

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ МЕТОДИКИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ БИОСОВМЕСТИМЫХ КСЕНОДЕРМАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

DOI: 10.17691/stm2022.14.1.04

УДК 616.5–089.844:544

Поступила 28.09.2021 г.



К.И. Мелконян, к.м.н., доцент, зав. центральной научно-исследовательской лабораторией¹;
Я.А. Козмай, младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории¹;
А.А. Веревкин, к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории¹;
Т.В. Русинова, к.б.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории¹;
А.С. Асякина, лаборант-исследователь¹; магистрант кафедры генетики, микробиологии и биохимии²;
М.Л. Золотавина, к.б.н., доцент кафедры генетики, микробиологии и биохимии²

¹Кубанский государственный медицинский университет, ул. Митрофана Седина, 4, Краснодар, 350063;

²Кубанский государственный университет, ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040

Цель исследования — подбор оптимальной методики создания хирургических биоматериалов на основе дермы свиньи и оценка их биологической безопасности.

Материалы и методы. Для создания ксенодермальных биоматериалов использованы образцы нативной кожи поросенка породы Ландрас возрастом 4 мес. Обработку дермы проводили солевым (протокол №1), перекисно-щелочным (протокол №2) и щелочным (протокол №3) растворами. Полученные образцы окрашивали гематоксилином и эозином, а также флуоресцентным красителем DAPI, проводили количественный анализ ДНК и оценивали цитотоксичность методом LIVE/DEAD. Подкожную имплантацию/инъекцию образцов биоматериалов выполняли лабораторным животным — самцам крыс породы Wistar (n=30) возрастом 6 мес, массой тела 260±20 г — с эксплантацией на 14-е сутки эксперимента. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Компьютерную морфометрию проводили с помощью программы GraphPad Prism v. 6.04.

Результаты. Полученные по трем протоколам образцы хирургических материалов обладали различными физическими характеристиками: после обработки по протоколу №1 дерма приобретала плотную структуру и белый цвет; по протоколу №2 — прозрачную и плотную структуру; по протоколу №3 — прозрачную гелеобразную структуру. Результаты гистологического анализа показали оксифильность и потерю структуры внеклеточного матрикса всех образцов, а окрашивание DAPI — разрушение клеточных ядер. Тем не менее количество ДНК в образцах, обработанных по протоколу №1, не соответствовало признанному критерию качества децеллюляризации (50 нг на 1 мг сухого веса). На основании этого дальнейшая оценка цитотоксичности *in vitro* и *in vivo* проводилась только для образцов, полученных по протоколам №2 и №3. По результатам анализа LIVE/DEAD оба образца не обладали токсичностью по отношению к клеткам. На 14-е сутки после подкожной имплантации образцов у животных не обнаруживалось признаков нагноения и иммунного отторжения.

Заключение. Для получения хирургических материалов в форме биопластических покрытий рекомендуется использовать щелочно-перекисную обработку дермы, а для получения гидрогелевых покрытий — щелочной гидролиз.

Ключевые слова: ксенодермальные материалы; хирургические биоматериалы; дерма; щелочной гидролиз; обесклевывание.

Как цитировать: Melkonyan K.I., Kozmai Y.A., Verevkin A.A., Rusinova T.V., Asyakina A.S., Zolotavina M.L. Selection of the optimal method for creating various forms of biocompatible xenodermal materials. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2022; 14(1): 34, <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.1.04>

Для контактов: Мелконян Карина Игоревна, e-mail: kimelkonian@gmail.com

Selection of the Optimal Method for Creating Various Forms of Biocompatible Xenodermal Materials

K.I. Melkonyan, MD, PhD, Associate Professor, Head of the Central Research Laboratory¹;
 Y.A. Kozmai, Junior Researcher, Central Research Laboratory¹;
 A.A. Verevkin, MD, PhD, Researcher, Central Research Laboratory¹;
 T.V. Rusinova, PhD, Researcher, Central Research Laboratory¹;
 A.S. Asyakina, Assistant Researcher¹; Graduate Student, Department of Genetics, Microbiology, and Biochemistry²;
 M.L. Zolotavina, PhD, Associate Professor, Department of Genetics, Microbiology, and Biochemistry²

¹Kuban State Medical University, 4 Mitrofana Sedina St., Krasnodar, 350063, Russia;

²Kuban State University, 149 Stavropolskaya St., Krasnodar, 350040, Russia

The aim of the study was to select the optimal method for creating surgical porcine dermis-based biomaterials and to assess their biological safety.

Materials and Methods. To create xenodermal biomaterials, the native skin of a 4-month-old Landrace pig was used. The porcine dermis was processed with saline (protocol No.1), peroxide-alkaline (protocol No.2), and alkaline (protocol No.3) solutions. The obtained samples were stained with hematoxylin-eosin and a DAPI fluorescent dye. Quantitative DNA analysis and assessment of cytotoxicity by the LIVE/DEAD assay were also performed. Samples were implanted/injected subcutaneously to 6-month-old male Wistar rats (n=30) weighing 260±20 g and explanted on day 14 of the experiment. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin. Computer morphometry was performed using GraphPad Prism v. 6.04.

Results. Samples of surgical materials obtained according to the three protocols had different physical characteristics: dermis treated according to protocol No.1 was dense and white in color after processing; samples processed by protocol No.2 were transparent and dense, and samples treated according to protocol No.3 had transparent gel-like structures. Histological analysis has shown oxyphilicity and extracellular matrix structure loss in all samples, and DAPI staining has revealed the destruction of cell nuclei. Nevertheless, DNA amount in the samples processed according to protocol No.1 did not meet the established quality criterion for decellularization (50 ng/mg dry weight). Further cytotoxicity assessment *in vitro* and *in vivo* was carried out only for samples fabricated according to protocols No.2 and No.3. According to the LIVE/DEAD analysis, both samples were not cytotoxic. On day 14 after the subcutaneous sample implantation, no signs of supuration and immune rejection were found in the animals.

Conclusion. To obtain surgical materials in the form of bioplastic coatings, it is recommended to use alkaline-peroxide treatment of the dermis, while hydrogel coatings are produced by alkaline hydrolysis.

