

Параметры ацеллюлярного дермального матрикса, полученного различными детергентно-ферментными методами

Аннотация

С целью получения ацеллюлярного дермального матрикса (АДМ) для реконструктивной хирургии образцы кожи крысы и человека обрабатывали додецилсульфатом натрия (ДС), дезоксихолатом натрия (ДХ), сапонином и ДНК-азой. Смесь ДС и ДХ эффективно удалила остатки клеток, но АДМ обладал цитотоксическими свойствами. После обработки 2%-ным ДХ эффект цитотоксичности отсутствовал, полученный материал содержал от 27 до 202 нг/мг сухого веса ДНК и от 0,07 до 2,6 % жира в зависимости от источника использованных образцов.

Введение

Материалы на основе экстраклеточного матрикса, используемые для реконструктивной хирургии, получают из органов животных и человека путем их децеллюляризации – удаления клеток при помощи комплекса химических и физических методов. АДМ должен иметь хорошую сохранность фибриллярных структур, не быть цитотоксичными, содержать минимальное количество остатков клеточных компонентов, контролируемых, как правило, по уровню ДНК [1]-[3]. АДМ кожи получают, как правило, детергентно-ферментативной обработкой. Такой материал обладает хорошими биомеханическими свойствами, но не лишен недостатков, к числу которых относится развитие хронического воспалительного процесса в зоне имплантации [4], [5]. Причинами этого явления могут быть как недостаточное удаление иммуногенных клеточных компонентов, так и химическая модификация материала в ходе децеллюляризации.

В качестве детергентов наиболее часто применяют додецилсульфат натрия (ДС), тритон X-100 и дезоксихолат натрия (ДХ), который, помимо эмульгирования нейтрального жира, активно разрушает клеточные мембраны. Практика показала, что в отношении удаления остатков клеток наибольшую эффективность проявляет ДС. Однако этот реагент обладает нежелательным качеством: связываясь с белково-липидными комплексами, он остается в экстраклеточном матриксе; в литературе неоднократно поднимался вопрос о его цитотоксичности. Есть сообщения о том, что АДМ, полученные с использованием ДС, тормозят пролиферацию клеток *in vitro* [6]; снижают их метаболическую активность [7] и жизнеспособность [8]. С другой стороны, в ряде исследований показано отсутствие цитотоксичности после обработки ДС [9]. Расхождения могут быть обусловлены как различиями в применяемых концентрациях, методах оценки цитотоксичности и используемых клеточных линиях, так и разными свойствами исходных биоматериалов, в частности различным содержанием клеточных и экстраклеточных белков и липидов, их растворимостью и силой связывания с детергентом.

Целью проведенного исследования явилась разработка протокола децеллюляризации кожи крысы и человека на основе ДС и ДХ для получения биоматрицы, отвечающей требованиям к ацеллюлярным материалам. В качестве исходных материалов были использованы полнослойные образцы кожи. У крыс крайне трудно полностью отделить сетчатый слой дермы от гиподермы, поэтому мы сочли необходимым контролировать процесс децеллюляризации не только по ДНК, но и по количеству остаточного жира. Наличие сальных желез в коже человека также делало необходимым контроль остаточного жира.

Материалы и методы

У крыс кожу забирали в области спины, соблюдая все этические требования, предъявляемые к работе с экспериментальными животными (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.; Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). Образцы донорской кожи человека забирали с живота и наружных поверхностей плеча при выполнении операции аутодермопластики после получения добровольного информированного согласия пациента. Биоматериал промывали разведенным 1:10 фосфатным буфером pH 7,4; трехкратно замораживали при -30 °C и размораживали при комнатной температуре. Для обработки ткани использовали додецилсульфат натрия – «Panreac», Испания; дезоксихолат натрия – «AppliChem», ФРГ; сапонин и ДНК-азу – «Merck», ФРГ; NaN₃ – «Aldrich», ФРГ; Трис – «Amresco», США; Na₂HPO₄, KH₂PO₄, ЭДТА, глицерин, этанол, NaCl – РФ.

