

# ИЗУЧЕНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ АЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ МАТРИКСОВ ЛЕГКИХ ПРИМАТОВ И ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

DOI: 10.17691/stm2017.9.4.10

УДК 57.085.2:616.24–089.843:599.8]–092.9

Поступила 21.04.2017 г.



**Е.В. Куевда**, к.м.н., научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины<sup>1</sup>;

**Е.А. Губарева**, к.м.н., зав. лабораторией фундаментальных исследований в области регенеративной медицины<sup>1</sup>;

**И.С. Гуменюк**, научный сотрудник лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины<sup>1</sup>;

**Д.Д. Карал-оглы**, к.б.н., зав. лабораторией доклинических и клинических исследований лекарственных средств и медицинских изделий<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кубанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, 350063, ул. Седина, 4;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи, Адлерский р-он, с. Весёлое, 354376, ул. Мира, 177

**Цель исследования** — изучить биосовместимость ацеллюлярных матриксов на модели легких приматов, максимально приближенной по анатомо-морфологическим характеристикам к легким человека, для создания тканеинженерных конструкций.

**Материалы и методы.** Ацеллюлярный матрикс получен в результате детергент-энзиматической децеллюляризации легких приматов по модифицированному протоколу — увеличено время экспозиции и концентрация детергентов. Качество полученного каркаса оценивали морфологически после окрашивания гематоксилином и эозином и флюорофором DAPI, а также путем количественного определения резидуальной ДНК. Изменение состава децеллюляризованного внеклеточного матрикса исследовали количественно при регистрации площади позитивного окрашивания после проведения иммуногистохимического исследования и при окрашивании альциановым синим. Биосовместимость каркасов определяли с помощью ХТТ-тестов через 48 и 72 ч статической рецеллюляризации с последующей количественной оценкой. В качестве основного клеточного ресурса для заселения каркасов использовали мультипотентные мезенхимные стволовые клетки приматов, клеточную принадлежность которых верифицировали иммунофенотипированием и направленной дифференцировкой.

**Результаты.** Морфологическое исследование не выявило значительных структурных повреждений каркасов, остаточная ДНК составила 19,2%. Количественное определение площади положительного окрашивания выявило статистически значимое снижение содержания коллагена 1-го типа и фактора роста эндотелия сосудов — VEGF — после децеллюляризации. Отмечены количественные изменения состава внеклеточного матрикса, однако они не ухудшают биосовместимость каркасов и не влияют на клеточную активность.

**Заключение.** Полученные каркасы не обладают цитотоксическими свойствами, способствуют адгезии, росту и метаболической активности клеток, что позволяет считать ацеллюлярные матриксы перспективными для создания тканеинженерных конструкций легких после дополнительного улучшения белкового состава.

**Ключевые слова:** ацеллюлярные матриксы; тканеинженерные конструкции; биосовместимость ацеллюлярных матриксов легких; детергент-энзиматическая децеллюляризация; рецеллюляризация.

**Как цитировать:** Kuevda E.V., Gubareva E.A., Gumenuyk I.S., Karal-ogly D.D. A study of biocompatibility of acellular matrices of primate lungs and the potential for their application as tissue-engineering constructions. *Modern Tehnologies in Medicine* 2017; 9(4): 82–88, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.10>

Для контактов: Куевда Елена Вячеславовна, e-mail: [elenakuevda@yandex.ru](mailto:elenakuevda@yandex.ru)

English

## A Study of Biocompatibility of Acellular Matrices of Primate Lungs and the Potential for Their Application as Tissue-Engineering Constructions

**E.V. Kuevda**, MD, PhD, Researcher, Laboratory of Fundamental Research in the Field of Regenerative Medicine<sup>1</sup>;

**E.A. Gubareva**, MD, PhD, Head of the Laboratory of Fundamental Research in the Field of Regenerative Medicine<sup>1</sup>;

**I.S. Gumenuyk**, Researcher, Laboratory of Fundamental Research in the Field of Regenerative Medicine<sup>1</sup>;

**D.D. Karal-ogly**, PhD, Head of the Laboratory of Preclinical and Clinical Studies of Pharmaceuticals and Medical Products<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kuban State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 4 Sedina St., Krasnodar, 350063, Russian Federation;

<sup>2</sup>Research Institute of Medical Primatology, 177 Mira St., Vesolyoe, Sochi, Adler Region, 354376, Russian Federation

**The aim of the study** was to evaluate biocompatibility of acellular matrices on the model of primate lungs, which is closely approximated to human lungs in terms of anatomic-morphological characteristics, for the purpose of creating tissue engineering constructions.