Key words: xenodermal biomaterials; surgical biomaterials; dermis; alkaline hydrolysis; decellularization.

Введение

В настоящее время остается актуальной разработка различных реконструктивных материалов, используемых в качестве раневых покрытий и хирургических имплантатов при заболеваниях различной этиологии [1]. Существующие стандарты в хирургии предполагают использование собственных тканей пациента для замещения дефектов, что, несомненно, дает лучший эффект по сравнению с применением ксеногенных материалов [2]. Однако дополнительный объем хирургического вмешательства, травматичность и трудность фиксации собственных тканей ограничивают применение данного метода, вследствие чего постоянно идет поиск новых биосовместимых, биodeградируемых материалов для решения широкого спектра клинических задач.

На современном фармацевтическом рынке предлагаются различные формы биоматериалов в зависимо-

сти от специфики их применения. Так, например, имеются продукты, представленные в виде матриксов, лиофилизатов, порошков, пленок, гидрогелей, губчатых материалов и патчей [3, 4]. Функциональной особенностью многих хирургических материалов является комплексное благоприятное воздействие на ткани: они могут быть носителями лекарственных веществ и обеспечивать доставку в зону поражения необходимых биологически активных веществ, факторов роста и стимуляторов регенерации [4–6].

Активно исследуются и внедряются в клиническую практику хирургические материалы, являющиеся аналогами внеклеточного матрикса (ВКМ) и имитирующие клеточное микроокружение: синтетические каркасы, полученные из полимерных субстратов (например, поликапролактона, полиэтиленгликоля и полигликолевой кислоты); гидрогели, синтезированные из сшитых гидрофильных полимеров (например, полиакриловой кислоты, полиэтиленгликоля и поливинилового

спирта); каркасы на керамической основе, изготовленные из гидроксиапатита или трикальцийфосфата. Также имеются материалы на основе природных биополимеров из животного и растительного сырья: альгинаты, хитозан, хондроитинсульфаты, целлюлоза, желатин, декстрин, фиброин шелка и коллаген [7, 8]. Недостатком синтетических материалов является неспособность к биодеградации и частые послеоперационные осложнения (инфильтраты, абсцессы, свищи, гнойно-воспалительные процессы). Биологические материалы на основе ВКМ соединительной ткани вызывают минимальную местную воспалительную реакцию и обеспечивают естественную среду для функционального восстановления ткани [9]. Стоит отметить, что биосовместимость и структурное сходство биологических материалов с нативным ВКМ делают их желательными для использования в качестве поддерживающих и замещающих имплантатов, а также для ускорения регенерации тканей.

Биологические материалы могут быть получены с помощью методов мягкой литографии, электроспиннинга, 3D-печати или децеллюляризации (обесклевывания) тканей [8]. При этом наиболее предпочтительным методом является технология децеллюляризации, которая позволяет сохранять гистоструктуру коллагенсодержащих ксено- и аллогенных тканей [10]. Химические методы обесклевывания наиболее оптимальны, так как они способствуют максимальному удалению клеток при минимальном повреждении ВКМ тканей, сохранению его трехмерной ультраструктуры, пространственной топологии и химического состава. Также следует подчеркнуть, что обесклевывание с помощью химических агентов обычно считается рентабельным методом; тем не менее сравнительно большая длительность обработки может быть существенной проблемой для оптимизации сроков получения данных материалов [11]. Достаточно популярны методики децеллюляризации на основе обработки коллагенсодержащих тканей щелочными растворами [12]. Чаще всего децеллюляризованные матрицы для медицинского применения изготавливают из ксеногенных тканей [13]. Поэтому процедура получения очищенного ВКМ должна обеспечивать отсутствие реакции отторжения ксенотрансплантата при его имплантации в ткани пациента.

Таким образом, вышесказанное позволяет сделать вывод о необходимости разработки биологических хирургических материалов с тканеспецифичной совместимой основой, обладающих способностью к биоинтеграции и оптимизирующих регенерацию ран.

Цель исследования — подбор оптимальной методики создания хирургических биоматериалов и оценка их биологической безопасности.

Материалы и методы

Забор и децеллюляризация образцов дермы. Основой для создания ксенодермальных биоматери-

алов была нативная кожа поросенка породы Ландрас возрастом 4 мес. Животному вводили летальные дозы Золетила и Ксилазина. С помощью электродерматома (диаметр дискового ножа — 100 мм) с донорского участка кожи животного удаляли эпидермис, после чего забирали образцы дермы массой $0,50 \pm 0,03$ г, толщиной $0,50 \pm 0,05$ мм. Образцы подвергали химической децеллюляризации по трем известным методикам с модификациями: протокол №1 — обработка концентрированными растворами солей [14], протокол №2 — обработка растворами щелочи и пероксида водорода [15], протокол №3 — обработка щелочным раствором [15].

По протоколу №1 образцы находились в пере-сыщенном солевом растворе, содержащем 1,19 М KCl, 1,74 М NaCl и 0,86 М CaCl₂ («Реахим», Россия), в течение 96 ч при температуре 25°C, гидромодуль (ткань:раствор) — 1:3. Избыток солей удаляли последовательным промыванием в 3% растворе борной кислоты («Реахим»), в деионизированной воде, в 0,3% растворе ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, США), после чего образцы отмывали в деионизированной воде до стабилизации pH.

По протоколу №2 образцы дермы обрабатывали смесью 5% раствора NaOH («Вектон», Россия) и 3% раствора H₂O₂ («Йодные технологии и маркетинг», Россия) в соотношении 1:1 при температуре 25°C в течение 48 ч, при гидромодуле 1:5. Затем образцы отмывали в деионизированной воде до стабилизации pH.

По протоколу №3 образцы обрабатывали 5% NaOH в течение 12 ч, при гидромодуле 1:5. После этого образцы промывали деионизированной водой до стабилизации pH.

Все образцы дермы подвергались рутинному гистологическому анализу до и после обработки для оценки сохранности структуры ВКМ.

