

УДК 616.5-001.17-089+576.5+616-089.844+57.085.21+547.96+577.11
DOI: 10.56871/RBR.2023.66.21.002

СРАВНЕНИЕ МЕТОДИК ПОЛУЧЕНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА

© Илья Александрович Барсук¹, Арина Александровна Кокорина^{1, 2}, Николай Викторович Белый¹, Семен Сергеевич Дебенюк¹, Николай Сергеевич Деданишвили², Руслан Иванович Глушаков^{1, 2}

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова. 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6, литера Ж

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

Контактная информация: Илья Александрович Барсук — адъюнкт научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра. E-mail: barsuk20220@gmail.com ORCID ID: 0000-0002-3728-9966

Для цитирования: Барсук И.А., Кокорина А.А., Белый Н.В., Дебенюк С.С., Деданишвили Н.С., Глушаков Р.И. Сравнение методик получения ацеллюлярного дермального матрикса // Российские биомедицинские исследования. 2023. Т. 8. № 3. С. 12–17. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.66.21.002>

Поступила: 13.06.2023

Одобрена: 04.07.2023

Принята к печати: 21.09.2023

Резюме. Развивающиеся технологии тканевой инженерии, несомненно, представляют интерес для разработки материала для закрытия дефектов кожных покровов. Одним из перспективных направлений является децеллюляризация аллогенных тканей для временного закрытия дефектов кожных покровов, насыщения децеллюляризированной ткани аутологичными клетками и/или создания гибридных конструкций. Цель данной работы состояла в сравнении методик получения децеллюляризованного дермального матрикса и определении оптимального протокола для последующей разработки тканеинженерной кожи. Для достижения цели была проведена оценка трех различных методов получения ацеллюлярных дермальных матриксов путем децеллюляризации кожи. В результате сравнительного анализа было определено, что все три протокола децеллюляризации кожи позволяют получить продукт с заданными свойствами: отсутствие клеточного и ядерного материала. Однако использование для децеллюляризации различных детергентов приводит к некоторым структурным особенностям полученного материала. Значимость различий в структурных характеристиках полученных матриксов должна быть оценена в дальнейших работах с точки зрения стимуляции миграции и пролиферации клеток.

Ключевые слова: ацеллюлярный дермальный матрикс; децеллюляризация; ожоговая травма; коллаген; регенеративная медицина.

COMPARISON OF THREE DIFFERENT METHODS FOR PROCESSING ACELLULAR DERMAL MATRIX

© Ilya A. Barsuk¹, Arina A. Kokorina^{1, 2}, Nikolai V. Belyi¹, Semyon S. Debenok¹, Nikolay S. Dedanishvili², Ruslan I. Glushakov^{1, 2}

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov. Akademician Lebedeva st., 6, lit. G, Saint Petersburg, Russian Federation, 194044

² Saint Petersburg State Pediatric Medical University. Lithuania 2, Saint Petersburg, Russian Federation, 194100

Contact information: Ilya A. Barsuk — Associate of the Research Department (Biomedical Research) of the Research Center. E-mail: barsuk20220@gmail.com ORCID ID: 0000-0002-3728-9966

For citation: Barsuk IA, Kokorina AA, Belyi NV, Debenok SS, Dedanishvili NS, Glushakov RI. Comparison of three different methods for processing acellular dermal matrix // Russian biomedical research (St. Petersburg). 2023; 8(3): 12-17. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2023.66.21.002>

Received: 13.06.2023

Revised: 04.07.2023

Accepted: 21.09.2023

Abstract. Tissue engineering is an inter-related and a multi-disciplinary field that blend of biology and engineering efforts that attempt to address clinical problem of skin damage by many reason including burn, trauma etc. Decellularization of allogeneic tissues with subsequent combined of the decellularized tissue with autologous cells and/or the processed of

hybrid structures plays a pivotal role in current tissue engineering approaches for temporary or constant closure of skin defects. The purpose of this study was to compare methods for processing a decellularized dermal matrix and to determine the optimal protocol for obtaining a decellularized dermal matrix scaffold. As a result of a comparative analysis, it was determined that all three skin decellularization protocols make it possible to obtain a product with desired properties by the absence of cellular and nuclear material. However, the use of various detergents for decellularization leads to some structural features of the resulting material. The significance of differences in the structural characteristics of the obtained matrices should be evaluated in future studies in terms of stimulation of cell migration and proliferation.