**Materials and Methods.** Acellular matrix was obtained from detergent-enzymatic decellularization of primate lungs according to a modified protocol, where exposition time and detergent concentration were increased. The quality of the obtained scaffold was morphologically evaluated after staining with hematoxylin and eosin and DAPI fluorophore, and by testing the assay for residual DNA. The change in the composition of decellularized extracellular matrix was quantitatively evaluated during the registration of the square area of positive staining after immunohistochemical testing and during staining with alcian blue. Biocompatibility of scaffolds was tested with XTT assay after 48 and 72 h of static recellularization with a consequent quantitative determination. As the main cellular resource for colonization of the scaffolds, we used multipotent mesenchymal stem cells of primates whose cellular affiliation was verified by immunophenotyping and targeted differentiation.

**Results.** Morphological testing did not reveal any considerable structural damage of the scaffolds, residual DNA was 19.2%. Quantitation of the square area of positive staining revealed a statistically significant decrease in the amount of type I collagen and the vascular endothelium growth factor (VEGF) after decellularization. Quantitative changes in extracellular matrix were registered, however they do not impair biocompatibility of the scaffolds and do not affect cell activity.

**Conclusion.** The obtained scaffolds do not have cytotoxic properties, they contribute to adhesion, growth and metabolic activity of cells, which allows us to consider acellular matrices to be a potential for creating tissue engineering constructions of lungs after additional enhancement of the protein composition.

**Key words:** acellular matrices; tissue-engineered constructions; biocompatibility of acellular matrices of lungs; detergent-enzymatic decellularization; recellularization.

Последнее десятилетие характеризуется стремительным ростом как аллергической и инфекционной патологии, так и злокачественных новообразований органов дыхания, которые наряду с болезнями сердечно-сосудистой системы приобретают большую социальную значимость [1]. Существующие методы терапевтического воздействия и даже органная трансплантация не способны в полной мере решить проблему лечения хронических заболеваний органов дыхания. В связи с этим большой интерес представляет регенеративная медицина, в арсенале которой имеются потенциально новые методы лечения. Например, тканевая инженерия предлагает использование рецеллюляризованных биологических каркасов легких, полученных путем децеллюляризации от доноров, подходящих не по всем параметрам, в ка-

честве *ex vivo* модели регенерации легких. При этом снижения иммуногенности каркасов и отсутствия необходимости постоянной иммуносупрессивной терапии после трансплантации предполагается достичь за счет рецеллюляризации собственными стволовыми клетками реципиента или эндогенными клетками-предшественниками [2]. Более того, органы после децеллюляризации являются перспективной моделью изучения взаимодействия клеток и внеклеточного матрикса при таких патологических изменениях легких, как эмфизема или фиброз, а также при изучении возрастных изменений [3, 4].

Биологические каркасы, полученные от мелких лабораторных животных, широко используют в качестве модели для отработки протоколов децеллюляризации и рецеллюляризации, изучения биосовместимости

матрицков и межклеточного взаимодействия [5, 6]. Однако полученные на моделях грызунов результаты не всегда можно оптимально и без потери качества транслировать на более крупных животных в связи со значительными межвидовыми и физиологическими отличиями, а также техническими затруднениями [7, 8]. Это обуславливает необходимость модификации протоколов децеллюляризации органов при работе с крупными животными с последующей оценкой качества получаемых каркасов и способности к поддержке адгезии, роста и пролиферации клеток.

**Цель исследования** — изучение биосовместимости ацеллюлярного матрикса на модели легких приматов, максимально приближенной к легким человека по анатомо-морфологическим характеристикам, полученного в результате децеллюляризации детергент-энзиматическим методом, а также оценка перспектив использования предложенного протокола для создания тканеинженерных конструкций.