Децеллюляризацию полученных биоматериалов [11] проводили в четыре этапа (табл. 1), выполняя дезэпителизацию (I); разрушение клеточных мембран с удалением остатков клеток и растворимых белков ткани по двум протоколам, которые различались составом детергентов (II); делипидизацию (III); удаление остаточной ДНК (IV). После окончания дезэпителизации образцы промывали деионизированной водой и разрезали на фрагменты площадью 1,5...2 см². Остатки детергентов после второго этапа тщательно удаляли деионизированной водой и фосфатно-солевым раствором (ФСР: 1 часть фосфат-

Таблица 1

Схема обработки биоматериала

| Этап | Процедуры | Режим |
|------|---|--|
| I | Гипертонический раствор: 605 мг основания Трис, 4 г NaCl и 202,5 мг ЭДТА в 100 мл ФСР | 8 ч; смена раствора через 4 ч |
| II | Протокол 1 | 48 ч (крысы), 60 ч (люди); смена каждые 12 ч |
| | 2%-ный ДХ | |
| II | Протокол 2 | 48 ч (крысы), 60 ч (люди); смена каждые 12 ч |
| | 1%-ный ДХ + 1%-ный ДС | |
| III | 1. Деионизированная вода. | 3 смены по 12 ч. |
| | 2. 20%-ный глицерин, 0,05%-ный NaN ₃ , 25 мМ ЭДТА в 0,9%-ном NaCl. | 2 смены по 12 ч. |
| | 3. Деионизированная вода. | 12 ч. |
| | 4. 1%-ный раствор сапонины с 0,05%-ным NaN ₃ . | 2 смены по 12 ч. |
| | 5. Деионизированная вода. | 12 ч. |
| | 6. 20%-ный глицерин, 25 мМ ЭДТА в 0,9%-ном NaCl | 2 смены по 12 ч |
| IV | Обработка ДНК-азой: 20 ед/мл ФСР, содержащего 10 мМ MgCl ₂ | 3 смены раствора через 3,3 и 4 ч при 37 °C |

ного буфера + 9 частей 0,9%-ного NaCl) в течение трех суток. Делипидизацию выполняли по схеме P. Akhyari et al. [10] с увеличением продолжительности всех процедур относительно оригинального метода. После удаления жира материал промывали деионизированной водой до прекращения пенообразования. После обработки ДНК-азой материал промывали ФСП и деионизированной водой в течение суток со сменной растворов через 1, 3, 8, 12 ч. Все процедуры, кроме инкубирования с ДНК-азой, проводили на орбитальном шейкере PSU-20i, «Biosan», Латвия. АДМ замораживали в деионизированной воде и хранили при температуре -20°C . Для работы с клеточными культурами материал стерилизовали 70-градусным этанолом.

Для гистологических исследований материал фиксировали в 12%-ном формалине, обезжовивали, заливали в парафин. Срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону, крезильовым фиолетовым. Содержание в АДМ жира оценивали унифицированным методом определения триглицеридов по глицерину [12]. Количество ДНК определяли с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33258 по протоколу DNA Quantitation Kit, «Sigma-Aldrich», кат. № DNAQF на планшетном ридере Infinite 200 PRO «Tecan».

Определение цитотоксичности АДМ осуществляли при помощи морфологических методов и ЛДГ-теста. Для проведения ЛДГ-теста дермальные фибробласты высеивали в лунки 12-луночных планшетов с плоским дном квалификации «для культур клеток» («Orange Scientific», Бельгия). Посевная доза $- 2 \times 10^4$ клеток/см². Культивировали клетки при 37°C , постоянной влажности и 5%-ным CO₂ в CO₂-инкубаторе («Sanyo – Incubator», «МСО-18 А», Япония) с использованием полной ростовой среды (среда 199 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки – ООО «Биолот», Россия) до достижения конfluence. После этого образцы материалов помещали на монослой и продолжали культивирование в течение 48 ч. ЛДГ-тест выполняли по схеме, приведенной в [13].

Для определения цитотоксичности морфологическим методом образцы размером 4×4 мм засеивали дермальными фибробластами человека из расчета 3×10^5 клеток на образец, выдерживали во влажной камере при 37°C и 5%-ном CO₂ в течение 2 ч, после чего переносили в 24-луночные планшеты. Лунки заполняли полной ростовой средой, планшеты помещали в CO₂-инкубатор на 7 суток. По окончании инкубации образцы фиксировали в 12%-ном формалине и обрабатывали по схеме для гистологических исследований.

