

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ЛЕГКИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Е.В. Куевда¹, Е.А. Губарева¹, А.С. Сотниченко¹, И.В. Гилевич¹,
И.С. Гуменюк¹, П. Маккиарини^{1,2}

¹Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

²Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

Prospects of the tissue engineering lung development with the methods of regenerative medicine (review)

E.V. Kuevda¹, E.A. Gubareva¹, A.S. Sotnichenko¹, I.V. Gilevich¹, I.S. Gumenyuk¹, P. Macchiarini^{1,2}

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

²Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Дефицит донорских органов, необходимость проведения пожизненной иммуносупрессивной терапии даже в случае успешной трансплантации легких, высокие риски летального исхода в послеоперационном периоде заставляют искать новые способы лечения терминальных стадий заболеваний, требующих пересадки органов. В последнее десятилетие большое внимание уделяется методам регенеративной медицины для восстановления или замещения функции поврежденных тканей и органов. Создание функционально полноценных легких в лабораторных условиях позволит в значительной мере решить проблемы с нехваткой донорских органов. Изучение морфологических свойств «биологических каркасов» органов и более глубокое понимание поведения стволовых клеток и клеток-предшественниц привели к идее использования методов децеллюляризации с последующей рецеллюляризацией аутогенными клетками для проведения трансплантации трахеи, легких, сердца, почек. Рецеллюляризованные солидные органы на настоящий момент могут функционировать в течение некоторого времени в условиях *in vitro*, что свидетельствует о потенциальной возможности клинического применения указанных методов. В настоящем обзоре представлены современные данные о децеллюляризации и рецеллюляризации легких, способы повышения эффективности и улучшения качества получаемого биологического каркаса, также обсуждаются основные аспекты трансплантации на животных моделях и перспективы биоинженерии легких в целом.

Ключевые слова: регенеративная медицина, тканевая инженерия легких, децеллюляризация, рецеллюляризация, биологические каркасы, стволовые клетки.

Введение

В настоящий момент клиническое использование методов регенеративной медицины вызывает большой интерес. Применение полученных знаний в области лечения заболеваний дыхательных путей особенно актуально с учетом возрастающей доли патологии дыхательной системы в структуре летальности. Так, например, более 1 млрд людей страдают от хронических респираторных заболеваний во всем мире, из которых около 4 млн ежегодно умирают. Рак легких и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) в совокупности вызывают около 280 тыс. летальных исходов ежегодно [1, 2], при этом ХОБЛ занимает пятое место в общей структуре летальных исходов с прогнозом выхода на третье место к 2030 г.

Существующие на настоящий момент хирургические вмешательства при хронических заболеваниях дыхательных путей несут преимущественно паллиативный характер с сохраняющимся высоким риском летального исхода в раннем послеоперационном периоде [3, 4]. Основным методом лечения паци-

Deficit of donor organs, the need for lifelong immunosuppressive therapy, even in the case of successful lung transplantation, high risk of death in the postoperative period are forced to look for the new ways to treat terminally ill patients, requiring organ transplants. In the last decade, much attention is given to methods of regenerative medicine to repair or replace the function of damaged tissues and organs. Creating functional lungs in the laboratory will hopefully solve the problem of donor organs shortage. The study of morphological properties of biological scaffolds, deeper understanding of stem cells and progenitor cells behavior led to the idea of using decellularization methods followed by recellularization with autologous cells for tissue engineered trachea, lungs, heart and kidney creation. Recellularized solid organs can perform organ-specific function *in vitro* conditions, indicating the potential clinical use of these methods. This review presents the current data about lung decellularization and recellularization methods to increase efficiency and improve the quality of the biological scaffold and discusses the main aspects of lung transplantation in animal models and perspectives of lung bioengineering.

Keywords: regenerative medicine, tissue engineering lungs, decellularization, recellularization, biological scaffolds, stem cells.