Количественный анализ ДНК. После обработки дермы определяли содержание ДНК с использованием набора реагентов (DNeasy Blood & Tissue Kit; QIAGEN, Швеция) по протоколу фирмы-изготовителя на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Оценка деструкции клеточных ядер методом окрашивания DAPI. Проводили окрашивание DAPI: парафиновые срезы полученных материалов толщиной 4–5 мкм фиксировали 4% формальдегидом в течение 10 мин. Затем DAPI (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:1000 добавляли к образцам и инкубировали в течение 5 мин.

Оценка цитотоксичности биоматериалов методом LIVE/DEAD. Для анализа LIVE/DEAD (набор LIVE/DEAD Cell Imaging Kit; Thermo Fisher Scientific, США) использовали линию человеческих дермальных фибробластов DF-1, полученных из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки инкубировали в среде DMEM (Gibco, Англия) с образцами биоматериалов в течение суток, затем окрашивали

флуоресцентными красителями кальцеином-AM и гомодимером этидия, при этом живые клетки приобрели зеленое, а мертвые — красное свечение. Визуализацию флуоресцентного свечения проводили с помощью программного обеспечения Olympus cellSens Entry (Olympus, Япония).

Подкожные тесты. Подкожную имплантацию/инъекцию образцов биоматериалов выполняли лабораторным животным — самцам крыс породы Wistar (n=30) возрастом 6 мес, массой тела 260±20 г. Животных наркотизировали 14 мл/кг раствора Золетила 100 и 1,2 мл/кг раствора Седамидина, затем вводили исследуемые материалы под кожу в межлопаточной области. Крыс выводили из наркоза раствором Антимедина (20 мг/кг). На 14-е сутки после подкожных тестов биоматериалов осуществляли эксплантацию образцов, проводили их морфологический и гистологический анализ.

Микроскопия. Микроскопические, гистологические и флуоресцентные исследования проводили в трех полях зрения/срезах для каждого образца с использованием микроскопа Olympus CX41 (Olympus), данные и изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Olympus cellSens Entry.

Исследование было одобрено Независимым этическим комитетом Кубанского государственного медицинского университета. Все манипуляции соответствовали требованиям приказа Минздрава России от 23.08.2010 г. №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» и Федерального закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 г.

Статистическую обработку данных морфометрии образцов биоматериалов и количественного анализа содержания ДНК в образцах осуществляли с помощью GraphPad Prism v. 6.04. Для проверки характера распределения значений использовали критерий Шапиро–Уилка. Поскольку распределение не отличалось от нормального, результаты представляли в виде $M \pm S$, где M — среднее арифметическое, S — стандартное отклонение. Для сравнения содержания ДНК в образцах различных биоматериалов использовали t -критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Образцы биологического материала, полученные по протоколу №1 с использованием концентрированного солевого раствора, приобрели белый цвет, были достаточно прочными, не продавливались под нажимом пинцета (рис. 1, а, б). Средняя толщина образцов составила $1,0 \pm 0,05$ мм. Образцы биоматериалов, обработанные по протоколам №2 и №3, после стабилизации pH стали полупрозрачными (рис. 1, в–е). Средняя толщина образцов, полученных по протоколу №2, составила также $1,0 \pm 0,05$ мм. Образцы дермы, обработанные по протоколу №3, через 12 ч приобрели гелеобразную структуру (рис. 1, ж).

При гистологическом исследовании образцы дермы, полученные после обработки по протоколам №1 и №2, в отличие от нативной ткани (рис. 2, а) имели вид оксифильной массы, представленной разнонаправленными тяжами пучков коллагеновых волокон,

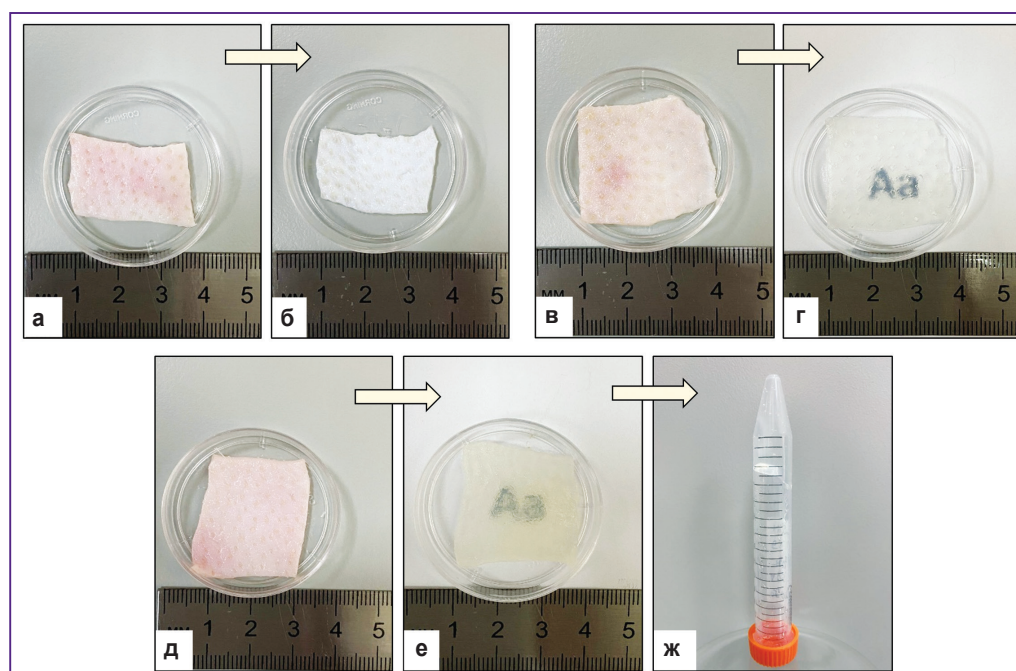


Рис. 1. Внешний вид образцов до (а) и после (б) обработки по протоколу №1; до (в) и после (г) обработки по протоколу №2; до (д) и после (е, ж) обработки по протоколу №3

