

БИОСОВМЕСТИМЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ МЕЛКОДИСПЕРСНОЙ 3D-МАТРИЦЫ ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ХРЯЩА СВИНЬИ

Е.А. Немец¹, А.Э. Лажко³, А.М. Григорьев¹, Ю.Б. Басок¹, А.Д. Кириллова¹,
В.И. Севастьянов^{1, 2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

В отличие от децеллюляризации мягких тканей для использования их в качестве тканеспецифических матриц при создании тканеинженерных конструкций децеллюляризация хрящевой ткани требует привлечения нескольких методов обработки, что может отрицательно влиять на биосовместимые и функциональные свойства нативного внеклеточного матрикса. **Цель работы:** исследование биосовместимых и функциональных свойств тканеспецифической мелкодисперсной 3D-матрицы из хряща свиньи, децеллюляризованного последовательной обработкой химическими, физическими и ферментативными методами. **Материалы и методы.** Для децеллюляризации микродисперсные частицы хряща (МЧХ), полученные методом криопомола, инкубировали в растворах детергентов (додецилсульфат натрия и Triton X-100) с последующей обработкой сверхкритическим диоксидом углерода (ск-СО₂) с добавлением этанола (10% по объему) и ДНКазой I типа. Для определения генотоксичности децеллюляризованных МЧХ (ДМЧХ) использовали мутационный тест Эймса на *Salmonella typhimurium*. Местное и общетоксическое действие, а также резорбцию ДМЧХ исследовали *in vivo* на половозрелых аутбредных крысах. Образцы ДМЧХ (10 мг) имплантировали в мышечную ткань бедра. Жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) при культивировании на ДМЧХ анализировали методом прижизненной микроскопии с окрашиванием флуоресцентным красителем Calcein AM. Метаболическую активность клеток оценивали с использованием PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. **Результаты.** Доказано, что имплантированные в мышцу крысы ДМЧХ свиньи после обработки ск-СО₂ не оказывают местного и общетоксического действия, не проявляют генотоксичности и отрицательного действия на репродуктивную систему животных. После 6 месяцев эксперимента *in vivo* резорбируется большая часть (87%) имплантированного децеллюляризованного хряща. Показали, что полученные матрицы способны поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч. **Заключение.** Образцы ДМЧХ свиньи соответствуют требованиям, предъявляемым к биосовместимым медицинским изделиям по показателям местного и общетоксического действия, гено- и репродуктивной токсичности, и могут быть рекомендованы в качестве матрицы при создании клеточно- и тканеинженерных конструкций хрящевой ткани.

Ключевые слова: суставной хрящ, децеллюляризация, 3D-матрица, резорбция, биосовместимость, МСК жировой ткани, адгезия, пролиферация, тканеинженерная конструкция.

Для корреспонденции: Немец Евгений Абрамович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (903) 579-23-79. E-mail: evgnemets@yandex.ru

Corresponding author: Evgenij Nemets. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (903) 579-23-79. E-mail: evgnemets@yandex.ru

BIOCOMPATIBLE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF A MICRODISPERSED TISSUE-SPECIFIC 3D MATRIX FROM DECELLULARIZED PORCINE CARTILAGE

E.A. Nemets¹, A.E. Lazhko³, A.M. Grigoriev¹, Yu.B. Basok¹, A.D. Kirillova¹, V.I. Sevastianov^{1, 2}

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

³ Moscow State University, Moscow, Russian Federation

In contrast to decellularization of soft tissues for use as tissue-specific matrices in the creation of tissue-engineered constructs, decellularization of cartilage tissue requires several processing techniques, which can negatively affect the biocompatibility and functional properties of the native extracellular matrix (ECM). **Objective:** to study the biocompatible and functional properties of microdispersed tissue-specific 3D matrix from a porcine cartilage that is decellularized by sequential use of chemical, physical and enzymatic techniques. **Materials and methods.** For decellularization, microdispersed cartilage particles (MCPs), obtained by cryomilling, were incubated in detergent solutions (sodium dodecyl sulfate and Triton X-100), then treated with supercritical carbon dioxide (scCO₂) with 10% ethanol and DNase I. The Ames test (*Salmonella typhimurium* reverse mutation assay) was used to determine the genotoxicity of decellularized microdispersed cartilage particles (dMCPs). Local and general toxic effects, as well as resorption of dMCPs were studied *in vivo* on sexually mature outbred rats. Decellularized MCP specimens (10 mg) were implanted into the thigh muscle tissue. Viability of human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells (hAdMSCs), when cultured on dMCPs, was analyzed by *in vivo* microscopy, stained with fluorescent Calcein AM dye. Cell metabolic activity was assessed using PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. **Results.** It has been proven that porcine dMCPs implanted in rat muscle after treatment with scCO₂ do not exhibit local and general toxic effects, and do not show genotoxicity and negative effects on the reproductive system of animals. After 6 months of *in vivo* experiment, most (87%) of the implanted decellularized cartilage was resorbed. It was shown that the resulting matrices are able to support adhesion and proliferation of hAdMSCs. **Conclusion.** Porcine dMCP specimens are suitable for biocompatible medical products in terms of local and general toxic effects, genotoxicity and reproductive toxicity, and can be used as a matrix for creating cell- and tissue-engineered cartilage constructs.

Keywords: articular cartilage, decellularization, 3D matrix, resorption, biocompatibility, adipose-derived MSCs, adhesion, proliferation, tissue-engineered construct.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени для создания биомедицинских продуктов для технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины разработан ряд биосовместимых 3D-матриц (синонимы: матриксы, каркасы, носители) из резорбируемых синтетических [1, 2] и природных полимеров [1, 3, 4], в той или иной степени моделирующих свойства естественного внеклеточного матрикса (ВКМ). Однако 3D-матрицы из полимерных материалов не обладают тканеспецифическими свойствами, характерными для ВКМ, способного выполнять не только функции каркаса, но и избирательно поддерживать процессы адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток конкретной ткани или органа [5]. В связи с этим наблюдается большой интерес к 3D-матрицам из децеллюляризованных аллогенных или ксеногенных тканей [6–8]. Основная проблема технологии децеллюляризации состоит в необходимости максимально полного удаления клеточного материала с наиболее возможной

степенью сохранения морфологии, состава, биохимических и механических свойств нативного ВКМ. В связи с тем что на полноту децеллюляризации оказывают влияние множество факторов, таких как вид донора, размеры и целостность органа, вид ткани, ее структура и плотность и др., не может быть универсального протокола децеллюляризации [9, 10]. К настоящему времени разработан широкий спектр протоколов децеллюляризации с использованием физических, химических, ферментативных методов обработки и их комбинации [11–13].

