

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ПОДСЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОНКОЙ КИШКИ В ТЕСТАХ IN VITRO И IN VIVO

А.А. Долгалев¹, А.А. Венедиктов², Д.В. Бобрышев¹, А.Д. Кручинина^{2,3}, А.А. Чагаров¹, Я.В. Евстратова⁴, А.И. Звягина⁴, К.С. Краснов⁴, И.С. Фадеева⁴, Г.А. Айрапетов¹

¹ Ставропольский государственный медицинский университет МЗ РФ, Ставрополь, Россия

² Научно-производственная компания ООО «Кардиоплант», Пенза, Россия

³ Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

⁴ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

STUDY OF BIOCOMPATIBILITY OF THE MATERIAL BASED ON SMALL INTESTINAL SUBMUCOSA IN TESTS IN VITRO AND IN VIVO

A.A. Dolgalev¹, A.A. Venediktov², D.V. Bobryshev¹, A.D. Kruchinina^{2,3}, A.A. Chagarov¹, Y.V. Evstratova⁴, A.I. Zvyagina⁴, K.S. Krasnov⁴, I.S. Fadeeva⁴, G.A. Airapetov¹

¹ Stavropol State Medical University, Stavropol, Russia

² "Cardioplant" Ltd, Penza, Russia

³ Penza State University, Penza, Russia

⁴ Institute of Theoretical and Experimental biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

e-mail: dolgalev@dolgalev.pro

Разработка барьерных мембран для направленной регенерации тканей остается актуальной задачей. Рядом авторов предложено использовать для этих целей ксеноматериалы из подслизистой оболочки тонкой кишки. Свойства таких материалов зависят от технологии удаления клеток донора (децеллюляризации) и состояния их внеклеточного матрикса после обработки (наличия или отсутствия провоспалительных поврежденных компонентов).

Целью настоящей работы являлось изучение биологических свойств тканеинженерных ксеногенных мембран, изготовленных из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи с использованием запатентованной нами технологии (НПК ООО «Кардиоплант»), в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Эксперименты *in vitro* проводили на культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека и фибробластов кожи человека, оценивая жизнеспособность, пролиферативную и митотическую активность клеток, культивируемых на поверхности материалов в течение 1–7 сут. В качестве контроля использовали лиофилизированную барьерную мембрану для направленной тканевой регенерации из ксеноперикарда быка bioPLATE MEMBRANE Barrier (НПК ООО «Кардиоплант», Россия), изготовленную по аналогичной технологии.

Для исследования биосовместимости экспериментальных мембран *in vivo* выполняли гетеротопическую имплантацию материалов самцам крыс породы Wistar. С помощью гистохимического анализа оценивали клеточную и тканевую реакции, а также степень биоинтеграции и скорость резорбции экспериментальных материалов в динамике через 14, 30, 60 и 90 сут. после имплантации.

Полученные результаты свидетельствуют о более высокой биосовместимости мембранных ксеноматериалов из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи по сравнению с материалами из перикарда, и указывают на перспективность применения подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи для разработки имплантатов, предназначенных для направленной регенерации тканей.

Ключевые слова: подслизистая оболочка тонкой кишки, перикард, децеллюляризация, мембранные материалы, биосовместимость, направленная регенерация.

Введение

Разработка новых пластических материалов для реконструктивной хирургии остаётся актуальным направлением современных биомедицинских исследований. При этом наблюдается тенденция к увеличению количества имплантируемых медицинских изделий, изготовленных на основе биоматериалов ксеногенного происхождения [1]. Для получения биоактивных тканеинженерных материалов широко применяют различные

The development of barrier membranes for guided tissue regeneration remains an urgent task. A several authors proposed to use for this purpose xenomaterials from the small intestinal submucosa (SIS). The properties of such materials depend on the technology of donor cell removal (decellularization) and the condition of their extracellular matrix after processing (the presence or absence of proinflammatory damaged matrix components).

