PBS-T с добавлением 2% BSA. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +3 °С. Клетки снова отмывали PBS трижды по 5 мин и наносили в PBS-T с добавлением 2% BSA: стрептавидин-Alexa Fluor 488 ко вторичным поликлональным антителам, конъюгированным с биотином; вторичные поликлональные антитела Alexa Fluor 594 к первичным антителам Ki67. В качестве отрицательного контроля использовали срезы без добавления первичных антител. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +32 °С. Срезы отмывали PBS трижды по 5 мин. Ядра окрашивали Hoechst-33342 в концентрации 1 мкг/мл. Препараты заключали под покровное стекло в 80% глицерине в PBS. Микроскопию проводили при помощи флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TE-2000.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили в GraphPad Prism версии 8.0 с проверкой на Гауссовское распределение тестом Шапиро–Уилка и Д'Агостино–Пирсона. Различия между контрольной группой без добавления экстракта и исследуемыми разведениями проверяли однофакторным дисперсионным анализом One-way ANOVA с апостериорным тестом Даннета. Достоверность различий считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фенотипирование первичной культуры клеток

При окрашивании МСК КМ иммуофлюоресцентным методом было показано, что по клеточной морфологии клетки были крупные, распластаные, фибробластоподобные. Клетки экспрессировали поверхностные маркеры CD90 и CD271, одновременное наличие которых характерно для МСК. Также клетки экспрессировали коллаген II типа, что необходимо для синтеза внеклеточного матрикса, в особенности хрящевой ткани.

Клетки легкого по морфологии были маленького размера, с большим количеством межклеточных контактов, плотно располагались на пластике. Все клетки экспрессировали белок цитоскелета – общий цитокератин (СКPan), основной маркер эпителиальных клеток. При этом в культуре не наблюдалось клеток СКPan-негативных и Vimentin-положительных, что говорит о чистоте полученной культуры от фибробластоподобных клеток. Также клетки окрашивались на цитокератины СК8/18 и СК14, что подтверждало эпителиальный фенотип [13].