Среди физических методов перспективным представляется применение сверхкритических флюидов, характеризующихся нулевым поверхностным натяжением, пониженной вязкостью, повышенной растворяющей способностью и способностью глубоко проникать в объем материалов [14–16]. Наибольший интерес представляет сверхкритический диоксид углерода (ск-CO₂) [17], критическая точка которого достигается при достаточно низкой температуре

(31,1 °C), а также благодаря легкости его удаления простым сбросом давления после обработки и нетоксичности. Одновременно может происходить экстракция растворимых в ск-СО₂ токсичных соединений, что приводит к повышению биосовместимых свойств полученных материалов, децеллюляризованных с применением цитотоксичных детергентов [18]. Так как ск-СО₂ является не полярным соединением, для повышения эффективности обработку проводят в присутствии полярного агента, например, этанола. Добавление этанола позволяет повысить как эффективность децеллюляризации тканей с высокой плотностью [19, 20], так и сохранность таких важных компонентов ВКМ, как коллагены, гликозаминогликаны, адгезивные белки (фибронектин, ламинин и другие) и ангиогенные факторы [21].

Высокая плотность хряща усложняет достижение полноты децеллюляризации, затрудняя диффузию поверхностно-активных веществ и выведение клеточного детрита. В предыдущих работах было показано, что для достижения полноты децеллюляризации хрящевой ткани необходимо использовать протокол, включающий как химические (обработка поверхностно-активными веществами), так и физические (сверхкритические флюиды, циклическое замораживание–оттаивание) методы обработки или ферментативные (обработка ДНКазой, РНКазой) методы воздействия на ткань [22, 23].

Целью данной работы было исследовать биосовместимые и матриксные свойства мелкодисперсной 3D-матрицы из хряща свиньи, децеллюляризованного последовательной обработкой химическими, физическими и ферментативными методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бедренные и коленные свиные суставы получены на бойне (ООО «АПК «ПРОМАГРО», г. Старый Оскол) после забоя здоровых животных (вес около 120 кг) в соответствии с Европейской директивой 64/433/ЕЕС. После транспортировки в охлажденном виде хрящ срезали с суставных поверхностей скальпелем, нарезами фрагментами размером 0,5 × 0,5 × 0,1 см, замораживали при –80 °C и хранили при этой температуре до момента начала криопомола.

Микродисперсные частицы хряща (МЧХ) получали в криомельнице CryoMill (Retch GmbH, Германия). Помол производили в условиях постоянного контакта размоленного стакана с жидким азотом при частоте 25 Гц в течение 4 минут. Фракция частиц с размерами 30–100 мкм была выделена с применением сит с соответствующим размером ячеек.

Децеллюляризацию МЧХ проводили согласно ранее разработанной методике [22]. МЧХ обрабатывали при комнатной температуре и периодическом перемешивании на магнитной мешалке (3 раза в сутки, 1 час, 200 об/мин) в трех сменах фосфат-

но-солевого буфера (ФСБ) (рН = 7,4), содержащего натриевую соль додецилсульфат натрия (SDS) и повышающую концентрацию Тритона X-100 (1, 2 и 3% соответственно).

Затем МЧХ тщательно отмывали от остатков детергентов в трех сменах ФСБ, содержащего антибиотик (ампициллин, 20 мкг/мл) и антимикотик (амфотерицин В, 2 мкг/мл), в течение 72 часов при комнатной температуре.

На втором этапе МЧХ обрабатывали в атмосфере ск-СО₂ на установке Speed SFE (Applied Separations, США) при давлении 300 Бар, температуре +35 °C, скорости потока ск-СО₂ 2,5 ± 0,5 мл/мин в течение 8–24 часов. Этанол в концентрации 10% по объему был использован в качестве модификатора полярности.

Для повышения эффективности удаления ДНК из МЧХ свиньи использовали ДНКазу I типа (New England Biolabs Inc., США) в концентрации 50 Е/мл в 10 ммоль Трис-НСl буферном растворе (рН 7,6), содержащем 2,5 ммоль MgCl₂, 0,5 ммоль CaCl₂. Время обработки при температуре 37 °C составляло 48 часов.

Образцы децеллюляризованных МЧХ (ДМЧХ) стерилизовали γ-излучением в дозе 1,5 Мрад.

Перед исследованием образцы ДМЧХ хранили при температуре –20 °C.

Определение содержания ДНК

Выделение ДНК из образцов МЧХ (n = 3) и ДМЧХ (n = 3) массой 25 мг проводили с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для определения абсолютного количества ДНК использовали калибровочную кривую ДНК бактериофага λ (Invitrogen, США) (0–1000 нг/мл).

Сканирующая электронная микроскопия поверхности образцов

Образцы микродисперсных частиц хряща МЧХ и ДМЧХ обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающих концентраций по схеме: 50% спирт – 3 мин, 50% спирт – 3 мин, 70% спирт – 3 мин, 90% спирт – 6 мин, 96% спирт – 6 мин; сушили на воздухе и наклеивали на столики для электронной микроскопии с помощью двустороннего скотча.

Токопроводящее покрытие получали методом ионного напыления золота в течение 40 секунд при постоянном токе 5–7 мА на установке JFC-1600 (JEOL, Япония). Исследование морфологии МЧХ осуществляли с применением сканирующего электронного микроскопа JSM-6360LA (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 5 кВ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСОВМЕСТИМЫХ СВОЙСТВ ДМЧХ

А. Исследования *in vitro*

Генотоксичность

Так как в процессе децеллюляризации используются потенциально генотоксичные вещества (детергенты) и не удается полностью удалить ДНК из МЧХ, не исключено, что при клиническом применении децеллюляризованного хряща в составе он может влиять на генетический материал пациента.

Генотоксичность образцов ДМЧХ оценивали мутационным тестом Эймса на *Salmonella typhimurium*, представляющим собой бактериальную тест-систему для учета мутаций к прототрофности по гистидину при действии тестируемых образцов и(или) их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены оснований или сдвига рамки считывания в геноме этого организма.

Использовали набор индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП «ГосНИИгенетика», имеющих соответствующие сертификаты.

Для приготовления вытяжки 25 мг ДМЧХ выдерживали 3 суток при температуре 37 °С в 1 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. Испытывали пять концентраций вытяжки: исходный раствор и четыре последовательные 5-кратные разведения в 0,9% растворе натрия хлорида. Эксперимент сопровождался положительными контролями, в качестве которых использованы вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров.

Для метаболической активации была использована фракция S9 печени самцов крыс Wistar, которым за 5 дней до забоя вводили индуктор микросомальных ферментов Совол, 300 мг/кг, однократно внутривенно.

После инкубации в течение 48 часов у групп индикаторных штаммов подсчитывали количество ревертантных колоний. Средние значения по показателю «количество ревертантных колоний» для групп, обработанных препаратом, сравнивали одновременно с соответствующими группами негативного контроля.

