

## ДЕТЕРГЕНТНО-ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ МЕТОД ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ЛЕГКИХ КРЫСЫ. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МАТРИКСА

<sup>1</sup>Кувда Е.В., <sup>1</sup>Губарева Е.А., <sup>1</sup>Сотниченко А.С., <sup>1</sup>Гуменюк И.С., <sup>2</sup>Гилевич И.В.,  
<sup>2</sup>Поляков И.С., <sup>2</sup>Порханов В.А., <sup>1,3</sup>Маккиарини П.

<sup>1</sup>Международный научно-исследовательский клиничко-образовательный центр регенеративной медицины, Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, e-mail: corpus@ksma.ru;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского министерства здравоохранения Краснодарского края г. Краснодар», e-mail: kkb1@mail.ru;

<sup>3</sup>Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Каролинский институт, Стокгольм, Швеция, e-mail: info@ki.se

---

Тканевая инженерия является перспективной альтернативой проведению аллотрансплантации легких пациентам в терминальной стадии дыхательной недостаточности. Разработка методов децеллюляризации органов животных, а впоследствии и человека, позволит решить этические и иммунологические проблемы трансплантации. Данное исследование направлено на выбор оптимального протокола децеллюляризации легких крысы, максимально сохраняющего структуру внеклеточного матрикса (ВКМ), что подтверждается проведением морфологической оценки полученных биологических каркасов и количественным определением содержания ядерного материала до и после обработки легких растворами детергентов. Путь введения децеллюляризирующих растворов оказывает влияние на скорость и эффективность процесса. Было установлено, что сочетание перфузии легочной артерии с одновременным вентилированием трахеи крысы атмосферным воздухом способствует полному удалению клеток с сохранением трехмерной структуры ВКМ биологического каркаса.

---

Ключевые слова: децеллюляризация, легкие, тканевая инженерия, морфологическая оценка.

## DETERGENT-ENZYMATIC METHOD OF RAT LUNG DECELLULARIZATION. MATRIX MORPHOLOGICAL EVALUATION

<sup>1</sup>Kuevda E.V., <sup>1</sup>Gubareva E.A., <sup>1</sup>Sotnichenko A.S., <sup>2</sup>Gilevich I.V., <sup>1</sup>Gumenyuk I.S.,  
<sup>2</sup>Polyakov I.S., <sup>2</sup>Porhanov V.A., <sup>1,3</sup>Macchiarini P.

<sup>1</sup>International Research, Clinical and Education Center of Regenerative Medicine, Kuban State Medical University, Krasnodar, e-mail: corpus@ksma.ru;

<sup>2</sup>SBIM "Research Institute - Regional Clinical Hospital №1 n. a.professor S.V. Ochapovsky Ministry of Health of the Krasnodar region, Krasnodar, e-mail: kkb1@mail.ru;

<sup>3</sup>Advanced Center for Translational Regenerative Medicine (ACTREM), Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, e-mail: info@ki.se

---

Tissue engineering is a promising alternative for lung allograft transplantation in patients with end-stage respiratory failure. Development of decellularization methods for animal organs and later for human ones would solve the ethical and immunological problems of transplantation. This study aims to choose the optimal protocol for rat lungs decellularization with almost complete extracellular matrix (ECM) structure preservation, which is confirmed by performing morphological evaluation of the biological scaffold and additionally by quantitative determination of nuclear material before and after lungs treatment with detergent solutions. Route of administration of decellularization solutions influences the speed and efficiency of the process. It was found that the combination of the pulmonary artery perfusion with simultaneous atmospheric air ventilation through the rat trachea promotes complete cells removal while maintaining the three dimensional structure of the biological scaffold (ECM).

---

Keywords: decellularization, lungs, tissue engineering, morphological evaluation.