ентов в терминальной стадии заболеваний остается аллогенная трансплантация легких [5]. Однако и этот метод не лишен недостатков [6], касающихся функционального состояния донорского органа и его пригодности к пересадке. Часто трансплантируемый орган имеет признаки отека, ателектаза, ишемии или пневмонии в связи с длительностью нахождения на ИВЛ самого донора или наличием у него функциональных системных расстройств [6]. Другим немаловажным недостатком проведения трансплантации является необходимость пожизненного назначения реципиентам иммуносупрессивной терапии, способствующей увеличению рисков развития вторичной инфекции и онкологических заболеваний [7]. Наибольшей проблемой остается дефицит донорских органов и этические проблемы их использования [8, 9]. Общеизвестно, что увеличение периода ожидания органа для трансплантации увеличивает риск развития осложнений у пациента и интраоперационных осложнений [10]. Все вышесказанное заставляет искать новые пути решения проблемы восстановления или замены поврежденных легких.

e-mail: g_lena82@list.ru

В этой связи определенным потенциалом обладают тканеинженерные каркасы, созданные на основе децеллюляризированных нативных органов с последующим заселением аутогенными стволовыми клетками реципиента [10–19]. Созданием подобных каркасов с использованием различных протоколов воздействия детергентами и энзимами занимается несколько лабораторий по всему миру. В представленном обзоре рассматриваются несколько стратегий создания тканеинженерных легких, начиная от характеристики самой концепции проведения децеллюляризации и рецеллюляризации легких до основных клеточных популяций, используемых для заселения полученных биологических каркасов.

Децеллюляризация легких для создания биологического каркаса: методы, преимущества, недостатки

Для создания функционирующих тканеинженерных легких основополагающую роль играет снижение иммуногенности внеклеточного матрикса (ВКМ) при максимальном сохранении его биохимического состава, морфологических и биомеханических свойств. Биологические каркасы легких после полного удаления клеток должны сохранять трехмерность структуры [20]. В связи с этим особое внимание следует уделять технике проведения децеллюляризации. Различают физические, ферментативные и химические способы удаления клеток [10, 20]. Физические методы децеллюляризации включают в себя: механическое воздействие,

температурную и ультразвуковую обработку. При ферментативной обработке используются трипсин, эндонуклеазы, экзонуклеазы [11, 13, 20]. Эффективность проведенной децеллюляризации оценивается путем количественного определения содержания нуклеиновых кислот, которое должно составлять менее 50 нг двухцепочечной ДНК в 1 мг сухого веса ВКМ, при этом фрагменты ДНК должны быть менее 200 пар нуклеотидов длиной [21, 22]. Многие исследования демонстрируют, что использование детергентов при проведении децеллюляризации приводит к повреждению ВКМ с уменьшением содержания коллагена, эластина и гликозаминогликанов на 30%, 60% и 90%, соответственно [11, 23]; при проведении иммуногистохимического окрашивания полученных образцов отмечено снижение таких компонентов ВКМ, как фибронектин, ламинин и эластических волокон [23, 24]. Выбор метода децеллюляризации, в целом, определяется морфологической структурой и свойствами исследуемого органа. Перспективы использования биологических каркасов зависят от разработки протоколов децеллюляризации, сводящих к минимуму структурное повреждение тканей. Наиболее часто в качестве детергентов используются Triton-X100, натриевая соль дезоксихолево́й кислоты, додецил сульфат натрия или 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS) [10] (табл. 1). По результатам исследований ряда авторов, сочетание Triton-X100 и дезоксихолата натрия является более щадящим методом воздействия на нативные легкие [11, 12, 15, 16, 23, 24].

Таблица. Протоколы проведения децеллюляризации легких

Авторы протокола, год	Доноры каркаса	Детергенты	Путь введения детергента
T.H. Petersen et al., 2010	Крысы (Fisher 344)	8mM CHAPS	Перфузия через ЛА
H.C. Ott et al., 2010	Крысы (Sprague Dawley)	0,1% SDS, 0,1% Triton X-100	Перфузия через ЛА
A.P. Price et al., 2010	Мыши (C57BL/6)	0,1% Triton X-100, 2% SDC	Перфузия через трахею и ПЖ
J. Cortiella et al., 2010	Крысы (Sprague Dawley)	1% SDS	Через трахею однократно, далее – погружной метод
J.J. Song et al., 2011	Крысы (Sprague Dawley)	0,1% SDS, 0,1% Тритон X-100	Перфузия через ЛА
J.M. Wallis et al., 2011	Мыши (BALB/C)	3 протокола: (1) 0,1% Triton X-100, 2% SDC; (2) 0,1% SDS, 0,1% Triton X-100. (3) 8mM CHAPS.	Перфузия через трахею и ПЖ
A.B. Daly et al., 2011	Мыши (C57BL/6, BALB/C)	0,1% Тритон X-100, 2% SDC	Перфузия через трахею и ПЖ
T. Jensen et al., 2012	Мыши (C57BL/6)	0,1% Triton X-100, 2% SDC	Перфузия через трахею
R.W. Bonvillain et al., 2012	Макаки-резус	0,1% Triton X-100, 2% SDC	Перфузия через трахею и ЛА
Nichols et al., 2013	Свиньи	2% SDS, 1% SDS	Перфузия через ЛА