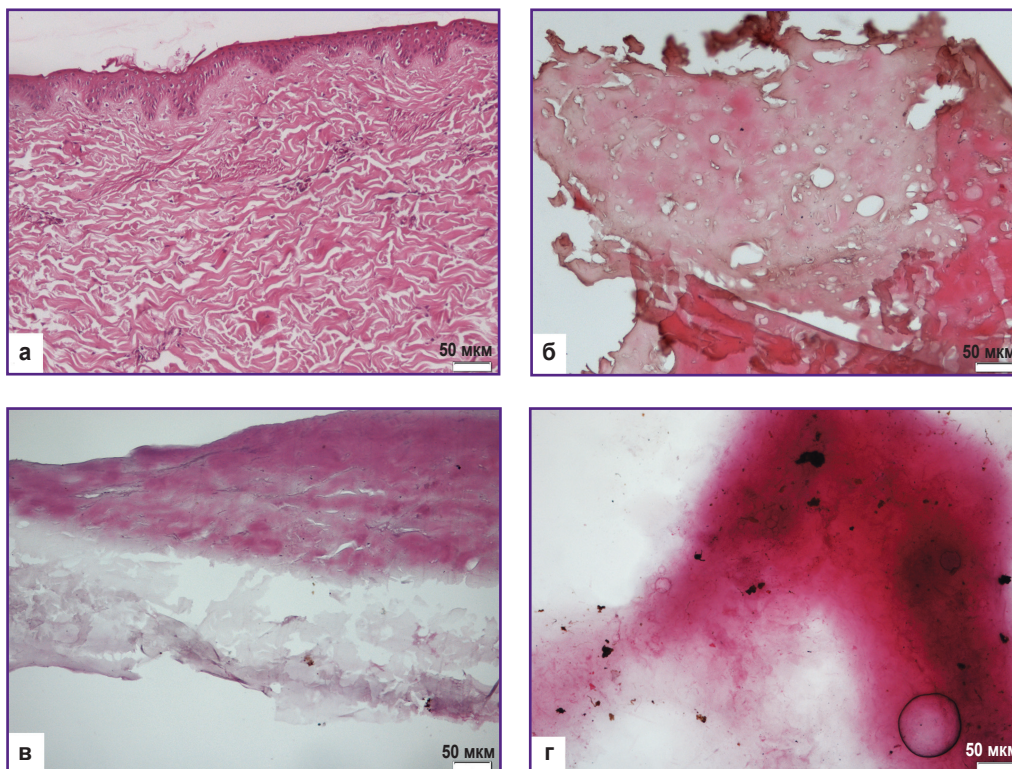


Рис. 2. Гистологический анализ образцов нативной дермы (а), после обработки по протоколу №1 (б), протоколу №2 (в) и протоколу №3 (г); ×100

структура которых была преимущественно гомогенна (рис. 2, б, в). Материал, обработанный по протоколу №3, также представлял собой оксифильную структуру, в которой наблюдались наиболее выраженный гидролиз и набухание полимеров (рис. 2, г).

Окрашивание DAPI показало отсутствие клеточных ядер во всех образцах, что доказывает эффективность процедуры обескелчивания и, возможно, лучшую цитосовместимость материалов при их применении (рис. 3).

Для определения оптимальных условий и эффективности процесса обескелчивания был проведен количественный анализ ДНК (рис. 4). Исследование показало, что количество ДНК в образцах, полученных по протоколам №2 и №3, статистически значимо снижалось до 25,51% ($47,95 \pm 2,03$ нг/мг сухого вещества; $p \leq 0,05$) и 20,57% ($38,66 \pm 1,64$ нг/мг сухого вещества; $p \leq 0,05$) соответственно относительно содержания ДНК в нативной дерме ($187,96 \pm 5,21$ нг/мг сухого вещества — 100%). При этом содержание ДНК в образцах, обработанных по протоколу №1, составило более 50 нг на 1 мг сухого веса, что не соответствовало признанному критерию качества децеллюляризации [16], поэтому эти образцы не подвергались дальнейшим исследованиям.

Анализ данных, полученных по методике LIVE/DEAD, продемонстрировал большое количество жизнеспособных клеток после сокультивации образцов

биологических материалов, полученных по протоколам №2 и №3, и дермальных фибробластов, что свидетельствовало об отсутствии цитотоксического действия образцов исследуемых матриц (рис. 5).

На рис. 6 представлены результаты подкожных тестов экспериментальных биоматериалов. У всех животных в месте введения образцов после обработки дермы по протоколам №2 и №3 отсутствовали макроскопические признаки воспаления на 14-е сутки, не наблюдалось нагноений и отека мягких тканей в области имплантации (рис. 6, б, д, е). У животных с подкожной имплантацией образцов биоматериалов по протоколу №2 образовалась соединительнотканная капсула, но фиксации имплантата к окружающим тканям не отмечалось (рис. 6, в).

При гистологической оценке тканевой реакции на имплантацию образцов, полученных по протоколам №2 и №3, было установлено, что на 14-е сутки в месте введения образцов исследуемых дермальных материалов в подлежащие ткани не наблюдалось признаков воспаления и формирования соединительнотканной капсулы (рис. 7).

Дермальные материалы характеризовались частичной биодеградацией, были незначительно пропитаны фибринозным экссудатом, что свидетельствует о возможности их применения как основы для регенерации и биоинтеграции в ткани при хирургическом лечении.