Трансплантация остается преимущественно единственным методом лечения пациентов в терминальной стадии заболеваний легких [5]. Однако необходимость использования органного донорства сопряжена с проблемами этического характера, проведением пожизненной иммуносупрессивной терапии и высокой частотой неблагоприятных исходов в

послеоперационном периоде [1; 5]. Тканевая инженерия предлагает принципиально новый подход к проведению аллотрансплантации легких, применение которого в клинической медицине в перспективе позволит избежать негативных эффектов иммуносупрессивной терапии и значительно снизит потребность в донорских органах. Концептуально тканевая инженерия легких основывается на получении биологического каркаса путем полного удаления клеток (децеллюляризации) с сохранением трехмерной структуры нативного органа. В последующем указанный каркас засеивается аутологичными клетками реципиента, что исключает потребность в проведении иммуносупрессивной терапии [2].

Децеллюляризация легких может проводиться механическим, физическим, химическим способами и их комбинациями [2; 3]. В частности, широко применяется детергентно-энзиматический метод с использованием различных растворов детергентов и разной продолжительностью времени их воздействия [3-8]. В то же время проблема сохранения структуры ВКМ после воздействия химических агентов остается актуальной и диктует необходимость разработки щадящих методов децеллюляризации легких с воссозданием физиологических условий вентиляции и перфузии каркасов [4-8].

**Целью настоящего исследования** явилась разработка оптимального протокола децеллюляризации легких крысы с последующей морфологической оценкой структуры ВКМ.

### **Материал и методы**

Оптимальный протокол децеллюляризации легких крысы разрабатывался на 25 взрослых беспородных крысах-самцах весом  $180 \pm 16$  г. Все исследования на животных проводились в лаборатории международного научно-исследовательского клиничко-образовательного центра регенеративной медицины на базе Кубанского государственного медицинского университета после одобрения протокола исследования локальным этическим комитетом. Основную группу составили 20 животных, в зависимости от протокола проведения децеллюляризации разделенные на подгруппы: (1) с вентиляцией легких атмосферным воздухом через трахею при одновременной перфузии аорты растворами детергентов; (2) с вентиляцией атмосферным воздухом через трахею на фоне перфузии легочной артерии; с проведением перфузии растворами детергентов через (3) аорту или (4) легочную артерию без симультанной вентиляции легких. Пять животных составили контрольную группу для оценки морфологической структуры нативных легких.

#### *Подготовка органокомплекса и проведение децеллюляризации*

Перед оперативным вмешательством животным интраперитонеально вводили летальную дозу барбитуратов (150 мг/кг), за час до операции выполняли инъекцию гепарина в дозе 100 ЕД. Эксплантацию органокомплекса «сердце - легкие» проводили единым блоком

после выполнения стернотомии. В стерильных условиях органокомплекс очищали от окружающей соединительной ткани и жировой клетчатки и промывали раствором фосфатного буфера с добавлением 1%-ного раствора пенициллина-стрептомицина. Трахею и аорту (или легочную артерию, в зависимости от протокола) канюлировали на расстоянии 2,5-3 см от устья. Органокомплекс фиксировали в биореакторе для последующей перфузии 1%-ным раствором пенициллина-стрептомицина в фосфатном буфере в течение 1 часа; деионизированной водой – 1 час; 1%-ным водным раствором дезоксихолата натрия с добавлением 0,002М натриевой соли ЭДТА – 2 часа; деионизированной водой – 30 мин.; 0,1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 1 часа; 1%-ным 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. Завершали децеллюляризацию воздействием 1%-ного раствора пенициллина-стрептомицина в фосфатном буфере в течение 12 часов. Подгруппам (1) и (2) проводили вентиляцию легких атмосферным воздухом с помощью системы Harvard Inspira Advanced Safety Ventilator (Harvard Apparatus, Массачусетс, США).

#### *Морфологическая оценка децеллюляризованного матрикса*

Образцы нативных и децеллюляризованных легких фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине, дегидратировали и заключали в парафин по стандартной методике с использованием автоматического гистопроцессора Leica TP1020 (Германия) и модульной установки Leica EG1150H (Германия). Парафиновые срезы толщиной 5 мкм, полученные при помощи ротационного микротомы Leica RM2235 (Германия), депарафинизировали и гидратировали с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином и флуорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI. Качественную оценку содержания гликозаминогликанов и эластических волокон в образцах проводили после окрашивания срезов альциановым синим и пикрофуксином по Ван Гизону соответственно. Белки ВКМ визуализировали при проведении иммуногистохимического анализа. В качестве первичных антител были выбраны мышинные моноклональные антитела к ламинину (ab11575, Abcam, Англия), эластину (ab21610, Abcam, Англия), фибронектину (ab6328, Abcam, Англия), коллагену IV типа (ab6586, Abcam, Англия), коллагену I типа (ab34710, Abcam, Англия).