Результаты

АДМ человека и крысы имели структуру, характерную для матрикса дермы данных видов. Эпидермис, клетки желез и их фрагменты не были видны, пространство между тонкими коллагеновыми и эластиновыми волокнами было оптически пустым. Характерной чертой АДМ крысы по сравнению с АДМ человека было более плотное переплетение коллагеновых волокон в сосочковом слое (рис. 1). Визуальной разницы при обработке образцов кожи по разным протоколам при гистологическом исследовании не наблюдалось.

Результаты ЛДГ-теста показали, что материалы, обработанные 2%-ным ДХ, не проявляют токсических свойств. Аналогичные данные были получены для АДМ из кожи крысы. Материалы, обработанные смесью 1%-го ДХ и 1%-го ДС, дали выраженный цитотоксический эффект: после внесения их в культуру индекс повреждения клеток резко увеличился (табл. 2).

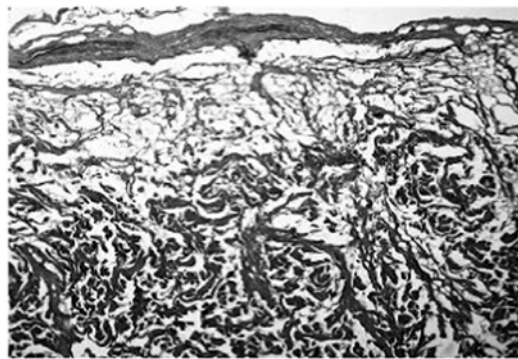


Рис. 1. АДМ крысы: обработка 1%-ный ДХ + 1%-ный ДС; окраска – гематоксилин и эозин. Ув. 10

При культивировании фибробластов *in vitro* на децеллюляризованных 2%-ных ДХ образцах кожи человека и крысы клетки располагались как в поверхностных, так и в более глубоких слоях материалов. Они имели веретеновидную или звездчатую форму, в ядрах отчетливо визуализировали гетеро- и эухроматин, крупные ядрышки. В цитоплазме и ядрах была видна мелкая зернистость, обусловленная РНК, которая окрашивалась крезильовым фиолетовым. Фибробласты, посаженные на АДМ, изготовленные по второму протоколу, лежали на поверхности; в глубоких слоях они встречались редко и были мельче. Ядра выглядели пузырьвидными, зернистость цитоплазмы не была выражена (рис. 2а, б), что указывало на снижение метаболической активности клеток.

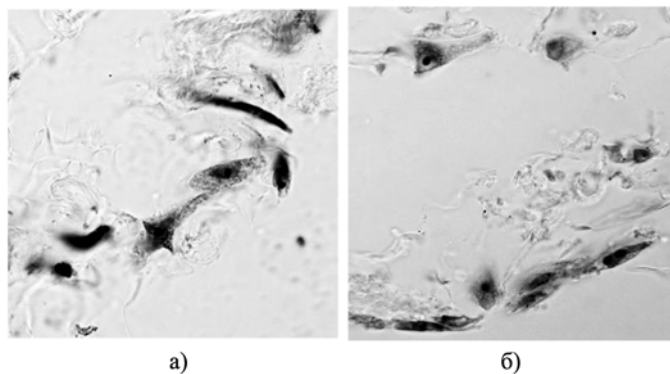


Рис. 2. Фибробласты в поверхностных слоях АДМ крысы, полученного обработкой: а) 2%-ным ДХ; б) 1%-ным ДХ + 1%-ным ДС. Окраска крезильовым фиолетовым. Ув. 100, МИ

Содержание жира в нативных образцах кожи половозрелых крыс варьирует в широких пределах, поэтому мы отдельно анализировали эффективность делипидизации в образцах с высоким (28,9%), средним (13,2%) и низким (2,6%) содержанием жира (табл. 3).