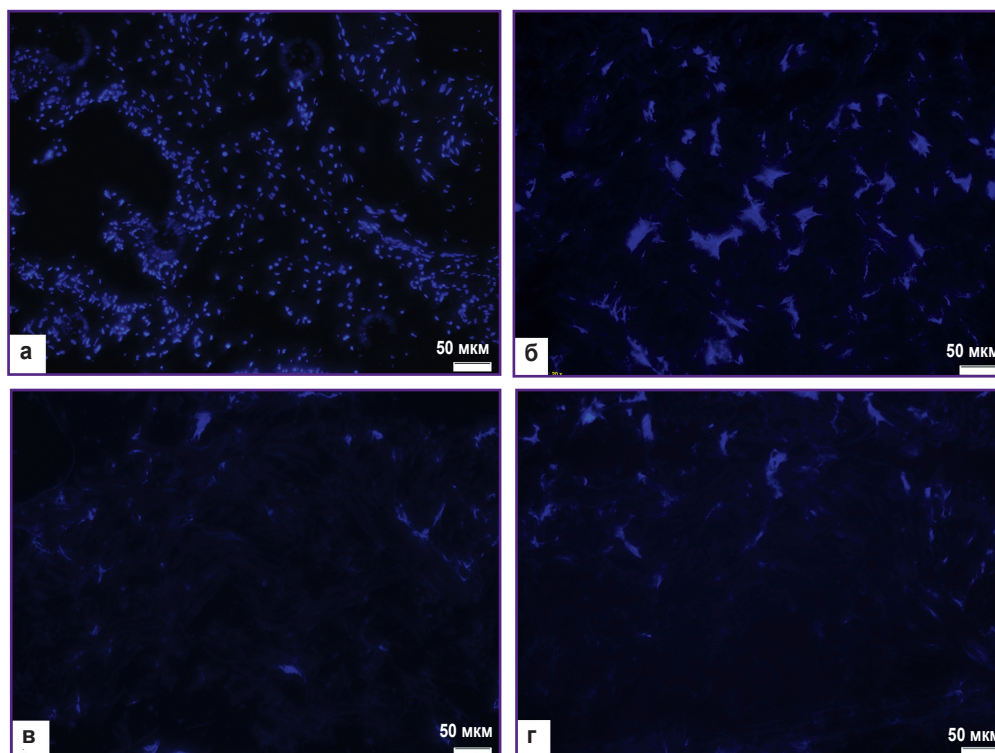


Рис. 3. Результаты окрашивания DAPI образцов нативной дермы (а), после обработки по протоколу №1 (б), протоколу №2 (в) и протоколу №3 (г); $\times 200$

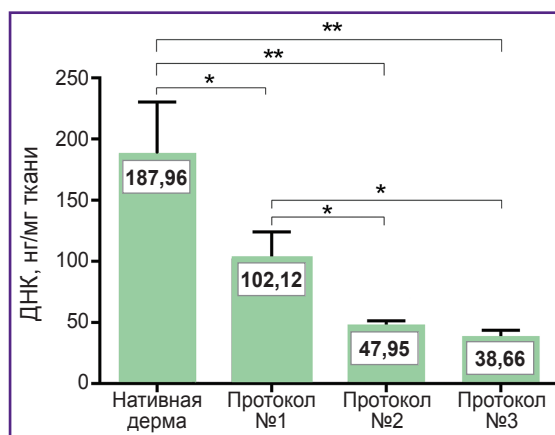


Рис. 4. Результаты количественного анализа ДНК:
* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$

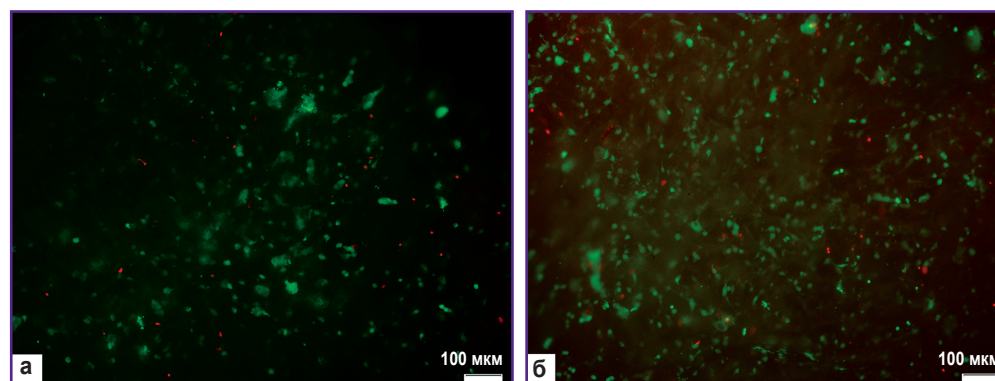


Рис. 5. Оценка цитотоксичности биоматериалов:
а — протокол №2; б — протокол №3; зеленое окрашивание — живые клетки, красное окрашивание — мертвые клетки; $\times 100$

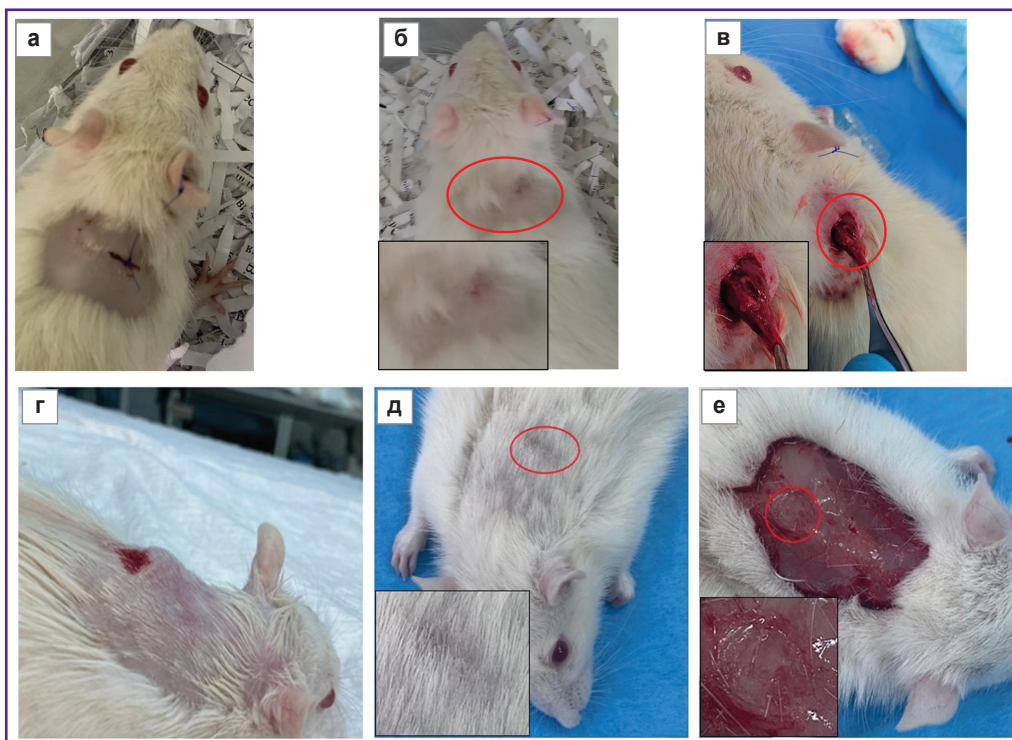


Рис. 6. Результаты подкожных тестов, 14-е сутки:
а-в — протокол №2; г-е — протокол №3

