

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-81-87

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕРМАЛЬНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

A.S. Sotnichenko¹, I.V. Gilevich², K.I. Melkonian¹, Ya.A. Yutskevich¹, A.V. Karakulev², S.B. Bogdanov², I.M. Bykov¹, A.N. Redko¹, V.A. Porhanov², S.N. Alekseenko¹

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

² ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 имени С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Российская Федерация

Несмотря на достижения современной хирургии в лечении повреждений кожных покровов, актуальным остается поиск новых методов для более быстрого и эффективного заживления ран. Тканевая инженерия, несомненно, представляет интерес для разработки таких технологий. **Цель** данной работы состояла в определении оптимального протокола получения децеллюляризованного дермального матрикса для последующей разработки тканеинженерной кожи. **Материалы и методы.** Экспериментальным животным был 1 поросенок породы Ландрас. После предварительной обработки кожи дерматомом забирали образцы толщиной 0,3 см. В работе рассматривалось 2 протокола децеллюляризации: протокол № 1 на основе применения тритон X100 и дезоксихолата, протокол № 2 только на основе дезоксихолата. Всего циклов обработки по 2 протоколам было 5. Ацеллюлярные матриксы после обработки были исследованы следующим образом: гистологический анализ, количественное определение содержания ДНК. Далее была проведена статическая рецеллюляризация матриксов фибробластами дермы свиньи. После чего матриксы были исследованы на цитотоксичность с помощью ХТТ-теста и теста на дифференциальное окрашивание живых и погибших клеток. **Результаты.** Проведенный сравнительный анализ двух протоколов децеллюляризации дермы свиной кожи показал, что оба протокола эффективно удаляют клетки и ядерный материал, при этом сохраняется архитектура межклеточного вещества неповрежденной, так как не происходит разрушения волокнистых структур. Но при оценке биосовместимости матриксов на основе анализа жизнеспособности клеток по данным ХТТ-теста и адгезии клеток к матриксу преимущества демонстрирует матрикс, обработанный по протоколу № 1. **Заключение.** В настоящем исследовании был отмечен протокол децеллюляризации на основе тритон X100 и дезоксихолата. Полученные результаты являются первым этапом для дальнейшей разработки тканеинженерной кожи.

Ключевые слова: регенеративная медицина, кожа, децеллюляризация, тканеинженерная конструкция.

DEVELOPMENT OF METHODS FOR OBTAINING DERMAL EXTRACELLULAR MATRIX

A.S. Sotnichenko¹, I.V. Gilevich², K.I. Melkonian¹, Ya.A. Yutskevich¹, A.V. Karakulev², S.B. Bogdanov², I.M. Bykov¹, A.N. Redko¹, V.A. Porhanov², S.N. Alekseenko¹

¹ Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation

² Research Institute – S.V. Ochapovskiy Regional Clinical Hospital № 1, Ministry of Health of the Krasnodar region, Krasnodar, Russian Federation

Despite the achievements of modern surgery in the treatment of cutaneous injuries, the search for new methods for faster and more effective wound healing remains topical. Tissue engineering is undoubtedly of interest for the development of such technologies. **Aim:** to determine the optimal protocol for obtaining a decellularized dermal

Для корреспонденции: Сотниченко Александр Сергеевич. Адрес: 350063, Краснодар, ул. Седина, д. 4. Тел. (962) 85-18-237. E-mail: alex24.88@mail.ru

For correspondence: Sotnichenko Alexander Sergeevich. Address: 4, Sedin str., Krasnodar, 350063, Russian Federation. Tel. (962) 85-18-237. E-mail: alex24.88@mail.ru

matrix for the subsequent development of tissue-engineered skin. **Materials and methods.** The experimental animal was 1 pig of the Landrace breed. After skin pretreatment with a dermatome, the samples were taken of a thickness of 0.3 cm. Two decellularization protocols were examined: protocol No. 1 based on the using of Triton X-100 and deoxycholate, protocol No. 2 only based on deoxycholate. Total processing cycles for 2 protocols were 5. The acellular matrices after treatment were examined with: histological analysis, quantitative determination of DNA content. Further, static matrix recellularization of porcine dermis fibroblasts was carried out. After that, the matrices were assessed for cytotoxicity using an XTT test and a test for the differential staining of living and dead cells. **Results.** The comparative analysis of two protocols for decellularization of porcine dermis showed that both protocols effectively remove cells and nuclear material, while maintaining the architectonic of the intercellular substance intact, since fibrous structures are not destroyed. But when analysed the biocompatibility of matrices on the basis of cell viability analysis according to the XTT test and cell adhesion to the matrix, the matrix processed according to protocol No. 1 demonstrates the advantages. **Conclusion.** In this study, a decellularization protocol based on Triton X-100 and deoxycholate was noted. The results are the first stage for the further development of tissue-engineered skin.