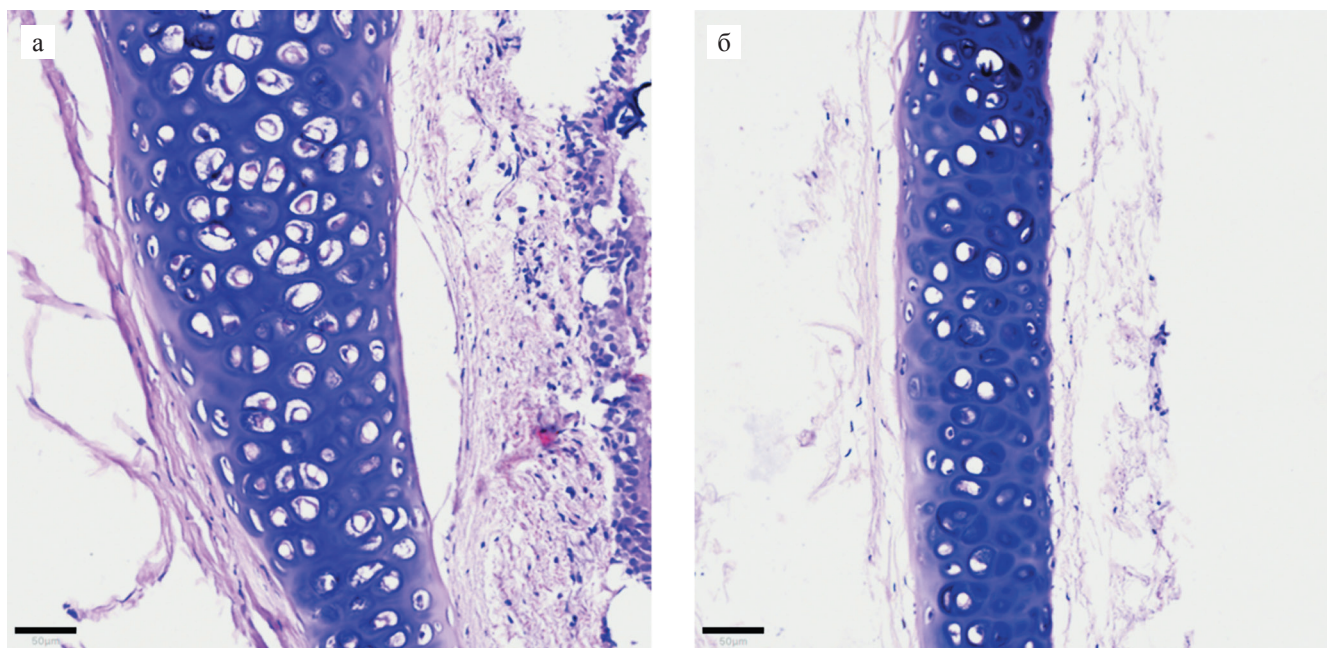


Рис. 1. Образец хрящевой ткани трахеи после выполнения девитализации: а – ткань нативной трахеи; б – ДТМ. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 50 мкм. $\times 100$

Fig. 1. Tracheal cartilage sample after devitalization: a – native tracheal tissue; б – devitalized tracheal scaffold. Hematoxylin-eosin staining. The scale bar is 50 μm . $\times 100$

Девитализация трахеальной ткани

ДТМ сравнивали с нативной тканью трахеи гистологическим методом и окраской гематоксилином и эозином (рис. 1). На рис. 1, б, представлена ткань хрящевого кольца трахеи, вокруг которого видны разрушенные ткани перихондрия, подслизистой оболочки и эпителия, что видно в сравнении с нативной тканью (рис. 1, а). Структура хрящевой ткани при этом сохранена. В глубине ткани наблюдаются оставшиеся хондроциты в лакунах. Архитектоника хрящевой ткани изменений не претерпела, что означает сохранение ее механической прочности.

Цитотоксичность ДТМ и жизнеспособность заселенных клеток

Клеточная активность МСК КМ после добавления экстракта ДТМ в сравнении с контрольной группой составила $144,3 \pm 3,8\%$ ($p < 0,05$).

Путем витализации ДТМ создана ТИК трахеи с полностью заселенными на поверхности МСК КМ, при этом большинство составляли окрашенные кальцеинном-АМ жизнеспособные клетки.

Приживление ТИК после имплантации

Для промежуточной оценки ранозаживления и состояния просвета трахеи на 3-й мес. после имплантации была проведена КТ под общей анестезией. Набор срезов был преобразован в объемное изображение, с

которого получены снимки в трех плоскостях: сверху (рис. 2, а), сбоку (рис. 2, б) и спереди (рис. 2, в).

Отмечено небольшое сужение в области имплантации – не более $\frac{1}{3}$ просвета, что видно выше и ниже зеленой линии (плоскости срезов фотографий) на рис. 2, а. Для того чтобы полностью оценить величину сужения относительно всего просвета трахеи, была создана объемная модель, область сегментации показана зеленым на рис. 2, в.

На рис. 3 представлена рассчитанная модель дыхательных путей, которая включает в себя мягкие ткани глотки и носоглотки кролика, гортань, трахею до бифуркации, бронхи и мягкие ткани легких.

На рис. 3, г, показана зона имплантации, при этом видно, что присутствует незначительное сужение просвета. В области имплантации стенозирования не наблюдалось.

Морфологический анализ

В зонах имплантации ТИК не было выявлено ни гранулярных лейкоцитов, ни лимфоцитов, что показало отсутствие признаков гнойного воспаления или асептического некроза вокруг материала ТИК (рис. 4, а и в). Это свидетельствует об отсутствии развития осложнений у животного в ходе эксперимента, связанных с тканевой реакцией на имплантат и развитием инфекционных заболеваний дыхательных путей.