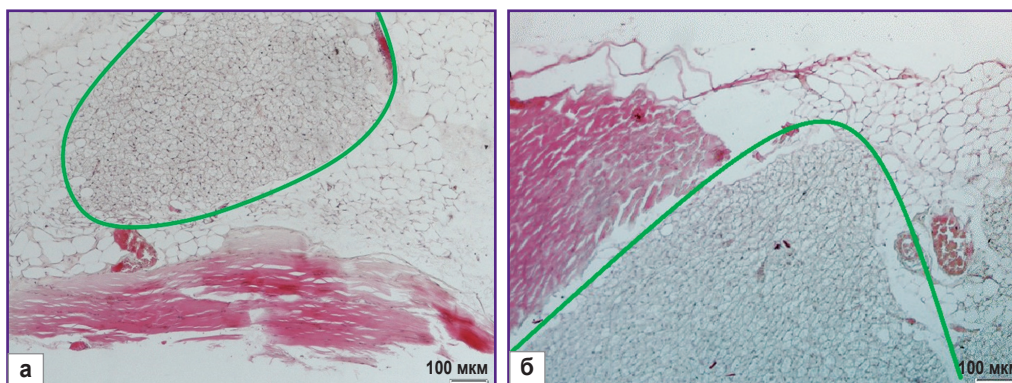


Рис. 7. Окраска гематоксилином и эозином, 14-е сутки:
а — протокол №2; б — протокол №3. Зелеными линиями показаны границы образцов и окружающих тканей; ×100

Обсуждение

В настоящее время имеются данные о современных технологиях децеллюляризации тканей с применением щелочного гидролиза для хрящевой ткани, амниотической мембраны и подслизистой оболочки кишечника, однако исследования по обработке дермы свиньи с применением щелочной технологии достаточно малочисленны и противоречивы [17, 18]. В нашей работе разработаны моно- и поликомпонентные методики щелочной и солевой обработки сырья для получения различных форм дермального ВКМ, а так-

же проведена комплексная оценка биологической совместимости и безопасности полученных материалов. Имеются единичные работы, которые посвящены комплексной оценке биосовместимости и безопасности ацеллюлярных дермальных материалов для применения в медицинской практике. Так, например, D. Li с соавт. [19] проводили подобные исследования, но в отношении биологических материалов на основе кожи рыб. D.M. Hoganson с соавт. [20] предложили методику получения ацеллюлярного дермального матрикса на основе дермы свиньи, обладающего значительной биологической активностью и безопасностью в отно-

шении клеточных культур, что соотносится с полученными нами данными.

Обработка растворами детергентов известна как один из наиболее эффективных методов получения децеллюляризованного ВКМ из плотных волокнистых соединительных тканей [18]. Однако большинство детергентов (Тритон X-100, дезоксихолат натрия, додецилсульфат натрия, CHAPS) [16] достаточно дорогостоящие, требуется дополнительная обработка ферментами (нуклеазами, трипсином, диспазами и др.), что увеличивает себестоимость получаемого материала. Разрабатываемая нами технология обработки дермы основана на использовании достаточно недорогих химических реагентов, таких как пероксид водорода, растворы минеральных солей и щелочей. Предложенные нами алгоритмы просты в использовании, так как не предусматривают многоступенчатой обработки и позволяют получить биологически безопасные материалы.

Количественный анализ содержания ДНК показал, что, несмотря на высокую степень разрушения гистоархитектоники нативной дермы и схожую гистоморфологическую картину для всех образцов полученных биологических материалов, обработка концентрированными растворами солей не полностью удаляет ядерный материал клеток дермы (протокол №1). Высокое содержание ДНК в образцах, обработанных растворами концентрированных солей, может быть объяснено тем, что при этом процессе происходит только нарушение клеточных мембран с частичным разрушением интегрированных внутрь клеток молекул, что обуславливает необходимость дополнительной ферментативной обработки [16]. Для увеличения степени обескелчивания дермы необходима модификация протокола №1 путем либо добавления детергентов (Тритона X-100, додецилсульфата натрия, дезоксихолата натрия и т.п.) и ферментов, либо увеличения времени и количества циклов обработки материала. Данный вывод подтверждается исследованиями [20, 21], в которых применяли многоступенчатую обработку органическими растворителями, детергентами, солевыми растворами и ферментами, при этом показатели ДНК не превышали 50 нг/мг ткани.

Щелочные растворы вызывают эффективный гидролиз и солюбилизацию клеточных компонентов, а также белков и гликопротеинов ВКМ, присутствие которых в матриксе может приводить к нежелательному ответу организма реципиента [22].

Полученные после щелочно-перекисной и щелочной обработки образцы представляли собой разные по структуре материалы — биопластический материал и гидрогель. Разница в форме биоматериалов, вероятно, связана с набуханием пучков волокон коллагена, происходящим при обработке щелочными растворами. Процесс набухания вызван ионизацией боковых групп цепей тропоколлагена в растворе с высоким значением pH, а также диссоциацией связанных с коллагеном молекул гликозаминогликанов.

