

## Получение микродисперсного тканеспецифического децеллюляризованного матрикса из суставного хряща свиньи

Ю. Б. Басок, А. Д. Кириллова, А. М. Григорьев,  
Л. А. Кирсанова, Е. А. Немец, В. И. Севастьянов

Разработан способ получения микродисперсного тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи с сохранением морфофункциональных свойств внеклеточного матрикса и без признаков цитотоксичности. Распределение частиц хряща после криопомола по размерам в суспензии определяли с помощью лазерного дифракционного анализа. Диапазон размеров полученных микродисперсных частиц хряща указывает на возможность их инъекционного введения (< 220 мкм). Комбинация этапов, включающая 3 цикла замораживания/оттаивания (-196 °C/37 °C) с последующей обработкой растворами поверхностно-активных веществ (ПАВ), додецилсульфата натрия и Тритона X-100, и ДНКазой, позволила добиться полного отсутствия не децеллюляризованных микрочастиц. Остаточное содержание ДНК составило  $9,11 \pm 1,13$  нг/мг ткани. Эффективность отмывки от ПАВ оценивали по цитотоксичности матрикса на культуре мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). Для анализа гемосовместимости полученных образцов исследовали *in vitro* их гемолитическую активность. Адгезию и пролиферацию МСК ЖТч на поверхности матрикса исследовали на 21 сутки культивирования. Матрикс не обладал гемолитической активностью и цитотоксичностью относительно МСК ЖТч. В образцах наблюдали активную пролиферацию МСК ЖТч на поверхности матрикса. Биосовместимость и гемосовместимость полученного матрикса *in vitro* указывает на его потенциал в использовании в регенеративной медицине хряща.

**Ключевые слова:** матрикс, децеллюляризация, микрочастицы, хрящевая ткань.

DOI: 10.30791/1028-978X-2020-5-51-60

### Введение

Для восстановления структуры и функций необратимо повреждённых хрящевых тканей технологии регенеративной медицины и тканевой инженерии в настоящее время предлагают имплантацию клеточно-инженерных конструкций (КИК), состоящих из матрикса, клеточной компоненты и культуральной среды, содержащей необходимые для жизнедеятельности клеток биомолекулы, как альтернативу традиционным хирургическим способам лечения [1]. КИК можно использовать как самостоятельный клеточный продукт, либо как

промежуточные продукты для формирования *in vitro* и *in vivo* биоэквивалентов тканей, так называемых тканеинженерных медицинских продуктов [2].

Особое внимание при создании клеточных продуктов до сих пор уделяется разработке матриксов с необходимым набором физико-химических и биологических свойств. К резорбируемому матриксу для КИК хряща предъявляют следующие требования: биосовместимость изделия и продуктов его деструкции, поддержание адгезии и пролиферации клеток, выполнение функции питательной среды для клеток, биостимулирующее действие, регуляция времени биодеградации, возможность

стерилизации без изменения медико-технических свойств [3].

Матрицы для тканеинженерных конструкций производят из полимерных материалов синтетического или природного происхождения в виде гидрогелей, губок или волокнистых сеток [4]. При всех своих положительных свойствах матрицы из резорбируемых полимерных и биополимерных материалов не обладают тканеспецифическими свойствами, то есть не способны избирательно поддерживать адгезию и пролиферацию клеток конкретной ткани или органа. В связи с этим наблюдается большой интерес к тканеспецифическим матрицам, изготовленным путем децеллюляризации, удаления клеточных элементов и их фрагментов из тканей донорского органа [5].

Заметим, что в качестве каркаса для биоинженерной конструкции хряща целесообразно использовать микродисперсный матрикс, позволяющий обеспечить полноту удаления клеток и отмывки от поверхностно-активных веществ (ПАВ), облегчить рецеллюляризацию матрикса клетками за счет увеличения площади для заселения при сохранении объема и имплантировать КИК наименее инвазивным инъекционным способом введения [6, 7].

В работе [8] в экспериментах *in vivo* на кроликах продемонстрирована эффективность использования тканеспецифического микродисперсного децеллюляризованного матрикса, полученного из тканеинженерной конструкции, включающей клетки пульпозного ядра и децеллюляризованный матрикс подслизистой оболочки тонкого кишечника свиньи, для предотвращения дегенерации межпозвоночных дисков. Таким образом, интерес вызывает использование микродисперсного тканеспецифического матрикса для восстановления суставного хряща. Заметим, что наиболее близким по составу и физико-химическим свойствам к естественному внеклеточному матриксу (ВКМ) является децеллюляризованный суставной хрящ. В связи со сложностью получения суставного хряща человека в качестве источника матрикса целесообразно использовать суставной хрящ свиньи. Можно предположить, что децеллюляризация исключит иммуногенность ксеногенной ткани за счет разрушения клеток при максимальном сохранении ВКМ, чьи белки, в отличие от клеток, несут незначительное количество антигенов, вызывающих реакцию отторжения трансплантата [9].

Цель исследования — получение инъекционной формы микродисперсного тканеспецифического децеллюляризованного матрикса из суставного хряща свиньи.

## Материалы и методы

### Получение микрочастиц суставного хряща свиньи

Бедренные и коленные свиньи суставы были 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 (4 °С) хрящ удаляли из суставных поверхностей скальпелем, нарезали фрагментами размером 0,5 × 0,5 см, замораживали при –80 °С и хранили при этой температуре до момента начала криомола. Микродисперсные частицы хряща получали в криомельнице CryoMill (Retch GmbH, Германия) при частоте 25 Гц.