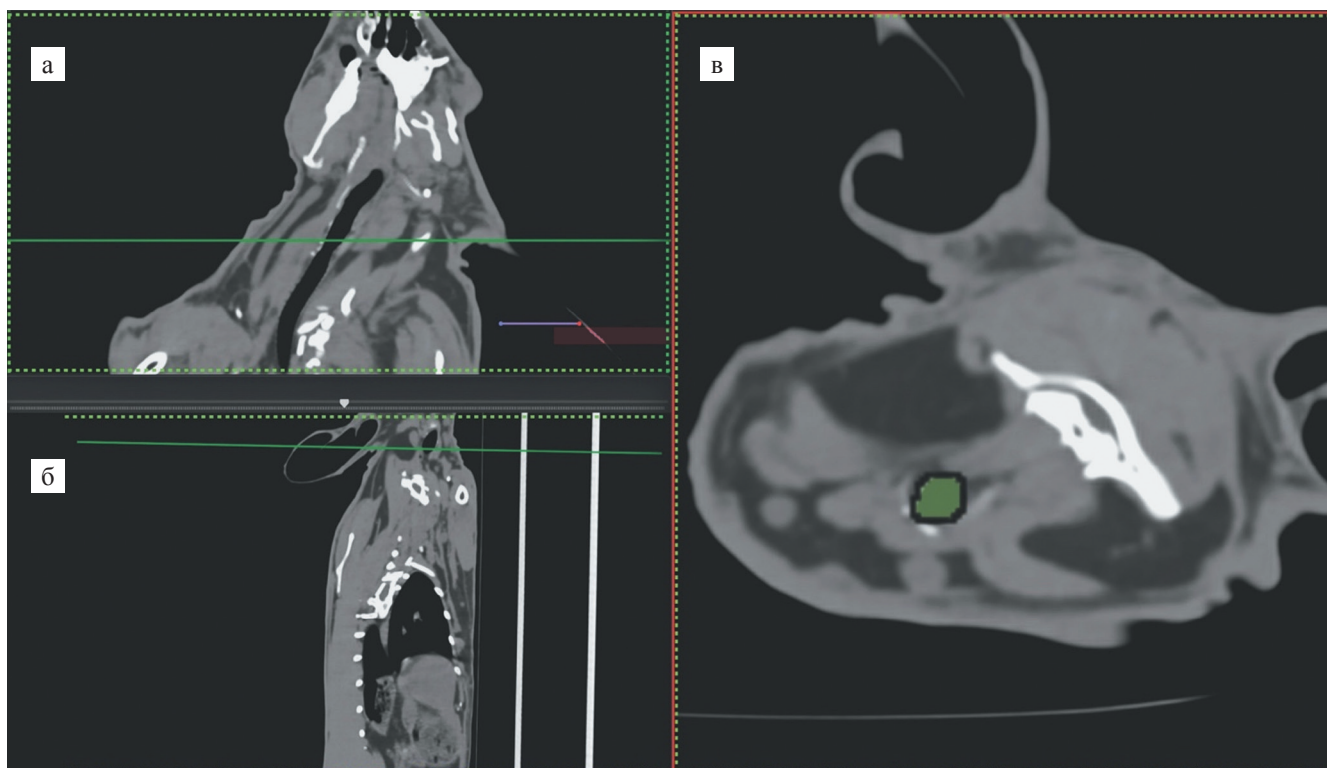


Рис. 2. КТ шеи и грудной клетки кролика, плоскости изображений: а – сверху, б – сбоку и в – спереди. Зеленая линия (а, б) – плоскость среза изображений. Зеленая область (в) – область автоматической сегментации дыхательных путей

Fig. 2. CT scan of the rabbit neck and thorax, the image planes: а – from above, б – from the side and в – from the front. The green line (а, б) – is the image cut-off plane. The green area (в) – the area of automatic segmentation of the respiratory tract

Была установлена причина сужения просвета, выявленного на 3-й мес. при помощи КТ. С правой стороны трахеи (рис. 4, а) развилась хроническая воспалительная реакция вокруг шовного материала, которая привела к частичному разрушению имплантата в этой области, замещению соединительной тканью и гипертрофии эпителиального слоя с повышением содержания бокаловидных клеток, продуцирующих слизь. Это хорошо видно на задней стенке трахеи (рис. 4, б), где эпителий стал утолщен и образовались полипы. С противоположной стороны относительно разреза участок воспаления уменьшился в размерах, из чего следует, что реакция на шовный материал имела локальный характер. Ткань на удалении от описанного шовного материала имела нормальную морфологию. Как видно на рис. 4, г, эпителий на имплантате не был гиперплазирован; ткани трахеи и имплантата срослись, наблюдались два ряда хрящевых колец: крупные – нативные, более мелкие – участки ТИК. Подслизистый слой был представлен разнонаправленными пучками коллагеновых волокон, которые окружали участки резорбции хрящевых структур имплантата, разрушаемых макрофагами.

На рис. 5 приведены результаты иммунофлюоресцентного окрашивания на СКРan (рис. 5, а–в),

белки межклеточных взаимодействий – кадгерин (CDH) (рис. 5, г), маркер клеточной пролиферации Ki-67 (рис. 5, а и б).

