

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ ИМЕНИ  
АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»

*На правах рукописи*

**Кондратенко Альбина Александровна**

**Биодеградируемый матрикс  
на основе децеллюляризованной пуповины человека  
для заживления полнослойных ран кожи  
(экспериментальное исследование)**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы  
3.3.3 – патологическая физиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук  
Басок Юлия Борисовна

доктор медицинских наук  
Калюжная-Земляная Лидия Ивановна

Москва – 2023

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	14
1.1 Процесс заживления глубоких повреждений кожи.....	14
1.2 Роль внеклеточного матрикса в заживлении глубоких повреждений кожи..	17
1.3 Подходы тканевой инженерии к заживлению глубоких повреждений кожи	22
1.4 Поиск оптимального биоматериала для создания матрикса, предназначенного для заживления глубоких повреждений кожи .....	29
1.5 Децеллюляризованный Вартонов студень пуповины в тканевой инженерии и регенеративной медицине .....	32
1.6 Модели для тестирования продуктов, влияющих на заживление полнослойных ран кожи .....	49
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	52
2.1 Объекты исследования .....	52
2.2 Изготовление матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека .....	52
2.3 Изготовление матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека с применением ферментативного гидролиза пепсином .....	53
2.4 Гистологические исследования .....	54
2.5 Иммуногистохимические исследования.....	55
2.6 Флюориметрическое окрашивание двуцепочечной ДНК для оценки полноты децеллюляризации .....	56
2.7 Определение количества ДНК.....	57
2.8 Окрашивание фрагментов ДНК бромистым этидием .....	57
2.9 Методы электронной микроскопии .....	57
2.10 Количественное определение содержания гликозаминогликанов .....	58
2.11 Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье .....	58
2.12 Исследование биodeградации матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека <i>in vitro</i> .....	59

2.13 Исследование набухаемости матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.....	60
2.14 Исследования на клетках человека и животных <i>in vitro</i> .....	60
2.15 Исследование влияния матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека на динамику заживления полнослойных кожных ран <i>in vivo</i> .....	64
2.16 Методы статистического анализа.....	67
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>68</b>
3.1 Выбор технологии изготовления матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.....	68
3.1.1 Подтверждение полноты децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека.....	68
3.1.2 Исследования морфологии матриксов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.....	71
3.1.3 Исследование метаболической активности фибробластов дермы человека, под действием «вытяжек» из матриксов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.....	76
3.2 Состав и свойства матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека .....	78
3.2.1 Компоненты матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.....	78
3.2.2 Биодegradация и набухание матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.....	82
3.3 Влияние матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека на рост и жизнеспособность клеток свиньи, морских свинок, крыс и мышей <i>in vitro</i> .....	89
3.4 Влияние матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины на заживление полнослойных кожных ран у мышей.....	96
3.5 Влияние матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины на заживление полнослойных кожных ран у свиньи .....	104

<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	110
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	111
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b> .....	112
<b>СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	113
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	115
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ А. Технология изготовления матрикса из децеллюляризованной пуповины человека</b> .....	133

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Совершенствование методов лечения глубоких повреждений кожи по-прежнему остается актуальной задачей современной биомедицины [1].

Создание *in vitro* биоэквивалентов для восстановления структуры и/или функций поврежденных органов и тканей с использованием биомиметиков внеклеточного матрикса, клеток и факторов роста является одной из задач тканевой инженерии [2, 3].

Альтернативным путем является формирование тканеинженерной конструкции в организме при имплантации бесклеточного матрикса, задачей которого является обеспечить миграцию к нему собственных клеток реципиента и стимуляцию их пролиферации с последующим замещением повреждения функционально активной тканью [4]. Такой матрикс может быть изготовлен заранее и применен без предварительной подготовки, что имеет особое значение для военной медицины [5, 6]. При этом отсутствие стадии культивирования клеток потенциально ускоряет внедрение бесклеточных матриксов в клиническую практику [7].

К одним из наиболее перспективных матриксов относят продукты, полученные методами децеллюляризации органов и тканей животных или человека. Такие матриксы обладают, как правило, высокой биосовместимостью, пористой структурой и способны обеспечивать доставку хемокинов и факторов роста [8, 9, 10]. Отметим, что аллогенный биоматериал как источник получения матриксов ограничен и его состав в значительной мере определяется воздействиями внешних и внутренних факторов в течение жизни донора [11, 12, 13]. Ксеногенный биоматериал животных любого возраста доступен, но развитие технологий генетических модификаций для удаления ксеноантигенов не достигли еще широкого применения [14].