Key words: regenerative medicine кожа, децеллюляризация, тканеинженерная конструкция.

ВВЕДЕНИЕ

Кожа является самым большим органом в организме и выполняет ряд важных функций, прежде всего барьерную, иммунную, сенсорную, обладает способностью к саморегуляции и рядом других особенностей [1]. Потеря целостности кожных покровов из-за травм или болезней может привести к острому физиологическому дисбалансу и в конечном итоге к значительной инвалидности или даже смерти [2].

Повреждения кожных покровов разнообразны и могут возникать из-за ожогов, травм или быть обусловлены трофическими нарушениями вследствие венозной гипертензии, артериальной недостаточности, сахарным диабетом и другими причинами, приводящими к изъязвлениям кожи. Ряд наследственных заболеваний, связанных с нарушением структурных белков эпидермиса или дермы, также могут вызывать развитие обширных кожных ран и хронических эрозий [3].

Как правило, при повреждении кожи происходит ряд сложных биохимических процессов, направленных на заживление раны. В поверхностных ранах, где дефекты ограничены эпидермисом или верхним дермальным слоем, необходима регенерация только эпидермиса, что приводит к быстрому заживлению и минимальному риску образования рубцов. Тем не менее в ранах, проникающих глубже дермального слоя, с отслоением кожи или подкожно-жировой клетчаткой, осложнения, такие как инфекция, развиваются чаще, и рубцы, как правило, остаются даже после полного заживления раны. Длительность процесса заживления ран в действительности имеет тенденцию варьировать у разных людей и зависит от различной степени тяжести повреждения [4].

Терапевтические вмешательства по восстановлению кожных покровов и функций кожи являются важным долгосрочным направлением как традиционной, так и трансляционной медицины, в которой в последние годы был отмечен ряд ключевых дости-

жений и клинических преимуществ [3]. Выбор подходящей стратегии заживления ран имеет решающее значение для успешного их закрытия. От данного выбора зависит скорость заживления раневой поверхности, вероятность наступления осложнений и образования рубцов. В настоящее время используются различные методы для закрытия раневых дефектов. В качестве покрытий раневых поверхностей применяют трупные аллотрансплантаты, ксенотрансплантаты, синтетические материалы. Золотым стандартом лечения большинства кожных ран остается аутодермопластика.

Благодаря интеграции инженерных дисциплин с биологическими науками в настоящее время активно развивается регенеративная медицина [5]. Рассматриваются возможности применения клеточных технологий, дополнительных биологических факторов, которые направлены на стимуляцию регенерации ткани. Проводятся экспериментальные работы по созданию тканеинженерной полноценной кожи [6]. Такие разработки интересны, и несомненно, могут оказаться полезными, особенно в тех случаях, когда имеется значительный дефицит кожных покровов и невозможно выполнить аутодермопластику.

Тканеинженерный подход к созданию искусственных органов включает в себя использование внеклеточных матриц, стволовых клеток и биологически активных веществ. Одним из методов получения матриц является децеллюляризация нативной ткани или органа. Выбор оптимального способа получения внеклеточного матрикса является одной из главных задач в тканевой инженерии. В своей работе мы проводили сравнительный анализ 2 протоколов получения ацеллюлярного дермального матрикса для последующего создания тканеинженерной кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экс-

периментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1972 г.) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), после одобрения протоколов исследования локальным этическим комитетом, в ЦНИЛ, лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины на базе Кубанского государственного медицинского университета. Забор образцов нативной дермы производили в стерильных условиях операционной при виварии. Экспериментальным животным был 1 поросенок породы Ландрас (возраст 12 недель, масса 22 кг). После предварительной обработки кожи дерматомом забирали образцы дермы толщиной 0,3 см.