**Материалы и методы**

**Получение ацеллюлярного каркаса легких приматов.** Для проведения децеллюляризации использовано 3 органокомплекса «сердце–легкие» взрослых самцов макак-резус (*Macaca mulatta*). Изъятие органов проводили на базе НИИ медицинской приматологии (Сочи) во время аутопсии, после естественной смерти животных. Органы промывали изотоническим раствором хлорида натрия и помещали в стерильный фосфатный буфер с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Органокомплексы транспортировали в специализированном контейнере при температуре не выше 4°C в лабораторию фундаментальных исследований в области регенеративной медицины на базе Кубанского государственного медицинского университета (Краснодар), где и выполняли децеллюляризацию каркасов с последующей оценкой качества полученного матрикса. Время транспортировки не превышало 24 ч. Все манипуляции осуществляли с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1972 г.) и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) после одобрения протокола исследования локальным этическим комитетом (протокол №30/1 от 2014 г.). При разработке способа децеллюляризации легких низших приматов в качестве опорного использован детергент-энзиматический метод воздействия, ранее успешно модифицированный и примененный нами для получения биологического каркаса легких крыс [6]. Модификация коснулась увеличения продолжительности экспозиции и концентрации раствора дезоксихолата натрия, а также способа введения децеллюляризирующих агентов. Кроме того, не представлялось возможным использовать систему вентиляции Harvard Inspira Advanced Safety Ventilator (Harvard Apparatus, США), предназначенную для гры-

зунов, ввиду неэффективности обеспечиваемых ею параметров дыхательного объема и жизненной емкости легких из-за большого веса животного. В связи с этим перфузию детергентами дополнительно выполняли через трахею, с естественным оттоком, под постоянным контролем скорости и объема поступающего раствора для исключения повреждения альвеол. Концентрация дезоксихолата натрия была увеличена до 2%. Однако дополнительные методы физической децеллюляризации (например, замораживание с последующим постепенным оттаиванием) были отклонены при предварительной оценке качества каркаса вследствие выраженного повреждающего воздействия [9]. Суммарная продолжительность воздействия детергентов и энзимов составила 48 ч.

**Оценка качества и биосовместимости ацеллюлярного матрикса легких приматов.**

Первичную морфологическую оценку качества полученных ацеллюлярных матрицков выполняли стандартными методами гистологической окраски гематоксилином и эозином и флюорофором (4',6-диамидино-2-фенилиндола) DAPI для оценки сохранности архитектоники каркаса и эффективности элиминации ядерного материала. Количественное определение остаточной ДНК проводили колориметрическим методом на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) [6, 9, 10]. Количественную оценку содержания компонентов внеклеточного матрикса (гликозаминогликанов, коллагеновых волокон и фактора роста эндотелия сосудов — VEGF) до и после проведения децеллюляризации осуществляли с помощью анализа площади позитивно окрашенных участков образцов в узкой спектральной области с оптической плотностью выше пороговой на основе принципа цветовой деконволюции [11, 12]. Предварительная подготовка образцов включала окрашивание альциановым синим для качественного определения содержания гликозаминогликанов, а также проведение иммуногистохимического анализа на содержание коллагена и VEGF. В качестве первичных антител использовали поликлональные антитела в разведении 1:100 к коллагену 1-го типа (ab 34710; Abcam, США) и VEGF (ab 46154; Abcam, США) соответственно. Микрофотографии для последующего морфометрического анализа получали с помощью микроскопа Olympus IX51 с камерой Olympus XC30 (Olympus Corporation, Япония). Изображения сохраняли в формате tif размером 2080×1544 пикселей. Для анализа микрофотографий выбирали случайные поля зрения без артефактов и краевых дефектов для нативных и децеллюляризованных образцов (для каждого из 6 образцов не менее 12 полей зрения). Полученные микрофотографии обрабатывали в программе Rawtherapee для нормализации по балансу белого и экспозиции. Сравнительный морфометрический анализ выполняли с использованием разработанного нами программного обеспечения Morphostain [<https://github.com/meklon/morphostain>; опубликовано

под свободной лицензией GNU GPL v. 3.0]. В процессе анализа выделены каналы отдельных красителей с использованием метода цветовой деконволюции [12]. После сегментации красителей автоматически определены области с интенсивностью окраски, превышающей заданный порог, затем так же рассчитана площадь окрашенных участков.