Если вещество и(или) его метаболиты обладают мутагенной активностью, то они будут индуцировать обратные мутации от ауксотрофности к прототрофности по гистидину у гистидин-зависимых штаммов *Salmonella typhimurium*. Мутагенный эффект в соответствии с общепринятыми подходами считали значимым, если среднее количество колоний ревертантов на чашку в опытном варианте превышало таковое в контрольном варианте в 2 и более раз.

Б. Исследования *in vivo* репродуктивной токсичности, местного и общетоксического действия

Эксперименты проводили на половозрелых аутбредных крысах. Содержание и все манипуляции с животными выполняли согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986), а также в соответствии с ГОСТ 33216-2014 Межгосударственный стандарт «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Репродуктивная токсичность

В случае когда генотоксический эффект действует не только на соматические, но и на половые клетки, изменения могут стать наследственными. Для исследования влияния на генеративную функцию и эмбриотоксическое действие в антенатальном и постнатальном периодах развития генотоксического эффекта на половые клетки была изучена репродуктивная токсичность ДМЧХ.

Животных распределяли на группы по 6 самцов и 12 самок в группе: контрольные самцы, контрольные самки, самцы с образцами ДМЧХ и самки с образцами ДМЧХ. Контролем служили ложнопериованные крысы.

Через 14 дней после имплантации самцов и самок ссаживали в соотношении 1 : 2 (один самец и 2 самки) на срок 14 суток. Каждое утро у самок брали вагинальные мазки и определяли в них наличие сперматозоидов. При обнаружении сперматозоидов крысу взвешивали, отсаживали в отдельную клетку и начинали отсчет срока беременности, считая день обнаружения сперматозоидов первым днем беременности.

В течение исследования проводили общее клиническое наблюдение, определяли массу тела, потребление корма и воды.

Часть беременных самок подвергали эвтаназии на 20-е сутки беременности, плоды осматривали, взвешивали и измеряли кранио-каудальный размер. Подсчитывали количество желтых тел в яичниках, мест имплантаций и количество живых и погибших плодов. На основании полученных данных определяли уровень пред- и постимплантационной смертности плодов. Другую половину самок оставляли до родов для наблюдения за развитием потомства в течение 5 суток. По окончании исследования взрослых животных подвергали эвтаназии. После регистрации смерти у самок удаляли яичники, у самцов семенники и придатки семенников. Органы репродуктивной системы животных изучали макроскопически.

чески на наличие аномальных или патологических изменений, взвешивали на весах VIBRA AJ-1200CE (ShinkoDenshiCo., Ltd, Япония) с дальнейшим расчетом относительной массы органов (процентное отношение массы органа к массе тела животного). Яичники и семенники фиксировали в 10–15% нейтральном формалине. После фиксации на гистопроцессоре TLP-144 (ООО «МедТехникаПоинт», Россия) проводили гистологическую проводку. Затем на станции заливки ESD-2800 (ООО «МедТехникаПоинт», Россия) готовили парафиновые блоки. Далее с помощью ротационного микротомы RMD-4000 (ООО «МедТехникаПоинт», Россия) получали срезы толщиной 3–4 нм, которые наклеивали на предметное стекло, депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии с помощью микроскопа биологического Leica DM1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Местное и общетоксическое действие

Имплантацию образца (навеску 10 мг) в мышечную ткань бедра животных выполняли в стерильных условиях под действием анестетика Золетил 100 (Вирбак, Франция) в дозе 15 мг/кг. Контролем служили ложнооперированные животные, которым проводили операцию без имплантации образцов.

Для изучения местного действия через 28 суток, 2, 3, и 6 месяцев после имплантации образцов ДМЧХ животных подвергали эвтаназии ингаляцией двуокиси углерода. Результаты оценивали макроскопически и с помощью гистологических методов исследования. По результатам полуколичественной оценки [24] определяли класс реактивности исследуемого материала по сравнению с контрольным образцом (в баллах): отсутствие реакции или минимальная (от 0,0 до 2,9); легкая реакция (от 3,0 до 8,9); умеренная реакция (от 9,0 до 15,0); серьезная реакция (15,1 и более).

Общетоксическое действие исследовали на сроке до 2 месяцев имплантации одновременно с оценкой их местного действия. Анализ состояния животных включал в себя: выживаемость и внешний вид, массу, поведение (возбудимость, агрессивность), реакцию на внешние раздражители, болевую реакцию, потребление корма и воды. Через 2 месяца у животных забирали кровь для клинического (гематологический анализатор Mindray BC-2800-vet (Mindray, Китай) и биохимического (биохимический фотометр «Стат факс 4500+» (Awareness Technology Inc., США) исследований и мочу (URISCAN Optima, YD Diagnostics Corporation, Корея). Забирали и взвешивали следующие органы: сердце, легкие, тимус, печень, селезенку, почки и головной мозг. Взвешивание органов животных осуществляли с помощью весов

Shinko, AJ-1200CE (Shinko Denshi Co., Ltd, Япония). Окрашенные гематоксилином-эозином гистологические препараты сердца, легких, тимуса, печени, селезенки, кишечника, почки, головного мозга и региональных лимфатических узлов исследовали с помощью микроскопа биологического LeicaDM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Степень резорбции имплантированных образцов определяли морфометрически при помощи компьютерной морфометрической программы LAS Interactive Measurement Module.

Вырезанные участки органов и тканей фиксировали в 10–15% растворе нейтрального формалина с последующей заливкой в парафин. Готовили срезы толщиной 5–7 мкм. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии с помощью микроскопа биологического LeicaDM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Исследование способности ДМЧХ поддерживать адгезию и пролиферацию клеток (функциональные свойства)

Мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека (МСК ЖТч) 3-го пассажа выделяли и культивировали в полной ростовой среде (ПРС) по стандартной методике [25].

Эксперименты с адгезией и пролиферацией проводили с применением культуры мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). Данные клетки способны дифференцироваться в хондрогенном направлении с последующим образованием хрящевой ткани. Для исключения возможности клеточного роста вне поверхности матрикса эксперимент проводили в полипропиленовых пробирках. 5 мг ДМЧХ в асептических условиях помещали в стерильные пробирки, добавляли ПРС и инкубировали 24 ч при температуре +37 °С для насыщения средой. Через сутки готовили клеточную суспензию МСК ЖТч с концентрацией 500 000 клеток/мл, из пробирок удаляли излишки среды и добавляли в каждую пробирку по 1 мл клеточной суспензии. Пробирки помещали в штатив и встряхивали на лабораторном шейкере MultiBio 3D (Biosan, Латвия) в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего пробирки помещали в CO₂-инкубатор и культивировали при температуре +37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1% CO₂.