Децеллюляризация дермального матрикса с последующей оценкой качества каркаса

Для децеллюляризации дермы нами были предложены 2 различных протокола воздействия. На первом этапе образцы размером $2 \times 1 \times 0,3$ см замораживали при температуре -80°C , далее следовала обработка раствором Трипсина–Версена (1:1, «Биолот», Россия) в термошейкере-инкубаторе при температуре $+37^\circ\text{C}$ в течение 18 часов. На следующем этапе следовала обработка матрикса растворами детергентов на вращающейся платформе при 170 об/мин. Для протокола № 1 было использовано чередование 1% раствора тритона X100 (Sigma-Aldrich, США) и 4% раствора дезоксихолата натрия (Sigma-Aldrich, США) в комбинации с 0,002 М Na₂-ЭДТА, по 2 часа воздействия каждый. Количество циклов обработки – 5. Обработка детергентами в протоколе № 2 состояла только из 4% раствора дезоксихолата натрия в комбинации с 0,002 М Na₂-ЭДТА в течение 4 часов, количество циклов также было равным 5. После каждого цикла воздействия матрикса промывали в деионизированной воде в течение 30 минут. Финальный этап обработки по обоим протоколам состоял из воздействия свиной панкреатической ДНКазы I (Sigma-Aldrich, США, 2000 ЕД растворили в 200 мл фосфатно-солевого буфера Ca²⁺/Mg²⁺) в течение 4 часов в термошейкере-инкубаторе при температуре $+37^\circ\text{C}$.

Полученные образцы нативной и децеллюляризированной дермы фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, дегидратировали и заключали в парафин по стандартной методике. С помощью микротомы получали срезы толщиной 4 мкм. Для общегистологической оценки препаратов проводили окраску срезов гематоксилином и эозином (Sigma-Aldrich, США). Клеточные ядра визуализировали с использованием флуорофора (4',6'-диамидино-2-фенилиндола) DAPI (Sigma-Aldrich, США). Изучение

микропрепаратов проводили на микроскопе Olympus CX 41 (Япония).

Количественное определение содержания ДНК выполняли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием набора реагентов (Dneasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Швеция) по протоколу фирмы-изготовителя.

Рецеллюляризация дермального матрикса с последующей оценкой биосовместимости с клетками *in vitro*

Для оценки биосовместимости, способности клеток к адгезии к дермальному матриксу использовали статический метод рецеллюляризации дермальными фибробластами, выделенными и культивированными из дермы свиньи. Для выделения клеток из дермы был использован стандартный ферментативный протокол на основе 0,1% раствора коллагеназы. Клетки культивировали с использованием полной питательной среды, состоящей из раствора DMEM (Gibco), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% раствора антибиотика-антимикотика (Gibco), в условиях CO₂-инкубатора. После достижения конfluence до 80% клетки были пассированы с помощью раствора Трипсина («Биолот», Россия) и продолжали культивировать до 2-го пассажа. Затем полученное количество клеток было использовано для проведения ХТТ-теста и теста на дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток. Рабочий раствор ХТТ реагента готовили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Cell proliferation assay ХТТ, AphliChem GmbH, Германия). Вначале образцы децеллюляризованных дермальных матриксов размером $0,3 \times 0,3$ см укладывали в 96-луночную планшете, затем засеивали образцы суспензией фибробластов из расчета 25 000 клеток на каркас при помощи пипетора. После 72 ч культивирования в каждую лунку добавляли 200 мкл рабочего раствора ХТТ, время инкубации составляло 4 ч. В качестве положительного контроля были взяты клетки, свободно культивируемые в планшете. Результаты оценивали при помощи многофункционального ридера FilterMax F5 (Molecular Devices, США) в стандартных условиях при длинах волн 450 нм по предустановленным протоколам фирмы – производителя прибора.

Для визуальной оценки способности матриксов поддерживать клеточный рост и их цитотоксичность проводили при статическом засеивании фибробластами децеллюляризованных каркасов дермы дифференциальное окрашивание живых и погибших клеток с использованием набора LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США) с кальцеином АМ и гомодимером этидия согласно инструкции производителя. Изучение микропрепаратов

проводили на флюоресцентном микроскопе Olympus IX 51 (Япония).