Обработка 2%-ным ДХ снижала содержание жира в 4..6 раз в образцах кожи крысы и почти в 18 раз в образцах кожи человека. Снижение показателя в ходе децеллюляризации кожи крысы смесью ДХ и ДС крыс оказалось очень небольшим – с 28,9 до 14,9%. Для уточнения результатов мы определили содержание жира в этом материале непосредственно после II этапа перед делипидизацией. Было установлено, что II этап децеллюляризации смесью детергентов обеспечивал более чем

Таблица 2

Результаты ЛДГ-теста

| Показатели | АДМ человека: обработка 2%-ным ДХ | | АДМ крысы: обработка 1%-ным ДХ + 1%-ным ДС | |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|--|------------------------------|
| | Клетки (контроль) | Клетки + образец | Клетки (контроль) | Клетки + образец |
| ЛДГ в клетках, нМ НАДН ₂ /мин | 4,67 ± 1,37 (n = 6) | 5,30 ± 1,10 (n = 6) | 6,55 ± 1,02 (n = 6) | 2,55 ± 0,47 (n = 6) |
| ЛДГ в среде, нМ НАДН ₂ /мин | 1,41 ± 1,00 (n = 6) | 2,12 ± 1,06 (n = 6) | 0,77 ± 0,45 (n = 6) | 4,76 ± 0,61 (n = 6) |
| Индекс повреждения, % | 23,6 ± 17,3 (n = 6) | 26,3 ± 13,2 (n = 6), p > 0,05 | 9,8 ± 6,3 (n = 6) | 64,8 ± 6,3 (n = 6), p < 0,05 |

десятикратное уменьшение содержания жира (до 2,7 %); таким образом, показатель 14,9% является артефактом. Известно, что ДС образует комплексы с низшими спиртами [14] и, по-видимому, не полностью удаляется из материала при промывке и химически связывается с глицерином, входящим в состав смесей протокола делипидизации. Это приводит к завышению показателей при определении жира методом, основанным на измерении образующегося в ходе гидролиза липидов глицерина.

Таблица 3

Содержание жира и ДНК в нативной коже и АДМ крысы и человека

| Материал | Обработка | Содержание жира, % на сухой вес | Содержание ДНК, нг/мг сухого веса |
|---------------|------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Кожа крысы | Нативная | 2,6 | 8152 |
| | Протокол 1 | 0,67 | 202 |
| Кожа крысы | Нативная | 13,2 | 2790 |
| | Протокол 1 | 2,3 | 199 |
| Кожа крысы | Нативная | 28,9 | 7960 |
| | Протокол 2 | 14,9 (2,7) | 38 |
| Кожа человека | Нативная | 1,29 | 5004 |
| | Протокол 1 | 0,07 | 27 |

Примечание – В скобках указано содержание жира в образце перед делипидизацией.

В процессе децеллюляризации 2%-ным ДХ происходило падение содержания ДНК – в АДМ крысы до 200 нг/мг сухого веса, в более рыхлом матрикссе кожи человека – до 27 нг/мг. Обработка кожи крысы по второму протоколу оказалась более эффективной, чем по первому: остаточное содержание ДНК составило 38 нг/мг сухого веса. Общепринятым пороговым значением, гарантирующим отсутствие иммуногенности ацеллюлярных материалов, является показатель в 50 нг/мг [1]. Однако установлено, что при аллогенной имплантации биоматериалы с содержанием ДНК ниже 450 нг/мг не вызывают иммунной реакции и могут применяться для стимуляции регенераторных процессов [15].

Заключение

Проведенные исследования показали, что обработка кожи крысы гипертоническим раствором, смесью 1%-ный ДХ + 1%-ный ДС с последующей обработкой ДНК-азой эффективно удаляет основные клеточные компоненты при хорошей сохранности фибриллярных структур матрикса. Однако полученный этим способом АДМ в экспериментах *in vitro* снизил жизнеспособность культивируемых клеток, что подтверждает вывод ряда исследователей о цитотоксичности материалов, изготовленных с применением ДС. Отрицательным качеством данного реагента является также его неполное удаление в ходе промывки и способность связываться с реагентами процесса делипидизации, что мешает контролировать остаточное содержание жира.