The aim of this work was to study of biological properties of tissue-engineered xenogenic membranes made from porcine SIS by our patented technology (Cardioplant LLC, Russia) in experiments *in vitro* and *in vivo*.

In vitro experiments was performed on cultures of multipotent mesenchymal stromal cells of the bone marrow and human skin fibroblasts, assessing viability, proliferative and mitotic activity of cells cultured on the surface of materials during 1–7 days. The lyophilized barrier membrane bioPLATE MEMBRANE Barrier (Cardioplant LLC, Russia) used as control.

To study of biocompatibility of experimental membranes *in vivo*, heterotopic implantation of materials to male Wistar rats was performed. The cell and tissue reactions and the degree of biointegration and the resorption of experimental materials were evaluated by rateover 14, 30, 60, and 90 days of implantation.

The results indicate a higher biocompatibility of SIS-membrane compared with pericardial materials, and indicate the promise of using the porcine small intestinal submucosa to develop implants for guided tissue regeneration.

Keywords: small intestinal submucosa, pericardium, decellularization, membrane materials, biocompatibility, guided regeneration.

соединительнотканые структуры: перикард, подслизистую оболочку тонкой кишки, глиссонову капсулу печени, твердую мозговую оболочку, дерму, подслизистую мочевого пузыря и др.

Одной из центральных задач при изготовлении биоактивных тканеинженерных материалов является выбор способа обработки биоматериала, обеспечивающей разрушение клеток и сохранение структуры внеклеточного матрикса. Полученный материал должен

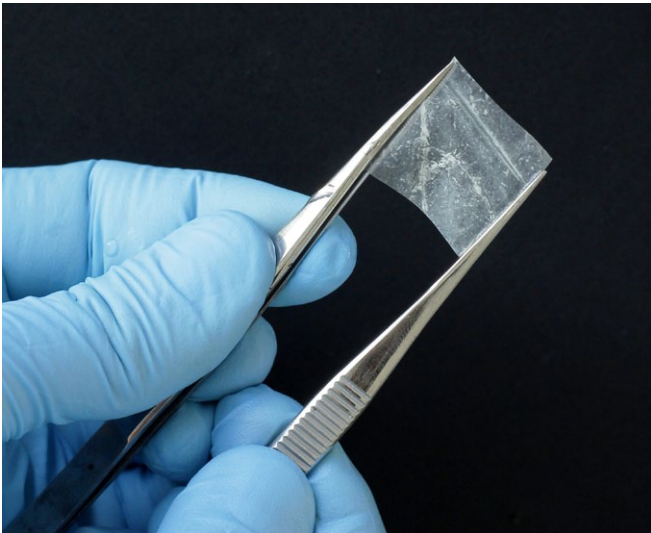


Рис. 1. Внешний вид лиофилизированной экспериментальной барьерной мембраны, изготовленной из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи по авторской технологии

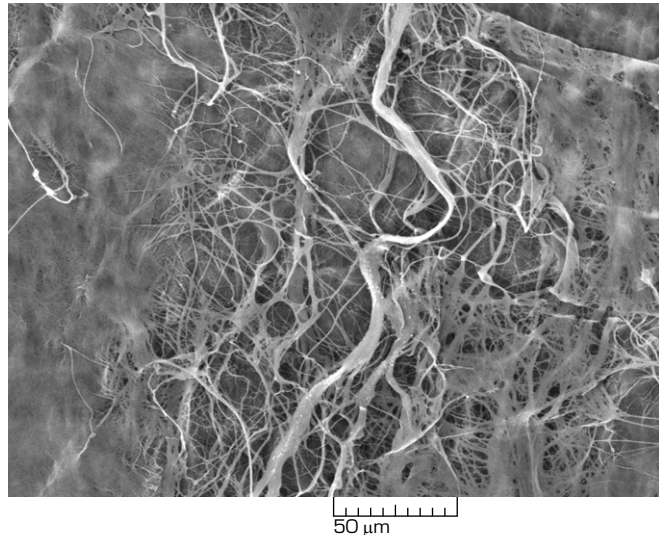


Рис. 2. Поверхность экспериментальной барьерной мембраны, изготовленной из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи по авторской технологии. СЭМ

быть биосовместимым, обеспечивать адгезию и рост клеток, замещаться собственными тканями организма, не вызывая воспалительную и дистрофическую тканевые реакции [2–4]. Медицинские изделия, изготовленные из биоматериалов ксеногенного происхождения, находят широкое применение в разных областях хирургии [5].