Статистический анализ

Статистическая обработка полученного материала произведена с использованием пакета программ MS Excel, v6.0, GraphPadPrism version 6.04 (источник www.graphpad.com). Результаты исследований оценены с использованием t-критерия Стьюдента. Доверительный интервал рассчитывался по таблице распределения Стьюдента. Достоверными признавались различия при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения децеллюляризации дермы нами был выбран детергент-энзиматический метод, который позволяет наиболее полным образом удалять клетки из тканей, но в то же время щадящий по отношению к белкам волокон внеклеточного матрикса. Различие в составе протоколов было продиктовано нашим желанием сократить время воздействия дезоксихолата натрия на ткани и оценить разницу в эффекте воздействия на ткани в сравнении с протоколом, в котором использован более мягкий по своему действию на внеклеточный матрикс детергент тритон X100. Вначале отработки протоколов одним из реагентов выбора на подготовительном этапе был раствор додецил сульфата натрия. Однако высокая концентрация вещества, необходимая для разрушения клеток сосочкового слоя дермы, оказывала значительное повреждающее воздействие на волокна внеклеточного матрикса. Невозможность полностью элиминировать действующий раствор из матрикса приводила к значительно худшему росту клеток на нем и к их гибели. Полученные данные заставили нас отказаться от дальнейшего применения раствора

додецил сульфата натрия, что соответствовало данной литературе [7].

Также на подготовительном этапе мы столкнулись с тем, что дерма, взятая одновременно с эпидермисом, хуже поддается децеллюляризации. Возможно, это связано со сложностью проникновения детергентов сквозь толстый эпителиальный слой и, несомненно, плотную базальную мембрану [8]. Решением возникшей сложности децеллюляризации кожи стало применение раствора Трипсина–Версена, который, по данным литературы, эффективно воздействует именно на клетки плоского эпителия, удаляя их, а также разрыхляет саму дерму, делая ее более восприимчивой к воздействию детергентов.

Окрашивание гематоксилином и эозином, проводимое нами после каждого цикла обработки детергентами, показало, что сохранные клетки и клеточные ядра в матриксе отсутствовали уже после 2-го цикла обработки в протоколе № 1 и после 1-го цикла обработки в протоколе № 2. Однако большое количество базофильно окрашенных нитей матрикса, присутствовавших в срезах, и высокое количественное содержание ДНК в тканях продиктовали необходимость увеличения количества циклов обработки до 5 в обоих случаях (рис. 1).

Окраска ядерного материала препаратов с помощью флуорофора DAPI подтвердила указанную тенденцию. В нативной дерме клеточные ядра активно флуоресцировали и были выявлены в большом количестве. В децеллюляризованных образцах обнаружили лишь незначительную аутофлуоресценцию волокон внеклеточного матрикса после проведения пятого цикла обработки (данные не представлены).

Определение остаточного содержания ДНК – важный этап оценки полученного матрикса после проведенной децеллюляризации. От наличия ДНК

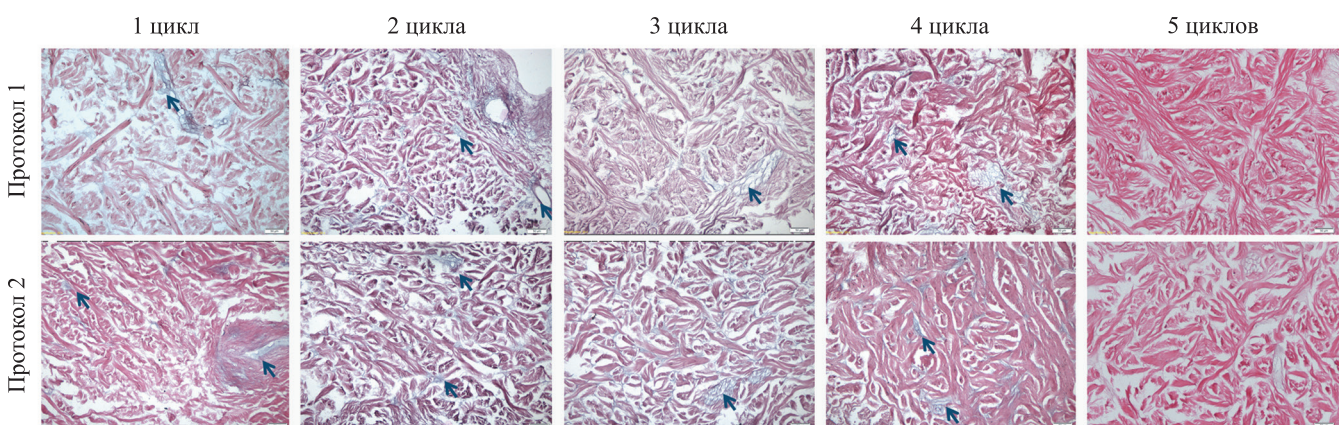


Рис. 1. Гистологический анализ. Динамика последовательных изменений структуры внеклеточного матрикса в течение децеллюляризации. Стрелками отмечены базофильно окрашенные тяжи, содержащие остаточный ядерный материал. $\times 200$