Материалом гомологичного происхождения, лишенным возрастных изменений внеклеточного матрикса, являются внеэмбриональные ткани. Их получение неинвазивно, не связано с этическими ограничениями [15]. Кроме того, провизорные органы обладают уникальным составом и свойствами [16]. Пуповина человека перспективна для создания на её основе бесклеточных матриксов, благодаря присутствию в ней коллагенов разных типов, несультатированных и сультатированных гликозаминогликанов, фибронектина, многочисленных факторов роста, таких как: трансформирующий фактор роста альфа (TGF- $\alpha$ ) и различные изоформы трансформирующего фактора роста бета (TGF- $\beta$ 1, 2, 3), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и др. [17, 18].

Применение лиофилизированных форм матриксов имеет дополнительные преимущества. Показано, что наличие пор и микроструктура коллагеновых каркасов являются факторами адсорбции жидкостей и механической стимуляции, васкуляризации и регенерации поврежденной кожи [19].

Способ децеллюляризации биоматериала обуславливает компонентный состав, структуру и биологические свойства изготовленного матрикса [10, 20]. Поскольку это служит фактором его биоинтеграции и биологической активности, технология получения матрикса из децеллюляризованной ткани определяет его биофункциональную активность.

Суммируя все вышесказанное, отметим, что актуальная проблема скорейшего восстановления поврежденного кожного покрова имеет большое социальное значение. Разработанные альтернативные стратегии лечения глубоких повреждений кожи могут в дальнейшем быть использованы в различных областях регенеративной медицины.

## **Цель исследования**

Разработать биodeградируемый матрикс из децеллюляризованной пуповины человека, предназначенный для заживления глубоких повреждений кожи; в условиях *in vitro* и *in vivo* исследовать биологические свойства изготовленного материала.

## **Задачи исследования**

1. Разработать лабораторный регламент получения матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.
2. Оценить влияние ферментативного гидролиза пепсином децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека на способность матрикса поддерживать метаболическую активность фибробластов человека *in vitro*.
3. Изучить состав, структуру, биodeградацию и набухание матрикса, изготовленного из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.
4. Оценить *in vitro* цитотоксичность матрикса, изготовленного из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.
5. Исследовать способность матрикса, изготовленного из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, стимулировать процесс заживления полнослойных ран кожи на экспериментальных моделях *in vivo*.

## **Научная новизна**

1. Разработан лабораторный регламент децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека, обеспечивающий удаление клеток, содержание ДНК менее 50 нг/мг ткани и длину фрагментов ДНК менее 200 пар оснований.

2. Показано, что ферментативный гидролиз пепсином децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека уменьшает содержание гликозаминогликанов и оказывает негативное влияние на способность матрикса поддерживать метаболическую активность фибробластов дермы человека.
3. Установлено, что матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека характеризуется пористой структурой, присутствием в составе гликозаминогликанов, коллагена IV типа, ламинина, фибронектина и TGF- $\beta$ 3, биодegradацией в растворе коллагеназы и набуханием в  $16,1 \pm 2,0$  раза при контакте с физиологическим раствором при  $37^\circ\text{C}$ .
4. Экспериментально подтверждена функциональная активность матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека для заживления глубоких повреждений кожи.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты, полученные в ходе проведения исследований показывают, что использование матрикса из децеллюляризованной пуповины человека для разработки раневого покрытия целесообразно. Матрикс из децеллюляризованной пуповины человека является компонентом тканеинженерного (бесклеточного /или дополненного ауто/аллогенными клетками) раневого покрытия для стимулирования регенерации глубоких повреждений кожи и мягких тканей. Матрикс не требует специальных условий хранения и может быть использован без предварительной подготовки (Патент № 2795904 «Способ изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека для создания высокорегенеративного раневого покрытия»). Это делает перспективным его клиническую апробацию при лечении полнослойных ран кожи.

### **Методология и методы исследования**

Объектами исследований явились: образцы пуповины человека и матриксов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.