Ранее в ряде работ было предложено использовать для получения барьерных мембран ксеноматериалы из подслизистой оболочки тонкой кишки [6, 7]. Цель настоящей работы: исследование биологических свойств тканеинженерных ксеногенных материалов на основе биологически активного внеклеточного матрикса подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи.

Материал и методы

Исучаемый экспериментальный материал на основе подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи был получен путем многоступенчатой обработки по методике, основа которой описана в патенте на изобретение РФ № 2542432 [8]. Материал представляет собой бесклеточную многослойную лиофилизированную мембрану (рис. 1). В качестве контроля использовали лиофилизированную барьерную мембрану для направленной тканевой регенерации из ксеноперикарда быка bioPLATE MEMBRANE Barrier (НПК ООО «Кардиоплант», Россия) [9], изготовленную по аналогичной технологии.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Для изучения структуры внеклеточного матрикса мембран после предимплантационной обработки, включающей цикл механической, химической, ультразвуковой и ферментативной очистки, децеллюляризованный материал лиофилизировали по стандартной методике, обрабатывали частицами золота в вакуумном распылителе Q150R ES (Quorum Technologies, Англия) и анализировали на сканирующем электронном микроскопе VEGA3 (Tescan, Чехия).

Исследование биосовместимости мембран *in vitro*. Исследование *in vitro* биосовместимости изготовленных мембран проводили на культурах мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека (ММСК) и фибробластов кожи человека, предоставленных криобанком ЦКП ИТЭБ РАН. Выбор клеточных линий в качестве тест-систем был обусловлен тем, что представленный материал потенциально может быть применен как для направленной регенерации

мягких тканей (GTR), так и для направленной регенерации костной ткани (GBR).

В экспериментах использовали клетки 1–4 пассажей. Клетки культивировали в среде α MEM (Sigma, США) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma, США) в CO_2 -инкубаторе при 37°C , 5% CO_2 . Из каждой группы экспериментальных и контрольных образцов материалов в случайном порядке отбирали 8 образцов размером 15×20 мм, помещали в 12-луночные планшеты по 1 образцу в лунку, добавляли 500 мкл питательной среды, содержащей 10^4 клеток, и инкубировали течение 1–7 сут. в зависимости от условий эксперимента.

Для изучения пролиферативной активности через каждые 24 ч. культивированные клетки открепляли от поверхности образцов раствором Accutase® (Sigma, США) и производили подсчет клеток с помощью автоматического счетчика Countess (Invitrogen, США).

Для исследования митотической активности клеток через 48 и 72 ч. культивирования образцы с клетками переносили в лунки нового 12-луночного планшета и инкубировали в течение 15 мин. в питательной среде L-15, содержащей 1 мкг/мл флуоресцентного красителя bisBenzimide Hoechst 33342 (Sigma, США). Количество клеток с характерным для митоза распределением хроматина определяли с помощью флуоресцентной микроскопии на микроскопе Leica DM6000 (Leica Microsystems, Германия) [10]. Количество живых и мертвых клеток после культивирования на материале в течение 24 и 96 ч., подсчитывали после окраски Hoechst 33342 и йодидом пропидия (Sigma, США) [11]. Контролем служили клетки, культивируемые на пластике. Результаты опытов *in vitro* представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение ($m \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с применением U-критерия Манна-Уитни, уровень статистической значимости различий был принят за $p < 0,05$. Для статистического анализа использовали программу SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., США).