Биосовместимость каркасов тестировали при проведении ХТТ-тестов через 48 и 72 ч культивирования клеток на ацеллюлярном матриксе. Рецеллюляризацию опытных образцов (n=6) выполняли в статических условиях в 96-луночных планшетах. Клеточную суспензию в объеме 100 000 клеток на 200 мкл культуральной среды наносили непосредственно на поверхность каркаса. В качестве положительного контроля (n=6) использовали клетки, культивированные на пластике без биологического каркаса; в качестве негативного контроля (n=6) и для исключения фонового влияния биологического матрикса на измеряемую оптическую плотность использованы образцы ацеллюлярного матрикса легких, не заселенные клетками. В качестве клеточного ресурса выбраны мультипотентные мезенхимные стволовые клетки макак-резус 6–7-го пассажей. Клеточную принадлежность использованных для рецеллюляризации клеток верифицировали с помощью иммунофенотипирования методом проточной цитофлуориметрии и направленной дифференцировкой в три клеточные линии. Для изучения поверхностных клеточных маркеров использованы антитела к CD34 (Lot 3277660), CD45 (Lot 3095590), CD73 (Lot 2237759), CD90 (Lot 2296945), CD105 (Lot 31516310) (Beckman Coulter, США). Типирование клеточных линий выполняли дважды: непосредственно в первичной культуре и на пятом пассаже с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter (США) на базе НИИ медицинской приматологии (Сочи). Индуцированную дифференцировку проводили по стандартной методике с исполь-

зованием среды StemPro (Thermo Fisher Scientific Inc., США) по примененной нами ранее технологии окрашивания с помощью Oil Red O (оценка адипогенной дифференцировки), толуидиновым синим (оценка хондрогенной дифференцировки) и ализариновым красным (оценка минерализации матрикса) [6].

**Статистическая обработка данных.** Выполнена методами вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v. 6.04 (источник — www.graphpad.com). Полученные результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $m$  — стандартная ошибка среднего. Вероятность возможной ошибки определяли по таблице t-критерия Стьюдента для парных сравнений. Для выборок, отличных от нормального распределения сравниваемых совокупностей, использован критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Рутинные методы гистологической окраски образцов легких приматов подтвердили полное отсутствие ядер и клеточных элементов. Повреждения альвеолярной структуры и архитектоники матрикса в целом выражены незначительно (рис. 1). Количественное содержание резидуальной ДНК после децеллюляризации составило  $148,3 \pm 16,22$  нг/мг ткани (19,2%), в то время как в нативных легких оно равнялось  $771,2 \pm 67,99$  нг/мг ткани ( $p = 0,0001$ ). Положительное окрашивание сульфатированных гликозаминогликанов альциановым синим отмечено как на срезах нативных легких, так и в децеллюляризованных образцах. В то же время количественный пересчет площади положительного окрашивания продемонстрировал снижение уровня гликозаминогликанов после воздействия детергентов. Тенденция уменьшения содержания компонентов внеклеточного матрикса отмечалась при количественном расчете суммарной площади положительного окраши-