Key words: acellular dermal matrix; decellularization; burn injury; collagen; regenerative medicine.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время крайне актуальной задачей является поиск новых оптимальных средств хирургического лечения поражений кожных покровов различного генеза [5, 7]. При этом необходимо добиться максимально возможного сочетания лечебных свойств, обеспечивающих улучшение состояния пациента и повышение качества последующей жизни, удобства применения в рутинной клинической практике, способствующего широкому внедрению методики, а также возможности относительно простого производства большого объема медицинских изделий, что обеспечит экономическую целесообразность применения их по сравнению с другими возможными вариантами [2]. Одним из направлений действий по выполнению данной задачи может быть создание изделий медицинского назначения с использованием биомедицинских технологий. Вариантом такого многофункционального изделия может быть продукт обработки тканей с сохранением ряда необходимых в клинике свойств: ацеллюлярный дермальный матрикс (АДМ), полученный путем детергентной децеллюляризации. Применение данного объекта представляется весьма перспективным направлением в лечении глубоких повреждений кожи, в том числе ожогов. Основными преимуществами данного биологического материала являются состав и структурная организация получаемого продукта, соответствующие собственной дерме пациента, позволяющие использовать его как временное биологическое покрытие, способствующее миграции клеток пациента и регенерации функционально состоятельного кожного покрова, при этом эффективно выполняющее функции раневой повязки. После полного цикла обработки в АДМ, полученном из донорской кожи, отсутствуют иммуногенные факторы, которые обуславливаются клеточными структурами и могут приводить к отторжению донорского материала. В то же время сохранены нативная структура и состав внеклеточного матрикса дермы [3]. Данный продукт может рассматриваться как самостоятельное медицинское изделие, так и в качестве этапа для дальнейшей разработки тканеинженерного аналога кожи. На данный момент накоплен довольно большой практический опыт по обработке кожи с целью децеллюляризации и определен обширный спектр реагентной базы для этих задач, а также методов оценки полученного результата [4]. Кроме того, совершенный метод, утвержденный в клинических рекомендациях и повсеместно применяемый, отсутствует. Также на данный момент расширение спектра методик и их технологическая отработка особенно актуальны в современных условиях, в которых возможны логистические проблемы с наличием различных реактивов.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить оптимальный метод децеллюляризации кожи на основании сравнительного анализа полученных разными методами ацеллюлярных дермальных матриксов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участок кожного покрова из абдоминальной области был получен в ходе выполнения косметологического оперативного вмешательства (абдоминопластика) у пациентки 37 лет и доставлен в научно-исследовательский отдел медико-биологических исследований НИЦ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ для проведения экспериментальной работы. Без нарушения условий стерильности был механически удален слой жировой клетчатки при помощи хирургического инструмента, а полученный пласт кожи разделен на 9 равных частей, которые были обильно промыты стерильной дистиллированной водой. Были сформированы 3 группы образцов (по 3 в каждой группе). Площадь каждого образца составила $\approx 7,78 \text{ см}^2$. Далее пласты кожи были помещены в низкотемпературный холодильник для хранения при температуре -80°C сроком на одни сутки (Angelantoni Life Science Platinum 340 V, Италия). Оттаивание образцов во всех случаях происходило при комнатной температуре в течение 4–6 часов.

Далее была проведена децеллюляризация с использованием трех различных протоколов, приведенных в таблице 1.

Для проведения децеллюляризации каждый образец помещали в стеклянную емкость с раствором соответствующих детергентов в объеме 200 мл и подвергали перемешиванию на орбитальном шейкере со скоростью 200 об./мин при температуре 37°C . Смену растворов производили в соответствии с протоколами (табл. 1). После каждого этапа детергентов производилась тщательная промывка образцов стерильной дистиллированной водой при тех же условиях.

В соответствии с протоколом № 1 образцы после оттаивания были сперва помещены в раствор Версена (Биолот, РФ), где находились 16 часов. Следующим этапом на образцы воздействовали 0,5% раствором додецилсульфата натрия (SDS, ЛенРеактив, РФ) в течение 48 часов. При этом каждые 12 часов производили смену раствора на свежий.