Для оценки взаимодействия клеток и образцов ДМЧХ методами прижизненной микроскопии использовали окрашивание флуоресцентными красителями системы Calcein AM (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение метаболической активности клеток проводили с помощью теста с реактивом PrestoBlue™

(Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Спектрофотометрический анализ выполняли на планшетном ридере Tecan Spark 10M (Tecan Trading AG, Швейцария). Количество клеток определяли согласно построенной калибровочной кривой.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010. Вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Статистическую достоверность различий оценивали по t -критерию Стьюдента. Достоверным считали различие данных групп при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате децеллюляризации количество ДНК снижается с 367 ± 53 нг/мг до 7 ± 1 нг/мг ткани, что составляет менее 2% от исходного значения и свидетельствует о высокой эффективности процесса децеллюляризации [26]. При этом в морфологии поверхности нативного и децеллюляризованного хряща наблюдаются значимые различия (рис. 1).

Структура поверхности исходной хрящевой ткани гладкая (рис. 1). Определяются клеточные лакуны, характерные для ткани суставного хряща, в которых визуализировались очертания клеток. В случае децеллюляризованного хряща наблюдается отсутствие клеток в лакунах на поверхности микрочастиц, что также свидетельствует об эффективности обработки.

Генотоксичность

Количество колоний ревертантов в контроле (растворитель) было в пределах колебаний спонтанно-

го уровня для данных штаммов. Ответ штаммов на стандартные мутагены был в пределах обычных уровней.

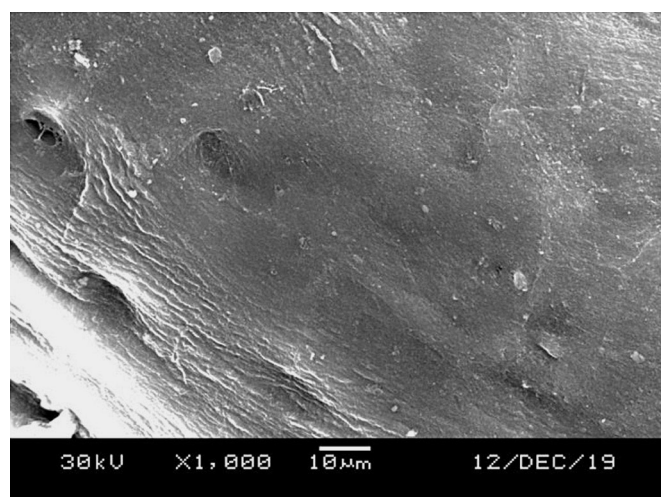
Децеллюляризованные тканеспецифические матриксы из МЧХ свиньи в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5 и 25 мг/мл не индуцируют генные мутации у тестовых штаммов *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 и TA 97 без системы метаболической активации и в ее присутствии. Во всех вариантах эксперимента кратность превышения среднего числа колоний ревертантов на чашку в опытах над таковым в контроле была менее 2 раз.

Таким образом, экспериментальные образцы ДМЧХ свиньи, полученные в результате последовательной обработки детергентами и ск- CO_2 , не обладают генотоксичностью.

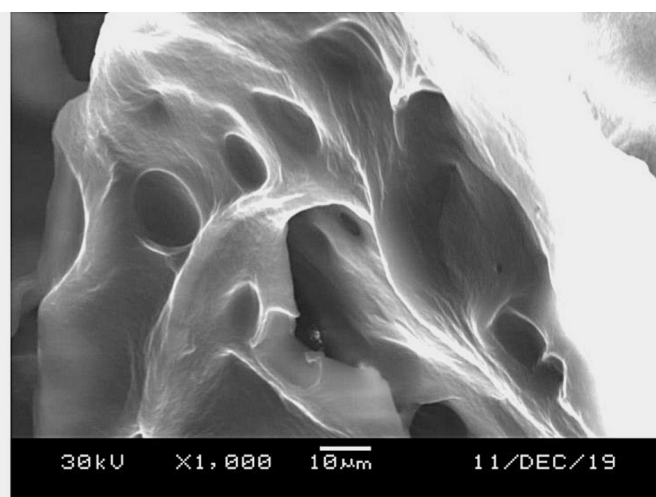
Местное действие

Заживление операционной раны у животных опытных и контрольной групп происходило первичным натяжением. Ни у одного животного не обнаружено явлений отторжения имплантатов, нагноения, расхождения швов и других послеоперационных осложнений. Вокруг всех образцов по периферии в окружающей мышечной ткани не отмечено некрозов, кровоизлияний, гранулем и выраженного отека. В области имплантации матриксов признаки воспаления отсутствовали. Признаков раздражения и воспаления тканей при макроскопическом исследовании не выявлено, рубцовой ткани не обнаружено.

Реакция тканей на оперативное вмешательство и последующую имплантацию образцов децеллюляризованного хряща свиньи протекала по обычной схеме, характерной для раневого процесса и реакции



Исходный хрящ



Децеллюляризованный хрящ

Рис. 1. Изменение структуры микрочастиц хряща свиньи в результате децеллюляризации

Fig. 1. Changes in the structure of porcine cartilage microparticles as a result of decellularization

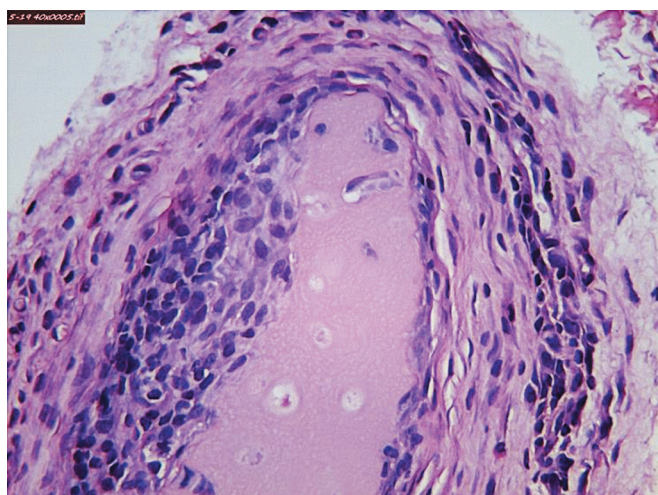
на инородное тело, включая стадии травматического воспаления и образование соединительной ткани.