Участок ТИК без признаков воспаления от шовного материала представлен на рис. 5, а. Видно, что эпителий имеет нормальную морфологию, при этом пролиферирующие клетки (Ki-67) находятся преимущественно в подслизистом слое. В области воспаления (рис. 5, б) Ki-67 положительные клетки наблюдаются как в подслизистом, так и эпителиальном слое, что говорит о постоянной пролиферации клеток. Эпителий в зоне воспаления также гипертрофирован, что видно по рис. 5, в и г.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка качества получения биологически и физиологически совместимых матриксов для создания ТИК основана на проведении экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*. При девитализации нативной трахеи большая часть клеток из объема трахеального матрикса была удалена нами в циклах замораживания–оттаивания, что, по всей видимости, благоприятно сказалось на снижении иммунного ответа на имплантат. При этом если ранее для получения девитализированного матрикса ТИК использовались протоколы с 5-кратными циклами заморажи-

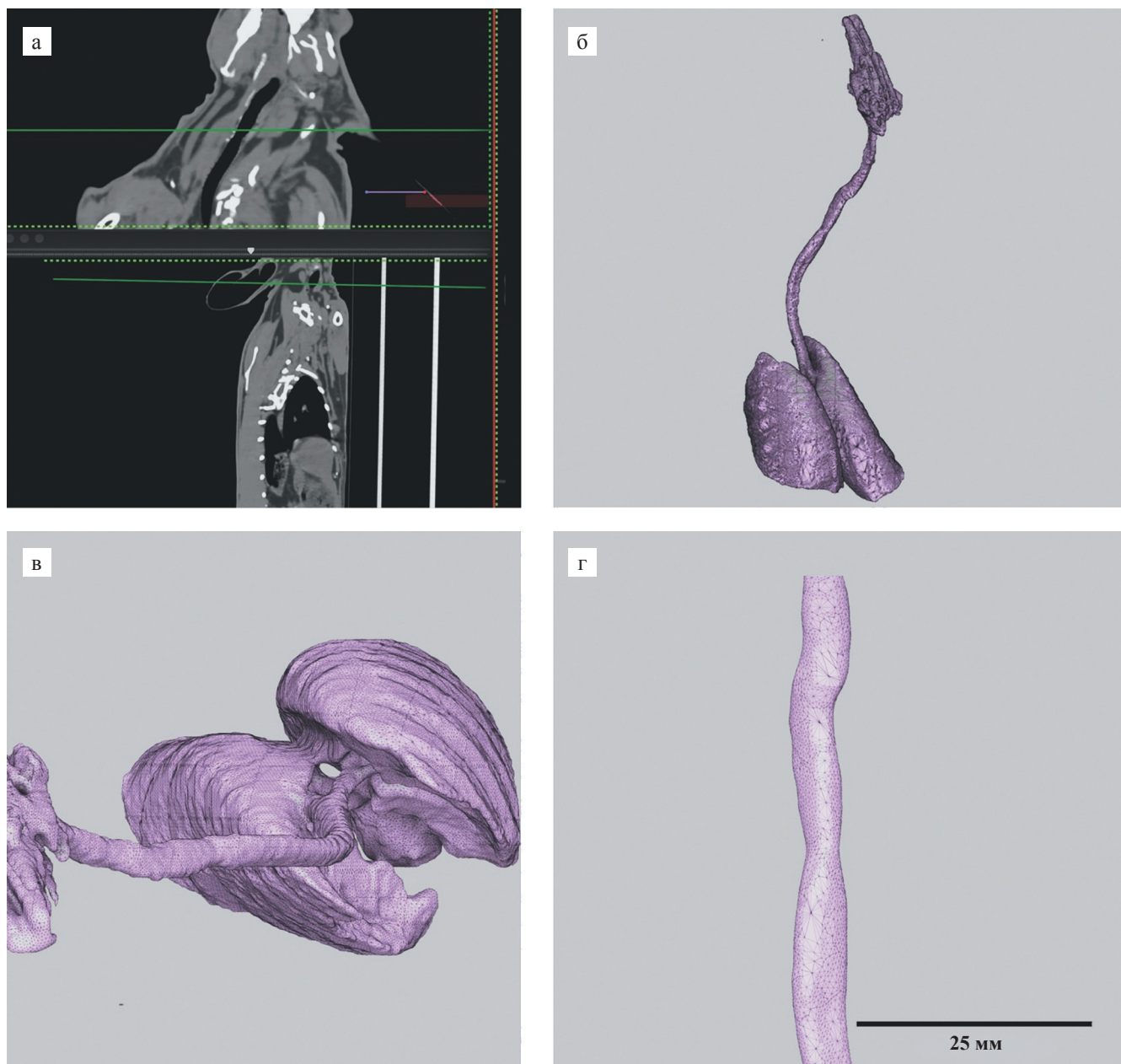


Рис. 3. Модель дыхательных путей кролика: а – МСКТ-снимок области имплантации ТИК; б–в – общий вид модели дыхательных путей; г – модель просвета трахеи в области имплантации