Результаты собственных исследований получены посредством комплекса методов. Для оценки качества децеллюляризации пуповины человека применяли методы световой, флюоресцентной и электронной микроскопии, а также биохимическое определение содержания ДНК. Для оценки морфологии и состава компонентов Вартонова студня пуповины после децеллюляризации применяли биохимическое определение содержания гликозаминогликанов, методы сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, инфракрасную спектроскопию Фурье преобразованием и иммуногистохимические методы окрашивания. Для оценки способности матрикса к биодеградации был применен ферментативный метод исследования.

Биосовместимость бесклеточного матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека оценивали *in vitro* на клетках, выделенных из печени, сердца, кожи, селезенки и коры головного мозга крыс, мышей, морских свинок и свиньи, а также исследовали влияние «вытяжек» из бесклеточных матриксов на метаболическую активность фибробластов дермы человека.

Модели полнослойных кожных ран *in vivo* у мышей (с пришиванием антиконтракционных колец) и свиньи использовали для оценки биологической активности матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработанный лабораторный регламент децеллюляризации обеспечивает эффективное удаление ДНК и сохранность компонентов внеклеточного матрикса Вартонова студня пуповины человека.
2. Протокол без применения ферментативного гидролиза пепсином позволяет получить гомологичный, биосовместимый матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, характеризующийся высокой степенью сохранения в составе гликозаминогликанов и способностью поддерживать метаболическую активность фибробластов человека *in vitro*.

3. Бесклеточный матрикс на основе децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека является биodeградируемым и способен к набуханию при контакте с физиологическим раствором более, чем в 16 раз.
4. Бесклеточный матрикс на основе децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека поддерживает пролиферацию и жизнеспособность клеток, выделенных из селезенки, печени, коры головного мозга, кожи и сердца мышей, крыс, морских свинок и свиньи.
5. Бесклеточный матрикс из пуповины человека проявляет биологическую активность в отношении заживления полнослойных ран кожи у экспериментальных животных *in vivo*.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность исследования обеспечена четкой постановкой задач, достаточным количеством экспериментальных данных, с использованием современных и стандартизированных методов исследования и статистической обработки.

Апробация работы состоялась 21.07.2023 года на совместной конференции научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения и результаты диссертации доложены и обсуждены на III Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлениям: «Нанотехнологии и наноматериалы» и «Биотехнические системы и технологии» (Анапа, 27-28 мая 2021 г.); Международной научной конференции «Актуальные вопросы ветеринарной патологии» (Санкт-Петербург, 24-25 сентября 2021 г.); Всероссийской научно-технической конференции «Новые материалы и энергетика в Вооруженных Силах Российской Федерации» (Анапа, 20-21

апреля 2022 г.); XV Всероссийской конференции патофизиологов Урала (Екатеринбург, 13-14 октября 2022 г.); V Национальном конгрессе по Регенеративной медицине (Москва, 23-25 ноября 2022 г.); II Междисциплинарном форуме «Медицина молодая» (Москва, 7 декабря 2022 г.); Конференции «Биотехнология и медицина. Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» на 21-ой Международной выставке «Аналитика ЭКСПО» (Москва, 14 апреля 2023 г.); Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии» (Анапа, 27 апреля 2023 г.).

### **Связь работы с научными программами и темами**

Работа выполнена в Федеральном Государственном бюджетном учреждении «Национальный Медицинский Исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» в рамках гранта Российского научного фонда № 21-15-00251 «Разработка комплексного подхода к регенеративной терапии остеоартроза с использованием инъекционной формы биомиметика внеклеточного матрикса с клеточными сфероидами» (2021-н.в.); экспериментальная работа по децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека была выполнена в Федеральном Государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-Медицинская академия имени С.М. Кирова» в рамках научно-исследовательских работ: «Исследование по созданию бесклеточного матрикса пуповины для тканеинженерного раневого покрытия и гидрогеля для регенеративной медицины», шифр «Аккорд» (2019-2021 гг.), и «Исследование регенеративных свойств бесклеточного продукта на основе пуповины человека в восстановлении поврежденных тканей в эксперименте», шифр «Гармония» (2022-2024 гг.).

## **Внедрение результатов исследования в практику**

Технология получения биodeградируемого матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня внедрена в работу отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии Федерального Государственного бюджетного учреждения «Национальный Медицинский Исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» и научно-исследовательского отдела медико-биологических исследований научно-исследовательского центра Федерального Государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова».