Ультраструктуру нативных и децеллюляризованных легких крысы оценивали при помощи сканирующего электронного микроскопа JSM6490, JEOL (Япония) после подготовки по стандартной методике: фиксации в 2,5%-ном растворе глутеральдегида (Merk, Германия) в 0,1 М какодилатном буфере (Prolabo, Франция) с последующим промыванием, обезвоживанием в спиртах, высушиванием и напылением золотых частиц.

Количественное определение содержания ДНК в образцах легких, децеллюляризированных по 4 протоколам, определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием набора реагентов (Dneasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Швеция) по стандартной методике фирмы-изготовителя.

### **Результаты и их обсуждение**

Ориентировочным макроскопическим критерием завершения процесса децеллюляризации явилось изменение насыщенно-розовой окраски легких на молочно-белую. Среднее время выполнения децеллюляризации составило  $35 \pm 7$  часов. При этом наибольшую длительность протокола отмечали в подгруппах (3) и (4) – 36 и 48 часов соответственно, наименьшую – 23 часа – в подгруппе (2). Рутинные методы гистологической окраски выявили значительные повреждения альвеолярной структуры в образцах, полученных в подгруппах (1) и (3), что связывали с ретроградным направлением перфузии. В то же время количество клеточных элементов, выявляемых как при окрашивании гематоксилином и эозином, так и при окрашивании флуорофором DAPI, а также уровень резидуального ДНК не позволял говорить об эффективности децеллюляризации, проведенной по протоколам (1), (3) и (4). В легких, децеллюляризированных по протоколу (2), при окрашивании микропрепаратов гематоксилином и эозином клеточные ядра и структуры не были визуализированы, повреждения альвеолярной структуры, несмотря на принудительную механическую вентиляцию, выражены незначительно. Окрашивание DAPI и определение процентного содержания остаточной ДНК подтверждало высокое качество децеллюляризации (рис. 1).