Исследование биосовместимости экспериментальных мембран *in vivo*. Исследование проводилось согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 10993-6-2011 «Исследование местного действия после имплантации» на самцах крыс породы Wistar ($n=24$) в возрасте

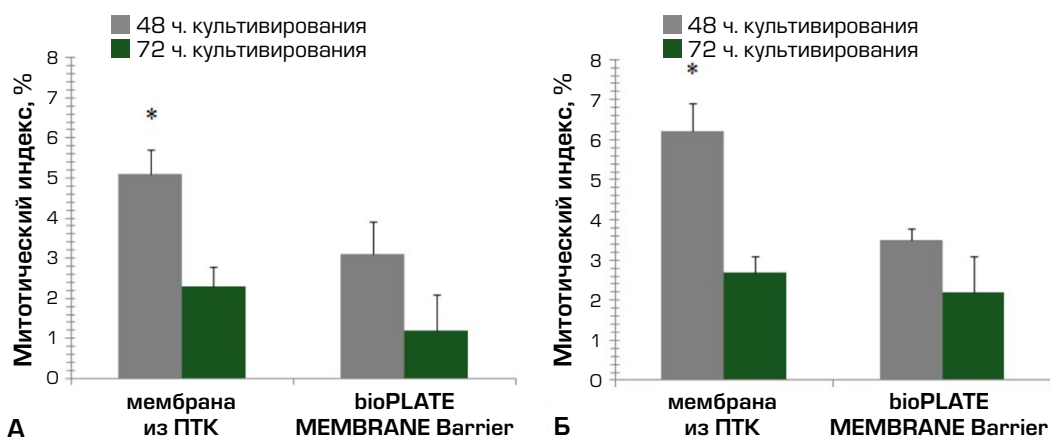


Рис. 3. Митотическая активность диплоидных фибробластов человека (А) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека (Б), культивированных на поверхности экспериментальных и контрольных барьерных мембран в течение 48 и 72 ч.

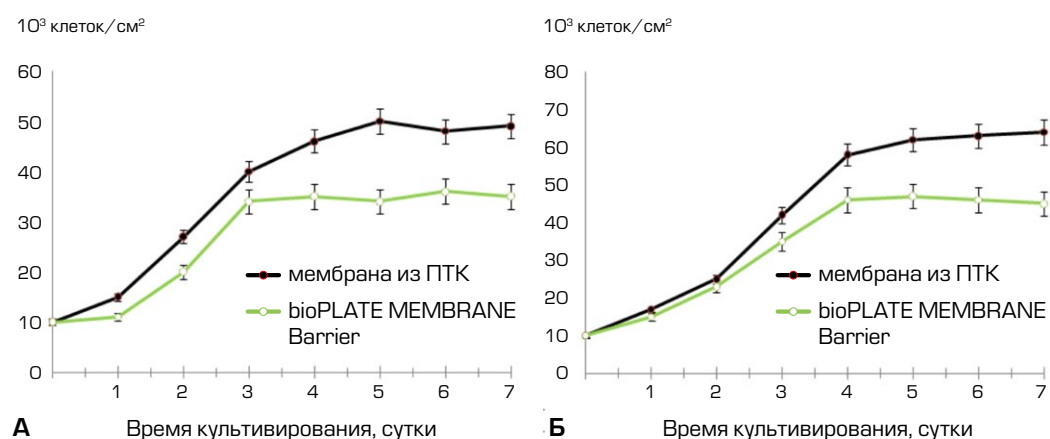


Рис. 4. Кривые роста диплоидных фибробластов человека (А) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека (Б), культивированных на поверхности экспериментальных и контрольных барьерных мембран