Результаты исследований используются при чтении лекций, проведении семинарских и практических занятий для студентов, клинических ординаторов и врачей на кафедрах медицинского факультета Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский Государственный Университет» Министерства науки и высшего образования. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедр и клиническую практику Федерального Государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова».

## **Личный вклад автора**

Автор принимала участие в изготовлении бесклеточного матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, в исследованиях его состава и свойств. Автор самостоятельно осуществляла планирование и проведение экспериментальной части работы *in vitro* и *in vivo*, работу с культурами клеток, работу с экспериментальными животными и морфологические исследования, анализ, обобщение и статистическую обработку полученных результатов.

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликованы 16 научных работ, в том числе 6 статей: из них 3 - в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 4 статьи - в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах данных; 10 публикаций - в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций. Получен патент РФ на изобретение.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 142 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 4 таблицами, 58 рисунками, содержит одну формулу. Список литературы включает 166 источника (50 отечественных и 116 зарубежных).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Процесс заживления глубоких повреждений кожи

Заживление кожных ран представляет собой последовательный процесс, состоящий из условно выделенных пересекающихся между собой фаз гемостаза, воспаления, образования грануляционной ткани и ремоделирования. Четко скоординированные клеточные и молекулярные события, вовлеченные в этот процесс, определяют результат заживления [21, 22]. Сразу после ранения активация процессов гемостаза приводит к формированию кровяного сгустка. Комбинация тромбоцитарного сгустка и фибриновой сетки останавливает кровотечение и создает временный каркас, необходимый для прикрепления клеток. Высвобождение хемотаксических веществ (хемокины и цитокины) запускает процессы фагоцитоза. Повышение проницаемости кровеносных сосудов вызывает отек и лейкоцитарную инфильтрацию в течение 24 часов после повреждения, реализуя процесс отграничения раны и создавая условия для фагоцитоза [23]. Растворимый фибронектин плазмы и продуцируемый клетками фибронектин собирается в нерастворимые фибриллы с конформационными изменениями его молекул и обнажением специфических последовательностей аминокислот, например, RGD (Arg-Gly-Asp), известной как «клетки-связывающий домен». Через RGD фибронектин связывается с  $\alpha_v\beta_3$ -интегрином фибробластов, стимулируя их миграцию в рану и прикрепление к волокнам временной структуры [24].

Миграция и пролиферация фибробластов и эндотелиоцитов уже в течение первых трех суток после повреждения приводит к формированию грануляционной ткани с образованием множества мелких незрелых кровеносных сосудов. Спустя 5-7 суток грануляционная ткань полностью замещает пространство раневого дефекта. В заживающей ране фибробласты производят большинство компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ). В то время как эпителиальные клетки с краев раны спустя 24 – 48 часов от повреждения

начинают пролиферировать и двигаться навстречу друг другу, формируя компоненты базальной мембраны и образуя слой эпителия. Раны с ровными жизнеспособными соприкасающимися краями заживают без нагноения первичным натяжением. Ушивание открытой раны способствует не только ее закрытию, но и заживлению первичным натяжением. Эпителизация глубоких и обширных ран происходит медленно. Такая рана заживает через нагноение, гранулирование с образованием рубцовой ткани [23]. Хирургическая обработка и выполнение кожно-пластических операций с целью раннего закрытия раневой поверхности необходимы для предотвращения инфицирования и скорейшего восстановления пациента [25]. При значительной утрате тканей данная тактика не всегда выполнима и требует применения альтернативных подходов [26].

Параллельно идут процессы «созревания» компонентов ВКМ с замещением коллагена III типа на коллаген I типа. Баланс между деградацией и синтезом ВКМ приводит к изменению структуры новообразованной ткани [27, 28]. Деградация белков ВКМ осуществляется клеточными лизосомальными ферментами нейтрофилов и макрофагов, и плазменными ферментами катепсином G, кининами, плазминогеном и другими протеазами. Важными ферментами деградации коллагена являются металломатриксные протеиназы (ММР). ММР-1, -8 и -13 расщепляют коллагены I, II и III типов; желатиназы ММР-2, -9 разрушают белки базальных мембран; стромелизины ММР-3, -10 и -11 действуют на различные компоненты ВКМ, в том числе протеогликаны, ламинин, фибронектин и аморфные коллагены. Различные типы клеток секретируют ММР под действием факторов роста и провоспалительных цитокинов [29].