CHAPS – 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат; SDS – додецил сульфат натрия (анионный сурфактант для лизиса клеток и расщепления белковых цепей); SDC – натриевая соль дезоксихолево́й кислоты (водорастворимый ионный детергент, используемый для разрушения белковых связей); Triton X-100 – неионный детергент для растворения белков; ЛА – легочная артерия; ПЖ – правый желудочек.

Резидуальные клеточные и ядерные фрагменты, образующиеся в процессе децеллюляризации, могут повлиять на развитие иммунного ответа. Существующие критерии оценки качества проведенной децеллюляризации определяют в большей степени денуклеаризацию тканей, а не собственно децеллюляризацию [20]. ДНК в данном случае является индикатором наличия иных, сопряженных с нуклеиновыми кислотами, внутриклеточных или мембранных молекул [25]. Например, протеомный анализ с использованием масс-спектрометрии показал присутствие широкого диапазона остаточных ядерных белков и белков цитоскелета даже после успешно проведенной децеллюляризации легких [10, 16, 17].

В связи с тем, что детергентно-энзиматический метод децеллюляризации вызывает определенного рода повреждения барьерной функции легких, существует необходимость разработки протоколов, сохраняющих волокна ВКМ при завершении децеллюляризации. Ряд авторов предлагают изменять кислотность растворов детергентов [10, 11] для снижения потерь эластической составляющей каркасов легких и содержания в них гликозаминогликанов. Другой метод предлагает покрывать децеллюляризованный каркас коллагеном или Matrigel для улучшения биомеханических свойств каркаса и адгезии клеток [18]. Однако убедительных данных о том, что предпринятые меры улучшают архитектуру каркаса легких в процессе децеллюляризации, получено не было [10, 18].

Способ введения растворов детергентов также влияет на степень микроструктурных повреждений легких. Методы децеллюляризации с проведением перфузии легочных сосудов повреждают аэрогематический барьер, что проявляется наличием крови в воздушных путях после имплантации рецеллюляризованного легкого [26, 27]. Проведение децеллюляризации через трахею более эффективно и легко доступно по сравнению с сосудистой перфузией, так как общая площадь дыхательной поверхности легких составляет в среднем 120 м² [28]. Был проведен ряд исследований по изучению результатов интермиттирующей децеллюляризации для сохранения микроархитектоники легочных мембран [29]. Однако предварительные данные морфологического и иммуногистохимического анализов, проведенных в том числе и в нашем исследовании, позволяют заключить, что при перфузии сосудистого русла снижение качественного и количественного состава ВКМ, включая протеогликаны, эластин, фибронектин и ламинин, происходит в меньшей степени, чем при использовании децеллюляризации через дыхательные пути [10, 30].

Рецеллюляризация легких: методы и клеточные популяции

Концепция рецеллюляризации легких, подобно иным органам, включает в себя заселение децеллюляризованного каркаса клетками, способными прикрепляться, мигрировать, пролиферировать, выполнять специализированные функции для воссоздания свойств нативных тканей органа. Имеющиеся данные экспериментальных и клинических исследований подтверждают тропность клеток к биологическому каркасу [10, 31, 32]. Так, описаны успешные трансплантации децеллюляризованных клапанов

аорты и сосудов, когда биоискусственные графты рецеллюляризовались миграцией клеток реципиента через каркас с последующей дифференцировкой в клетки, подобные эндотелиальным [32, 33]. Подобного успеха удалось достичь и при проведении клинических исследований в отношении трахеи, мочевого пузыря и клапанов сердца [34-38]. Безусловно, определенную трудность проведения рецеллюляризации представляет собой трехмерность структуры легких по сравнению с более простыми по строению кожей, костью или клапанами сердца. В настоящий момент проводятся исследования по заселению каркаса легких через трахею и статической рецеллюляризации фрагментов легких клетками альвеолярного эпителия I и II типов [39]. Основными клеточными ресурсами при рецеллюляризации каркаса легких в эксперименте также считаются эндотелиальные клетки, эмбриональные стволовые клетки, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [10].

