

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-59-63>



ОЦЕНКА ЭЛИМИНАЦИИ ЯДЕРНОГО МАТЕРИАЛА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ДЕРМЫ

К.И. Мелконян¹, Т.В. Рушинова¹, Я.А. Козмай^{1*}, А.С. Асякина^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России
350063, Российская Федерация, Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»
350040, Российская Федерация, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

В исследовании была проведена сравнительная оценка степени дезинтеграции и элиминации ядерного материала в образцах децеллюляризированной дермы свиньи, получаемых с помощью химического, детергентного и ферментативного методов обесклевывания и выступающих в качестве потенциальных раневых покрытий. В качестве химического метода (Протокол № 1) выступала обработка растворами NaOH и H₂O₂, при детергентном методе (Протокол № 2) использовались растворы Тритона X-100 и дезоксихолата натрия в комбинации с Na₂-ЭДТА, при ферментативном (Протокол № 3) — растворы трипсина-Версена и свиной панкреатической ДНКазы. После получения образцов в них и в образцах нативной дермы (контрольная группа) проводился анализ количества ДНК, результаты которого показали соответствие критериям эффективного обесклевывания во всех образцах. Была установлена перспективность использования детергентного метода по сравнению с другими методиками создания обесклеванных дермальных матриц.

Ключевые слова: децеллюляризация, дермальные раневые покрытия, ядерный материал, детергентная обработка, ферментативный метод, химический метод

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Мелконян К.И., Рушинова Т.В., Козмай Я.А., Асякина А.С. Оценка элиминации ядерного материала при различных методах децеллюляризации дермы. *Биомедицина*. 2021;17(3E):59–63. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-59-63>

Поступила 16.04.2021

Принята после доработки 11.05.2021

Опубликована 20.10.2021

ASSESSMENT OF NUCLEAR MATERIAL ELIMINATION BY DIFFERENT METHODS OF DERMIS DECELLULARIZATION

Karina I. Melkonyan¹, Tatyana V. Rusinova¹, Yana A. Kozmai^{1*}, Alevtina S. Asyakina^{1,2}

¹ Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia
350063, Russian Federation, Krasnodar, Mitrofan Sedina Str., 4

² Kuban State University
350040, Russian Federation, Krasnodar, Stavropolskaya Str., 149

We carry out a comparative assessment of the degree of nuclear material disintegration and elimination in the samples of decellularized porcine dermis after using chemical, detergent and enzymatic decellularization methods. Decellularized dermis materials are promising materials as wound dressings. The chemical method (Protocol No. 1) was performed using NaOH and H₂O₂ solutions; the detergent method (Protocol No. 2) involved the solutions of Triton X-100 and sodium deoxycholate in combination with Na₂-EDTA; the enzymatic method (Protocol No. 3) was based on the solutions of trypsin Versene and porcine pan-

creatic DNase. Subsequently, we analyzed the DNA amount in decellularized and native dermis (control group) samples. The results of this analysis showed positive results in all three protocols. It was found that the detergent method have advantages over other methods of producing decellularized dermis matrices.

Keywords: decellularization, dermal wound dressings, nuclear material, detergent treatment, enzymatic method, chemical method

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Melkonyan K.I., Rusinova T.V., Kozmai Y.A., Asyakina A.S. Assessment of Nuclear Material Elimination by Different Methods of Dermis Decellularization. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):59–63. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-59-63>

Submitted 16.04.2021

Revised 11.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

В последние годы для решения проблемы нехватки донорских органов используется технология децеллюляризации. В её основе лежит разрушение клеточных мембран, органоидов и ядерного материала, в результате чего остаётся внеклеточный матрикс (ВКМ) [3]. Такой матрикс имеет трёхмерную структуру обескелеченной ткани и не обладает антигенной нагрузкой [6], что делает его перспективным материалом для использования в трансплантологии [4]. Особенно актуальным в настоящее время является создание децеллюляризованных дермальных матриксов, которые могут быть применены в ожоговой терапии и пластической хирургии.