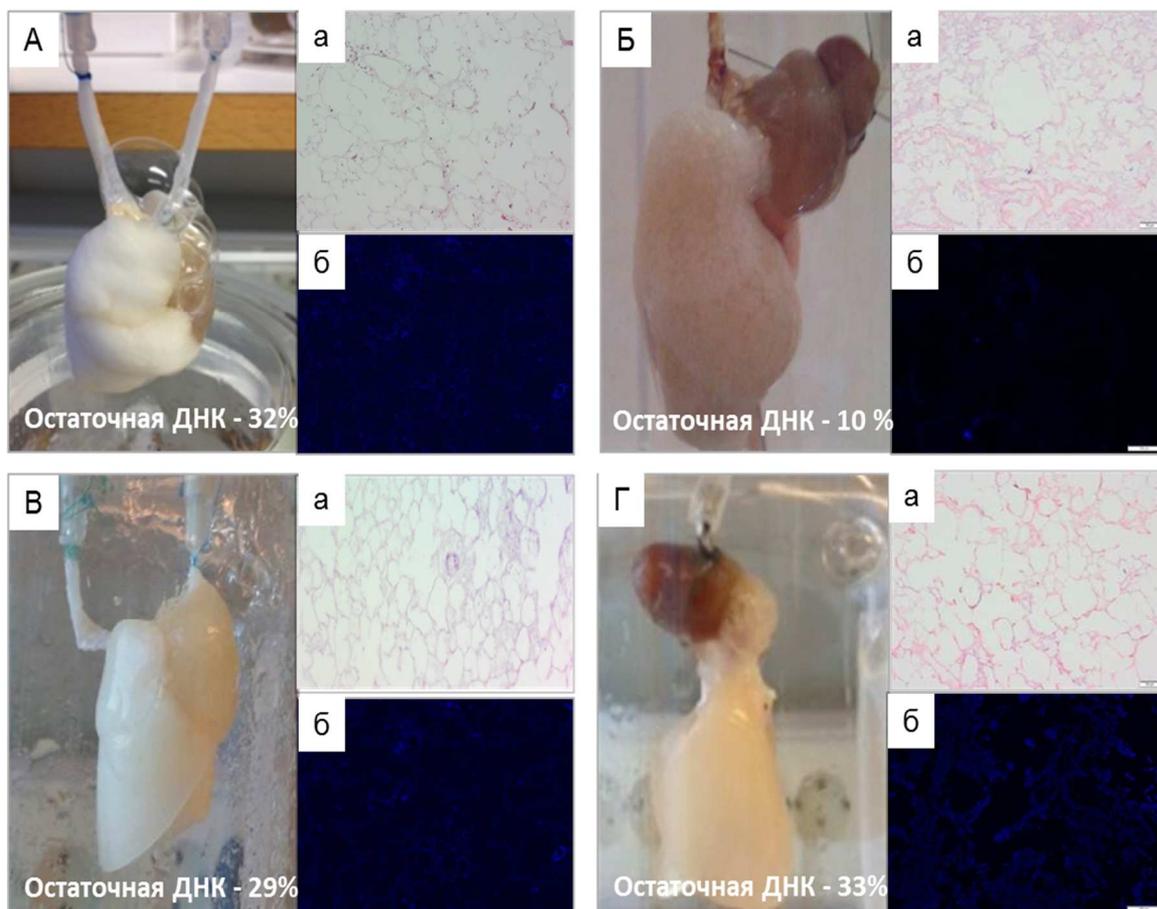


Рис. 1. Сравнительный анализ протоколов децеллюляризации легких крысы: А - подгруппа (1), Б - подгруппа (2), В - подгруппа (3), Г - подгруппа (4); а - окрашивание гематоксилином и эозином; б – окрашивание DAPI. Увеличение: об x10; ок. x10.

Окрашивание пикрофуксином по Ван Гизону позволило визуализировать сохранность архитектоники соединительных волокон ВКМ, слабокислые сульфатированные гликозаминогликаны были выявлены по положительному окрашиванию срезов альциановым синим (рис. 2).

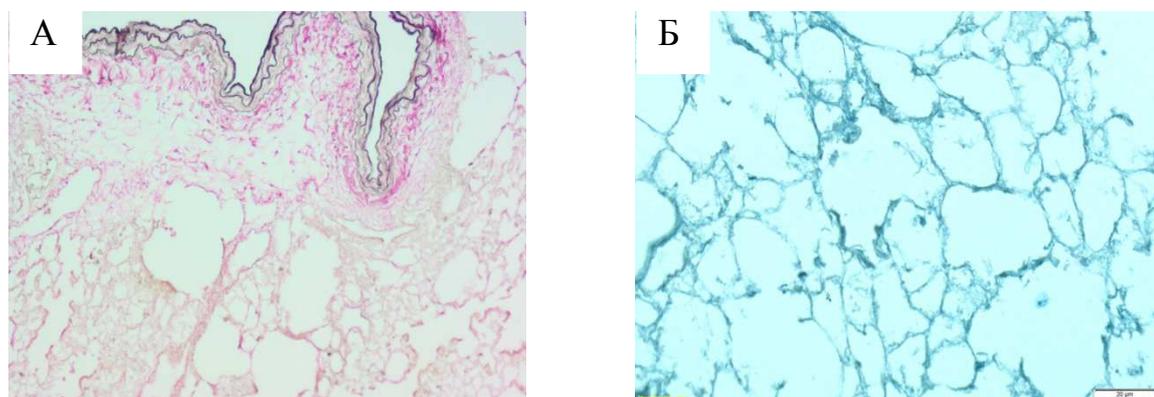


Рис. 2. Децеллюляризованные легкие, подгруппа (3). Окрашивание пикрофуксином по Ван Гизону (А), окрашивание альциановым синим (Б). Увеличение: об x40; ок. x10.