Одними из ключевых клеточных компонентов иммунной системы, ответственными за течение процесса регенерации, являются макрофаги, которые претерпевают изменения в процессе заживления и проявляют различные спектры фенотипов между «провоспалительной» и «противоспалительной» крайностями [4]. Фенотипы макрофагов классифицируются по спектру маркеров на их поверхности, ассоциированы с цитокинами и эффекторными молекулами [30, 31]. Классически активированные макрофаги (провоспалительный M1-фенотип)

принимают участие в распознавании молекулярных паттернов, связанных с патогенами, повреждениями, пептидогликанами, высвобождаемыми внутриклеточными белками и нуклеиновыми кислотами. Проявляя активность в процессинге антигена, данный вид макрофагов усиливает секрецию провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерлейкины 1, 6 и 12 (IL-1, IL-6, IL-12) и окислительных метаболитов. Провоспалительное действие макрофагов необходимо для активации процессов фагоцитоза и ангиогенеза. Однако длительное присутствие провоспалительных макрофагов может способствовать формированию хронического воспалительного процесса, нарушению заживления и формированию грубого рубца [32, 33, 34].

Популяцию классически активированных макрофагов сменяет пул альтернативно активированных макрофагов (противовоспалительного M2-фенотипа), способствующих ремоделированию ткани и ангиогенезу. Высвобождаются противовоспалительные цитокины, такие, как интерлейкины 4 и 10 (IL-4, IL-10), PDGF, TGF $\beta$ , VEGF, FGF, EGF и др. Противовоспалительная популяция макрофагов принимает участие в восстановлении кожного покрова, стимулировании образования и ремоделировании ВКМ и ангиогенезе. Помимо макрофагов, регуляторные Т-лимфоциты также принимают участие в подавлении воспалительного процесса посредством высвобождения противовоспалительных цитокинов (например, IL-10 и TGF- $\beta$ 1) и аргиназы. Более того, Т-регуляторные клетки в сотрудничестве с Т-хелперами секретируют TGF- $\beta$ 1, IL-4, IL-5, IL-13 и IL-21 и участвуют в формировании ВКМ [35].

Для эффективного заживления ран важны процессы ангиогенеза. Ангиогенез, или неоваскуляризация, могут быть осуществлены за счет ветвления предсуществующих сосудов или *de novo* за счет привлечения эндотелиальных клеток-предшественников [36]. Направленная подвижность эндотелиальных клеток играет ключевую роль в этом процессе. Решающее значение в процессах новообразования сосудов играют интегрины, белки ВКМ и протеиназы [37]. VEGF является наиболее значимым фактором роста, обеспечивающим ангиогенез при заживлении ран. Его синтез регулируется фактором транскрипции,

индуцированным гипоксией. В процессе созревания новообразованных сосудов с привлечением периэндотелиальных клеток участвует ангиопоэтин-1. PDGF обеспечивает миграцию гладкомышечных клеток, а TGF- $\beta$  стабилизирует сосуды, увеличивая образование белков ВКМ перицитами [38].

По определению Food and Drug Administration любая рана, которая не заживает в течение 30 дней при адекватном лечении определяется как длительно не заживающая [38]. По результатам исследования Д.Н. Федорова и соавторов не заживающие раны разной этиологии характеризуются схожими морфофункциональными изменениями, а именно нарушениями клеточно-матриксных взаимодействий, процессов синтеза и ремоделирования ВКМ, невозможностью образования базальной мембраны и миграции кератиноцитов, преобладанием провоспалительной среды в ране (клетки и цитокины), недостаточная неоваскуляризация [40]. Совокупность патологических изменений препятствует нормальному течению процесса репарации. Следует отметить, что на сегодняшний день нет четких критериев для постановки диагноза хроническая рана [1].

Таким образом, тонко скоординированный баланс параллельно протекающих процессов, зависящий от объема поврежденной ткани, может быть нарушен на любом этапе раневого процесса под влиянием различных внешних и внутренних факторов.

## **1.2 Роль внеклеточного матрикса в заживлении глубоких повреждений кожи**

Помимо каркасной функции и обеспечения клеточной адгезии, ВКМ способен влиять на выживание, пролиферацию клеток и их функциональную активность [40, 42]. Все фазы заживления ран зависят от динамического взаимодействия между клетками и ВКМ, способствующему быстрому разрешению воспаления и функциональному заживлению [43, 44].

