

## ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИСЕПТИКОВ ДЛЯ ОБРАБОТКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТРИКСОВ ЛЁГКИХ КРЫС

Е. В. Куевда<sup>1,\*</sup>, Е. А. Губарева<sup>1</sup>, А. А. Басов<sup>1,2</sup>, С. В. Крашенинников<sup>3</sup>,  
Т. Е. Григорьев<sup>3</sup>, И. С. Гуменюк<sup>3</sup>, С. С. Джима<sup>3</sup>, О. А. Качанова<sup>1</sup>, С. Н. Чвалун<sup>3</sup>

Представлено академиком РАН А.Б. Лисицыным 27.04.2018 г.

Поступило 04.07.2018 г.

С целью подбора оптимального способа дезинфекции каркасов перед рецеллюляризацией с помощью морфологических методов (исследования биомеханической прочности волокон внеклеточного матрикса) и анализа хемилюминесценции у крыс изучали действие октенисепта и хлоргексидина в разных концентрациях на биологические матриксы лёгких до и после децеллюляризации. Хлоргексидин в разведении 1 : 10 обладал наименьшими повреждающими свойствами для матрикса и в наибольшей степени способствовал обеззараживанию каркасов для дальнейшего хранения и проведения экспериментальных исследований.

*Ключевые слова:* децеллюляризация, хлоргексидин, хемилюминесценция, биомеханическая прочность волокон, биологический каркас.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524844498-502>

Децеллюляризация органов и тканей считается перспективной технологией регенеративной медицины, позволяющей решить проблемы органного донорства и назначения пожизненной иммуносупрессивной терапии [1, 2]. Получение в условиях *in vitro* биологических бесклеточных матриксов, рецеллюляризация их собственными клетками реципиента с последующей ортостатической имплантацией являются основными этапами создания тканеинженерных конструкций. При этом особое внимание необходимо уделять стерильности имплантируемых каркасов [3]. Уровень стерильности  $10^{-6}$  является “золотым” стандартом при выполнении хирургических операций [4]. Для обработки имплантируемых материалов и достижения требуемого уровня стерильности используются различные химические соединения: надуксусная кислота, хлорид меди (II), перекись водорода и сверхкритическая двуокись углерода [1, 5]. Однако упомянутые соединения способны влиять на целостность трансплантатов, обладают цитотоксическими и иммунотоксическими свойствами и не применимы для биологических объектов

[6–8]. Обработка матриксов надуксусной кислотой, например, приводит к снижению содержания коллагена типа IV и эластина во внеклеточном матриксе [9]. В условиях потери эластичности после децеллюляризации дополнительное повреждение волокон внеклеточного матрикса (ВКМ), особенно для таких органов, как лёгкие, является критическим [10]. В связи с этим поиск новых методов обработки биологических матриксов, не влияющих на структурные и биомеханические свойства, а также на рост и пролиферацию клеток, остаётся важной проблемой регенеративной медицины.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния октенисепта и хлоргексидина в разных концентрациях на биологические матриксы лёгких крыс для выбора оптимального способа дезинфекции биологических каркасов.

Для исследования эффектов воздействия антисептиков на биологические матриксы лёгких крыс выбрано четыре группы образцов: нативные образцы (группа *a*); образцы лёгких после децеллюляризации, не обработанные растворами антисептиков (группа *b*); образцы децеллюляризованных лёгких, обработанные раствором октенисепта в разведении 1 : 6 (группа *в*); образцы децеллюляризованных лёгких, обработанные раствором хлоргексидина в разведении 1 : 10 (группа *г*). Концентрации антисептиков мы выбрали после проведения в соответствии с международными рекомендациями [4] оценочных тестов на жизнеспособность клеток,

<sup>1</sup> Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

<sup>2</sup> Кубанский государственный университет, Краснодар

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва

\* E-mail: [elenakuevda@yandex.ru](mailto:elenakuevda@yandex.ru)

размещённых на каркасах. Эксперименты выполняли после одобрения протоколов исследования Локальным этическим комитетом. Децеллюляризацию лёгких осуществляли детергент-энзиматическим методом путём последовательной перфузии через лёгочную артерию 1%-го водного раствора дезоксихолата натрия и 0,1%-го раствора тритона X-100 в сочетании с вентиляцией атмосферным воздухом через трахею [11].