Иммуногистохимический анализ компонентов ВКМ не показал качественных изменений его состава: ориентация и структура волокон патологически изменена не была.

Ламинин, фибронектин и коллаген IV типа располагались преимущественно в базальных мембранах легочных сосудов и бронхов, в то время как эластин и коллаген I типа - в строме нативных и децеллюляризованных легких (данные не представлены).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) альвеолярной и плевральной поверхностей легких, децеллюляризованных по протоколу (2), выявила полное отсутствие клеточных элементов при сохранении ультраструктуры альвеол по сравнению с данными, полученными для нативных легких (рис. 3).

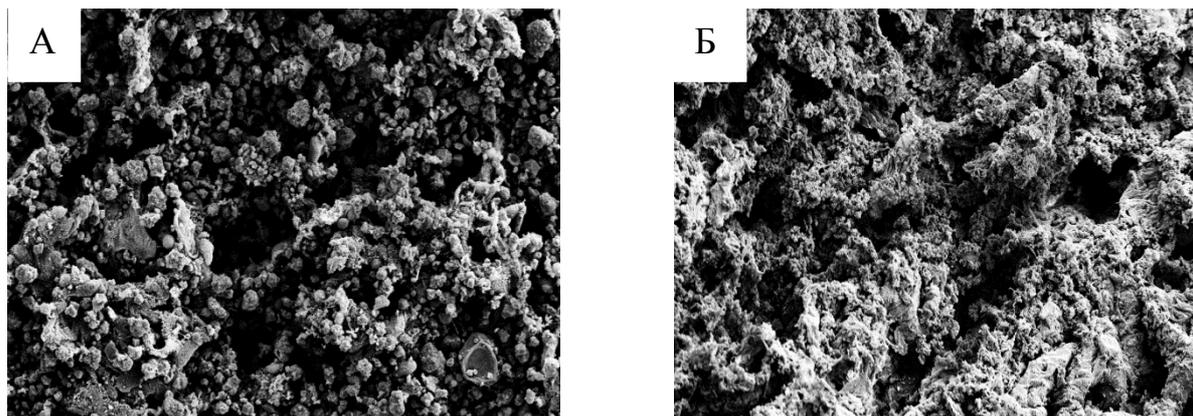


Рис. 3. СЭМ нативных (А) и децеллюляризованных легких (Б). Альвеолярная поверхность. Увеличение x1500.

### **Заключение**

Детергентно-энзиматический метод децеллюляризации легких путем перфузии растворов через легочную артерию в сочетании с вентиляцией трахеи атмосферным воздухом представляется наиболее перспективным способом получения биологических каркасов для создания тканеинженерных легких.

*Работа финансирована грантом Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования от 19 октября 2011 г. № 11.G34.31.0065.*

### **Список литературы**

1. Сотниченко А.С. Децеллюляризованный матрикс сердца крысы как основа для создания тканеинженерного сердца // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2012. - Т. VII, № 4. - С. 38-45.
2. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds // Annu Rev. Biomed. Eng. - 2011. - Vol. 13. - P. 27 – 53.

3. Daly A.B. Initial binding and recellularization of decellularized mouse lung scaffolds with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells // *Tissue Eng. Part A.* - 2012. - Vol. 18. - P. 1–16.
4. Kuevda E. Best decellularization protocol for tissue-engineered lungs // *Reg. Med.* - 2013. - Vol. 8, Suppl. 6s. - P. 21.
5. O’Neill J.D. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering // *Ann Thorac Surg.* – 2013. - Vol. 96. - P. 1046 – 1056.
6. Ott H.C. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung // *Nat. Med.* - 2010. - Vol. 16. - P. 927 – 933.
7. Petersen T.H. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation // *Science.* - 2010. - Vol. 329. - P. 538 – 541.
8. Song J.J. Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats // *Ann. Thorac. Surg.* - 2011. - Vol. 92. - P. 998 – 1005.

**Рецензенты:**

Славинский А.А., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО «КубГМУ Минздрава России», г. Краснодар;

Павлюченко И.И., д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ГБОУ ВПО «КубГМУ Минздрава России», г. Краснодар.