4–5 мес., массой 200–250 г. Содержание животных и условия проведения экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 «Требования к обращению с животными», положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Гетеротопическая имплантация образцов материалов. Оперативное вмешательство проводилось в стерильных условиях по стандартной методике [12]. Во время операции животных наркотизировали растворами тилетамина гидрохлорида, золазепам гидрохлорида (6 мг/кг, золетил 100, Virbac Sante Animale, Франция) и ксилазина гидрохлорида (10 мг/кг, Рометар, Bioveta, Чешская Республика). Каждому животному от срединного разреза в межлопаточной области, характеризующейся малой подвижностью и недоступностью для самого животного, формировали два латеральных подкожных кармана, в один из которых помещали экспериментальный материал и ушивали, а второй подкожный карман, используемый в качестве контроля, ушивали без имплантации материала. Животных выводили из эксперимента путем передозировки препарата золетил на 14, 30, 60, 90 сут.

Области гетеротопической имплантации с материалом (эксперимент) или без него (контроль) иссекали с захватом окружающих здоровых тканей, фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина в течение 24 ч. при комнатной температуре, а затем отмывали от излишков фиксатора в проточной воде.

Гистологическое исследование. Преаналитический этап подготовки образцов для рутинного гистохимического исследования осуществляли в соответствии с общепринятым стандартом [13]. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином

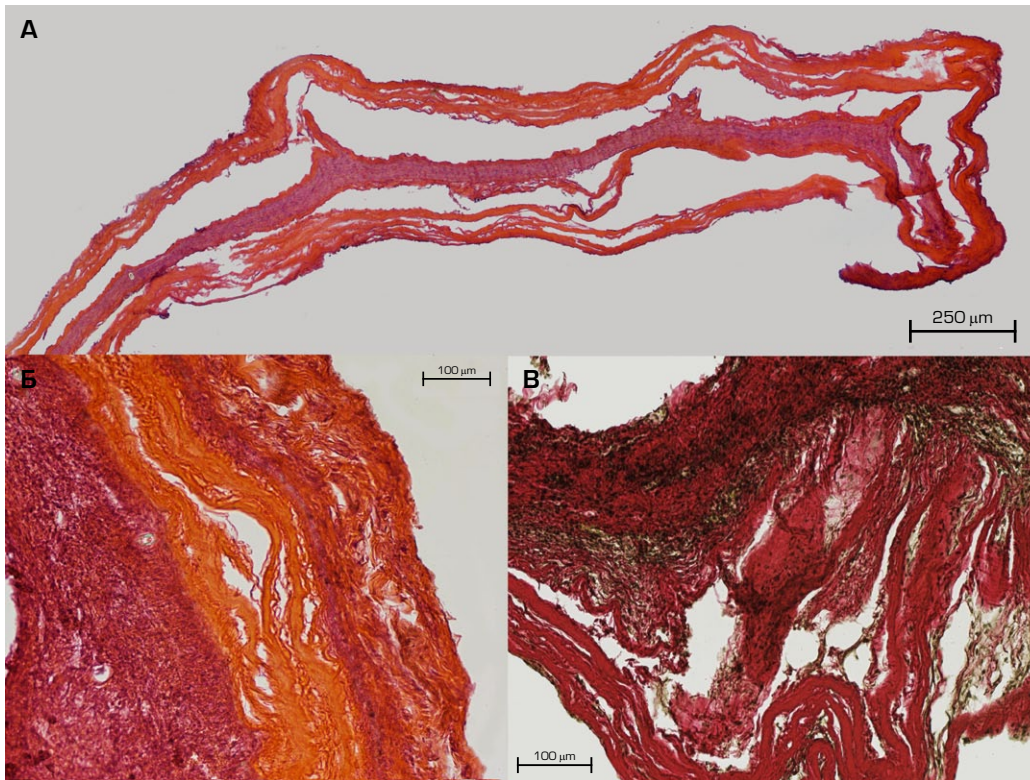
и пикрофуксином по Ван Гизону. С целью получения объективных данных по реакции организма на имплантированный материал делали обзорные гистотопограммы окрашенных препаратов с помощью программы обеспечения Nis Elements AR4.13.05 (Build933) (Nikon, Япония). Анализ препаратов проводили с использованием световой микроскопии на микроскопической станции Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония).