Обработка материала 2%-ным ДХ позволяет получить из кожи крысы нетоксичный материал с низким содержанием жира, но более высоким содержанием ДНК, а из кожи человека – АДМ с незначительным количеством жира и менее 50 нг/мг ДНК. Теоретически такие материалы могут быть пригодны для имплантации, но окончательный вывод об этом может быть сделан только после оценки их биосовместимости в экспериментах *in vivo*.

Список литературы:

1. *Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F.* An overview of tissue and whole organ decellularization processes // *Biomaterials*. 2011. Vol. 32 (12). PP. 3233-3243.

2. *Snyder D., Sullivan N., Schoelles K.* Skin substitutes for treating chronic wounds. Technology Assessment Report // Prepared by the ECRI Institute Evidence-based. Practice Center (EPC). 2012. N.HHSA 290-2007-10063.

3. *Гильмутдинова И.Р., Волова Л.Т., Болтовская В.В., Нефедова И.Ф., Рахматуллин Р.Р.* Исследование эффективности применения биопластического материала «Гиаматрикс» при ожогах 3Б степени в эксперименте // *Морфологические ведомости*. 2013. № 3. С. 28-31.

4. *Badylak S.F., Thomas W.G.* Immune response to biologic scaffold materials // *Seminars in Immunology*. 2008. Vol. 20. PP. 109-116.

5. *Bryan N., Ashwin H., Smart N.J. et al.* Characterisation and comparison of the host response of 6 tissue-based surgical implants in a subcutaneous *in vivo* rat model // *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 2015. Vol. 13 (1). PP. 35-42.

6. *Reing J.E., Browna B.N., Daly K.A. et al.* The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31 (33). PP. 8626-8633.

7. *Syed O., Walters N.J., Day R.M. et al.* Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering // *Acta Biomaterialia*. 2014. Vol. 12. PP. 5042-5053.

8. *Rieder E., Kasimir M.T., Silberhumer G. et al.* Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2015. Vol. 149 (5). P. 1469.

9. *Youngstrom D.W., Barrett J.G., Jose R.R., Kaplan D.L.* Functional characterization of detergent-decellularized equine tendon extracellular matrix for tissue engineering applications // *PLoS One*. 2013. Vol. 8 (5). e 64151.

10. *Akhyari P., Aubin H., Gwamnesia P., Barth M. et al.* The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: A comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extra-cellular matrix qualities // *Tissue Eng. Part C. Methods*. 2011. Vol. 17. PP. 915-926.

11. *Kumar N., Gangwar A.K., Sharma A.K. et al.* Extraction techniques for the decellularization of rat dermal constructs // *Trends Biomater. Artif. Organs*. 2013. Vol. 27 (3). PP. 102-107.

12. *Карпищенко А.И.* Медицинские лабораторные технологии. Справочник в 2-х томах. Т. 2. – СПб.: Интермедика, 1999. С. 92-93.

13. *Lopez E., Figueroa S., Oset-Gasque M.J., Gonzalez M.P.* Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced by cadmium incortical neurons in culture // *British Journal of Pharmacology*. 2003. Vol. 138. PP. 901-911.

14. *Макарова Р.А., Хилько С.Л., Рыбаченко В.И.* Теоретическое моделирование комплексов додецилсульфата натрия и додеканола с низшими спиртами // *Хімія і хім. технологія*. 2010. Вип. 14 (162). С. 8-12.

15. *Zuo H., Peng D., Zheng B., Liu X. et al.* Regeneration of mature dermis by transplanted particulate acellular dermal matrix in a rat model of skin defect wound // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012. Vol. 23 (12). PP. 2933-2944.

Наталья Николаевна Сарбаева,
канд. биолог. наук, ведущий научный сотрудник,
Марина Николаевна Милякова,
канд. биолог. наук, ведущий научный сотрудник,
Виктория Викторовна Россинская,
канд. мед. наук, доцент, ведущий научный сотрудник,
Ольга Витальевна Грибкова,
канд. биолог. наук, ст. научный сотрудник,
Дмитрий Александрович Долгушкин,
канд. мед. наук, ст. научный сотрудник,
ИЭМБ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, г. Самара,
e-mail: sarbaeva@gmail.com