Для проведения децеллюляризации могут применяться различные способы: физические, химические, детергентные и ферментативные [2, 5]. К физическим относят механическую и ультразвуковую обработку и заморозку/оттаивание; к химическим — воздействие щелочами и кислотами, а также гипертоническими солевыми растворами; в качестве детергентов могут использоваться ионные (дезоксихолат натрия, додецил сульфат натрия, Тритон-Х200), неионные (Тритон-Х100) и цвиттер-ионные (CHAPS, сульфобетаины) детергенты, к ферментам — трипсин, папаин и различные нуклеазы [2]. Стоит отметить, что различные методики и реагенты воздействуют

на ткани определённым образом, с чем связаны возможные негативные последствия децеллюляризации (например, нарушение биологических свойств матриксов в связи с нарушением их структурной организации). В связи с этим имеется необходимость подбора оптимального методики децеллюляризации, эффективность которой может быть охарактеризована с помощью оценки содержания оставшихся компонентов клеток, например ДНК [1].

Таким образом, **целью** нашего исследования является сравнительная оценка эффективности элиминации ядерного материала после химической, детергентной и ферментативной децеллюляризации дермы свиньи.

Материалы и методы

Основой для создания БМ была нативная кожа поросёнка (самец, возраст 2 мес.) породы Ландрас массой 13,4 кг, полученного из учебно-производственного комплекса «Пятачок» на базе Кубанского государственного аграрного университета. Животное наркотизировали растворами золетила (Zoletil 100, 1 мг/кг) и ксилазина (Rometar, «Spofa», 4 мл/кг). Животное содержалось в стационарной клетке, индивидуально. В качестве корма применялся стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для свиней КК 56. Водопроводная очищенная вода давалась в поилках *ad libitum*. Животные содержались в контролируемых

условиях окружающей среды: температура воздуха — 18–22°C, относительная влажность — 60–70%. Освещение в помещениях — естественно-искусственное, 12-часовой световой цикл. Образцы дермы толщиной 0,5 мм брали после предварительного механического удаления эпителиального слоя электродерматомом в стерильных условиях. Образцы дермы хранили при –80°C. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом (протокол № 96 от 29.01.2021).

При децеллюляризации по Протоколу № 1 (химический метод) образец дермы при температуре 25°C обрабатывали смесью 5% р-ра NaOH («Вектон», РФ) и 3% р-ра H₂O₂ («Иодные Технологии и Маркетинг», РФ) в соотношении 1:1 в течение 17 ч, затем отмывали в дистиллированной воде и нейтрализовали 1 н. H₂SO₄. По Протоколу № 2 дерму помещали в деионизированную воду на 4 ч. Затем проводили 2 цикла обработки 1% Тритоном X-100 («Sigma Aldrich», США) и 4% р-ром дезоксихолата натрия («Sigma Aldrich», США) в комбинации с 0,002 М Na₂-ЭДТА общей продолжительностью 12 ч при комнатной температуре в шейкере-инкубаторе (170 об./мин). При каждой смене растворов образцы отмывали деионизированной водой в течение 10 мин. По Протоколу № 3 размороженную дерму инкубировали в течение 6 ч (3 цикла по 2 ч) при 37°C в р-ре трипсина-Версена («Биолот», Россия). Затем с целью удаления ядерного материала клеток образцы инкубировали в р-ре свиной панкреатической ДНКазы («Sigma Aldrich», США; 2000 ЕД в 200 мл фосфатного буфера) при 37°C в течение 4 ч. Между циклами также проводилась отмывка образцов деионизированной водой.

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. Статистическая обработка полученного материала производилась с использованием пакета программ MS Excel, v6.0, GraphPad Prism version 6.04. 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 их обсуждение

В результате использования различных протоколов обесклевывания были получены образцы децеллюляризированной дермы. Количественный анализ показал, что содержание ДНК в полученных образцах после обработки по всем протоколам снижалось примерно в три раза по сравнению с содержанием в нативной дерме свиньи (рис.). При этом содержание ДНК в образцах, полученных химическим методом (Протокол № 1), по сравнению с данными образцов, обработанных детергентным и ферментативным методами (Протоколы № 2 и № 3 соответственно), было повышено на 18,05 и 26,05% соответственно.