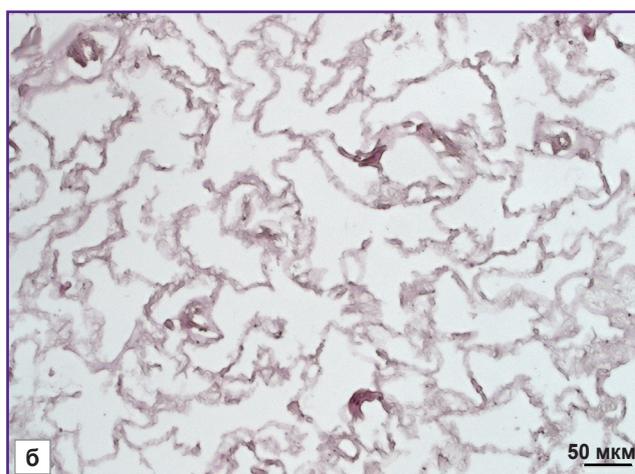
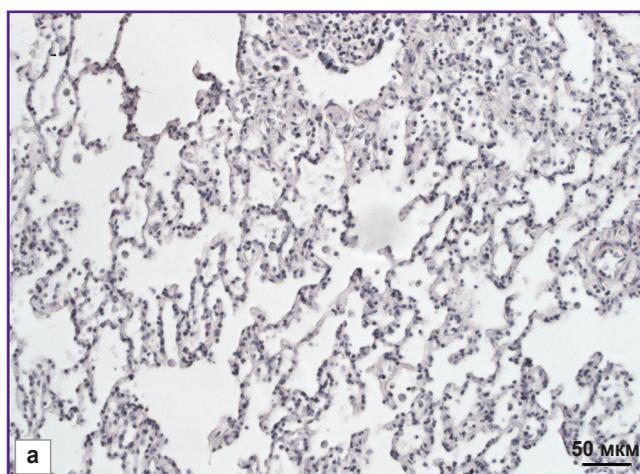
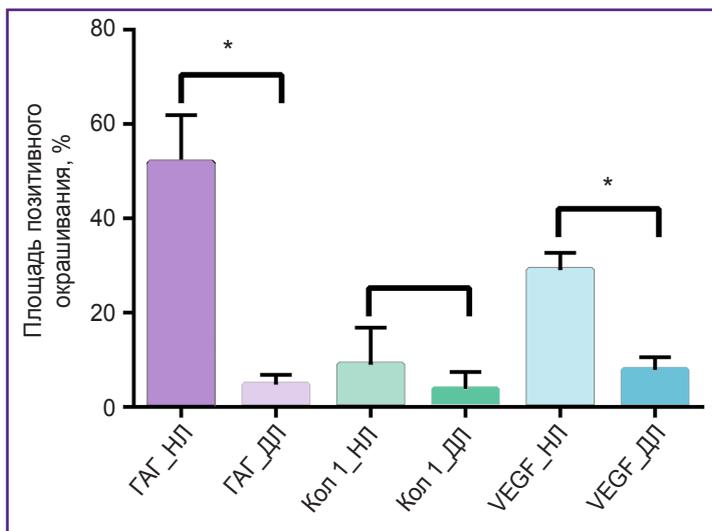


Рис. 1. Морфологическая характеристика альвеолярной структуры легких приматов до (а) и после (б) децеллюляризации; окрашивание гематоксилином и эозином; об.  $\times 20$ ; ок.  $\times 10$



**Рис. 2. Количественная характеристика содержания белков внеклеточного матрикса нативных и децеллюляризованных легких приматов:** ГАГ\_НЛ и ГАГ\_ДЛ — содержание гликозаминогликанов в нативных и децеллюляризованных легких; Кол 1\_НЛ и Кол 1\_ДЛ — содержание коллагена 1-го типа в нативных и децеллюляризованных легких; VEGF\_НЛ и VEGF\_ДЛ — содержание VEGF в нативных и децеллюляризованных легких; \* —  $p=0,0001$

**Имунофенотипирование мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) приматов на примере трех самцов *Macaca mulatta***

Номер типизируемого образца	Вид образца	Результаты экспрессии поверхностных маркеров, %				
		CD45-	CD90+	CD34-	CD105+	CD73+
1	Первичная культура	32,5	51,7	30,0	49,3	55,6
	ММСК 5-го пассажа	29,8	28,4	38,6	31,5	32,7
2	Первичная культура	52,0	54,6	26,4	55,4	56,1
	ММСК 5-го пассажа	31,4	28,4	32,8	24,7	28,6
3	Первичная культура	28,6	52,6	25,5	54,6	57,1
	ММСК 5-го пассажа	24,9	33,9	33,3	31,1	32,0