Распределение микрочастиц хряща по размерам в суспензии определяли с помощью лазерного дифракционного анализатора SALD-7101 (Shimadzu, Япония).

### Режимы децеллюляризации

#### Децеллюляризация под действием ПАВ

Микрочастицы хрящевой ткани обрабатывали при комнатной температуре и периодическом перемешивании на магнитной мешалке (3 раза в сутки, 1 ч, 200 об/мин) в трех сменах фосфатно-солевого буферного (ФСБ) раствора (138 мМ NaCl, 2,67 мМ KCl, 1,47 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH = 7,4), содержащего додецилсульфат натрия и повышающую концентрацию Тритона X100:

А. 200 мл ФСБ, содержащего 1 % Triton X-100 и 0,1 % натриевой соли додецилсульфата, в течение 24 ч при комнатной температуре;

Б. 200 мл ФСБ, содержащего 2 % Triton X-100 и 0,1 % натриевой соли додецилсульфата, в течение 24 ч при комнатной температуре;

В. 200 мл ФСБ, содержащего 3 % Triton X-100 и 0,1 % натриевой соли додецилсульфата, в течение 24 ч при комнатной температуре.

#### Циклическое замораживание/оттаивание

Образцы помещали в криопробирки и подвергали сухой заморозке в сосуде Дьюара при –196 °С в течение 1 ч, после чего проводили оттаивание в термостате при 37 °С в течение 1 ч. При необходимости цикл замораживание/оттаивание повторяли от 1 до 10 раз. Далее образцы, подвергнутые термическому воздействию, обра-

батывали растворами додецилсульфата натрия и Triton X-100.

#### Удаление остаточного ДНК

Для удаления ДНК из фрагментов свиного хряща использовали ДНКазу I типа (New England Biolabs Inc., США). Пробу объемом 0,5 мл помещали в 1 мл 10 мМ Трис-НСI буферного раствора (рН 7,6), содержащего 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМоль CaCl<sub>2</sub> и 50 Е/мл ДНКазы и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С.

Отмывка от децеллюляризирующих веществ заключалась в экспозиции матрикса в бидистиллированной воде, содержащей антибиотик (ампицилин, 20 мкг/мл) и антимикотик (амфотерицин, 2,0 мкг/мл), на протяжении 90 часов. Отмытые образцы стерилизовали  $\gamma$ -облучением дозой 1,5 Мрад.

#### Исследование полноты удаления ДНК методом флуоресцентной микроскопии

Степень децеллюляризации фрагментов суставного хряща свиньи оценивали с использованием модифицированного метода [10]. Для количественного определения полностью децеллюляризованных, частично децеллюляризованных и не децеллюляризованных микрочастиц проводили окрашивание в 24-луночном планшете раствором специфического для двуцепочечной ДНК флуоресцентного красителя 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) в концентрации 1 мкг/мл (6 мкг

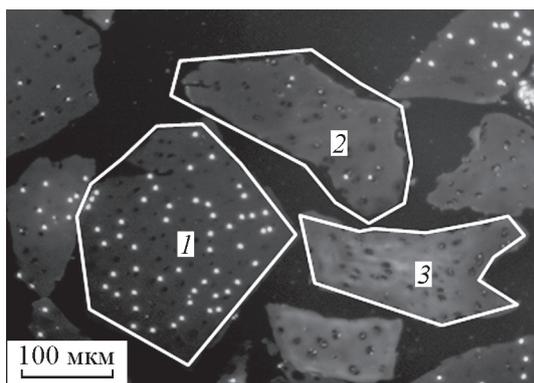


Рис. 1. Микрочастицы хряща свиньи после криопомола. Окрашка DAPI: 1 — не децеллюляризованные микрочастицы; 2 — частично децеллюляризованные микрочастицы; 3 — полностью децеллюляризованные микрочастицы.

Fig. 1. Cartilage microparticles. Stained by DAPI: 1 — non-decellularized microparticles; 2 — partially decellularized microparticles; 3 — completely decellularized microparticles.

хряща на 1 лунку). Длина волны возбуждения красителя составляет 358 нм, длина волны максимума излучения — 461 нм.

В каждом образце, с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Ti (Nikon Corporation, Япония), определяли количество микрочастиц матрикса (рис. 1): не децеллюляризованных; частично децеллюляризованных, содержащих отдельные клетки; полностью децеллюляризованных.

На дне лунки произвольным образом выбирали 15 полей зрения при увеличении  $\times 40$ . В каждом поле определяли количество частиц каждого типа. Результаты по всем полям суммировали, и количество фрагментов каждого типа в образце рассчитывали в процентах от общего количества частиц.

#### Количественное определение ДНК

Остаточное количество ДНК служит индикатором сохранившихся в децеллюляризованном матриксе клеточных компонентов, несущих основную долю антигенов, обеспечивающих реакцию отторжения трансплантата. Перед исследованием образцы хранили при температуре  $-20$  °С. Выделение ДНК проводили с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Образцы механически измельченной нативной ( $n = 3$ ) и децеллюляризованной ткани ( $n = 3$ ) массой 25 мг лизировали с использованием лизирующего буфера и протеиназы К в течении 16 ч при  $+56$  °С. Для количественного определения двуцепочечной ДНК использовали флуоресцентный краситель <sup>TM</sup> Picogreen Quant-iT (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя.