В результате набухания увеличивается расстояние между пучками волокон коллагена и сеть коллагенов разрыхляется. Однако определенное действие оказывает и высокая степень окисляющей способности перекиси водорода. Достаточно высокая концентрация перекиси водорода (3%) значительно увеличивает прочностные характеристики полученного биопластического материала, не допуская высокой степени гидролиза коллагена. Это коррелирует с литературными данными — при относительно высоких концентрациях перекиси водорода (более 0,5%) коллагеновые материалы демонстрируют увеличение предельной прочности на разрыв [11, 23]. Стоит также отметить возможные процессы разрушения и вымывания гликозаминогликанов, входящих в состав гликопротеинов, участвующих в процессах упаковки волокон коллагена в пучки. Возможно, утолщение и структурная гомогенность пучков коллагена, вызванные его набуханием, обуславливают увеличение его плотности. Тем не менее полученные после перекисно-щелочной обработки матриксы, по всей вероятности, будут способствовать большей жизнеспособности клеток для успешной регенерации соединительной ткани за счет увеличения площади поверхности, связанной с разрыхлением волокнистой сети ВКМ, и могут быть использованы в качестве поддерживающих имплантатов и закрывающих покрытий. Известно исследование S. Schwarz с соавт. [24], в котором децеллюляризации с помощью щелочи (1 н. раствор NaOH) и пероксида водорода (5% раствор H₂O₂) подвергалась хрящевая ткань свиней и человека; дополнительно были применены гидрохлорид гуанидина и ацетат натрия. Образцы имели вид плотного биопластического материала и характерный белый цвет, что не соответствует полученным нами данным.

Обработка щелочью без добавления перекиси водорода приводила к получению гидрогелевого коллагенового материала, что можно объяснить нарушением структуры коллагена, а именно расщеплением коллагеновых фибрилл и разрушением невосстанавливаемых коллагеновых сшивок. В схожем исследовании [11] дерма подвергалась обработке 0,06 М NaOH, однако в связи с низкой концентрацией щелочи срок обработки значительно удлинялся, а полученный материал был близок по структуре к биопластическому материалу. В другом исследовании [25] дерму крупного рогатого скота обрабатывали 1 М раствором NaOH в течение 20 ч. По результатам гистологического анализа не было зарегистрировано клеточных структур, а количественный анализ ДНК показал 13,1 нг/мг ткани, что коррелирует с нашими результатами, однако авторам не удалось получить гелеобразную структуру материала. Разработка гидрогелей на основе соединительной ткани описана в нескольких работах, но она подразумевает длительную и трудоемкую технологию, включающую децеллюляризацию, шоковую заморозку, лиофильную сушку, измельчение в криомельнице и набухание [26, 27]. Наша методика является достаточно

простой, однокомпонентной, при этом полученный биоматериал обладает удовлетворительной биосовместимостью и биологической безопасностью.

Заключение

Предлагаемые протоколы обесклевывания позволяют получить различные формы биологически безопасных, не токсичных биоматериалов, которые могут применяться для направленной регенерации тканей в хирургической практике. С целью создания биопластических покрытий рекомендуется использовать щелочно-перекисную обработку, благодаря которой образуется плотный полупрозрачный материал, удобный для использования и наблюдения за течением процессов заживления. Для получения гидрогелевых покрытий или инъекционных материалов оптимальным является применение щелочного гидролиза. Однако для более детального изучения взаимодействия биоматериалов с тканью необходимы долгосрочные исследования.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта №МФИ-П-20.1/11.

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

Литература/References

1. Brocke T., Barr J. The history of wound healing. *Surg Clin North Am* 2020; 100(4): 787–806, <https://doi.org/10.1016/j.suc.2020.04.004>.

2. Ушмаров Д.И., Гуменюк С.Е., Гуменюк А.С., Гайворонская Т.В., Караблина С.Я., Поморцев А.В., Сотниченко А.С., Мелконян К.И., Григорьев Т.Е. Сравнительная оценка многофункциональных раневых покрытий на основе хитозана: многоэтапное рандомизированное контролируемое экспериментальное исследование. *Кубанский научный медицинский вестник* 2021; 28(3): 78–96, <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2021-28-3-78-96>.

Ushmarov D.I., Gumenyuk S.E., Gumenyuk A.S., Gayvoronskaya T.V., Karablina S.Y., Pomortsev A.V., Sotnichenko A.S., Melkonyan K.I., Grigoriev T.E. Comparative evaluation of chitosan-based multifunctional wound dressings: a multistage randomised controlled experimental trial. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik* 2021; 28(3): 78–96, <https://doi.org/10.25207/1608-6228-2021-28-3-78-96>.

3. Chattopadhyay S., Raines R.T. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* 2014; 101(8): 821–833, <https://doi.org/10.1002/bip.22486>.

4. Choi J.S., Oh S.H., Kim Y.M., Lim J.Y. Hyaluronic acid/alginate hydrogel containing hepatocyte growth factor and promotion of vocal fold wound healing. *Tissue Eng Regen Med* 2020; 17(5): 651–658, <https://doi.org/10.1007/s13770-020-00280-6>.

5. Li R., Xu J., Rao Z., Deng R., Xu Y., Qiu S., Long H., Zhu Q., Liu X., Bai Y., Quan D. Facilitate angiogenesis and neurogenesis by growth factors integrated decellularized matrix hydrogel. *Tissue Eng Part A* 2021; 27(11–12): 771–787, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0227>.

6. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Усов В.В., Андриков Б.Г. Биосовместимые и биodeградируемые раневые покрытия на основе полисахаридов из морских водорослей (обзор литературы). *Вестник хирургии имени И.И. Грекова* 2020; 179(4): 109–115, <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2020-179-4-109-115>.

Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Usov V.V., Andryukov B.G. Biocompatible and biodegradable wound dressings on the basis of seaweed polysaccharides (review of literature). *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova* 2020; 179(4): 109–115, <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2020-179-4-109-115>.

7. Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Истранов Л.П., Истранова Е.В., Бутнару Д.В., Винаров А.З., Захаркина О.Л., Курков А.В., Кантимеров Д.Ф., Антонов Е.Н., Марисов Л.В., Глыбочко П.В. Морфология коллагеновых матриц для тканевой инженерии (биосовместимость, биodeградация, тканевая реакция). *Архив патологий* 2015; 77(6): 29–38, <https://doi.org/10.17116/patol201577629-38>.