Fig. 3. The rabbit respiratory tract model: а – CT scan of the tissue-engineered graft implantation area; б–в – general view of the respiratory tract model; г – tracheal lumen model in the area of implantation

вания–оттаивания [14, 15], то использование нами 3-кратного цикла также оказалось пригодно для получения ДТМ. При этом метод продемонстрировал удовлетворительные результаты витализации ДТМ с заведомо высоким уровнем присутствия в материале сохранившихся после циклов замораживания–оттаивания сингенных клеток. Соответственно, данный метод девитализации может быть пригоден для получения матриц ТИК.

Отработанные ранее методы эффективного заселения матриц ТИК в режимах статичного и динамического культивирования [16] показали свою

пригодность для создания ТИК трахеи с двухслойным клеточным покрытием.

Нами была предложена и отработана модель для оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии критического дефекта дыхательных путей с использованием методов МСКТ, гистологии и иммуногистохимии.

По отсутствию нейтрофилов и эозинофилов в зонах эпителия и подслизистого слоя окружающих ТИК тканей можно сделать вывод, что имплантат не обладал токсическим воздействием на ткань реципиента. По отсутствию хронической воспалительной

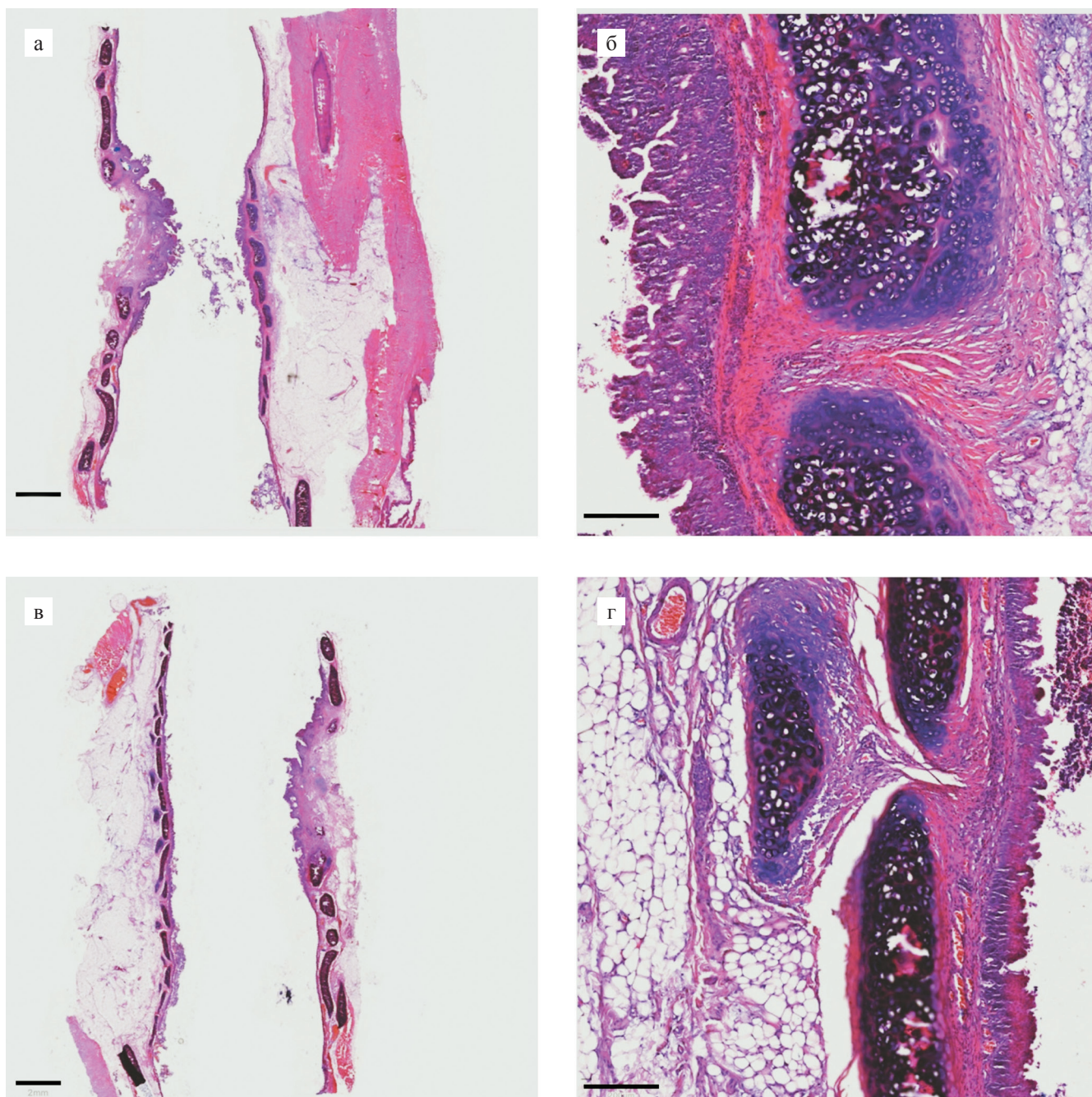