Результаты

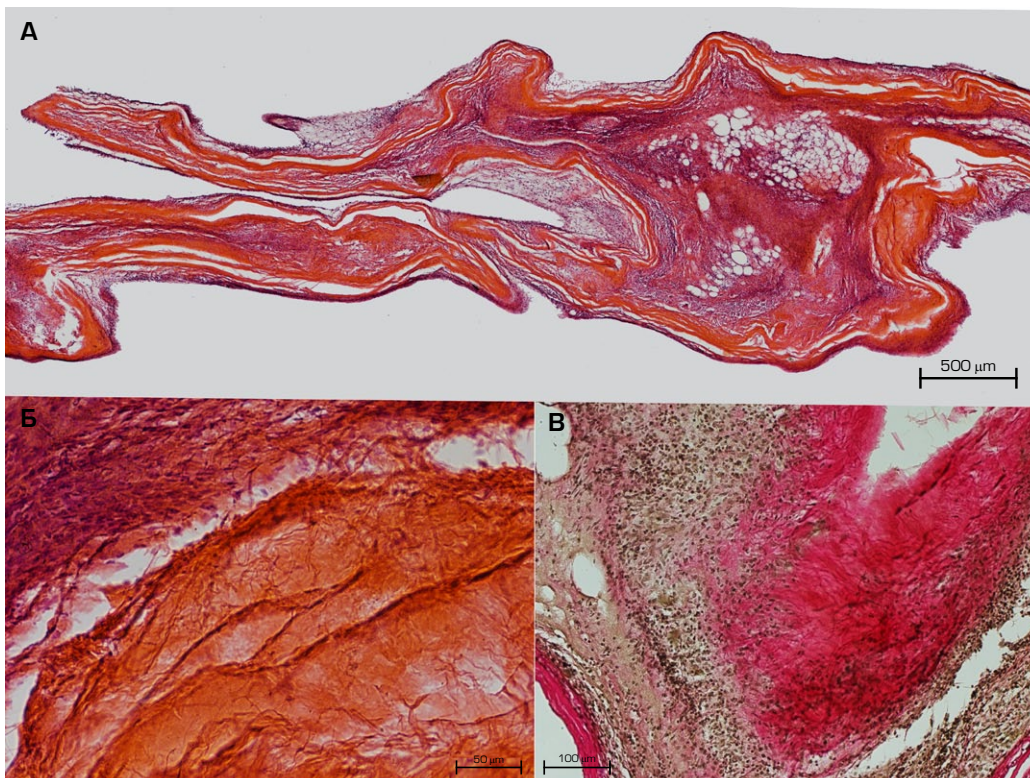
Исследование *in vitro*. Электронномикроскопический анализ показал, что экспериментальный материал, изготовленный из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи, представляет собой бесклеточную лиофилизированную мембрану с высоким уровнем сохранения целостности волокон нативной соединительной ткани (рис. 2).

Было установлено, что клетки сохраняют жизнеспособность как через 24 ч., так и через 96 ч. культивирования на мембранах. Доля живых клеток составляла $95,2 \pm 4,7\%$ от общего числа фибробластов и $96,8 \pm 5\%$ от общего числа ММСК. Количество мертвых клеток при культивировании на мембранах достоверно не отличалось от количества мертвых клеток при культивировании на пластике и находилось в пределах $4,3 \pm 2,4\%$ от общего числа фибробластов и $3,5 \pm 1,7\%$ от общего числа ММСК.

Анализ митотической активности фибробластов и ММСК через 48 и 72 ч. после начала культивирования на поверхности мембран показал, что митотическая активность как фибробластов, так и ММСК, культивируемых на образцах мембран, изготовленных из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи, выше по сравнению с митотической активностью тех же клеток, культивируемых на образцах мембран bioPLATE MEMBRANE Barrier (рис. 3, отличие достоверно, $p < 0,05$).