Протокол № 2 повторял способ № 1 кроме того, что вместо раствора Версена использовали 3% раствор Tween 20 (PanReac, Испания).

Таблица 1

Этапность технологий получения децеллюляризированного дермального матрикса тремя разными методами

№ этапа обработки	Протокол 1	Протокол 2	Протокол 3
1	Замораживание–оттаивание	Замораживание–оттаивание	Замораживание–оттаивание
2	Раствор Версена (16 часов)	3% Tween 20 (16 часов)	1,8 M NaCl (3 часа)
3	Промывка стерильной дистиллированной водой (15 минут)	Промывка стерильной дистиллированной водой (15 минут)	Промывка стерильной дистиллированной водой (15 минут)
4	0,5% SDS (24 часа, 2 смены растворов). <i>Гистологическое исследование</i> 0,5% SDS (24 часа, 2 смены растворов)	0,5% SDS (48 часов, 4 смены растворов)	3% Tween 20 (16 часов)
5	Промывочный раствор <i>Гистологическое исследование</i>	Промывочный раствор <i>Гистологическое исследование</i>	Промывка стерильной дистиллированной водой (15 минут)
6			0,5% SDS (48 часов, 4 смены растворов)
7			Промывочный раствор. <i>Гистологическое исследование</i>

Протокол № 3 отличался от предыдущего лишь добавлением дополнительного этапа после оттаивания участков кожи — 3-часовой обработки 1,8 M NaCl (ЛенРеактив, РФ).

После всех этапов детергентной обработки образцы тщательно промывали фосфатно-солевым буфером (Биолот, РФ). В течение всего проведения обработки отмечали внешний вид образцов. Далее, по завершению децеллюляризации, выполняли гистологическое исследование центральной и краевой областей каждого образца. При выполнении протокола № 1 гистологическое исследование проведено дважды (табл. 1). Материал фиксировали в 10% формалине, дегидратировали и заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 2–3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону (Биовитрум, РФ), а также тропным к нуклеиновым кислотам флуоресцентным красителем DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол).

Исследование не противоречило принципам Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы научных и медицинских исследований с участием человека». После-

операционный материал (кожный лоскут) был передан с одобрения пациентки после подписания письменного добровольного информированного согласия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При выполнении протокола № 1 отделение слоя эпидермиса обнаруживалось лишь на этапе обработки SDS и завершалось по окончании протокола. Децеллюляризированная ткань при этом была довольно пластичной и податливой, гладкой со стороны эпидермиса, но заметно волокнистой с обратной стороны.

В середине протокола (4-й этап, табл. 1) наблюдали мозаично расположенные по всей поверхности материала остатки эпидермального слоя кожи. При гистологическом исследовании также визуализировали клеточные структуры в центральной области образцов (рис. 1). По окончании протокола ядер и других элементов клеток выявлено не было (рис. 2).

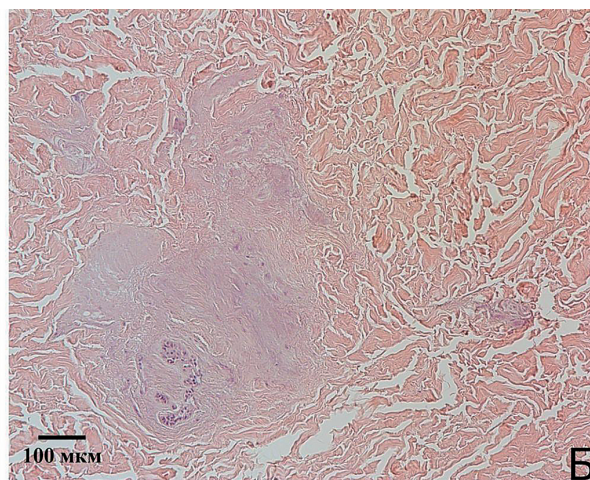


Рис. 1. Морфологическое исследование ацеллюлярного дермального матрикса при неполной децеллюляризации кожи: макроскопический (А) и микроскопический (увеличение $\times 100$, окраска гематоксилином–эозином) (Б) виды