#### Исследование цитотоксичности

Цитотоксичность образцов исследовали в соответствии с ГОСТ ISO 10993-5-2011 [11] методом прямого контакта образцов с культурой мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч), полученных из фрагмента подкожной жировой клетчатки от здорового донора в ФГБУ НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова. Клетки выделяли из жировой ткани методом ферментативного разложения ткани раствором коллагеназы I-го типа, достигая активности фермента в растворе 600 ед/г жировой ткани. Далее клетки культивировали по стандартной методике на полной ростовой среде (ПРС) со сменой пассажа на 14 – 16 сутки. В эксперименте использовали клетки III-го пассажа.

МСК ЖТч высевали в культуральные плоскодонные 6-луночные планшеты и инкубировали  $24 \pm 2$  ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  в стандартных условиях во влажной атмосфере, содержащей  $5 \pm 1\%$   $\text{CO}_2$ . На поверхность образовавшегося  $80 \pm 10\%$  монослоя клеток помещали исследуемые образцы. Через  $24 \pm 2$  ч инкубации оценивали морфологию и лизис клеток с применением автоматизированной системы прижизненного наблюдения за клетками IncuCyte Zoom (Sartorius, США). Отрицательным контролем была эмбриональная телячья сыворотка, положительным контролем — стандартный раствор цинка в азотной кислоте (9,95 мг Zn в 1–2 масс. %  $\text{HNO}_3$ , разведение 1:200 раствором 0,9 % NaCl для инъекций).

### **Исследование гемосовместимости**

К образцам добавляли 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении масса образца (г): эстрагирующая жидкость (мл) = 1:30. В качестве отрицательного контроля использовали 0,9 % раствор натрия хлорида, а положительного контроля дистиллированную воду.

Все пробирки с растворами инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 120 мин. Затем в каждую пробирку добавляли цитратную кровь кролика, приготовленную на 3,8 %-м растворе цитрата натрия в соотношении 1:9, из расчета 200 мкл на 10 мл экстракта, перемешивали и вновь инкубировали в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. После инкубации пробирки помещали в центрифугу для осаждения крови при ускорении 2000 об/мин в течение 20 мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли на биохимическом анализаторе “Стат факс 1904+” при длине волны 545 нм.

Количественным критерием метода служит относительная величина гемолиза  $\alpha_h$  в %, определяемая по формуле:

$$\alpha_h = \frac{E_s - E_c}{E_{100} - E_c} \cdot 100\%,$$

где  $E_s$ ,  $E_c$ ,  $E_{100}$  — оптические плотности опытной пробы, контрольной пробы и пробы со 100 %-м гемолизом соответственно.

Образец признается гемосовместимым по тесту на гемолиз, если  $\alpha_h \leq 2\%$ .

### **Исследование функциональных свойств (адгезия и пролиферация клеточных культур)**

МСК ЖТ осаждали центрифугированием, ресуспендировали в ростовой культуральной среде

(DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мМ L-глутамина (все перечисленные реактивы производства Gibco, США) и культивировали до формирования монослоя, меняя среду 2 раза в неделю. Перевод клеток в суспензию осуществляли путем инкубации в 0,25 % растворе трипсина в смеси с раствором Версена (1:1) при  $37^\circ\text{C}$  в течение 5 мин. В эксперименте использовали клетки 3-го пассажа.

Каждая КИК включала  $1 \cdot 10^6$  клеток и 5 мг тканеспецифических децеллюляризованных микрочастиц суставного хряща свиньи. Матрикс заселяли клетками путем вращения в пробирках с культуральной средой на платформе шейкера типа “балерина” Multi Bio 3D (Biosan, Латвия). Первые 5 суток КИК культивировали в ростовой культуральной среде. Далее культуральную среду заменяли на хондрогенную дифференцировочную среду (DMEM HG добавкой GlutaMAX™ (Gibco, США), содержащей 10 % ITS+ (Corning, США), 1 % пируват натрия (Gibco, США), 0,25 % аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 0,0001 % дексаметазона (Sigma-Aldrich, США), 0,002 % TGF- $\beta$ 1 (PeproTech, США) и 1 % культурального антибиотика-антимикотика (Gibco, США)). Замену среды осуществляли на каждый третий день. Морфологию образцов исследовали на 21 сутки культивирования в дифференцировочной культуральной среде с использованием иммуногистохимического окрашивания.

### **Гистологическое и иммуногистохимическое исследования**

Исходные и децеллюляризованные образцы фиксировали в 10 %-м растворе формалина на ФБС, промывали в течение 15 мин в проточной воде и обезживали в спиртах восходящей концентрации (70 %, 80 %, 96 %; по 5 мин в каждой смене спиртового раствора), выдерживали по 5–7 минут в смеси этанола и хлороформа, а также хлороформе и заливали в парафин.

Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные с помощью микротомы Leica RM3255, депарафинировали, дегидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, алыциановым синим и DAPI. Кроме того, проводили постановку иммуногистохимической реакции на коллаген II, используя Novocastra™ Lyophilized Rabbit Polyclonal antibody Collagen Type II.

Для визуализации в срезах образцов коллагена II типа использовали Novocastra™ Concentrated

Peroxidase Detection System (RE7130-K, Leica Microsystems), следуя протоколу, рекомендованному производителем. Предварительно препараты подвергали ферментативной процедуре ретривизации — нагретые срезы инкубировали при 37 °С с теплым раствором трипсина в течении 30 мин.

Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon eclipse, оснащенный цифровой фотокамерой.

## Результаты и обсуждение

Лазерный дифракционный анализ показал, что размер частиц хряща не превышал 220 мкм, при этом преобладали частицы с размером  $161 \pm 11$  мкм, что указывает на возможность инъекционного введения ТИК хряща.

На рис. 2 представлены результаты анализа количества частично и полностью децеллюляризованных, а также не децеллюляризованных микро-частиц хряща свиньи в образцах, полученных при комбинации разного количества циклов замораживания/оттаивания с обработкой ПАВ.

Как следует из представленных на рис. 2 данных, уже после добавления одного цикла замораживания/оттаивания к обработке ПАВ, количество полностью децеллюляризованных микро-частиц в образцах значительно увеличилось — до  $20 \pm 4$  %. Максимальное количество полностью свободных от клеток микро-частиц, было выявлено при комбинации 10 циклов замораживания/оттаивания с обработкой ПАВ ( $88 \pm 9$  %).

Как видно из рис. 2, количество не децеллюляризованных микро-частиц, богатых клетками, существенно снижалось уже при использовании 2 циклов замораживания/оттаивания в комбинации с ПАВ ( $64 \pm 4$  %) по сравнению с отдельным действием ПАВ ( $78 \pm 10$  %). Отметим, что минимальное количество микро-частиц, содержащих многочисленные клетки, выявляли при комбинации 10 циклов замораживания/оттаивания с воздействием ПАВ ( $8 \pm 2$  %). При этом, значения для режимов с 9 и 10 циклами значимо не различались.

Отметим, что наибольшее количество частично децеллюляризованных микро-частиц присутствовало при 6 и 7 циклах замораживания/оттаивания, а минимальное их количество обнаружили в образцах, чья обработка включала 10 циклов замораживания/оттаивания ( $5 \pm 1$  %).

Из полученных результатов следует, что комбинированный метод децеллюляризации хряща свиньи, включающий 10 циклов замораживания/оттаивания с последующей обработкой ПАВ при-

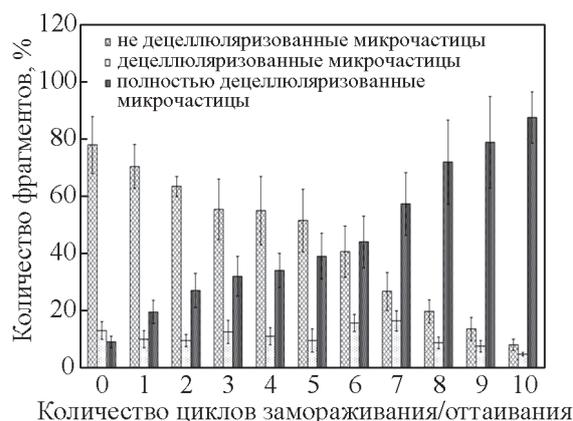


Рис. 2. Влияние количества циклов замораживания/оттаивания и последующей децеллюляризации микро-частиц хряща свиньи под действием ПАВ на удаление ДНК.

Fig. 2. The influence of freeze/thaw cycles ( $-196$  °C/ $37$  °C) number with subsequent decellularization of porcine cartilage microparticles with surfactant on DNA removal.

водит к снижению количества не децеллюляризованных микро-частиц в 7 раз и возрастанию доли децеллюляризованных микро-частиц в 6,8 раз по сравнению с действием ПАВ в отдельности.

Таким образом, комбинация двух методов (замораживание/оттаивание с последующей обработкой растворами ПАВ) позволяет добиться практически полной децеллюляризации микро-частиц хрящевой ткани свиньи.

Однако, для окончательной децеллюляризации микро-частиц суставного хряща свиньи, нами

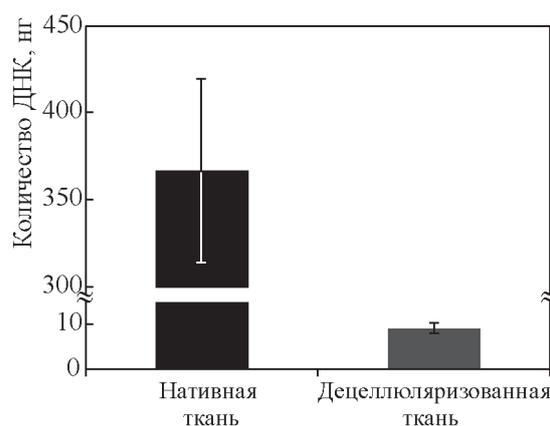


Рис. 3. Анализ количества ДНК в нативной и децеллюляризованной ткани суставного хряща свиньи.

Fig. 3. Analysis of DNA content in native and decellularised articular cartilage tissue.