**Рис. 5.**

Микрофотографии гистологических препаратов через 14 сут. после имплантации: А, Б — экспериментальная мембрана из подслизистой оболочки тонкой кишки — оранжево-алая, контактная грануляционная ткань — розовая, ядра клеток — синие; В — коллагеновый матрикс — красный, ядра клеток — черные, неколлагеновые структуры — зелено-желтые. Окраска: А, Б — гематоксилин и эозин; В — окраска пикрофуксином по Ван Гизону

**Рис. 6.**

Микрофотографии гистологических препаратов через 30 сут. после имплантации: А, Б — экспериментальная мембрана из подслизистой оболочки тонкой кишки — оранжево-алая, контактная фиброгрануляционная ткань — розовая, ядра клеток — синие; В — коллагеновый матрикс — малиново-красный, ядра клеток — черные, неколлагеновые структуры — зелено-желтые. Окраска: А, Б — гематоксилин и эозин; В — пикрофуксин по Ван Гизону

Выявлено, что пролиферативная активность фибробластов и ММСК при культивировании на образцах мембран, изготовленных из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи, выше, чем при культивировании на образцах мембран bioPLATE MEMBRANE Barrier (рис. 4).

Исследование биосовместимости экспериментальных мембран *in vivo*. Модель гетеротопической имплантации широко применяется для оценки биосовместимости медицинских изделий, скорости биоинтеграции и биорезорбции материалов, изучения тканевой реакции на имплантат [12, 14]. В качестве маркеров

успешного приживления или, напротив, биодеструкции мембран использовали следующие морфологические показатели: изменение структуры матрикса мембран; интенсивность и продолжительность воспалительной реакции со стороны тканей реципиента; время образования капсулы и степень ее зрелости; скорость восстановления первоначальной структуры тканей реципиентного ложа. Изменение структурной целостности имплантата или его фрагментация и резорбция показывают, насколько быстрыми будут васкуляризация и смена клеточного фенотипа с полиморфноядерного

на лимфо-макрофагальный, а затем и на фибробластический. Следовательно, определяется время и скорость формирования коллагеновых волокон капсулы, которая является барьером и связующим звеном между имплантатом и тканями реципиента [14].

При гистологическом анализе контрольных образцов на всех сроках имплантации каких-либо признаков инфекционных осложнений, воспаления или нарушения стандартных процессов репаративной регенерации выявлено не было.

На 14 сут. в зоне имплантации экспериментальной мембраны, изготовленной из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи (рис. 5), была обнаружена лимфогистиоцитарная инфильтрация по всему образцу и грануляционная ткань на границе контакта с мембраной, содержащая фрагменты имплантированного материала, пронизанные фибробластами. Наличие отдельных гигантских клеток свидетельствовало об относительно слабой гигантоклеточной реакции при резорбции коллагена мембраны. Наблюдалось формирование множественных кровеносных сосудов в грануляциях. Можно предположить, что резорбция образцов проходила за счет активности макрофагов и ферментативного лизиса.

На 30 сут. происходило замещение мембраны, изготовленной из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи, на фиброзированную грануляционную ткань (рис. 6), что свидетельствует об активной биоинтеграции окружающих тканей в имплантируемый биоматериал.

На 60 и 90 сут. следов мембраны не оставалось, а ткань на месте имплантации восстанавливала свою структуру.