Микроскопическая картина на 28-е сутки имплантации образцов ДМЧХ (рис. 2) характеризовалась наличием тонкой капсулы вокруг имплантата, состоящей из плотной волокнистой соединительной ткани. Прорастания соединительной ткани в имплантаты не отмечено. По периферии в окружающей фиброзно-мышечной ткани некрозов, кровоизлияний, лимфогистиоцитарной инфильтрации и отека не наблюдали. В капсуле и окружающих тканях отмечалась лимфомакрофагальная инфильтрация, а также наличие единичных гигантских клеток, что свидетельствует о начальных стадиях резорбции. Среди клеток соединительной ткани преобладали клетки фибробластического ряда: мезенхимные клетки, фибробласты, фиброциты. В окружающих тканях

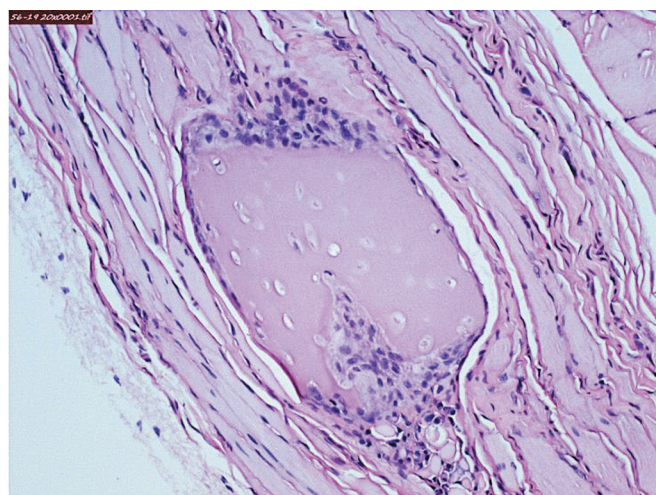
обнаруживалось небольшое количество нейтрофилов. Отмечался скудный васкулярный рисунок.

На 28-е сутки после имплантации наблюдалась слабо выраженная резорбция образцов ДМЧХ. Средняя площадь одной имплантированной частицы ДМЧХ на группу животных составляла $13867 \pm 964 \text{ мкм}^2$. Отчетливо выделялась центральная часть имплантата, не заселенная клетками. На периферии регистрировалась активная инфильтрация макрофагами.

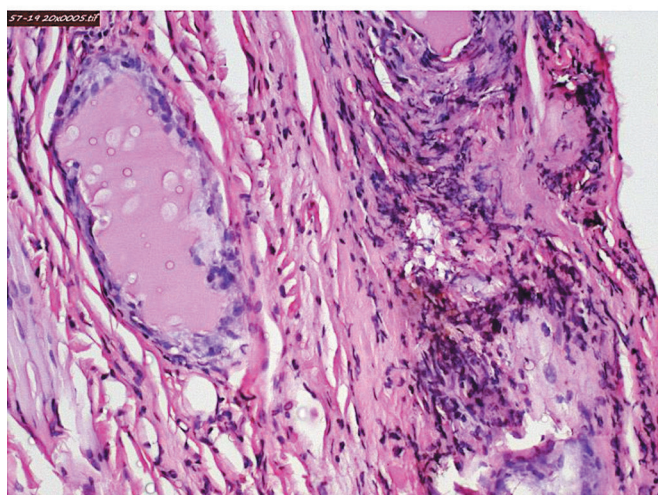
Спустя 2 месяца (рис. 2) место имплантации покрыто волосным покровом и визуально не определяется. Наблюдаются признаки регенерации в виде мышечно-соединительной ткани. Регенерат был представлен тонкими пучками коллагеновых волокон, инфильтрированных фибробластами и фиброцитами. В строме отмечено наличие мелких сосудов,



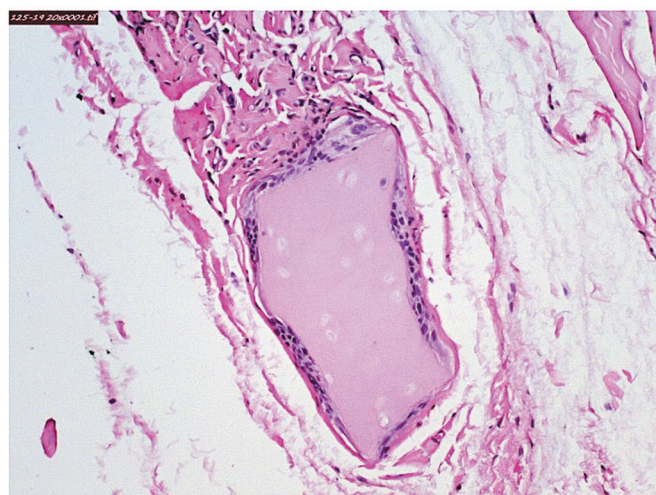
28-е сутки



2 месяца



3 месяца



6 месяцев

Рис. 2. Реакция тканей на имплантацию частиц децеллюляризованного хряща свиньи. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Fig. 2. Tissue response to implantation of decellularized porcine cartilage particles. H&E staining. $\times 400$

миоцитов, образующих почки роста и тяжи новообразованных тонких мышечных волокон.

На сроке 3 месяца (рис. 2) имплантат представляет собой овал, капсула вокруг него отсутствует. Наблюдали интенсивную резорбцию матрикса макрофагами по периферии. В сравнении с 30 сутками имплантации материал резорбировался на ~44%. Средняя площадь имплантата составляла $7644 \pm 155 \text{ мкм}^2$. Структура не подвергшегося резорбции ДМЧХ не была изменена. Наблюдали макрофагальную реакцию на периферии имплантата с присутствием лимфоцитов.

Через 6 месяцев после имплантации (рис. 2) вокруг образцов ДМЧХ формировалась тонкая капсула из коллагеновых волокон, что является показателем высокой биосовместимости. При этом количество активных макрофагов в тканях, примыкающих к имплантатам, по-прежнему оставалось на высоком уровне. На периферии имплантированных частиц, резорбированных на ~87% (средняя площадь имплантата составляла $1759 \pm 1482 \text{ мкм}^2$), наблюдали образование зрелой соединительной ткани в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов.

Медленная резорбция может быть связана с высокой плотностью хрящевой ткани, затрудняющей проникновение клеток и диффузию веществ в объем ДМЧХ. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования ДМЧХ в качестве мат-

рицы при формировании *in vitro* и *in vivo* тканевого эквивалента хряща.

На рис. 3 приведены результаты полуколичественной оценки биологического действия имплантированных образцов. Местное действие ДМЧХ на окружающие ткани снижается в течение шести месяцев имплантации от уровня «легкая реакция» тканей (от 3,0 до 8,9 балла) до уровня «отсутствие реакции или минимальная» (0,0–2,9 балла). Заметим, что изменение характера реакции тканей на ДМЧХ происходит в течение времени резорбции основной массы имплантируемых частиц.

Таким образом, мелкодисперсные частицы децеллюляризованного хряща свиньи и продукты их резорбции не проявляют отрицательного биологического действия на прилегающие к имплантату ткани.

Общетоксическое действие

В течение 2 месяцев эксперимента животные контрольной и опытной групп были здоровыми. Ни у одной из крыс не было отмечено изменений внешнего вида и поведения в сторону угнетения или возбуждения. Масса тела крыс на протяжении эксперимента имела положительную динамику и не отличалась между группами.