Эпителиальные клетки

Альвеолярный эпителий представлен в основном двумя типами специализированных клеток: альвеолярным эпителием типа I (АЕТ I) в стадии терминальной дифференцировки и сурфактант продуцирующим кубическим эпителием типа II (АЕТ II) [39]. Последние представляют особую значимость ввиду важности производимого ими сурфактанта для снижения поверхностного натяжения жидкости и, таким образом, предотвращения спадания альвеол.

В 1986 г. J.S. Lwebuga-Mukasa с соавт. продемонстрировали возможность трансформации крысиных клеток АЕТ II в АЕТ I на децеллюляризованном матриксе легких человека [40]. А.Р. Price с соавт. (2010) удалось доказать, что децеллюляризованный матрикс поддерживает рост фетальных АЕТ II [13]. Более того, через неделю после инъекции фетальных АЕТ II в альвеолах отмечалось наличие клеток, прикрепленных к каркасу и позитивно окрашивающихся на содержание цитокератина-18 и предшественников сурфактант ассоциированных белков группы С [13]. Следовательно, каркас после обработки детергентами сохраняет структурные компоненты, влияющие на дифференцировку клеток альвеолярного эпителия, при этом указанное влияние является органоспецифичным, так как рецеллюляризация теми же клетками-предшественницами децеллюляризованного каркаса печени не способствовала синтезу специфических белков [10, 41]. Неслучайно большинство исследователей считают эпителиальные клетки наиболее перспективным источником для репопуляции каркаса легких [10, 13, 32-38].

Различные виды стволовых клеток

Стволовые клетки негемопоэтического ряда обладают иммуномодулирующим и регенеративным потенциалом, что широко используется при рецеллюляризации биологических каркасов легких [10-12]. ММСК представляют собой наиболее доступный клеточный ресурс, обладают выраженной пролиферативной активностью, способны выделять ряд факторов роста и противовоспалительных цитокинов для регулирования эндотелиальной и эпители-

альной проницаемости и уменьшения выраженности воспалительного процесса [16, 42–45]. А.В. Daly (2012) с соавт. продемонстрировали в эксперименте, что ММСК, введенные через трахею, способны к пролиферации и миграции в ткани с высоким содержанием ламинина и коллагена I и IV типов [16]. Указанная тропность к коллагену в условиях сохранности компонентов базальной мембраны каркаса после децеллюляризации легких является одним из преимуществ использования ММСК. В то же время, способность ММСК дифференцироваться в клетки эпителиального ряда на децеллюляризованном каркасе подвергается сомнению рядом авторов [10, 15, 17, 19].

Децеллюляризованный каркас легких при сохранности белков ВКМ также поддерживает дифференцировку *in vitro* эмбриональных стволовых клеток в различные специфичные клеточные линии для репопуляции легких, что широко используется многими исследователями [19, 46, 47]. Так, R.W. Bonvillain с соавт. (2012) подтвердили способность мышечных эмбриональных стволовых клеток дифференцироваться в эпителиальные и эндотелиальные клеточные линии [19]. В целом, возможность использования стволовых клеток для индукции различных структур дыхательных путей представляется перспективным направлением. Однако клиническое применение клеточной терапии требует проведения более продолжительных фундаментальных исследований с обязательным изучением отдаленных результатов и противопоказаний к проведению лечения.

Эндотелиальные клетки

Эндотелиальные клетки обеспечивают функционирование процессов газообмена и барьерной функции легких, поддерживая нормальный метаболизм эпителиальных клеток и клеток-предшественниц, а также обеспечивая протекание не респираторных метаболических процессов. Рецеллюляризация каркасов легких эндотелиальными клетками, несмотря на многократные попытки, приводит к неравномерному их распределению в сосудистом русле и повышению риска развития тромбозов и органной недостаточности [14, 48].