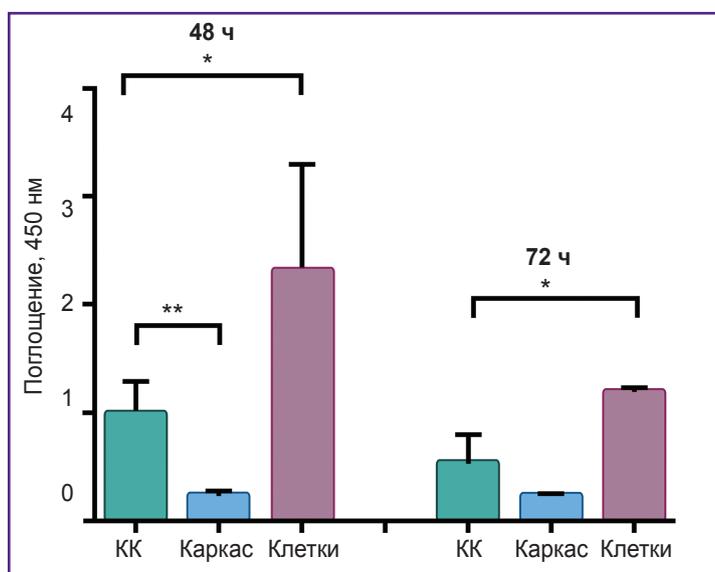
вания для VEGF, при этом статистически значимых изменений содержания коллагеновых волокон 1-го типа не обнаружено ( $p=0,1595$ , критерий Манна–Уитни) (рис. 2). Это согласуется с полученными нами ранее данными [11] по снижению содержания эластина после завершения децеллюляризации легких в результате повреждающего воздействия детергентов.

В результате иммунофенотипирования клеток выявлено отсутствие экспрессии CD34 и CD45 и положительная экспрессия CD73, CD90 и CD105. Количественное распределение клеток в зависимости от наличия поверхностных маркеров представлено в таблице.

Воздействие на клеточную культуру специализированных индукционных сред способствует направленному адипогенезу, хондрогенезу и остеогенезу, что качественно подтверждено наличием положительного окрашивания. Все это не оставляет сомнений относительно принадлежности использованной культуры к мультипотентным мезенхимным стволовым клеткам.

Результаты ХТТ-тестов на второй и третий день культивирования показали, что каркас не является токсичным, способствует адгезии, поддержанию роста и метаболической активности клеток (рис. 3).

**Обсуждение.** Детергент-энзиматический метод децеллюляризации нативных органов широко используется при получении ацеллюлярных матриксов для тканевой инженерии. Трансляция методик децеллюляризации легких мелких лабораторных животных на более крупные модели требует значительной модификации как самих протоколов получения биологических каркасов, так и способов оценки качества и биосовместимости матриксов. Ряд ведущих исследователей США и Западной Европы [13–15] предлагают несколько протоколов получения



**Рис. 3. Результаты тестов на биосовместимость каркасов через 48 и 72 ч культивирования:**

KK — клетки на ацеллюлярном каркасе; каркас — незаселенный децеллюляризованный матрикс; клетки — контрольные клетки, культивируемые на пластике; \* —  $p \leq 0,05$ ; \*\* —  $p = 0,0016$

ацеллюлярного матрикса легких свиней и приматов. Однако использованные протоколы предполагают длительную обработку нативных органов растворами детергентов — от 3 до 7 сут [13–15], что создает угрозу бактериальной и вирусной контаминации получаемого матрикса. Вызывает сомнение эффективность использования забуференного 10% формалина в качестве консерванта [13] при последующей рецеллюляризации матрикса в связи с токсичностью примененного метода предварительной обработки. Кроме того, ряд исследователей используют агрессивные растворы детергентов, такие как додецилсульфат натрия, что приводит к почти полному разрушению волокон ламинина и коллагена 1-го типа и к выраженному снижению эластина и коллагена 4-го типа во внеклеточном матриксе [15]. Исследование цитотоксичности полученных каркасов зарубежные авторы [13, 15] проводили лишь путем регистрации пролиферативной активности клеток на каркасе в процессе культивирования, что занимает не менее 7 дней. Применение МТТ-теста для оценки способности клеток пролиферировать на децеллюляризованных каркасах [14] ограничено токсичностью реагентов, что оставляет простор для разработки новых методов оценки цитотоксических свойств ацеллюлярных матриксов.