Имплантация исследуемых образцов ДМЧХ не повлияла на гемопоэз в организме крыс. Достоверных различий средних показателей клинического

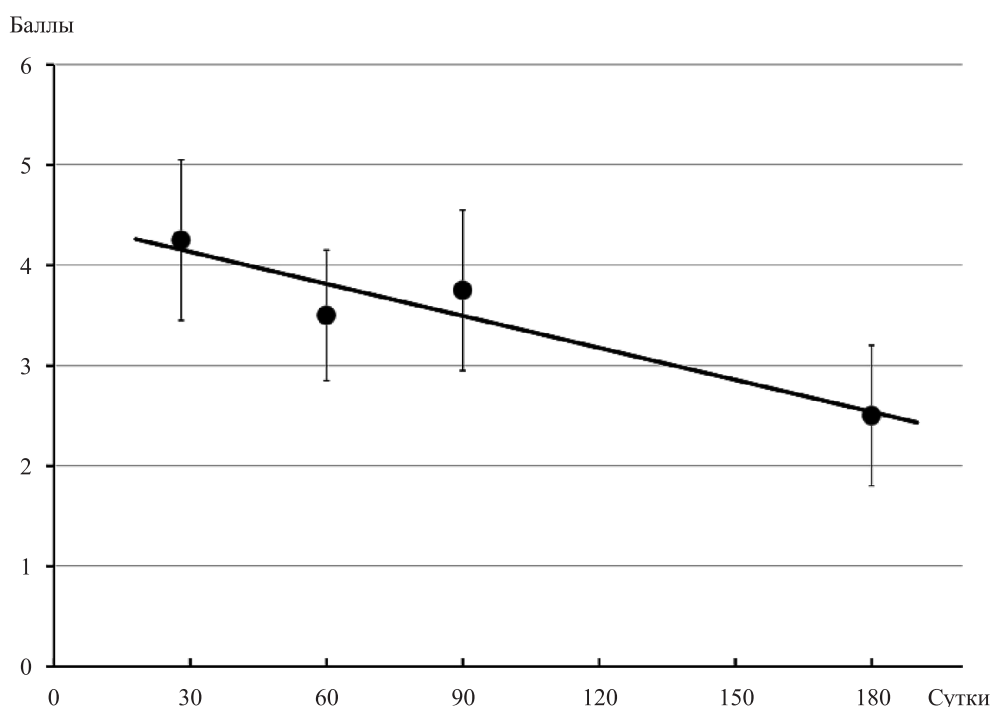


Рис. 3. Полуколичественная оценка реакции тканей на имплантацию частиц децеллюляризованного хряща свиньи

Fig. 3. Semi-quantitative assessment of tissue response to implantation of porcine decellularized cartilage particles

анализа крови крыс между животными контрольной и опытной групп не было.

Для выявления возможного повреждающего воздействия исследуемых образцов на печень, сердце и костную ткань в сыворотке крови животных определяли активность щелочной фосфатазы, аспартат- и аланинаминотрансфераз. Анализ полученных данных не выявил различий между группами в активности изучаемых ферментов и содержании общего билирубина, а также показателей белкового обмена в организме животных.

Введение исследуемых образцов крысам не повлияло на показатели мочи по сравнению с контрольной группой. Белок, глюкоза, билирубин, уробилиноген, нитриты, кетоновые тела, лейкоциты и аскорбиновая кислота в моче животных отсутствовали или находились ниже отметки первого значения, определяемого прибором Uriscan Optima как положительное.

При макроскопическом исследовании отчетливого влияния исследуемых образцов на состояние внутренних органов крыс не установлено. Различий между контрольной и опытной группами не обнаружено.

При гистологическом исследовании отчетливого влияния исследуемых образцов на состояние внутренних органов крыс не установлено. Не выявлено различий между контрольной и опытной группами.

Следовательно, образцы тканеспецифических матриц децеллюляризованного хряща свиньи не проявляют системного токсического действия на организм животных.

Репродуктивная токсичность

При наблюдении за половым поведением животных после ссаживания отмечено, что латентный пе-

риод и длительность половой активности у опытных самцов (с имплантированными образцами ДМЧХ) соответствовали контрольным самцам (ложнооперированные).

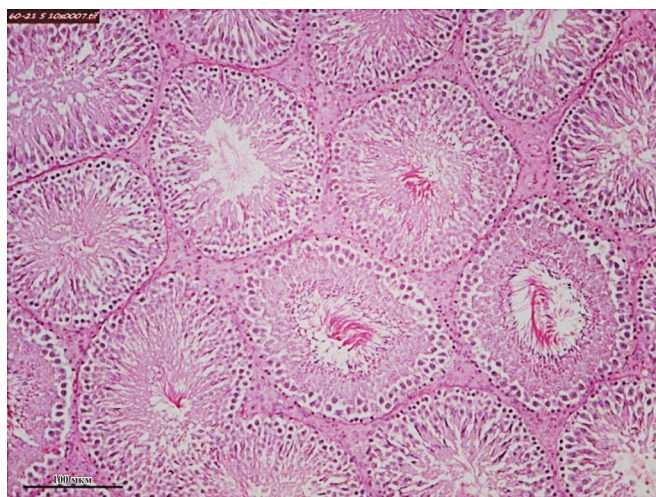
На протяжении беременности поведение самок опытных групп было аналогично контрольным животным. В период гестации прибавка массы беременных крыс опытных групп не отличалась от показателей контрольной группы.

Часть беременных самок подвергали эвтаназии на 20-й день беременности. На вскрытии подсчитывали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации в матке, количество живых и мертвых плодов, количество резорбций. При внешнем осмотре ни у одного эмбриона не было выявлено аномалий развития.

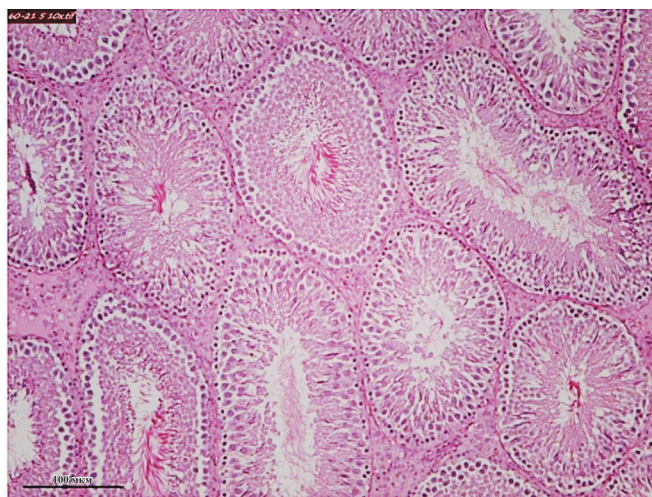
Часть беременных самок оставляли до родов, с целью наблюдения за выживаемостью и развитием потомства в течение 5 дней. Продолжительность беременности, количество рожденных крысят, их масса и кранио-каудальный размер статистически не отличались между опытными и контрольной группами. Мертворожденных не было ни у одной самки. После родов все самки проявляли инстинкт материнства. Выживаемость потомства в течение 5 суток составила 100% во всех группах. Развитие крысят в течение этого периода происходило без отклонений.