После децеллюляризации и обработки антисептиками состояние матриксов оценивали путём определения биомеханических и цитотоксических свойств каркасов; эффективность дезинфекции — микробиологическим методом, а также с помощью регистрации хемилюминесценции. Учитывая, что использованный протокол детально описан нами и верифицирован [11], дополнительное исследование морфологических свойств рутинными гистологическими методами и определение резидуальной ДНК не проводили. Спонтанную и  $H_2O_2$ -индуцированную хемилюминесценцию, позволяющую получить данные о соотношении прооксидантных и антиоксидантных факторов без повреждающего действия на биологические матриксы [12, 13], исследовали с помощью аппаратно-программного комплекса Хемилюминометр Lum-5773 (разработан на кафедре медицинской биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова) для регистрации и анализа сверхслабых световых потоков. Диаметр исследуемых образцов ткани лёгкого составил  $6,0 \pm 0,1$  мм, толщина  $4,0 \pm 0,2$  мм. При подготовке к исследованию регистрировали фоновое свечение (ФС) хемилюминометра — измерение интенсивности свечения контрольного источника в пустом кюветном отделении. Определяли площадь собственной хемилюминесценции (ПСХ) объекта, позволяющую оценить общее количество радикалов, образовавшихся в течение времени измерения, и площадь индуцированной хемилюминесценции (ПИХ) при введении в кювету 100 мкл 0,3%-го раствора  $H_2O_2$ . Для стандартизации полученных результатов измерения проводили в течение 100 с. Показатель ПСХ за 100 с ( $ПСХ_{100}$ ) определяли по формуле:  $ПСХ_{100} = ПСХ - ФС$  в вольтах (В). Величину ПИХ рассчитывали по формуле:  $ПИХ = ПИХ_t - ПСХ_t$ , где  $t$  — продолжительность вспышки ИХ до её выхода на плато.

Биомеханические исследования левых долей лёгких крыс проводили с помощью универсальной разрывной машины Instron 5965 (“Instron”, Великобритания). Перед испытаниями образцы деформировали 4 раза в фосфатном буфере на 20% от начальной высоты образца для удаления остатков воздуха. Циклические испытания на одноосное сжатие образцов проводили 1000 раз с предварительной нагрузкой 0,05 Н, частотой 20 циклов/мин,

амплитудой циклов 30–70% от начальной высоты образца. Испытания проводили при 30°C после 7 дней инкубации в фосфатном буфере для групп *a* и *b* и в растворах антисептиков для групп *в* и *г*.

Цитотоксические свойства каркасов оценивали с помощью красителя ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксамид) согласно рекомендациям производителя (Cell proliferation assay ХТТ, “AppliChem GmbH”, Германия) через 72 ч культивирования после статической рецеллюляризации опытных и контрольных образцов крысиными мультипотентными стромальными клетками. Цитотоксический индекс рассчитывали по методике [14], и его величину выражали в процентах.