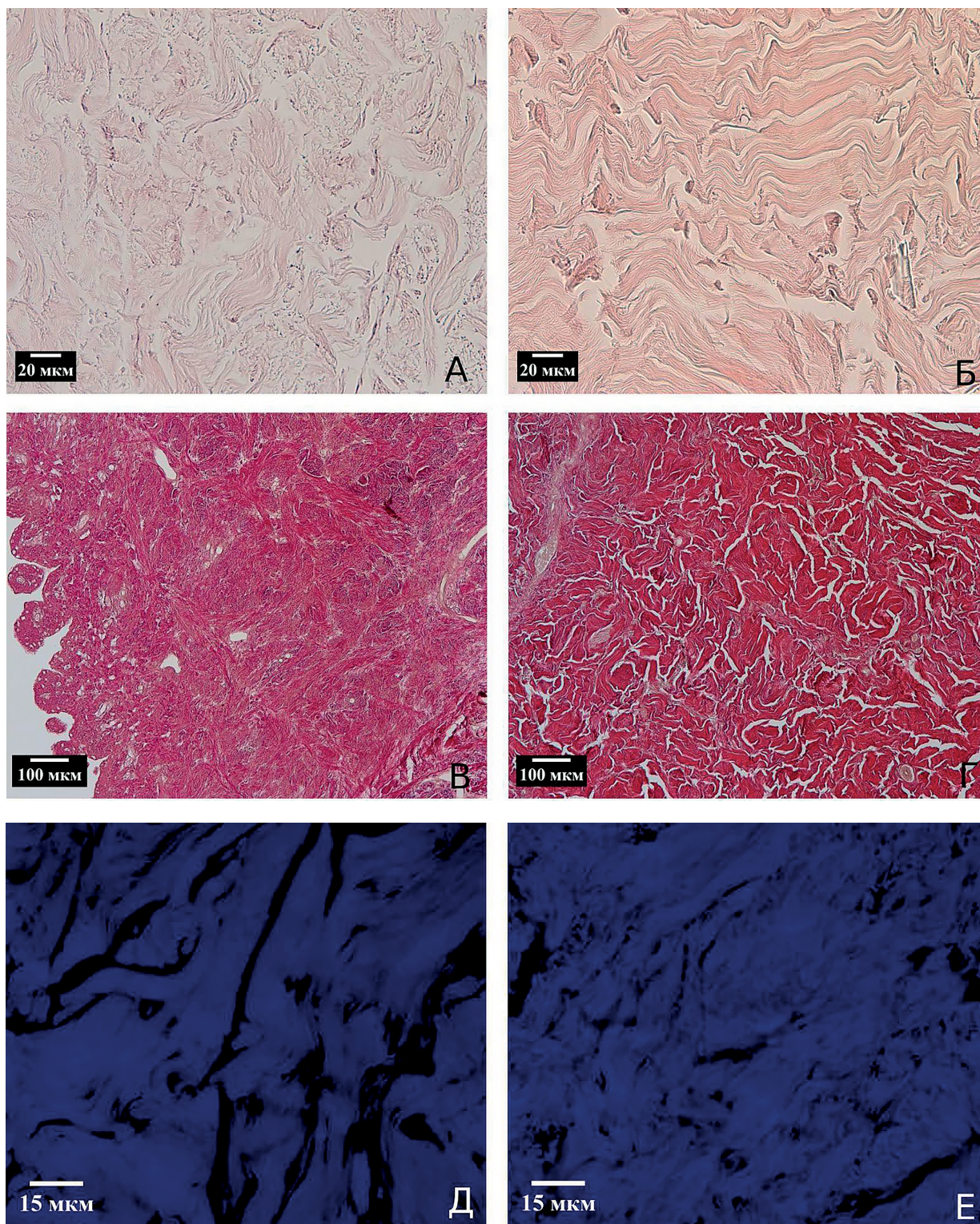


Рис. 2. Ацеллюлярный дермальный матрикс, полученный в соответствии с протоколом № 1. А, В, Д — краевой участок; Б, Г, Е — центральный участок. Окрашивание: гематоксилин и эозин (А, Б), по Ван-Гизону (В, Г), DAPI (Д, Е)

Протокол № 2 отличался от протокола № 1 тем, что для первичной обработки использовался более мягкий детергент — Tween 20. В этом случае очистка дермы от эпидермиса происхо-

дила медленнее, однако результат (в части удаления клеточных элементов, а также эпидермального слоя) по окончании протокола оказался аналогичным. Тем не менее имелось значительное

внешнее отличие полученного образца — его обратная сторона не была разволокнена, механически он был несколько более плотным и упругим.