Разветвленная сеть кровеносных сосудов и бронхов в легких позволяет использовать комбинированный способ введения клеток при проведении рецеллюляризации в эксперименте. Так, через трахею целесообразно вводить эпителиальные клетки и фетальные АЕТ II для регенерации альвеолярного эпителия, в то время как для эндотелиальных и стволовых клеток оптимальна перфузия в виде суспензии через сосудистое русло [11–18]. Последние исследования по изучению способности эндотелиальных клеток-предшественниц использовать молекулы клеточной адгезии для запуска неоваскулогенеза подтверждают данную гипотезу [10].

Рецеллюляризация легких: основные трудности проведения

Технические трудности вентиляции легких в био-реакторе требуют оптимизации процессов рецеллюляризации, а также сокращения времени выполнения протоколов. Собственные исследования авторов в области разработки протоколов децеллюляризации

и рецеллюляризации легких крысы подтверждают необходимость соблюдения условий, максимально приближенных к физиологическим, на протяжении всего эксперимента, а также важность мониторинга частоты дыхания, общего объема, функциональной и остаточной жизненной емкости при вентиляции графта [30].

Для формирования функционирующих легких особенно важен период внутриутробного развития, когда дыхательные движения способствуют попаданию амниотической жидкости в трахеобронхиальное дерево плода, играя значительную роль в процессе роста и созревания легких [49]. Попытки воссоздать *in vitro* указанные физиологические условия механическим растяжением незначительно повысили эффективность синтеза белков ВКМ [10]. При создании тканеинженерных легких также необходимо иметь в виду, что альвеолярная структура каркаса повреждается при уменьшении содержания белков ВКМ, неизбежном при проведении децеллюляризации и рецеллюляризации. Снижение содержания фибронектина и ламинина в базальных мембранах легочных альвеол препятствует полноценной клеточной адгезии и ухудшает биомеханические свойства каркаса [50, 51]. Любое чрезмерное механическое воздействие повреждает микроструктуру органа, что потенциально снижает функциональные способности тканеинженерного каркаса [50].

Трансплантация тканеинженерных легких животным: исходы и перспективы

На данный момент известно о двух трансплантациях тканеинженерных легких мелким лабораторным животным (крысам). Оба вмешательства были выполнены в 2010 г. в США с использованием биореактора на подготовительном этапе для рецеллюляризации легких суспензией эпителиальных и эндотелиальных клеток [11, 12]. Полученные тканеинженерные графты были ортотопически пересажены крысам и вовлечены в процесс газообмена в течение 120 мин. и 30 мин., соответственно. Легкие вентилировались атмосферным воздухом с положительным давлением на выдохе (РЕЕР). Физиологическая поддержка заключалась в проведении гиперосмолярной перфузии до проведения трансплантации, аспирация секреторируемой слизи выполнялась через эндотрахеальную трубку [14]. Несмотря на принятые превентивные меры, сохранность и гомеостаз каркаса были сильно ограничены. После трех дней вентиляции каркаса отмечалась дилатация дыхательных путей, наличие разрушенных клеток в просвете. Кроме того, вентиляция атмосферным воздухом вызывала деструкцию альвеолярного эпителия и дилатацию периферических альвеол, что приводило к нарушениям микроархитектоники каркаса [51]. Однако пригодность созданных *in vitro* тканеинженерных легких к длительному функционированию в организме реципиента оценить сложно, так как ни один эксперимент не продолжался более 6 ч. от момента проведения трансплантации [11, 12].

Необходимо учитывать, что для создания рецеллюляризованных легких, пригодных для пересадки, одним из важнейших аспектов является выбор донора для проведения первого этапа исследования — децеллюляризации. При помощи методов иммуногистохимии и масс-спектрометрии было показано, что возраст донора легких, состояние

донорских органов и тип клеток, выбранных для проведения рецеллюляризации существенно влияют на состояние получаемого тканеинженерного каркаса [52]. Это исключает использование для проведения децеллюляризации органов с патологией, например, эмфиземой и легочным фиброзом. В качестве модели для создания тканеинженерных легких человека рассматриваются низшие приматы и свиньи. Однако различия в составе ВКМ, особенно коллагеновых волокон, у животных и человека порождает сложности в интерпретации данных экспериментов. ВКМ, полученный при децеллюляризации легких свиньи, содержит небольшое количество α -галактозилы эпителиоцитного типа, который способствует развитию реакции отторжения через активацию системы комплемента [53]. В то же время, несмотря на присутствие данного эпителиоцита в матриксе после децеллюляризации, не удалось привести убедительные доказательства развития неблагоприятного иммунного ответа и ремоделирования тканей при проведении доклинических исследований [54–56], что позволяет использовать животных, в частности, свиней для изучения рецеллюляризации каркасов легких животных клетками человека. Возможно также проведение генной модификации свиней перед проведением эксперимента для снижения вероятности отторжения ксеногенных каркасов [57–59]. Использование низших приматов для данной цели во многих странах ограничивается сложностью законодательного регулирования, большими экономическими затратами на содержание животных, а также возможностью развития перекрестных зоонозов [10].