Рис. 4. Образец ткани трахеи кролика на 6-й месяц после имплантации конструкции, окраска гематоксилином–эозином: а, в – обзорное изображение тканей трахеи с двух сторон относительно разреза, масштабный отрезок 2 мм; б, г – участки слизистой оболочки на удалении от очага воспаления, масштабный отрезок 200 мкм

Fig. 4. Sample of rabbit trachea tissue at 6 months after the graft implantation, hematoxylin-eosin staining: а, в – overview of tracheal tissues from two sides relative to the incision, the scale bar is 2 mm; б, г – areas of the mucous membrane at a distance from the source of inflammation, the scale bar is 200 μm

реакции можно сделать вывод, что специфический иммунный ответ на ТИК также не развивался. В подслизистом слое наблюдалось большое количество сосудов и капилляров, что говорит о хорошей васкуляризации конструкции.

На основании полученных результатов гистологического исследования ТИК и окружающих имплантат тканей можно сделать вывод, что созданная конс-

струкция жизнеспособна, хорошо эпителизируется, васкуляризируется и интегрируется в структуру трахеи реципиента, несмотря на развитие осложнения, связанного с воспалением из-за шовного материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание и оценка *in vitro* и *in vivo* в хирургическом эксперименте тканеинженерной конструкции на