Fig. 1. Histological analysis. Dynamics of successive changes in the structure of the extracellular matrix during decellularization. Pointers indicate basophilically colored bands containing residual nuclear material. $\times 200$

зависит развитие неблагоприятных реакций со стороны организма реципиента, поскольку многие децеллюляризованные ткани получают из ксено- и аллогенных источников и есть опасения, что эта ДНК может быть включена в клетки реципиента. Количественный анализ показал, что содержание ДНК в децеллюляризованной дерме после 5-го цикла обработки снижалось до 19,8% (65,4 нг/мг ткани) и 12,1% (40,1 нг/мг ткани) по протоколу № 1 и № 2 соответственно в сравнении с количеством ДНК в нативной дерме (330,4 нг/мг ткани). Полученные результаты свидетельствовали об эффективности децеллюляризации, после которой матрикс был в значительной степени ($p = 0,0011$) очищен от ядерного материала (рис. 2).

После того как были учтены основные критерии оценки эффективности проведения децеллюляризации, предложенные в литературе [9], необходимым условием для выбора оптимального протокола явилась оценка влияния получаемого матрикса на клетки после рецеллюляризации. Важность данного этапа состоит в том, что он позволяет отобрать тот матрикс, который будет наилучшим образом способствовать адгезии и пролиферации клеток и в то же время будет наименее токсичным для тканей ввиду возможного сохранения остаточных количеств детергентов.

ХТТ-тест, проведенный после статической рецеллюляризации матриксов, выявил в обоих опытных образцах живые, метаболически активные клетки. Однако жизнеспособность клеток оказалась выше на матриксе, децеллюляризованном по протоколу

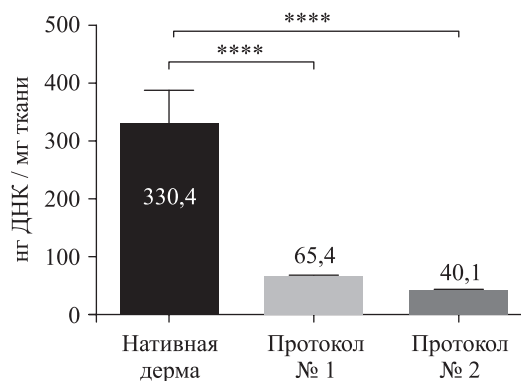


Рис. 2. Количественный анализ содержания ДНК в нативной и децеллюляризованной дерме свиньи

Fig. 2. Quantitative analysis of the DNA content in the native and decellularized porcine dermis

№ 1, в отличие от протокола № 2, где жизнеспособность была статистически ниже ($p < 0,005$).

При сравнении образцов из опытных и контрольной групп обнаружено, что результаты ХТТ-теста в лунках, засеянных только клетками, отличаются от опытных и значительно их превосходят ($p < 0,001$), что объясняется условиями эксперимента и доказанной способностью клеток легко прикрепляться к пластику. В целом при сравнении всех групп по результатам ХТТ-теста было установлено, что полученные матриксы по протоколам № 1 и № 2, засеянные клетками, являются биосовместимыми и не являются цитотоксичными (рис. 3).