Заключение

В работе представлены результаты исследования в условиях *in vitro* и *in vivo* биосовместимости мембран, изготовленных из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи с использованием запатентованной нами технологии (НПК ООО «Кардиоплант»).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wessing B., Lettner S., Zechner W. Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2018; 33(1): 87–100.
2. Brown B.N., Badylak S.F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Transl. Res.* 2014; 163(4): 268–85.
3. Hodde J. Extracellular matrix as a bioactive material for soft tissue reconstruction. *ANZ J. Surg.* 2006; 76(12): 1096–100.
4. Swinehart I.T., Badylak S.F. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. *Dev. Dyn.* 2016; 245(3): 351–60.
5. Badylak S.F., Freytes D.O., Gilbert T.W. Reprint of Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* 2015; 23: 17–26.
6. Shi L., Ronfard V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. *Int. J. Burns Trauma* 2013; 3(4): 173–9.
7. Ji Y., Zhou J., Sun T. et al. Diverse preparation methods for small intestinal submucosa (SIS): Decellularization, components, and structure. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2019; 107(3): 689–97.
8. Фуки В.К., Живаева Л.В., Венедиктов А.А. и др. Способ изготовления пластины на основе модифицированной ксеногенной подслизистой оболочки тонкой кишки. Патент РФ на изобр. № 2542432. 20 февраля 2015. [Fuji V.K., Zhivaeva L.V., Venediktov A.A. et al. A method of manufacturing a plate based on a modified xenogenic small intestinal submucosa. RU patent № 2542432. 2015 Feb 20].

Было установлено сохранение жизнеспособности фибробластов человека и ММСК костного мозга человека, культивируемых на образцах экспериментального материала. Митотическая и пролиферативная активность клеток, культивируемых на образцах экспериментального материала, были выше чем при культивировании на мембране из перикарда.

Гетеротопическая имплантация выявила отсутствие реакции отторжения в ответ на имплантацию экспериментальных образцов. Было обнаружено, что коллаген мембраны подвергается макрофагальной резорбции и ферментативному лизису, замещаясь грануляционной, а затем фиброзной тканью с последующей ее инволюцией. Была отмечена высокая скорость биоинтеграции и резорбции образцов экспериментальных мембран.

Результаты исследования показали, что новый биоматериал российского производства, изготовленный из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи, имеет более высокие показатели биосовместимости по сравнению с мембранами, изготовленными из перикарда по той же технологии, и способен при имплантации полностью замещаться собственными тканями организма, не вызывая воспалительную и дистрофическую тканевые реакции.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения биоматериала, изготовленного из подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи, для разработки имплантатов, предназначенных для направленной регенерации тканей.

Благодарности

Финансирование исследования осуществлялось из личных средств авторов (Funding for the study was carried out from the personal funds of the authors).

Работа выполнена с использованием приборов ЦКП ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

9. Долгалев А.А., Цогоев В.К., Брусницын Д.А. и др. Метод направленной тканевой регенерации для увеличения площади прикрепленной слизистой полости рта. *Пародонтология* 2017; 4: 73–6. [Dolgalev A.A., Cogojev V.K., Brusnitsin D.A. et al. The method of increasing the volume of the attached oral mucosa in the area of implants. *Periodontology* 2017; 4: 73–6].

10. Vangipuram M., Ting D., Kim S. et al. Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *J. Vis. Exp.* 2013; (77): e3779.

11. Secunda R., Vennila R., Mohanashankar A.M. et al. Isolation, expansion and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology* 2015; 67(5): 793–807.

12. Рябов А.Ю., Фадеева И.С., Деев Р.В. и др. Экспериментально-морфологическое исследование биологических мембран ксеногенного происхождения. *Гены и Клетки* 2014; 9(4): 103–9. [Ryabov A.Y., Fadeeva I.S., Deev R.V. et al. Experimental and Morphological study of the xenogenic biological membranes. *Genes and Cells* 2014; 9(4): 103–9].

13. Lillie R.D. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3rd ed. New York [NY]: Blakiston Division, McGraw-Hill; 1965.

14. Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Истратов Л.П. и др. Морфология коллагеновых матриц для тканевой инженерии (биосовместимость, биодеградация, тканевый ответ). *Архив патологии* 2015; 77(6): 29–38. [Shekhter A.B., Guller A.E., Istranov L.P. et al. Morphology of collagen matrices for tissue engineering (biocompatibility, biodegradation, tissue response). *Arkh. Patol.* 2015; 77(6): 29–38].

Поступила: 20.10.2019