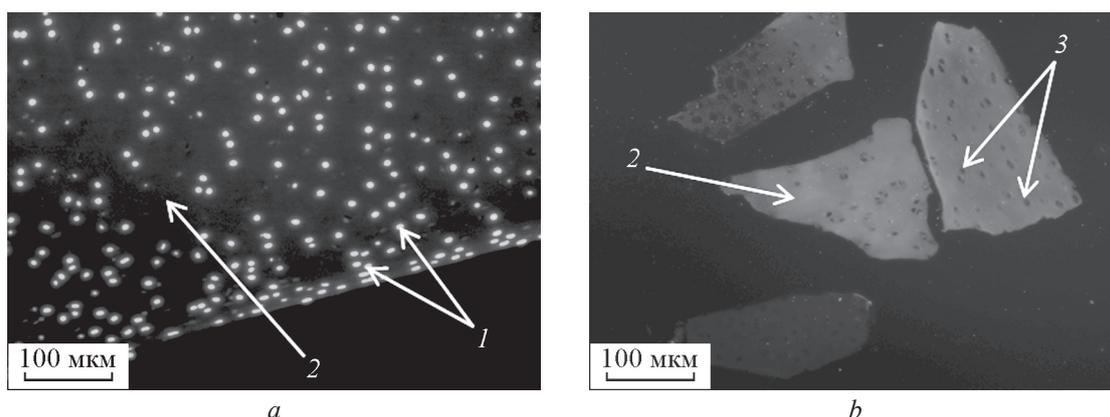


Рис. 4. Нативный суставной хрящ свиньи (а) и микрочастицы суставного хряща свиньи после децеллюляризации (b): 1 — клетки, 2 — ВКМ, 3 — пустые лакуны без клеток. Окрашивание DAPI.

Fig. 4. Native porcine articular cartilage (a) and porcine articular cartilage microparticles after decellularization (b): 1 — cells, 2 — extracellular matrix, 3 — empty lacunae without cells. Stained by DAPI.

было предложено включить в протокол обработку раствором ДНКазы, применяющуюся для удаления остаточных количеств сохранившейся ДНК [12]. В образцах, полученных при последовательной обработке хряща растворами ПАВ и раствором ДНКазы, количество децеллюляризованных микрочастиц составило  $71 \pm 12\%$ . В случае использования комбинации замораживания/оттаивания и обработки ПАВ с экспозицией микрочастиц хряща в растворе ДНКазы, уже начиная с 3 циклов применения замораживания/оттаивания в образцах не определяли фрагментов содержащих клетки (рис. 3). Отметим, что уменьшение циклов замораживания/оттаивания приводило к появлению одиночных центров флуоресценции. Основываясь на

полученных данных, в качестве оптимального протокола децеллюляризации выбрали сочетание 3-х циклов замораживания/оттаивания и последовательной экспозиции микрочастиц хрящевой ткани в растворах ПАВ и растворе ДНКазы.

Количественный анализ показал, что полученный по выбранному протоколу матрикс децеллюляризованного суставного хряща свиньи был в значительной степени очищен от ДНК: содержание ДНК снизилось с  $366,9 \pm 53,0$  нг/мг ткани до  $9,1 \pm 1,1$  нг/мг ткани,  $p < 0,05$  (рис. 3).

Заметим, что в ткани сохранилось лишь около 2,5 % ДНК, что свидетельствует о хорошей децеллюляризации и, соответственно, низкой иммуногенности полученного матрикса [9].

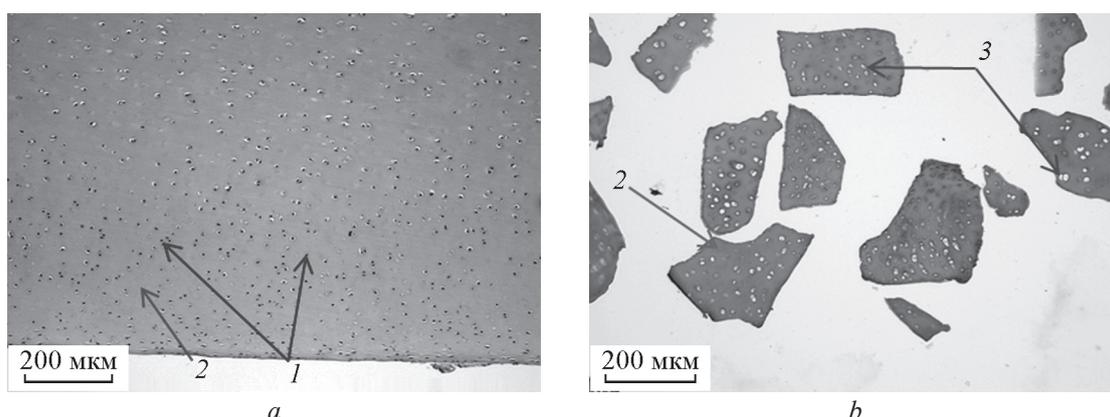


Рис. 5. Нативный суставной хрящ свиньи (а) и микрочастицы суставного хряща свиньи после децеллюляризации (b): 1 — клетки, 2 — ВКМ, 3 — пустые лакуны без клеток. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Fig. 5. Native porcine articular cartilage (a) and porcine articular cartilage microparticles after decellularization (b): 1 — cells, 2 — extracellular matrix, 3 — empty lacunae without cells. Stained by hematoxylin and eosin.