Одним из наиболее сложных моментов в создании функционирующих тканеинженерных легких является проведение операции по пересадке рецеллюляризованного легкого с наложением бронхиальных и сосудистых анастомозов. Согласно стандартной технике, операция включает в себя наложение анастомоза на главный бронх, легочную вену и ствол легочной артерии. В связи с повреждением каркаса легких и снижением содержания белков ВКМ, в различной степени происходящих во время проведения децеллюляризации, механические свойства тканеинженерного легкого нарушаются. Это предполагает модификацию применяемой хирургической тактики в сторону максимальной защиты тканей от повреждения и превентивные меры, направленные на укрепление анастомоза и предотвращение его несостоятельности. Той же стратегии необходимо придерживаться и при трансплантации ксеногенного тканеинженерного каркаса легких, когда ряд анатомических структур подвергается резекции в силу видовой специфичности строения организмов (например, трахеальный бронх краниальной доли правого легкого свиньи резецируется при пересадке). Более того, у различных видов формы легких значительно отличаются в зависимости от объема грудной

клетки, что также нужно учитывать при проведении трансплантации ксеногенных каркасов, рецеллюляризованных аллогенными клетками [60, 61]. Эта проблема, наряду с упомянутыми выше, предполагает проведение дополнительных исследований для достижения конечной цели — получения функционирующих тканеинженерных легких.

Заключение

В последние десятилетия широко изучаются различные подходы для решения проблемы нехватки донорских органов для проведения трансплантации легких пациентам в терминальных стадиях болезни. Основные перспективы в этой области связывают с использованием методов регенеративной медицины: клеточной терапии для регенерации легких, в том числе с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, дифференцирующихся в клетки легочного эпителия, и тканевой инженерии для создания каркаса легких после последовательного проведения децеллюляризации и рецеллюляризации. Децеллюляризация легких с сохранением компонентов ВКМ и сложной микроархитектоники органа является «золотым стандартом» для получения неиммуногенного каркаса легких для последующего заселения аутогенными клетками реципиента. Таким образом, рецеллюляризация как основа регенерации легких может оказаться перспективной альтернативой лечению заболеваний легких в будущем. Однако, несмотря на имеющиеся плюсы применения методов регенеративной медицины в лечении заболеваний легких, остается ряд вопросов, которые должны быть решены до применения биоинженерных легких в клинической практике. К вопросам, требующим проведения дополнительных исследований для их решения, относится, например, проблема проведения децеллюляризации легких с сохранением механических и функциональных свойств получаемого каркаса, выбор идеального животного — донора для создания и исследования модели легких человека *in vivo*, а также проблема выбора оптимального типа и количества клеток для заселения биологического каркаса. Решение упомянутых вопросов приведет к получению тканеинженерных легких, которые в перспективе позволят решить проблемы трансплантологии и органного донорства.

Благодарности

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.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Lim M.L., Jungebluth P., Macchiarini P. The Implications of stem cell applications for diseases of the respiratory system. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2013; 130:39-54.
2. Calle E.A., Petersen T.H., Niklason L.E. Procedure for lung engineering. *J. Vis. Exp.* 2011; 49: 26-51.
3. Wang D., Morales J.E., Calame D.G. et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived alveolar epithelial type II cells abrogates acute lung injury in mice. *Mol. Ther.* 2012; 18(3):625-34.
4. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.