Предлагаемые в данной работе использование натриевой соли дезоксихолевой кислоты в качестве основного детергента, увеличение времени экспозиции растворов и повышение их концентрации способствуют полному удалению чужеродного клеточного материала без выраженных структурных повреждений внеклеточного матрикса. Суммарная продолжительность воздействия децеллюляризирующих агентов была снижена и составила 48 ч, что уменьшило риск развития контаминации. При окрашивании альциановым синим с последующим расчетом площади положительного окрашивания образцов нативных и децеллюляризованных легких приматов отмечены значительные количественные изменения состава внеклеточного матрикса (снижение содержания сульфатированных гликозаминогликанов после децеллюляризации), которые невозможно было установить при проведении окрашивания тех же образцов альциановым синим с проведением качественной визуальной оценки результатов. Выявленные изменения не ухудшают биосовместимость каркасов и не влияют на клеточную активность, хотя и снижают комплаенс легочной ткани после децеллюляризации. В связи с этим требуется разработка методов обогащения каркасов после децеллюляризации. ХТТ-тест, использованный авторами для оценки метаболической активности и жизнеспособности клеток на каркасах, позволил оценить цитотоксические свойства каркасов в максимально короткие сроки. Полученные матриксы не обладали токсическими свойствами и не угнетали пролиферативную и метаболическую активность клеток.

**Заключение.** Проведенные исследования по получению и изучению биосовместимости ацеллюляр-

ных матриксов легких приматов являются важным этапом на пути создания трехмерных биологических каркасов. Отсутствие цитотоксических свойств децеллюляризованных матриксов, их способность поддерживать клеточный рост и создавать надлежащее микроокружение на модели легких приматов, максимально приближенной по анатомо-морфологическим особенностям к человеку, свидетельствуют о потенциальной возможности клинического применения тканеинженерных конструкций легких.

**Финансирование исследования.** Работа выполнена в рамках комплексной НИР «Клеточные механизмы регенерации интраторакальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».

**Конфликт интересов.** Авторы не имеют конфликта интересов.

## Литература/References

1. Ignatova G.L., Zakharova I.A., Sarsenbayeva A.S., Rodionova O.V., Grebneva I.V., Drozdov I.V., Blinova E.V., Minakina O.L., Antonov V.N., Belsner M.S., Pustovalova I.A. Features of chronic bronchitis in different age groups. *International Journal of BioMedicine* 2014; 4(1): 15–18.
2. Wagner D.E., Bonvillain R.W., Jensen T., Girard E.D., Bunnell B.A., Finck C.M., Hoffman A.M., Weiss D.J. Can stem cells be used to generate new lungs? Ex vivo lung bioengineering with decellularized whole lung scaffolds. *Respirology* 2013; 18(6): 895–891, <https://doi.org/10.1111/resp.12102>.
3. Sokocevic D., Bonenfant N.R., Wagner D.E., Borg Z.D., Lathrop M.J., Lam Y.W., Deng B., Desarno M.J., Ashikaga T., Loi R., Hoffman A.M., Weiss D.J. The effect of age and emphysematous and fibrotic injury on the re-cellularization of de-cellularized lungs. *Biomaterials* 2013; 34(13): 3256–3269, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.028>.
4. Booth A.J., Hadley R., Cornett A.M., Dreffs A.A., Matthes S.A., Tsui J.L., Weiss K., Horowitz J.C., Fiore V.F., Barker T.H., Moore B.B., Martinez F.J., Niklason L.E., White E.S. Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186(9): 866–876, <https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0754oc>.
5. Bonenfant N.R., Sokocevic D., Wagner D.E., Borg Z.D., Lathrop M.J., Lam Y.W., Deng B., Desarno M.J., Ashikaga T., Loi R., Weiss D.J. The effects of storage and sterilization on decellularized and recellularized whole lung. *Biomaterials* 2013; 34(13): 3231–3245, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.031>.
6. Кувейда Е.В., Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гуменюк И.С., Гилевич И.В., Поляков И.С., Порханов В.А., Алексеенко С.Н., Маккиарини П. Опыт перфузионной рецеллюляризации биологического каркаса легких крысы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов* 2016; 18(1): 38–44. Kuevda E.V., Gubareva E.A., Sotnichenko A.S., Gumenyuk I.S., Gilevich I.V., Polyakov I.S., Porhanov V.A., Alekseenko S.N., Macchiarini P. Experience of perfusion recellularization of biological lung scaffold in rats. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs* 2016; 18(1): 38–44, <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2016-1-38-44>.