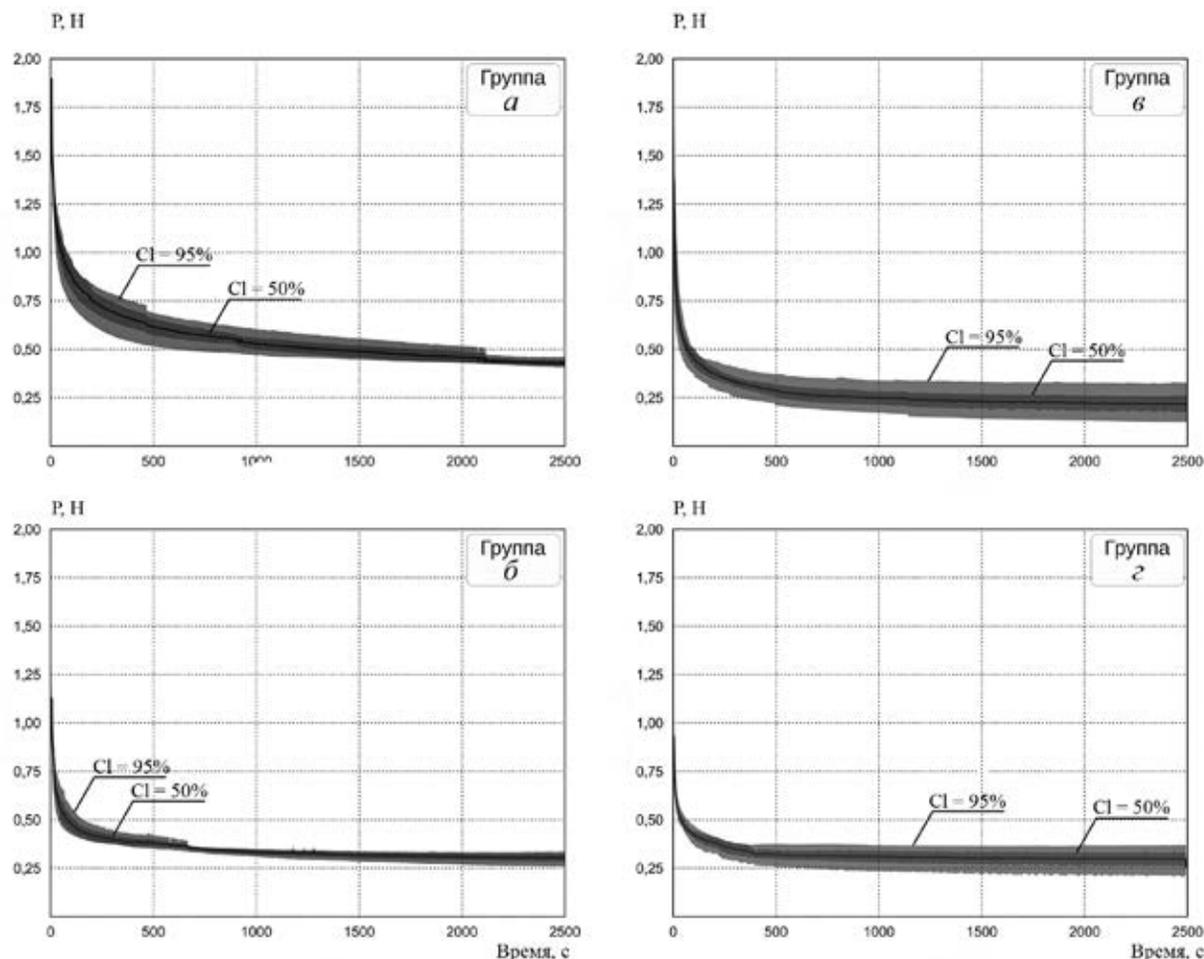
В микробиологических исследованиях использовали стандартные тест-штаммы микроорганизмов (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р, *Candida albicans* ATCC 885-653) в разведении 1 : 1000 стерильным физиологическим раствором, которые инкубировали с исследуемыми образцами в течение 14 сут. Контролем служили 5 образцов (по одному на каждый тест-штамм) питательной среды DMEM (“Sigma-Aldrich”, США) без добавления антимикробных препаратов [15].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета GraphPad Prism, v. 6.04. Достоверность различий определяли с помощью критерия  $t$  Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ .

В результате микробиологических исследований мы установили, что при добавлении в питательную среду хлоргексидина и октенисепта в разведении соответственно 1 : 10 и 1 : 6 видимых невооружённым глазом признаков роста тест-штаммов микроорганизмов на протяжении всего срока наблюдения мы не зарегистрировали. Таким образом, среда DMEM, содержащая антисептики в указанных концентрациях, обладала бактериостатическим и фунгистатическим действием.

При проведении ХТТ-теста мы обнаружили, что цитотоксический индекс каркасов группы *b* составил 21,36%, *в* — 60,1%, *г* — 7,9%. Значительное увеличение цитотоксичности матриксов при обработке октенисептом негативно влияет на возможность рецеллюляризации, препятствует точной пролиферации на каркасах.

При исследовании биомеханических свойств матриксов мы установили, что начальные пиковые нагрузки первых циклов образцов групп *a* и *b* были одинаковы:  $1,25 \pm 0,15$ ;  $n = 5$  (рис. 1). Затем в группе *a* мы зарегистрировали плавное падение пиковых нагрузок, что, возможно, обусловлено



**Рис. 1.** Колебания пиковых нагрузок при циклическом нагружении образцов нативных лёгких (группа *а*), децеллюляризованных лёгких (группа *б*), децеллюляризованных лёгких, обработанных хлоргексидином (группа *в*) и октенисептом (группа *г*) с визуализацией плотности распределения кривых при 95%CI и 50%CI ( $n = 5$  для каждой группы).