Shekhter A.B., Guller A.E., Istranov L.P., Istranova E.V., Butnaru D.V., Vinarov A.Z., Zakharkina O.L., Kurkov A.V., Kantimerov D.F., Antonov E.N., Marisov L.V., Glybochko P.V. Morphology of collagen matrices for tissue engineering (biocompatibility, biodegradation, tissue response). *Arhiv patologii* 2015; 77(6): 29–38, <https://doi.org/10.17116/patol201577629-38>.

8. Hussey G.S., Dziki J.L., Badylak S.F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat Rev Mater* 2018; 3(7): 159–173, <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0023-x>.

9. Keane T.J., Badylak S.F. The host response to allogeneic and xenogeneic biological scaffold materials. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; 9(5): 504–511, <https://doi.org/10.1002/term.1874>.

10. Ivanov A.N., Saveleva M.S., Kozadaev M.N., Matveeva O.V., Salkovskiy Yu.E., Lyubun G.P., Gorin D.A., Norkin I.A. New approaches to scaffold biocompatibility assessment. *BioNanoScience* 2019; 9(2): 395–405, <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00613-3>.

11. Terzini M., Bignardi C., Castagnoli C., Cambieri I., Zanetti E.M., Audenino A.L. Ex vivo dermis mechanical behavior in relation to decellularization treatment length. *Open Biomed Eng J* 2016; 10: 34–42, <https://doi.org/10.2174/1874120701610010034>.

12. Saghizadeh M., Winkler M.A., Kramerov A.A., Hemmati D.M., Ghiam C.A., Dimitrijevic S.D., Sareen D., Ornelas L., Ghiasi H., Brunken W.J., Maguen E., Rabinowitz Y.S., Svendsen C.N., Jirsova K., Ljubimov A.V. A simple alkaline method for decellularizing human amniotic membrane for cell culture. *PLoS One* 2013; 8(11): e79632, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079632>.

13. Rieder E., Steinacher-Nigisch A., Weigel G. Human immune-cell response towards diverse xenogeneic and allogeneic decellularized biomaterials. *Int J Surg* 2016; 36(Pt A): 347–351, <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2016.06.042>.

14. Rodrigues F.T., Martins V.C.A., Plepis A.M.G. Porcine skin as a source of biodegradable matrices: alkaline treatment and glutaraldehyde crosslinking. *Polimeros* 2010; 20(2): 92–97, <https://doi.org/10.1590/s0104-14282010005000013>.

15. Антипова Л.В., Сторублевцев С.А. Способ получения коллагеновой основы с асептическими свойствами. Патент РФ 2739396. 2020.

Antipova L.V., Storublevtsev S.A. Method for producing collagen base with aseptic properties. Patent RU 2739396. 2020.

16. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011; 32(12): 3233–3243, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>.
17. Lange P., Greco K., Partington L., Carvalho C., Oliani S., Birchall M.A., Sibbons P.D., Lowdell M.W., Ansari T. Pilot study of a novel vacuum-assisted method for decellularization of tracheae for clinical tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11(3): 800–811, <https://doi.org/10.1002/term.1979>.
18. Keane T.J., Swinehart I., Badylak S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods* 2015; 84: 25–34, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005>.
19. Li D., Sun W.Q., Wang T., Gao Y., Wu J., Xie Z., Zhao J., He C., Zhu M., Zhang S., Wang P., Mo X. Evaluation of a novel tilapia-skin acellular dermis matrix rationally processed for enhanced wound healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021; 127: 112202, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112202>.
20. Hoganson D.M., O'Doherty E.M., Owens G.E., Harilal D.O., Goldman S.M., Bowley C.M., Neville C.M., Kronengold R.T., Vacanti J.P. The retention of extracellular matrix proteins and angiogenic and mitogenic cytokines in a decellularized porcine dermis. *Biomaterials* 2010; 31(26): 6730–6737, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.019>.
21. Gilbert T.W., Freund J.M., Badylak S.F. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res* 2009; 152(1): 135–139, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.02.013>.
22. Leow-Dyke S.F., Rooney P., Kearney J.N. Evaluation of copper and hydrogen peroxide treatments on the biology, biomechanics, and cytotoxicity of decellularized dermal allografts. *Tissue Eng Part C Methods* 2016; 22(3): 290–300, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0271>.
23. Биштаков Р.Б., Гарифуллина Р.А., Садыкова Г.У., Ломакин С.П. О коллагене и гидролизатах коллагена дермы. *Столица науки* 2021; 2: 23–27. URL: <https://ftp.scientific-capital.ru/feb2021/0022021.pdf#page=24>.
24. Bishtakov R.B., Garifullina R.A., Sadykova G.U., Lomakin S.P. About collagen and hydrolysates of derma collagen. *Stolica nauki* 2021; 2: 23–27. URL: <https://ftp.scientific-capital.ru/feb2021/0022021.pdf#page=24>.
25. Schwarz S., Koerber L., Elsaesser A.F., Goldberg-Bockhorn E., Seitz A.M., Dürselen L., Ignatius A., Walther P., Breiter R., Rotter N. Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering applications. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(21–22): 2195–2209, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0705>.
26. Калмыкова Н.В., Демьяненко И.А., Шевлягина Н.В., Андреевская С.Г., Суслов А.П. Сравнительный анализ эффективности простого и многокомпонентного методов щелочной децеллюляризации на примере очистки волокнистого внеклеточного матрикса дермы. *Морфологические ведомости* 2016; 24(4): 36–45.
27. Kalmykova N.V., Demyanenko I.A., Shevlyagina N.V., Andreevskaya S.G., Suslov A.P. The comparative efficiency analysis of simple and multicomponent alkaline decellularization on the example of purification of the fibrous extracellular matrix of the derma. *Morfologicheskie vedomosti* 2016; 24(4): 36–45.
28. Fernández-Pérez J., Ahearne M. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. *Sci Rep* 2019; 9(1): 14933, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49575-2>.
29. Bordbar S., Lotfi Bakhshaiesh N., Khanmohammadi M., Sayahpour F.A., Alini M., Baghaban Eslaminejad M. Production and evaluation of decellularized extracellular matrix hydrogel for cartilage regeneration derived from knee cartilage. *J Biomed Mater Res A* 2020; 108(4): 938–946, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36871>.