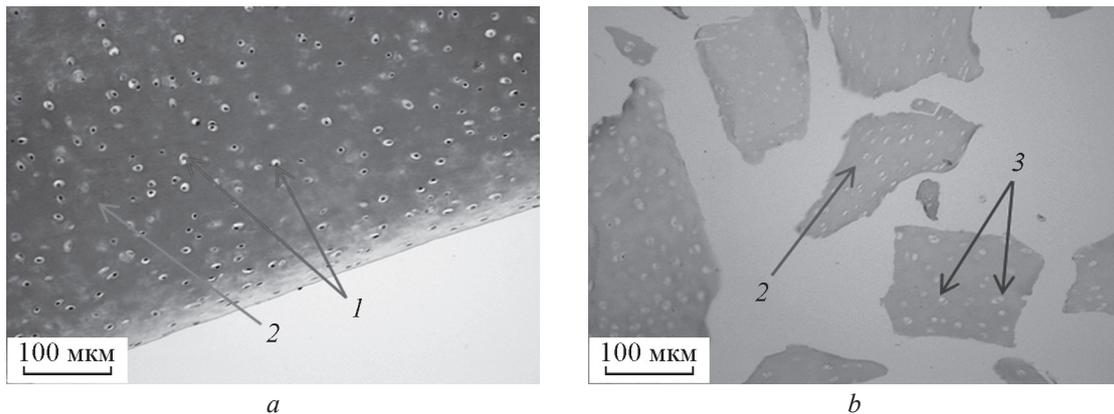


Рис. 6. Нативный суставной хрящ свиньи (a) и микрочастицы суставного хряща свиньи после децеллюляризации (b): 1 — клетки, 2 — ВКМ, 3 — пустые лакуны без клеток. Окрашивание альциановым синим на ГАГ.

Fig. 6. Native porcine articular cartilage (a) and porcine articular cartilage microparticles after decellularization (b): 1 — cells, 2 — extracellular matrix, 3 — empty lacunas without cells. Stained by alcian blue.

Полнота децеллюляризации также была подтверждена окрашиванием гистологических срезов флуоресцентным красителем DAPI. Как видно на рис. 4 в нативном суставном хряще определялась характерная флуоресценция ядер. При этом в микрочастицах децеллюляризованного матрикса ДНК не визуализировали.

Окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты (рис. 5a) дают наглядную картину состояния нативного суставного хряща свиньи. Можно выделить: поверхностную зону, содержащую фибробластоподобные клетки (вероятно, хондробласты) и более глубокую зону, содержащую округлые и овальные клетки, расположенные в лакунах (хондроциты). Поверхность нативного суставного хряща выглядит гладкой. При этом в децеллюляризованном хряще сохранившихся клеток не наблюдали (рис. 5b). Также в образце не визуализировались ядерный материал и клеточный детрит. Это свидетельствовало о том, что разработанная методика позволила проводить равномерную децеллюляризацию всех микрочастиц вне зависимости от их зонального происхождения. Заметим, что ВКМ в микрочастицах децеллюляризованного хряща выглядел сохранным.

Как видно на рис. 6, в нативной ткани наблюдали интенсивное позитивное окрашивание альциановым синим. При этом поверхностный слой имел более слабое окрашивание по сравнению с интенсивным синим. Окрашивание же децеллюляризованной ткани альциановым синим практически отсутствовало во всех микрочастицах.

В результате исследования цитотоксичности на клеточной культуре МСК ЖТч не обнаружено

проявлений цитотоксического эффекта децеллюляризованного матрикса суставного хряща свиньи на протяжении времени исследования (24 ч) как методом прямого контакта, так и методом вытяжек из матрикса.

Относительная величина гемолиза не отличалась от отрицательного контроля и была равна 0,001, тогда как для положительного контроля описываемая величина была равна 1,511.

Таким образом, согласно критерию теста на гемолиз эритроцитов, индуцированный контак-

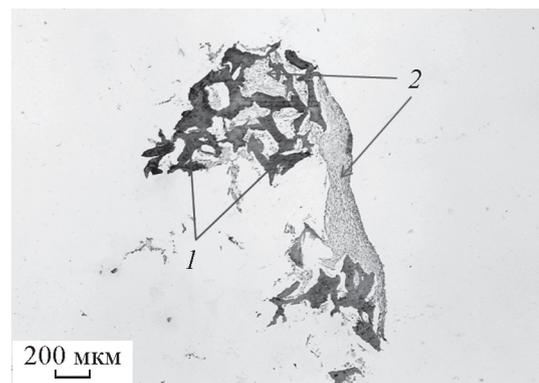


Рис. 7. Пролиферация МСК ЖТч на поверхности микрочастиц суставного хряща свиньи после децеллюляризации: 1 — микрочастицы децеллюляризованного хряща, 2 — клетки. Иммуногистохимическое окрашивание на коллаген II типа.

Fig. 7. hADSCs proliferation on the surface of porcine articular cartilage microparticles after decellularization: 1 — articular cartilage microparticles after decellularization, 2 — cells. Immunohistochemical staining on type II collagen.

том с чужеродной поверхностью, и исследованию цитотоксичности *in vitro* матрикс соответствует требованиям ГОСТ Р ИСО 10993-1-2011, предъявляемым к биосовместимым материалам.

В образце суставного хряща свиньи после децеллюляризации мы наблюдали активную пролиферацию МСК ЖТч на поверхности матрикса (рис. 7). Клетки образовывали многослойные тяжи и склеивали микрочастицы децеллюляризованного хряща свиньи в единый конгломерат. При иммуногистохимическом окрашивании выявили, что все без исключения микрочастицы равномерно окрашивались на коллаген II типа, основной тип коллагена суставного хряща (> 90 % от всего коллагена в суставном хряще), что свидетельствует о том, что предложенный протокол децеллюляризации суставного хряща позволяет не только сохранить основной белковый компонент ткани, но и обеспечить высокую биосовместимость.

## Выводы

Разработан способ получения микродисперсного тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи с сохранением морфофункциональных свойств ВКМ и без признаков цитотоксичности.