При гистологическом исследовании семенников (рис. 4) не было установлено изменений морфологической структуры органа и повреждения сперматогенного эпителия ни в одном случае, а аналогичное исследование яичников крыс не выявило морфологических изменений в органе (рис. 5).

Из полученных результатов следует, что имплантированные в мышечную ткань образцы ДМЧХ, как



Контрольная группа



Группа с имплантированным ДМЧХ

Рис. 4. Гистологический срез семенника крысы. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 4. Histological section of rat testis. H&E staining. $\times 100$

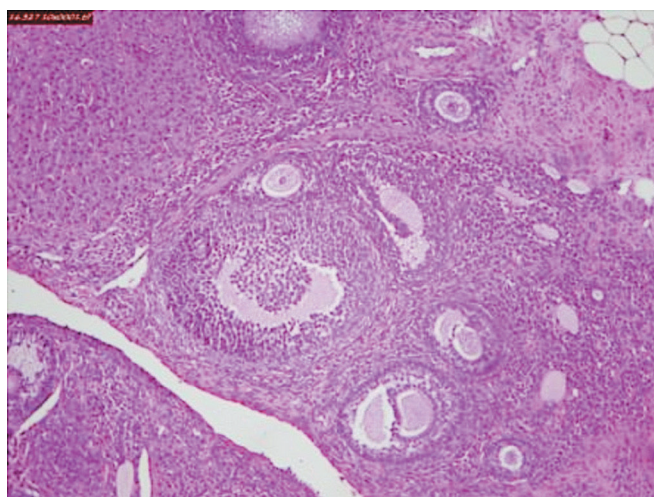
до спаривания животных, так и во время гестации, не проявляют отрицательного действия на репродуктивную систему животных.

Взаимодействие тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного хряща свиньи с клетками

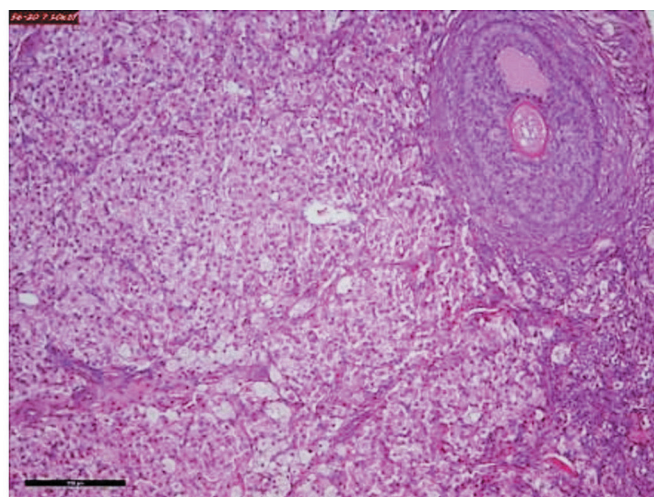
К 3-м суткам эксперимента количество пролиферирующих адгезированных МСК ЖТч составило $112 \pm 10 \times 10^3$ клеток/мм², а на 7-е сутки эксперимента количество пролиферирующих клеток удвоилось.

Исследование жизнеспособности клеток с применением красителя Calcein AM показало, что к 3-м суткам эксперимента визуализируется пролиферация клеток, равномерно распределенных по поверхности матрикса (рис. 6).

Морфология клеток нормальная, фибробластоподобная. К 7-м суткам количество клеток увеличивается, прикрепившиеся клетки равномерно распределены по поверхности матриксов ДМЧХ, имеют распластанную фибробластоподобную морфологию, сохраняют жизнеспособность и нормальную морфологию.



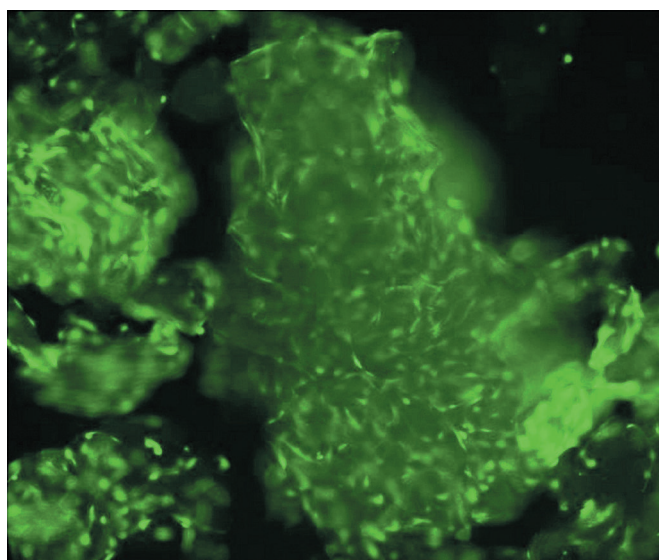
Контрольная группа



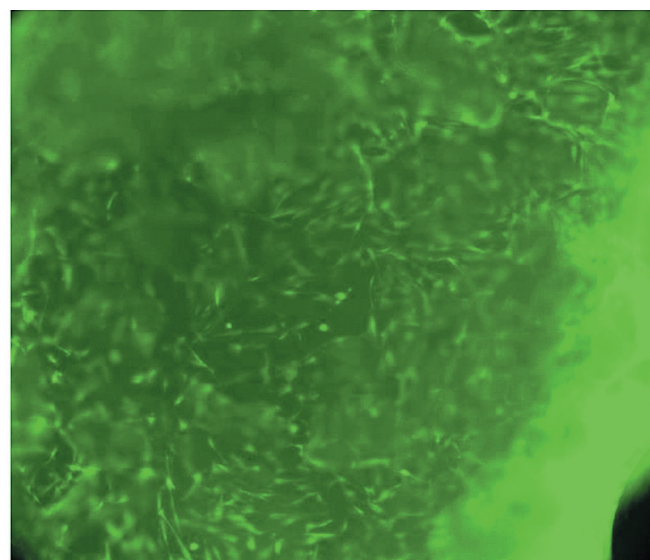
Группа с имплантированным ДМЧХ

Рис. 5. Гистологический срез яичника крысы. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 5. Histological section of rat ovary. H&E staining. $\times 100$



3 суток



7 суток

Рис. 6. МСК ЖТч на децеллюляризованных микродисперсных частицах хряща свиньи. Окрашивание Calcein AM. $\times 100$

Fig. 6. hAdMSCs cultured on decellularized microdispersed porcine cartilage particles. Calcein AM staining. $\times 100$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказана эффективность применения последовательной обработки ПАВ, ск-СО₂ и ДНКазой для получения биосовместимого тканеспецифического матрикса из ксеногенного материала – децеллюляризованного суставного хряща свиньи.