5. Hoshiba T., Lu H., Kawazoe N. et al. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010; 10(12): 1717-28.
6. Kotsimbos T., Williams T.J., Anderson G.P. Update on lung transplantation: programmes, patients and prospects. *Eur. Respir. Rev.* 2012; 21: 271-305.
7. Zafar S.Y., Howell D.N., Gockerman J.P. Malignancy after solid organ transplantation: an overview. *Oncologist* 2008; 13:769-78.
8. Valapour M., Paulson K., Smith J.M. et al. Annual Data Report: lung. *Am. J. Transplant.* 2013; 13(Suppl 1):149-77.
9. Oto T., Okada Y., Bando T. et al. Japanese society of lung and heart-lung transplantation. Registry of the Japanese society of lung and heart-lung transplantation: the official Japanese lung

transplantation report 2012. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2013; 61:208-11.

10. Tsuchiya T., Sivarapatna A., Rocco K. et al. Future prospects for tissue engineered lung transplantation. Decellularization and recellularization-based whole lung regeneration. *Organogenesis* 2014; 10(2): 196-207.

11. Petersen T.H., Calle E.A., Zhao L. et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* 2010; 329: 538-41.

12. Ott H.C., Clippinger B., Conrad C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat. Med.* 2010; 16: 927-33.

13. Price A.P., England K.A., Matson A.M. et al. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. *Tissue Eng. Part A* 2010; 16: 2581-91.

14. Song J.J., Kim S.S., Liu Z. et al. Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. *Ann. Thorac. Surg.* 2011; 92: 998-1005.

15. Cortiella J., Niles J., Cantu A. et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng. Part A* 2010; 16: 2565-80.

16. Daly A.B., Wallis J.M., Borg Z.D. et al. Initial binding and recellularization of decellularized mouse lung scaffolds with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. Part A* 2012; 18: 1-16.

17. Wallis J.M., Borg Z.D., Daly A.B. et al. Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung decellularization and recellularization. *Tissue Eng. Part C Methods* 2012; 18: 420-32.

18. Jensen T., Roszell B., Zang F. et al. A rapid lung decellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation. *Tissue Eng. Part C Methods* 2012; 18: 632-46.

19. Bonvillain R.W., Danchuk S., Sullivan D.E. et al. A nonhuman primate model of lung regeneration: detergent-mediated decellularization and initial in vitro recellularization with mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A* 2012; 18: 2437-52.

20. Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006; 27: 3675-83.

21. McDevitt C.A., Wildey G.M., Cutrone R.M. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003; 67: 637-40.

22. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011; 32: 3233-43.

23. Petersen T.H., Calle E.A., Colehour M.B. et al. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs* 2012; 195: 222-31.

24. Wallis J.M., Borg Z.D., Daly A.B. et al. Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung decellularization and recellularization. *Tissue Eng. Part C Methods* 2012; 18: 420-32.

25. Nagata S., Hanayama R., Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 2010; 140(5): 619-30.

26. Franzdóttir S.R., Axelsson I.T., Arason A.J. et al. Airway branching morphogenesis in three dimensional culture. *Respir. Res.* 2010; 11: 162-72.

27. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A. et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* 2010; 328: 1662-8.

28. Gehr P., Bachofen M., Weibel E.R. The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir. Physiol.* 1978; 32: 121-40.

29. Maghsoudlou P., Georgiades F., Tyraskis A. et al. Preservation of micro-architecture and angiogenic potential in a pulmonary acellular matrix obtained using intermittent intra-tracheal flow of detergent enzymatic treatment. *Biomaterials* 2013; 34: 6638-48.

30. Kuevda E., Gubareva E., Sotnichenko A. et al. Best decellularization protocol for tissue-engineered lungs. *Proceedings of the World Conference on Regenerative Medicine*; 2013 Oct 23-25; Leipzig; Germany. *Regenerative Medicine* 2013; 8 (Suppl 6): s21.

31. Sayk F., Bos I., Schubert U. et al. Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: an autopsy study. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 79: 1755-8.

32. Takagi K., Fukunaga S., Nishi A. et al. In vivo recellularization of plain decellularized xenografts with specific cell characterization in the systemic circulation: histological and immunohistochemical study. *Artif. Organs* 2006; 30: 233-41.

33. Friedrich L.H., Jungebluth P., Sjöqvist S. et al. Preservation of aortic root architecture and properties using a detergent-enzymatic perfusion protocol. *Biomaterials* 2014; 35(6): 1907-13.

34. Baiguera S., Jungebluth P., Burns A., et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials* 2010; 31: 8931-38.