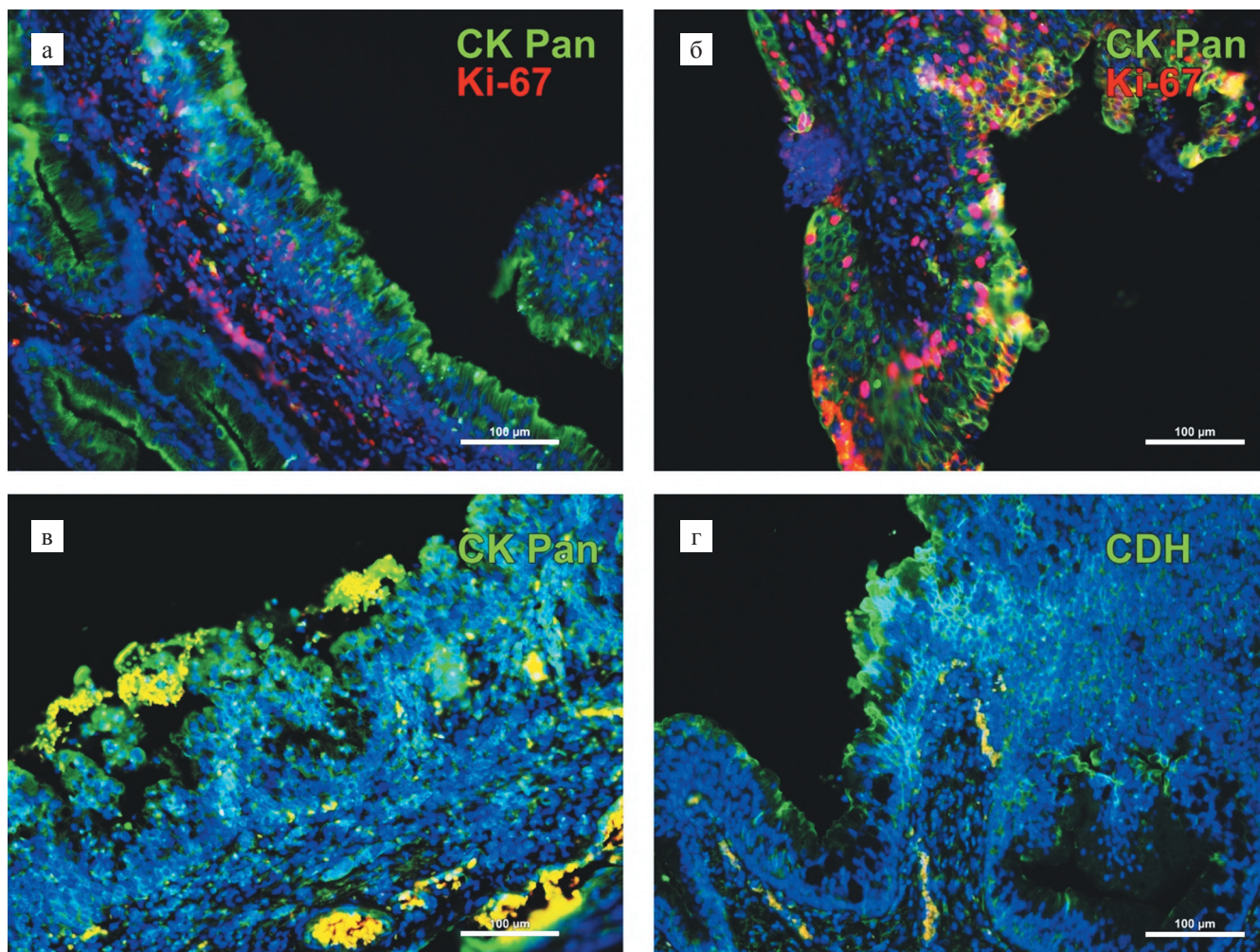


Рис. 5. Стенка кроличьей трахеи в зоне имплантации. Иммунофлюоресцентная окраска клеточных ядер Hoechst 33342 (голубая флюоресценция). Масштабный отрезок 100 мкм. ×200

Fig. 5. The wall of the rabbit trachea in the implantation area. Immunofluorescent staining of cell nuclei for Hoechst 33342 (blue fluorescence). The scale bar is 100 μm. ×200

основе девитализированного трахеального матрикса кролика, заселенного мезенхимальными стромальными клетками костного мозга и эпителиальными клетками, подтвердили цитологическую и биологическую совместимость конструкции. Минимальное сужение трахеи в области имплантации при отсутствии стенозирования свидетельствует о способности ТИК к поддержанию постоянного просвета трахеи реципиента. Целесообразным является продолжение исследований по совершенствованию биологически и физиологически совместимой тканеинженерной трахеи на основе сохранившего тканевую микроархитектонику девитализированного трахеального матрикса.

Настоящая работа выполнена при поддержке соглашения о субсидии Минобрнауки РФ № 14.614.21.0001 (ID RFMEFI61417X0001) с использованием оборудования ЦКП «Регенеративная

медицина» (ID 310020)/УНУ (506197) и помощи исследованию по программе «5-100» Сеченовского университета.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Barbetakis N, Samanidis G, Paliouras D, Lafaras C, Bischiniotis T, Tsilikas C. Intraoperative tracheal reconstruction with bovine pericardial patch following iatrogenic rupture. *Patient Saf Surg.* 2008; 2 (1): 4. doi: 10.1186/1754-9493-2-4.
2. Голуб ИЕ, Пинский СБ, Нетесин ЕС. Постинтубационные повреждения трахеи. *Сибирский медицинский журнал.* 2009; 87 (4): 124–128. Golub IE, Pinsky SB, Netesin ES. Postintubational damage of trachea. *The Siberian Medical Journal.* 2009; 87 (4): 124–128. [In Russ].