Показанная биосовместимость и гемосовместимость полученного матрикса *in vitro* указывает на его потенциал в использовании в регенеративной медицине хряща.

*Работа выполнена частично при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-06012).*

## Литература

1. Kwon H., Brown W.E., Lee C.A., Wang D., Paschos N., Hu J.C., Athanasiou K.A. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nat Rev Rheumatol.* 2019, v. 15, no. 9, pp. 550 – 570.
2. Басок Ю.Б., Севастьянов В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины в лечении дефектов хрящевой ткани суставов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*, 2016, т. 18, № 4, с. 102 – 122.
3. Rai V., Dilisio M.F., Dietz NE, Agrawal DK. Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2017, v. 105, no. 8, pp. 2343 – 2354.
4. Fu N., Dong T., Meng A., Meng Z., Zhu B., Lin Y. Research Progress of the Types and Preparation Techniques of Scaffold Materials in Cartilage Tissue

Engineering. *Curr. Stem. Cell. Res. Ther.*, 2018, v. 13, no. 7, pp. 583 – 590.

5. Немец Е.А., Кирсанова Л.А., Басок Ю.Б., Шагидулин М.Ю., Волкова Е.А., Метельский С.Т., Севастьянов В.И. Особенности технологии децеллюляризации фрагментов печени человека как тканеспецифического мелкодисперсного матрикса для клеточно-инженерной конструкции печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2017, т. 19, № 4, с. 70 – 77.
6. Westman A.M., Goldstein R.L., Bradica G., Goldman S.M., Randolph M.A., Gaut J.P., Vacanti J.P., Hoganson D.M. Decellularized extracellular matrix microparticles seeded with bone marrow mesenchymal stromal cells for the treatment of full-thickness cutaneous wounds. *J. Biomater. Appl.*, 2019, vol. 33, no. 8, pp. 1070 – 1079.
7. Gilbert T.W., Stolz D.B., Biancaniello F., Simmons-Byrd A., Badylak S.F. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 2005, v. 26, no. 12, pp. 1431 – 1435.
8. Shan Z., Lin X., Wang S., Zhang X., Pang Y., Li S., Yu T., Fan S., Zhao F. An injectable nucleus pulposus cell-modified decellularized scaffold: biocompatible material for prevention of disc degeneration. *Oncotarget.*, 2017, v. 8, no. 25, pp. 40276 – 40288.
9. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 2011, v. 32, no. 12, pp. 3233 – 3243.
10. Hung S.H., Su C.H., Lee F.P., Tseng H. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. *J. Voice.* 2013, v. 27, pp. 289 – 294.
11. ГОСТ ISO 10993-1-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*.
12. Fermor H.L., Russell S.L., Williams S., Fisher J., Ingham E. Development and characterisation of a decellularised bovine osteochondral biomaterial for cartilage repair. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2015, v. 26, article 186.

## References

1. Kwon H., Brown W.E., Lee C.A., Wang D., Paschos N., Hu J.C., Athanasiou K.A. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2019, vol. 15, no. 9, pp. 550 – 570.
2. Basok Yu.B., Sevast'yanov V.I. Tekhnologii tkanevoj inzhenerii i regenerativnoj mediciny v lechenii defektov hryashchevoj tkani sustavov [Tissue engineering and regenerative medicine technologies in the treatment of articular cartilage defects]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov — Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*, 2016, vol. 18, no. 4, pp. 102 – 122.

3. Rai V., Dilisio M.F., Dietz N.E., Agrawal D.K. Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2017, vol. 105, no. 8, pp. 2343 – 2354.
4. Fu N., Dong T., Meng A., Meng Z., Zhu B., Lin Y. Research progress of the types and preparation techniques of scaffold materials in cartilage tissue engineering. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.*, 2018, vol. 13, no. 7, pp. 583 – 590.
5. Nemeč E.A., Kirsanova L.A., Basok Yu.B., SHagidulin M.Yu., Volkova E.A., Metel'skij S.T., Sevast'yanov V.I. Osobennosti tekhnologii decel'lyulyarizacii fragmentov pecheni cheloveka kak tkanespecificeskogo melkodispersnogo matriksa dlya kletочно-инженерной konstrukcii pecheni [Technology features of decellularization of human liver fragments as tissue-specific fine-grained matrix for cell-engineering liver construction]. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov — Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*, 2017, vol. 19, no. 4, pp. 70 – 77.
6. Westman A.M., Goldstein R.L., Bradica G., Goldman S.M., Randolph M.A., Gaut J.P., Vacanti J.P., Hoganson D.M. Decellularized extracellular matrix microparticles seeded with bone marrow mesenchymal stromal cells for the treatment of full-thickness cutaneous wounds. *J. Biomater. Appl.*, 2019, vol. 33, no. 8, pp. 1070 – 1079.
7. Gilbert T.W., Stolz D.B., Biancaniello F., Simmons-Byrd A., Badylak S.F. Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 12, pp. 1431 – 1435.
8. Shan Z., Lin X., Wang S., Zhang X., Pang Y., Li S., Yu T., Fan S., Zhao F. An injectable nucleus pulposus cell-modified decellularized scaffold: biocompatible material for prevention of disc degeneration. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 25, pp. 40276 – 40288.
9. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 12, pp. 3233 – 3243.
10. Hung S.H., Su C.H., Lee F.P., Tseng H. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. *J. Voice*, 2013, vol. 27, pp. 289 – 294.
11. GOST ISO 10993-1-2011 *Izdeliya medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstviya medicinskih izdelij. Chast' 5. Issledovanie na citotoksichnost': metody in vitro* [Medical Products. Assessment of the biological effects of medical devices. Part 5. Cytotoxicity assay: in vitro methods].
12. Fermor H.L., Russell S.L., Williams S., Fisher J., Ingham E. Development and characterisation of a decellularised bovine osteochondral biomaterial for cartilage repair. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2015, vol. 26, article 186.