Проведенные эксперименты показали, что образцы мелкодисперсных децеллюляризованных тканей хряща свиньи не проявляют отрицательного биологического действия по показателям местного и общетоксического действия, гено- и репродуктивной токсичности и способны поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч.

Таким образом, полученный ксеногенный тканеспецифический мелкодисперсный матрикс может быть рекомендован для создания тканевых эквивалентов хрящевой ткани человека.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-15-00251).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Reddy MSB, Ponnammam D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers (Basel)*. 2021; 13 (7): 1105. doi: 10.3390/polym13071105.
- Jafari M, Paknejad Z, Rad MR, Motamedian SR, Eghbal MJ, Nadjmi N et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017; 105 (2): 431–459. doi: 10.1002/jbm.b.33547.
- Song R, Murphy M, Li C, Ting K, Soo C, Zheng Z. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des Devel Ther*. 2018; 12: 3117–3145. doi: 10.2147/DDDT.S165440.
- Vasilets VN, Surguchenko VA, Ponomareva AS, Nemets EA, Sevastianov VI, Bae JW et al. Effects of surface properties of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) on adhesion and proliferation of mouse fibroblasts. *Macromolecular Research*. 2015; 23: 205–213. doi: 10.1007/s13233-015-3025-1.
- Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840 (8): 2506–2519. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010.
- Paulo Zambon J, Atala A, Yoo JJ. Methods to generate tissue-derived constructs for regenerative medicine applications. *Methods*. 2020; 171: 3–10. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.09.016.
- Gupta SK, Mishra NC, Dhasmana A. Decellularization methods for scaffold fabrication. *Methods Mol Biol*. 2018; 1577: 1–10. doi: 10.1007/978-1-4939-9834-2_34.
- Cramer MC, Badylak SF. Extracellular matrix-based biomaterials and their influence upon cell behavior. *Ann Biomed Eng*. 2020; 48 (7): 2132–2153. doi: 10.1007/s10439-019-02408-9.
- Philips C, Campos F, Roosens A, Sánchez-Quevedo MDC, Declercq H, Carriel V. Qualitative and quantitative evaluation of a novel detergent-based method for decellularization of peripheral nerves. *Ann Biomed Eng*. 2018; 46 (11): 1921–1937. doi: 10.1007/s10439-018-2082-y.
- Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, Garcia-Urquia N, Olalde-Graells B, Abarrategi A. Tissue-specific decellularization methods: rationale and strategies to achieve regenerative compounds. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (15): 5447. doi: 10.3390/ijms21155447.
- Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 9831534. doi: 10.1155/2017/9831534.
- Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: a systematic review and future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (12): 4117. doi: 10.3390/ijms19124117.
- Sevastianov VI, Basok YB, Kirsanova LA, Grigoriev AM, Kirillova AD, Nemets EA et al. A comparison of the capacity of mesenchymal stromal cells for cartilage regeneration depending on collagen-based injectable biomimetic scaffold type. *Life*. 2021; 11 (8): 756. doi: 10.3390/life11080756.
- Song C, Luo Y, Liu Y, Li S, Xi Z, Zhao L et al. Fabrication of PCL scaffolds by supercritical CO₂ foaming based on the combined effects of rheological and crystallization properties. *Polymers (Basel)*. 2020; 12 (4): 780. doi: 10.3390/polym12040780.
- Gil-Ramírez A, Rosmark O, Spégel P, Swärd K, Westergren-Thorsson G, Larsson-Callerfelt A.K et al. Pressurized carbon dioxide as a potential tool for decellularization of pulmonary arteries for transplant purposes. *Sci Reports*. 2020; 10 (1): 4031. doi: 10.1038/s41598-020-60827-4.
- Алексеев ЕС, Алентьев АЮ, Белова АС, Богдан ВИ, Богдан ТВ, Быстрова АВ и др. Сверхкритические флюиды в химии. *Успехи химии*. 2020; 89 (12): 1337–1427. Alekseev ES, Alentiev AY, Belova AS, Bogdan VI, Bogdan TV, Bystrova AV et al. Supercritical fluids in chemistry. *Russ Chem Rev*. 2020; 89 (12): 1337–1427. [In Russ]. doi: 10.1070/RCR4932.
- Разгонова МП, Захаренко АМ, Сергиевич АА, Каленик ТК, Голохваст КС. Сверхкритические флюиды: теория, этапы становления, современное применение: учебное пособие. СПб.: Лань, 2019; 192. Razgonova MP, Zakharenko AM, Sergievich AA, Kalenik TK, Golokhvast KS. Sverxkriticheskie flyuidy: teoriya, e'tapy' stanovleniya, sovremennoe primeneniye: uchebnoe posobie. SPb.: Lan', 2019; 192.
- Nemets EA, Malkova AP, Dukhina GA, Lazhko AE, Basok YB, Kirillova AD et al. Effect of supercritical carbon dioxide on the in vivo biocompatible and resorptive properties of tissue-specific scaffolds from decellularized pig liver fragments. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2022; 13: 413–420. doi: 10.1134/S2075113322020319.

19. Ingrosso F, Ruiz-López MF. Modeling solvation in supercritical CO₂. *Chemphyschem*. 2017; 18: 2560–2572. doi: 10.1002/cphc.201700434.
20. Sevastianov VI, Nemets EA, Lazhko AE, Basok YuB, Kirsanova LA, Kirillova AD. Application of supercritical fluids for complete decellularization of porcine cartilage. *Journal of Physics: Conference Series*. XV International Russian Chinese Symposium «New Materials and Technologies». 2019; 1347 (1): 012081. doi: 10.1088/1742-6596/1347/1/012081.
21. Seo Y, Jung Y, Kim SH. Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis. *Acta Biomater*. 2018; 67: 270–281. doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.046.
22. Nemets EA, Lazhko AE, Basok YuB, Kirsanova LA, Kirillova AD, Sevastianov VI. Preparation of tissue-specific matrix from decellularized porcine cartilage. *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2020; 14: 1245–1251. doi: 10.1134/S1990793120080059.
23. Huang Z, Godkin O, Schulze-Tanzil G. The challenge in using mesenchymal stromal cells for recellularization of decellularized cartilage. *Stem Cell Rev Rep*. 2017 Feb; 13 (1): 50–67. doi: 10.1007/s12015-016-9699-8.
24. ГОСТ ISO 10993-6. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследование местного действия после имплантации. GOST ISO 10993-6. Izdeliya medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstviya medicinskix izdelij. Chast' 6. Issledovanie mestnogo dejstviya posle implantacii.
25. Basok YB, Kirillova AD, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Nemets EA, Sevastianov VI. Fabrication of microdispersed tissue-specific decellularized matrix from porcine articular cartilage. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2020; 11 (5): 1153–1159. doi: 10.1134/S2075113320050044.
26. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32: 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.

Статья поступила в редакцию 20.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 20.07.2022