3. Соколович АГ, Деринг ЕВ, Хорошилов ИА. Несостоятельность анастомоза после циркулярной резекции трахеи и ее профилактика. *Сибирское медицинское обозрение*. 2006; 40 (3): 17–20. Sokolovich AG, Dering EV, Horoshilov IA. Inefficiency and prophylaxis of anastomosis after circular resection of trachea. *Siberian Medical Review*. 2006; 40 (3): 17–20. [In Russ, English abstract].
4. Паршин ВД, Люндуп АВ, Тарабрин ЕА, Паршин ВВ. Отдаленный результат трансплантации трахеи: успех и нерешенные проблемы. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2018; (11): 11–19. Parshin VD, Lyundup AV, Tarabrin EA, Parshin VV. Long-term outcomes of tracheal transplantation: success and unsolved problems. *Khirurgiia. J. im. N.I. Pirogova*. 2018; (11): 11–19. [In Russ, English abstract]. doi: 10.17116/hirurgiia201811111.
5. Law JX, Liao LL, Aminuddin BS, Ruszymah BH. Tissue-engineered trachea: a review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016; 91: 55–63. doi: 10.1016/j.ijporl.2016.10.012.
6. Барановский ДС, Демченко АГ, Оганесян РВ, Лебедев ГВ, Берсенева ДА, Балясин МВ и др. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017; 72 (4): 254–260. Baranovsky DS, Demchenko AG, Oganesyanyan RV, Lebedev GV, Berseneva DA, Balyasin MV et al. Acellular tracheal cartilaginous scaffold producing for tissue-engineered constructs. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2017; 72 (4): 254–260. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15690/vramn723.
7. Кувяда ЕВ, Губарева ЕА, Сотниченко АС, Гуменюк ИС, Гилевич ИВ, Поляков ИС и др. Опыт перфузионной рецеллюляризации биологического каркаса легких крысы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2016; 18 (1): 38–44. Kuyevda EV, Gubareva EA, Sotnichenko AS, Gumenyuk IS, Gilevich IV, Polyakov IS et al. Experience of perfusion recellularization of biological lung scaffold in rats. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2016; 18 (1): 38–44. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2016-1-38-44.
8. Seguin A, Vaccari S, Holder-Espinasse M, Bruneval P, Carpentier A, Taylor DA et al. Tracheal regeneration: evidence of bone marrow mesenchymal stem cell involvement. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013; 145 (5): 1297–1304. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.09.079.
9. Go T, Jungebluth P, Baiguero S, Asnaghi A, Martorell J, Ostertag H et al. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 139 (2): 437–443. doi: 10.1016/j.jtcvs.2009.10.002.
10. Jungebluth P, Bader A, Baiguera S, Möller S, Jaus M, Lim ML et al. The concept of *in vivo* airway tissue engineering. *Biomaterials*. 2012; 33 (17): 4319–4326. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.016.
11. Shin YS, Choi JW, Park JK, Kim YS, Yang SS, Min BH et al. Tissue-engineered tracheal reconstruction using mesenchymal stem cells seeded on a porcine cartilage powder scaffold. *Ann Biomed Eng*. 2015; 43 (4): 1003–1013. doi: 10.1007/s10439-014-1126-1.
12. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *J Immunol Methods*. 1997; 204 (2): 205–208. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00043-4.
13. Jetten AM, George MA, Smits HL, Vollberg TM. Keratin 13 expression is linked to squamous differentiation in rabbit tracheal epithelial cells and down-regulated by retinoic acid. *Exp Cell Res*. 1989; 182 (2): 622–634. doi: 10.1016/0014-4827(89)90264-4.
14. Roth SP, Glauche SM, Plenge A, Erbe I, Heller S, Burk J. Automated freeze-thaw cycles for decellularization of tendon tissue—a pilot study. *BMC biotechnology*. 2017; 17 (1): 13. doi: 10.1186/s12896-017-0329-6.
15. Chang CH, Chen CC, Liao CH, Lin FH, Hsu YM, Fang HW. Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102 (7): 2248–2257. doi: 10.1002/jbm.a.34897.
16. Люндуп АВ, Демченко АГ, Тенчурин ТХ, Крашенинников МЕ, Клабуков ИД, Шепелев АД и др. Повышение эффективности заселения биодеградируемых матриц стромальными и эпителиальными клетками при динамическом культивировании. *Гены и клетки*. 2016; 11 (3): 102–107. Lyundup AV, Demchenko AG, Tenchurin TH, Krasheninnikov ME, Klabukov ID, Shepelev AD et al. Improving the seeding effectiveness of stromal and epithelial cell cultures in biodegradable matrices by dynamic cultivation. *Genes and Cells*. 2016; 11 (3): 102–107. [In Russ, English abstract].

Статья поступила в редакцию 14.10.2019 г.
The article was submitted to the journal on 14.10.2019