Статья поступила в редакцию — 10.02.2020 г.  
после доработки — 26.02.2020 г.  
принята к публикации — 27.02.2020 г.

**Басок Юлия Борисовна** — Федеральное государственное бюджетное учреждение “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России (123182, Москва, ул. Щукинская, 1), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, специалист в области биоматериаловедения, тканевой инженерии и регенеративной медицины. E-mail: bjb2005@mail.ru.

**Кириллова Александра Дмитриевна** — Федеральное государственное бюджетное учреждение “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России (123182, Москва, ул. Щукинская, 1), аспирант, специализируется в области биоматериаловедения, тканевой инженерии и регенеративной медицины. E-mail: sashak1994@mail.ru.

**Григорьев Алексей Михайлович** — Федеральное государственное бюджетное учреждение “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России (123182, Москва, ул. Щукинская, 1), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, специалист в области биоматериаловедения, тканевой инженерии и регенеративной медицины. Email: Bear-38@yandex.ru.

**Кирсанова Людмила Анфилофьевна** — Федеральное государственное бюджетное учреждение “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России (123182, Москва, ул. Щукинская, 1), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, специалист в области гистохимических методов и тканевой инженерии. Email: ludochkakirsanova@mail.ru.

**Немец Евгений Абрамович** — Федеральное государственное бюджетное учреждение “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России (123182, г. Москва, ул. Щукинская, 1), доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, специалист в области биоматериаловедения, тканевой инженерии, разработки гемосовместимых материалов и покрытий. E-mail: evgnemets@yandex.ru.

**Севастьянов Виктор Иванович** — Федеральное государственное бюджетное учреждение “Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова” Минздрава России (123182, Москва, ул. Щукинская, 1), доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биомедицинских технологий и тканевой инженерии, специалист в области биоматериаловедения, тканевой инженерии и регенеративной медицины, систем доставки лекарственных веществ. E-mail: viksev@yandex.ru.

---

## Fabrication of microdispersed tissue-specific decellularized matrix from porcine articular cartilage

Yu. B. Basok, A. D. Kirillova, A. M. Grigoryev, L. A. Kirsanova,  
E. A. Nemets, V. I. Sevastianov

The method for obtaining a microdispersed tissue-specific matrix from decellularized porcine articular cartilage with maintenance of morphological and functional properties of the extracellular matrix and no signs of cytotoxicity was developed. Cartilage particles size distribution in suspension after cryogrinding was determined using the laser diffraction analysis. The range of sizes of the cartilage microparticles obtained demonstrates the possibility of their injection administration ( $< 220 \mu\text{m}$ ). The combination of stages, including 3 cycles of freezing/thawing ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}/37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) followed by treatment with solutions of surface-active substances (surfactant), sodium dodecyl sulfate and Triton X-100, and DNase, allowed to achieve the complete absence of non-decellularized microparticles. The residual DNA content was  $9.11 \pm 1.13 \text{ ng/mg}$  of tissue. The effectiveness of surfactant washing was assessed by the cytotoxicity of the matrix on human adipose tissue mesenchymal stromal cells (hADSCs) culture. To assess the hemocompatibility of the samples obtained, their hemolytic activity was studied *in vitro*. The adhesion and proliferation of hADSCs on the matrix surface were studied on 21 days of cultivation. The matrix did not possess hemolytic activity and cytotoxicity on hADSCs. In the samples we observed active hADSCs proliferation on the matrix surface. The biocompatibility and hemocompatibility of the obtained matrix *in vitro* show its potential for use in regenerative cartilage medicine.

**Keywords:** matrix, decellularization, microparticles, cartilage tissue.

---

**Basok Yulia** — Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, 123182 Schukinskaya street, 1), PhD (Biology), senior research fellow, specialist in biomaterials, tissue engineering and regenerative medicine. E-mail: bjb2005@mail.ru.

**Kirillova Aleksandra** — Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, 123182 Schukinskaya street, 1), PhD student, specialist in biomaterials, tissue engineering and regenerative medicine. E-mail: sashak1994@mail.ru.

**Grigor'ev Aleksey** — Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, 123182 Schukinskaya street, 1), PhD (Biology), senior research fellow, specialist in biomaterials, tissue engineering and regenerative medicine. E-mail: Bear-38@yandex.ru.

**Kirsanova Ljudmila** — Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, 123182 Schukinskaya street, 1), PhD (Biology), senior research fellow, specialist in histochemical methods and tissue engineering. E-mail: ludochkakirsanova@mail.ru.

**Nemets Evgenij** — Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, 123182 Schukinskaya street, 1), PhD (Biology), leading research fellow, specialist in biomaterials, tissue engineering, development of hemocompatible materials and coatings. E-mail: evgnemets@yandex.ru.

**Sevastianov Viktor** — Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, 123182 Schukinskaya street, 1), professor, Dr Sci (Biology), head of laboratory tissue engineering and delivery systems, specialist in biomaterials, tissue engineering and regenerative medicine, drug delivery systems. E-mail: viksev@yandex.ru.