35. Macchiarini P., Jungebluth P., Go T. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372: 2023-30.

36. Atala A., Bauer S.B., Soker S. et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006; 367: 1241-6.

37. Biancosino C., Zardo P., Walles T. et al. Generation of a bioartificial fibromuscular tissue with autoregenerative capacities for surgical reconstruction. *Cytotherapy* 2006; 8: 178-83.

38. Cebotari S., Lichtenberg A., Tudorache I. et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* 2006; 114(Suppl 1): 132-7.

39. Hermanns M.I., Unger R.E., Kehe K. et al. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab. Invest.* 2004; 84: 736-52.

40. Lwebuga-Mukasa J., Inggar D., Madri J. Repopulation of a human alveolar matrix by adult rat type II pneumocytes in vitro. A novel system for type II pneumocyte culture. *Exp. Cell Res.* 1986; 162: 423-35.

41. Cortiella J., Niles J., Cantu A. et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng. Part A* 2010; 16: 2565-80.

42. Ingenito E.P., Tsai L., Murthy S. et al. Autologous lung derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental emphysema. *Cell Transplant.* 2012; 21(1): 175-89.

43. Collas P., Hakelien A.M. Teaching cells new tricks. *Trends Biotechnol.* 2003; 21 (8): 354-361.

44. Ambrosi D.J., Rasmussen T.P. Reprogramming mediated by stem cell fusion. *J. Cell Mol. Med.* 2005; 9(2): 320-330.

45. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4): 663-76.

46. Petersen T.H., Calle E.A., Colehour M.B. et al. Bioreactor for the long-term culture of lung tissue. *Cell Transplant.* 2011; 20: 1117-26.

47. Longmire T.A., Ikonomou L., Hawkins F. et al. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 398-411.

48. Shamis Y., Hasson E., Soroker A. et al. Organ-specific scaffolds for in vitro expansion, differentiation, and organization of primary lung cells. *Tissue Eng. Part C Methods* 2011; 17: 861-70.

49. Inanlou M.R., Baguma-Nibasheka M., Kablar B. The role of fetal breathing-like movements in lung organogenesis. *Histol. Histopathol.* 2005; 20: 1261-6.

50. Petersen T.H., Calle E.A., Colehour M.B. et al. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs* 2012; 195: 222-31.

51. Badylak S.F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl. Immunol.* 2004; 12: 367-77.

52. Sokocevic D., Bonenfant N.R., Wagner D.E. et al. The effect of age and emphysematous and fibrotic injury on the recellularization of decellularized lungs. *Biomaterials* 2013; 34: 3256-69.

53. Daly K.A., Stewart-Akers A.M., Hara H. et al. Effect of the alphaGal epitope on the response to small intestinal submucosa extracellular matrix in a nonhuman primate model. *Tissue Eng. Part A* 2009; 15: 3877-88.

54. McPherson T.B., Liang H., Record R.D. et al. Galalpha(1,3) Gal epitope in porcine small intestinal submucosa. *Tissue Eng.* 2000; 6: 233-9.

55. Badylak S., Kokini K., Tullius B. et al. Morphologic study of small intestinal submucosa as a body wall repair device. *J. Surg. Res.* 2002; 103: 190-202.

56. Nuininga J.E., van Moerkerk H., Hanssen A. et al. Rabbit urethra replacement with a defined biomatrix or small intestinal submucosa. *Eur. Urol.* 2003; 44: 266-71.

57. Cantu E., Parker W., Platt J.L. et al. Pulmonary xenotransplantation: rapidly progressing into the unknown. *Am. J. Transplant.* 2004; 4(Suppl 6): 25-35.

58. Toledo-Pereyra L.H., Lopez-Nebolina F. Xenotransplantation: a view to the past and an unrealized promise to the future. *Exp. Clin. Transplant* 2003; 1: 1-7.

59. Ekser B., Rigotti P., Gridelli B. et al. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl. Immunol.* 2009; 21: 87-92.

60. Nakakuki S. Bronchial tree, lobular division and blood vessels of the pig lung. *J. Vet. Med. Sci.* 1994; 56: 685-9.

61. Daggett C.W., Yeatman M., Lodge A.J. et al. Total respiratory support from swine lungs in primate recipients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1998; 115: 19-27.

Поступила: 18.02.2015