постепенным разрушением связей коллагенового каркаса и клеток. У образцов группы *в* после начального падения уровень пиковых нагрузок практически не менялся. В образцах, обработанных хлоргексидином и октенисептом, мы наблюдали падение пиковых нагрузок в начале испытаний (циклы 2–50), и затем уровень пиковых нагрузок оставался стабильным. Указанные изменения биомеханических свойств могут свидетельствовать о механической устойчивости образцов и отсутствии дополнительного повреждения коллагенового каркаса в результате обработки антисептиками.

При оценке хемилюминесценции (рис. 2) нативных лёгких достоверных отличий показателей ПСХ<sub>100</sub> по сравнению с децеллюляризованными образцами мы не выявили. После добавления раствора пероксида водорода наблюдали достоверное увеличение ПИХ децеллюляризованного матрикса на 96,2% ( $p = 0,027$ ). При воздействии раствора октенисепта в разведении 1 : 6 мы не

обнаружили достоверных изменений параметров хемилюминесценции по сравнению с таковыми интактной ткани децеллюляризованных лёгких, в то время как при обработке хлоргексидином в разведении 1 : 10 мы зарегистрировали увеличение ПСХ<sub>100</sub> в 4,1 раза по сравнению с этим показателем в образцах группы *б* ( $p = 0,010$ ) при одновременном снижении ПИХ на 51,4% ( $p = 0,010$ ). Увеличение ПСХ<sub>100</sub> при анализе хемилюминесценции децеллюляризованных матриксов после добавления хлоргексидина может быть обусловлено свечением матрикса, возникающим при образовании гипохлорита в результате разрушения внеклеточных антиоксидантных факторов.

Данные микробиологических исследований, изучение цитотоксических свойств каркасов, их биомеханической прочности и интенсивности хемилюминесценции позволяют считать концентрацию хлоргексидина при разведении 1 : 10 достаточно эффективной для дезинфекции

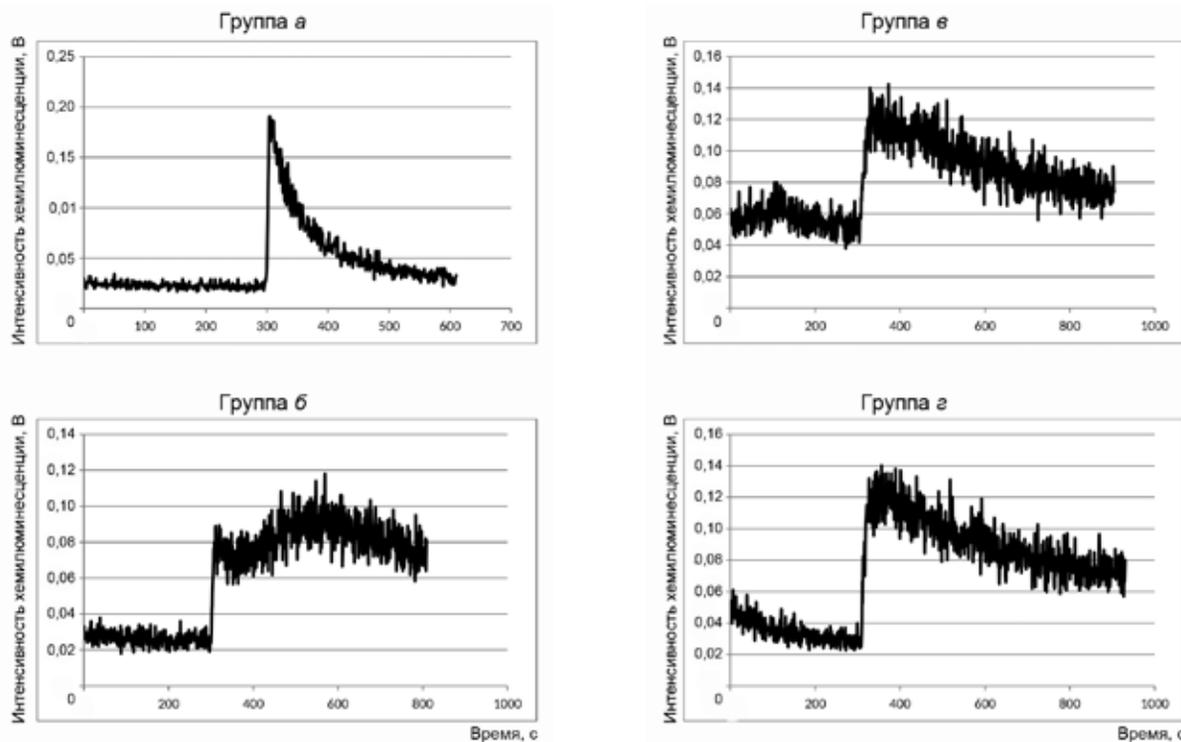


Рис. 2. Показатели хемилюминесценции ткани исследуемых образцов лёгких. Обозначение групп как на рис. 1.