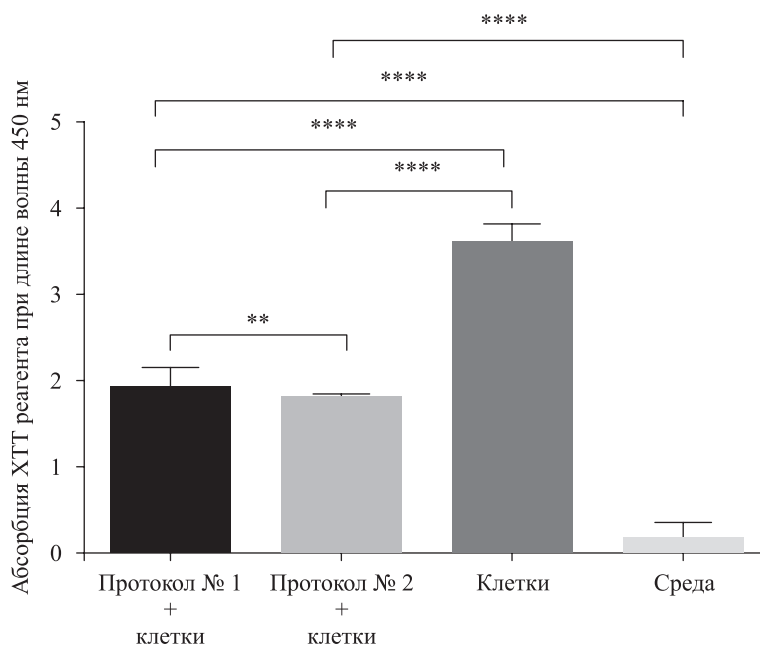


Рис. 3. Результаты цитотоксических тестов биологических каркасов дермы свиньи. Оптическая плотность при проведении ХТТ-теста

Fig. 3. Results of cytotoxic tests of biological matrix of porcine dermis. Optical density during the XTT test