Использование гипертонического раствора NaCl в протоколе № 3 позволило ускорить инициацию процесса отделения эпидермального слоя от дермы, который начался практически сразу, однако завершился ближе к окончанию протокола. Таким образом, дополнительный этап не дал каких-либо преимуществ, и по окончании протокола результат был аналогичен полученному при использовании протокола № 2, в том числе и в части внешнего вида.

Исследование микропрепаратов АДМ, полученных всеми исследуемыми способами, показало полное удаление клеточных элементов, что подтверждается при окрашивании гематоксилином–эозином (рис. 2, А, Б) и ядерным красителем DAPI — при микрофотографировании визуализировали лишь аутофлуоресценцию белков внеклеточного матрикса (рис. 2, Д, Е). Окрашивание срезов по Ван-Гизону позволило убедиться в сохранности коллагеновых волокон (рис. 2, В, Г).

Морфологических различий между образцами, полученными тремя разными способами, при микрофотографировании гистологических препаратов выявлено не было. Однако использование раствора Версена привело к некоторому разволокнению коллагенового матрикса с одной из сторон, что может иметь и положительный эффект для миграции клеток реципиента.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из полученных данных по оценке качества полученного бесклеточного материала, можно утверждать, что все три протокола, представленные нами, достаточно эффективны для получения конечного продукта с необходимыми биологическими характеристиками. В полученном АДМ сохранена структурная организация, необходимая для реализации лечебного эффекта при клиническом использовании. При этом отсутствует клеточный компонент, создающий иммуногенный потенциал, способный вызвать отторжение образца при его размещении на раневой поверхности. Физико-химические свойства изделия обеспечивают удобство в обращении и непосредственном применении при лечении повреждений кожи различной этиологии. При этом процесс производства отработан, не требует сложных технологических решений и дорогостоящих реактивов, не предъявляет слишком высоких требований к квалификации персонала, сравнительно легко реализуем на научно-производственной базе ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ. Совокупность данных фактов открывает большие перспективы по обширному производству и клиническому применению АДМ в лечении кожных дефектов различного генеза. Весьма логичным выглядит дальнейшее определение категорий пациентов и состояния их ран для применения АДМ.

Различия в протоколах децеллюляризации кожи не имели значимого влияния на конечный результат. На выполнение протокола № 3 потребовалось на 3,5 часа больше, чем на протоколы № 1 и 2, при этом значительного усиления эффекта не

обнаружено: произошло ускорение отделения эпидермального слоя, которое не повлияло на дальнейшую обработку. Можно предположить, что для повышения эффективности обработки кожи гипертоническим раствором NaCl необходимо более длительное воздействие с периодической сменой последнего.

Для выполнения протоколов № 1 и 2 нужно одинаковое количество реактивов, времени и трудозатрат. Однако в первом случае материал оказался более мягким, с наличием некоторого разволокнения с одной из сторон, что, вероятно, является следствием воздействия на коллагеновый матрикс этилендиамин уксусной кислоты (ЭДТА), являющейся основой раствора Версена. Подобный эффект показан при децеллюляризации ленткулярной ткани роговицы раствором трипсин-ЭДТА [1]. В случае с кожей этот эффект может оказаться полезным, поскольку значительного разрушения внеклеточного матрикса не происходит, однако повышение пористости и, соответственно, снижение плотности материала будет способствовать миграции клеток пациента вглубь материала [6].