матриц при наименьшем токсическом влиянии на клеточные линии при рецеллюляризации, а также оказывающей минимальное повреждающее действие на волокна ВКМ.

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках комплексной НИР лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины ГБОУ ВПО Минздрава России “Клеточные механизмы регенерации интраорганальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов” (приказ № 145 от 29.02.2016 г.) и при поддержке Государственного задания Министерства образования и науки РФ (проект № 6.5882.2017/БЧ).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balestrini J.L., Liu A., Gard A.L., et al. // *Tissue Eng. Pt C*. 2016. V. 22. № 3. P. 1–10.
2. Scarritt M.E., Pashos N.C., Bunnell B.A. // *Frontiers in Bioeng. and Biotechnol.* 2015. V. 3. № 43. P. 1–17.
3. Torbeck L., Raccasi D., Guilfoyle D.E., et al. // *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2011. V. 65. P. 535–543.
4. von Woedtke T., Kramer A. // *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*. 2008. V. 3. № 19. P. 1–10.
5. Leow-Dyke S.F., Rooney P., Kearney J.N. // *Tissue Eng. Pt C*. 2016. V. 22. № 3. P. 1–11.
6. Nguyen H., Cassady A.I., Bennett M.B., et al. // *Bone*. 2013. V. 57. P. 194–200.
7. Wilshaw S.P., Rooney P., Berry H., et al. // *Tissue Eng. Pt A*. 2012. V. 18. P. 471–483.
8. Hogg P., Rooney P., Leow-Dyke S., et al. // *Cell Tissue Bank*. 2015. V. 16. P. 351–359.
9. Gouk S.S., Lim T.M., Teoh S.H., et al. // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2008. V. 84. P. 205.
10. Куевда Е.В., Губарева Е.А., Крашенинников С.В., Григорьев Т.Е., Гуменюк И.С., Сотниченко А.С., Гилевич И.В., Карал-оглы Д.Д., Орлов С.В., Чвалун С.Н., Редько А.Н., Алексеенко С.Н., Маккиарини П. // *ДАН*. 2016. Т. 470. № 6. С. 724–727.
11. Куевда Е.В., Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гуменюк И.С., Гилевич И.В., Поляков И.С., Порханов В.А., Алексеенко С.Н., Маккиарини П. // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*. 2016. Т. 18. № 1. С. 38–44.
12. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. // *Биофизика*. 2011. Т. 56. № 6. С. 1081–1090.
13. Быков И.М., Басов А.А., Малышко В.В., Джимаков С.С., Федосов С.Р., Моисеев А. В. // *БЭБиМ*. 2017. Т. 163. № 2. С. 237–241.
14. Багаева В.В., Попова В.М., Пашкова Г.С., Исаджанян К.Е., Никитин В.В., Жиленков Е.Л. // *Исслед. и практика в медицине*. 2015. Т. 2. № 3. С. 35–42.
15. Королюк В.Б. *Медицинская микробиология*. СПб.: ЭЛБИ-СПБ, 2002. 268 с.

## **EXPERIENCE OF THE APPLICATION OF ANTISEPTICS FOR THE TREATMENT OF BIOLOGICAL MATRIXES OF RAT LUNG**

**E. V. Kuevda, E. A. Gubareva, A. A. Basov, S. V. Krasheninnikov, T. E. Grigoriev,  
I. S. Gumenyuk, S. S. Dzhimak, O. A. Kachanova, S. N. Chvalun**

Presented by Academician of the RAS A.B. Lisitsyn April 27, 2018

Received July 4, 2018

In order to select the optimal method for disinfecting the scaffolds prior to decellularization using morphological methods (studying the biomechanical strength of extracellular matrix fibers) and analyzing chemiluminescence in rats, the effect of octenisept and chlorhexidine was studied at different concentrations on the biological matrices of the lungs before and after decellularization. Chlorhexidine at a dilution of 1:10 possessed the least damaging properties for the matrix and most contributed to the decontamination of the cages for further storage and experimental studies.

*Keywords:* decellularization, chlorhexidine, chemiluminescence, biomechanical strength of fibers, biological framework.