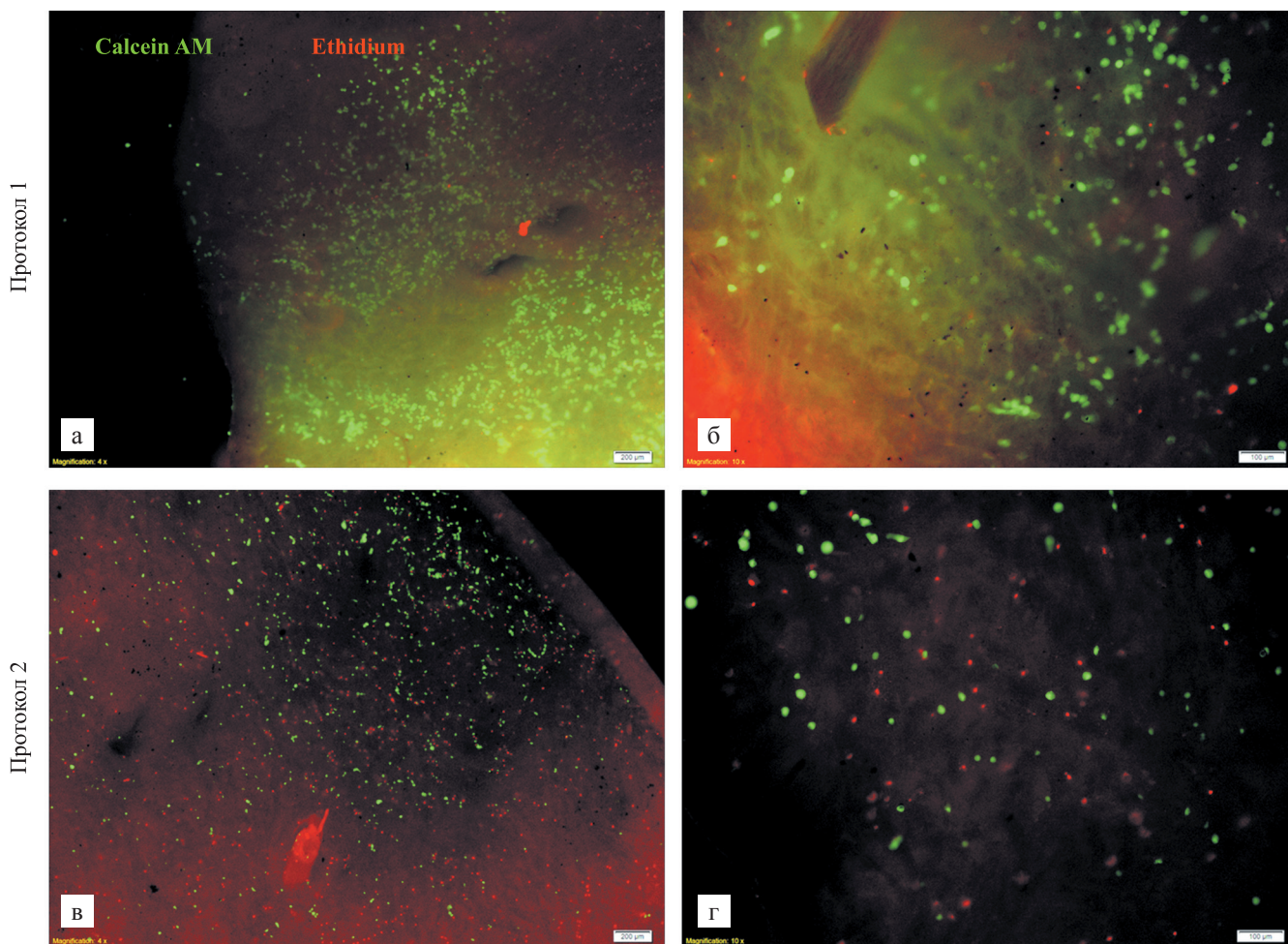


Рис. 4. Оценка жизнеспособности фибробластов, заселенных на децеллюляризованные каркасы дермы свиньи. Живые клетки – положительное окрашивание кальцеином АМ (зеленые), погибшие – положительное окрашивание гомодимером этидия (красные). а, в – $\times 40$; б, г – $\times 100$

Fig. 4. Evaluation of the viability of fibroblasts settled on decellularized matrix of porcine dermis. Living cells – positive calcein AM (green) staining, dead ones – positive ethidium homodimer (red) staining. а, в – $\times 40$; б, г – $\times 100$

Дифференциальное выявление живых (флюоресценция с кальцеином) и мертвых (флюоресценция с гомодимером этидия) клеток, основанное на активном транспорте кальцеина внутрь живых клеток и пассивном транспорте гомодимера этидия внутрь мертвых клеток, позволило дополнительно визуализировать живые клетки во время статичной рецеллюляризации каркаса (рис. 4). Было установлено, что культивированные клетки сохраняли свою жизнеспособность на обоих полученных матриксах в течение 72 часов. Показано, что $80 \pm 10\%$ клеток оставались жизнеспособными на матриксе № 1 и $55 \pm 10\%$ на матриксе № 2. Также обращало на себя внимание формирование монослоя из живых клеток при культивировании на матриксе, полученном по протоколу № 1. Данные результаты показали не только способность клеток к адгезии, но и низкую цитотоксичность получаемых каркасов. Разницу в результатах мы связываем с двукратным различием по времени

обработки раствором дезоксихолата натрия, и как следствие, меньшим его остаточным содержанием в матриксе при выполнении протокола № 1.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ двух протоколов децеллюляризации дермы свиной кожи показал, что оба протокола эффективно удаляют клетки и ядерный материал, при этом сохраняется архитектура межклеточного вещества неповрежденной, так как не происходит разрушения волокнистых структур. Но при оценке биосовместимости матриксов на основе анализа жизнеспособности клеток и их адгезии к матриксу преимущества демонстрирует матрикс, обработанный по протоколу № 1, что заставило нас отметить более перспективным для последующего изучения именно протокол на основе применения Тритон X100 и дезоксихолата, считая, что Тритон X100 является более мягким детергентом для децеллюляризации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск оптимального протокола децеллюляризации ткани является основополагающим в тканевой инженерии, что продиктовано прежде всего получением такого матрикса, который бы максимально соответствовал нативному внеклеточному матриксу, был биосовместим на всех уровнях и активно функционален. В настоящей работе определение способа децеллюляризации и начальных характеристик полученного матрикса является первым этапом для дальнейшей разработки тканеинженерной кожи.

Работа выполнена при поддержке комплексной НИР «Клеточные механизмы регенерации интра-торакальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering – *in vivo* and *in vitro* applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2011; 63 (4–5): 352–366.
2. Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007; 127 (5): 1018–1029. doi: 10.1038/sj.jid.5700715.
3. Petrof G, Abdul-Wahab A, McGrath JA. Cell therapy in dermatology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014; 4 (6): a015156.
4. You HJ, Han SK. Cell therapy for wound healing. *Journal of Korean medical science*, 2014; 29 (3): 311–319.
5. Wu SC, Marston W, Armstrong DG. Wound care: the role of advanced wound healing technologies. *Journal of vascular surgery* 2010; 52 (3): 59S–66S.
6. Sha H, Fu X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of Controlled Release* 2010; 142 (2): 149–159.
7. Reing JE, Brown BN, Daly KA, Freund JM, Gilbert TW, Hsiong SX et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010; 31 (33): 8626–8633.
8. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004; 25 (13): 2679–2686.
9. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32 (12): 3233–3243.

*Статья поступила в редакцию 28.06.2019 г.
The article was submitted to the journal on 28.06.2019*