7. Wagner D.E., Bonenfant N.R., Sokocevic D., DeSarno M.J., Borg Z.D., Parsons C.S., Brooks E.M., Platz J.J., Khalpey Z.I., Hoganson D.M., Deng B., Lam Y.W., Oldinski R.A., Ashikaga T., Weiss D. Three-dimensional scaffolds of acellular human and porcine lungs for high throughput studies of lung disease and regeneration. *Biomaterials* 2014; 35(9): 2664–2679, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.078>.
8. O'Neill J.D., Anfang R., Anandappa A., Costa J., Javidfar J., Wobma H.M., Singh G., Freytes D.O., Bacchetta M.D., Sonett J.R., Vunjak-Novakovic G. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *Ann Thorac Surg* 2013; 96(3): 1046–1056, <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.04.022>.
9. Кувда Е.В., Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гилевич И.В., Гуменюк И.С., Шаркова Т.В., Карал-оглы Д.Д., Орлов С.В., Маккиарини П. Децеллюляризация легких низших приматов: оптимизация протокола. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований* 2015; 8: 244–247. Kuevda E.V., Gubareva E.A., Sotnichenko A.S., Gilevich I.V., Gumenyuk I.S., Sharkova T.V., Karal-ogly D.D., Orlov S.V., Macchiarini P. Nonhuman lung decellularization: protocol optimization. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* 2015; 8: 244–247.
10. Badylak S.F., Taylor D., Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* 2011; 13: 27–53, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124743>.
11. Кувда Е.В., Губарева Е.А., Крашенинников С.В., Григорьев Т.Е., Гуменюк И.С., Сотниченко А.С., Гилевич И.В., Карал-оглы Д.Д., Орлов С.В., Чвалун С.Н., Редько А.Н., Алексеенко С.Н., Маккиарини П. Оценка влияния процесса децеллюляризации на изменение биомеханических свойств легких у приматов. Доклады Академии наук 2016; 470(6): 724–727. Kuevda E.V., Gubareva E.A., Krashennnikov S.V., Grigoriev T.E., Gumenyuk I.S., Sotnichenko A.S., Gilevich I.V., Karal-ogly D.D., Orlov S.V., Chvalun S.N., Redko A.N., Alekseenko S.N., Macchiarini P. Evaluation of the influence of decellularization on the changes in biomechanical properties of primate lungs. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 2016; 470(1): 375–378, <https://doi.org/10.7868/s0869565216300289>.
12. Ruifrok A.C., Johnston D.A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23(4): 291–299.
13. Bonvillain R.W., Danchuk S., Sullivan D.E., Betancourt A.M., Semon J.A., Eagle M.E., Mayeux J.P., Gregory A.N., Wang G., Townley I.K., Borg Z.D., Weiss D.J., Bunnell B.A. 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(23–24): 2437–2452, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0594>.
14. Gilpin S.E., Guyette J.P., Gonzalez G., Ren X., Asara J.M., Mathisen D.J., Vacanti J.P., Ott H.C. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. *J Heart Lung Transplant* 2014; 33(3): 298–308, <https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.10.030>.
15. Nichols J.E., Niles J., Riddle M., Vargas G., Schilagard T., Ma L., Edward K., La Francesca S., Sakamoto J., Vega S., Ogadegbe M., Mlcak R., Deyo D., Woodson L., McQuitty C., Lick S., Beckles D., Melo E., Cortiella J. Production and assessment of decellularized pig and human lung scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(17–18): 2045–2062.