ВЫВОДЫ

1. Все три исследованных протокола позволяют получить ацеллюлярный дермальный матрикс с заданными свойствами отсутствия клеточного и ядерного материала.
2. Протокол № 1 приводит к разволокнению матрикса, что может оказаться положительным фактором для миграции клеток реципиента.
3. Ацеллюлярный матрикс, полученный в результате протоколов № 2 и 3, напротив, сохранил свою плотность, оставаясь при этом упругим.
4. Особенности структурных характеристик полученных матриксов должны быть оценены в дальнейших работах с точки зрения влияния на успешность клинического применения.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Информированное согласие на публикацию. Авторы получили письменное согласие пациентов на публикацию медицинских данных.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article,

final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patient for publication of relevant medical information within the manuscript.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борзенко С.А., Костенев С.В., Дога А.В. и др. Сравнительный анализ протоколов децеллюляризации лентикулярной ткани роговицы. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2021; 23(2): 137–46.
2. Джабраилова Д.Ш., Зикирходжаев А.Д., Усов Ф.Н. и др. Использование аллоимплантата на основе твердой мозговой оболочки при реконструктивно-пластических операциях у больных раком молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2021; 17(3): 44–50.
3. Сачков А.В., Боровкова Н.В., Жиркова Е.А. и др. Использование трупной кожи в лечении ран. Трансплантология. 2018; 10(4): 327–35.
4. Сотниченко А.С., Гилевич И.В., Мелконян К.И. и др. Разработка методики получения дермального внеклеточного матрикса. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2020; 21(4): 81–7.
5. Guo Z.Q., Qiu L., Gao Y. et al. Use of porcine acellular dermal matrix following early dermabrasion reduces length of stay in extensive deep dermal burns. Burns. 2016; 42(3): 598–604.
6. Nasiry D., Khalatbary A.R., Abdollahifar M.A. et al. Engraftment of bioengineered three-dimensional scaffold from human amniotic membrane-derived extracellular matrix accelerates ischemic diabetic wound healing. Arch Dermatol Res. 2021; 313(7): 567–82.
7. Stone R. 2nd, Saathoff E.C., Larson D.A. et al. Accelerated Wound Closure of Deep Partial Thickness Burns with Acellular Fish Skin Graft. Int J Mol Sci. 2021; 4, 22(4): 1590.

REFERENCES

1. Borzenok S.A., Kostenev S.V., Doga A.V. i dr. Sravnitel'nyj analiz protokolov decelljularizacii lentikuljarnoj tkani rogovicy. [Comparative analysis of protocols for decellularization of lenticular corneal tissue]. Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. 2021; 23(2): 137–46. (in Russian).
2. Dzhabrailova D.Sh., Zikirjodzhaev A.D., Usov F.N. i dr. Ispol'zovanie alloimplantata na osnove tverdoj mozgovo obolochki pri rekonstruktivno-plasticheskikh operacijah u bol'nyh rakom molochnoj zhelezy. [The use of alloimplant based on the dura mater in reconstructive plastic surgery in patients with breast cancer]. Opuholi zhenskoy reproduktivnoj sistemy. 2021; 17(3): 44–50. (in Russian).
3. Sachkov A.V., Borovkova N.V., Zhirkova E.A. i dr. Ispol'zovanie trupnoj kozhi v lechenii ran. [Use of cadaveric skin in wound healing]. Transplantologija. 2018; 10(4): 327–35. (in Russian).
4. Sotnichenko A.S., Gilevich I.V., Melkonjan K.I. i dr. Razrabotka metodiki poluchenija dermal'nogo vnekletochnogo matriksa. [Development of a technique for obtaining a dermal extracellular matrix]. Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. 2020; 21(4): 81–7.
5. Guo Z.Q., Qiu L., Gao Y. et al. Use of porcine acellular dermal matrix following early dermabrasion reduces length of stay in extensive deep dermal burns. Burns. 2016; 42(3): 598–604.
6. Nasiry D., Khalatbary A.R., Abdollahifar M.A. et al. Engraftment of bioengineered three-dimensional scaffold from human amniotic membrane-derived extracellular matrix accelerates ischemic diabetic wound healing. Arch Dermatol Res. 2021; 313(7): 567–82.
7. Stone R. 2nd, Saathoff E.C., Larson D.A. et al. Accelerated Wound Closure of Deep Partial Thickness Burns with Acellular Fish Skin Graft. Int J Mol Sci. 2021; 4, 22(4): 1590.