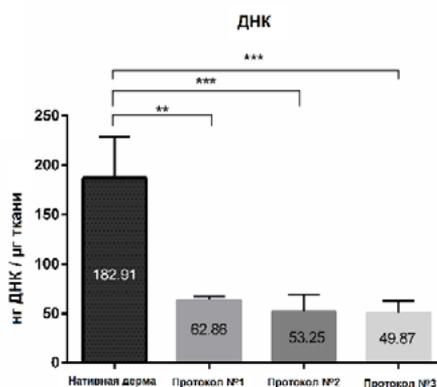


Рис. Количественный анализ содержания ДНК в нативной и децеллюляризированной различными методами дерме свиньи. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Fig. Quantitative DNA analysis in native and decellularized porcine dermis by various methods. ** — $p < 0.01$; *** — $p < 0.001$.

Полученные результаты иллюстрируют эффективность обесклевивания по Протоколам № 2 и № 3, с помощью которых из клеточных матриц был успешно удалён ядерный материал до требуемых для децеллюляризации и успешной имплантации показателей (~50 нг/мг ткани) [1, 2].

Выводы

Несмотря на различные подходы к децеллюляризации дермы, использованные нами методики показывают удовлетворительные результаты по количественному содержанию нуклеиновых кислот в матриксах. Тем не менее, хотя наилучшие ре-

зультаты показал ферментативный метод, являющийся наиболее «мягким» методом обесклевивания, стоит отметить, что этот метод наиболее дорогостоящий, что значительно увеличивает стоимость получаемых материалов. В связи с этим наиболее перспективным методом децеллюляризации выступает детергентный метод, показавший большую эффективность при элиминации ДНК дермы. Однако необходимо отметить, что химический метод при дальнейшей разработке, направленной на более эффективное разрушение ядерного материала, позволит существенно снизить себестоимость получаемых дермальных матриц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Максяткина Л.В., Абагов Н.Т., Ахмалтдинова Л.Л., Бадыров Р.М., Трошин В.В. Применение биоимплантов при пластике дефектов передней брюшной стенки. *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. 2019;1:304–309. [Maksyatkina L.V., Abatov N.T., Ahmaltidinova L.L., Badyrov R.M., Troshin V.V. Primenenie bioimplantov pri plastike defektov peredney bryushnoy stenki [The use of bioimplants for plastic surgery of defects of the anterior abdominal wall]. *Bulletin of the Kazakh National Medical University*. 2019;1:304–309. (In Russian)].
2. Срапо Р.М., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
3. Duisit J., Maistriaux L., Bertheuil N., Lellouch A.G. Engineering vascularized composite tissues by perfusion decellularization/recellularization: Review. *Current Transplantation Reports*. 2021;8(2):1–13. DOI: 10.1007/s40472-021-00317-2.
4. Faulk D.M., Badylak S.F. Natural biomaterials for regenerative medicine applications. *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. 2014;8:101–112. DOI: 10.1016/B978-0-12-398523-1.00008-2.
5. Hussein K.H., Park K.M., Teotia P.K., Yang J.W., Kim H.M., Honq S.H., Yang S.R., Park I.C., Park S.M., Woo H.M. Fabrication of a biodegradable xenoantigen-free rat liver scaffold for potential drug screening applications. *Transplantation Proceedings*. 2013;45(8):3092–3096. DOI: 10.1016/B978-0-12-398523-1.00008-2.
6. Keane T.J., Swinehart I.T., Badylak S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. 2015;84:25–34. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мелконян Карина Игоревна, к.м.н., ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: kimelkonian@gmail.com

Karina I. Melkonyan, Cand. Sci. (Med.), Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: kimelkonian@gmail.com

Русинова Татьяна Викторовна, к.б.н., ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: rusinova.tv@mail.ru

Tatyana V. Rusinova, Cand. Sci. (Biol.), Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: rusinova.tv@mail.ru

Козмай Яна Андреевна*, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: yana.kozmay@gmail.com

Yana A. Kozmai*, Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: yana.kozmay@gmail.com

Асякина Алевтина Сергеевна, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России; ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»;
e-mail: alevtina.asyakina@mail.ru

Alevtina S. Asyakina, Kuban State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; Kuban State University;
e-mail: alevtina.asyakina@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author