ВКМ – динамичная среда, волокнистые структурные компоненты которой образованы сложной трехмерной сетью твердых протеинов. 77% обезжиренной

сухой массы кожи человека составляют коллагены [45]. Другие волокнообразующие белки кожи включают фибрин, фибронектин, витронектин, эластин и фибриллин. Неволокнистые протеогликаны и гликозаминогликаны (ГАГ) создают заряженное осмотически активное пространство и соединяют элементы матрикса друг с другом и клетками, заполняя большую часть межклеточного пространства ткани. Их отрицательно заряженная и гидрофильная природа позволяет протеогликанам и ГАГ поддерживать гидратацию, буферность и дисперсию внутри ткани [13, 46]. Также в ВКМ могут присутствовать матрицеллюлярные белки, которые важны для осуществления клеточно-матричной сигнализации. В отличие от постоянно присутствующих в нормальной коже структурных белков, они появляются в ранах через определенные интервалы времени. К ним относят остеопонтин, остонектин, факторы роста, тенасцин-С, фибулин-5 и др. [24].

90% всего коллагена кожи человека составляет коллаген I типа [45]. Уникальность спиральной структуры структурного коллагена возникает благодаря обилию глицина (Gly), пролина и гидроксипролина. Три цепи из повторяющихся триплетов Gly-Xxx-Yyy, где позиции Xxx и Yyy обычно занимают остатки пролина и гидроксипролина, составляют сверхзакрученную молекулу коллагена, а межмолекулярное сшивание приводит к образованию фибрилл и волокон. Такое строение обеспечивает замечательную прочность при растяжении [47]. Разнонаправленность волокон коллагена создает векторы механического напряжения в коже. Линии натяжения Лангера коррелируют с ориентацией волокон коллагена в дерме [48]. Существует предположение, что чрезмерное напряжение пучков коллагена в самом начале раневого процесса, наряду с другими факторами, коррелирует с образованием гипертрофических рубцов [24]. Может иметь место и обратная ситуация, когда недостаточная механическая стимуляция дермальных фибробластов компонентами ВКМ ассоциирована с меньшей продукцией коллагенов. Это можно наблюдать при старении кожи [13].

Молекулярные сигналы механического напряжения описаны в качестве основного стимула для дифференцирования фибробластов в миофибробласты [49]. Даже 15% повышения нормального сигнала механотрансдукции достаточно для изменений в сигналинге киназы фокальной адгезии и трансляции экспрессии гладкомышечного актина- $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) [24]. Фибробласты, культивируемые на полимерных гелях, покрытых коллагеном I типа, с большим модулем жесткости, в большей степени демонстрировали экспрессию интегрина  $\alpha_v\beta_3$  и  $\alpha$ -SMA, а культивирование в более мягких условиях способствовало экспрессии интегрина  $\alpha_2\beta_1$  без экспрессии  $\alpha$ -SMA [50]. Эти данные согласовывались с наблюдениями за заживлением открытых ран. В случае, когда рана была заполнена грануляционной тканью и напряжение было минимально – фибробласты экспрессировали интегрин  $\alpha_2\beta_1$ , который необходим для организации тонких фибрилл коллагена в толстые волокна. При высоком напряжении, когда рана долгое время остается незакрытой, развивались «стрессовые волокна» цитоскелета с экспрессией  $\alpha$ -SMA и  $\alpha_v\beta_3$ . Уплотнение грануляции втягивало окружающую кожу в дефект и создавало дополнительное напряжение. Чрезмерное механическое стимулирование миофибробластов в фазу ремоделирования также может препятствовать их естественному апоптозу. В мышинной модели активация пути серин/треониновой протеинкиназы, способствующего выживанию клеток, во время пролиферативной фазы заживления замедляла входение миофибробластов в апоптоз и способствовало фиброзу. Так же было показано, что механическое напряжение увеличивает синтез коллагенов и ингибиторов MMP (TIMP) [50].

В дополнение к каркасной функции коллаген является важной сигнальной молекулой. Благодаря наличию последовательностей распознавания интегринов коллаген I типа модулирует адгезию, миграцию и дифференцировку клеток. Кроме этого, он способен связывать протеазы и воспалительные цитокины, модулируя таким образом микросреду заживающей раны [47].

Следующим наиболее значимым коллагеном для заживления кожных ран является коллаген III типа, на долю которого приходится примерно 10% всего коллагена в коже. Наблюдения за заживлением ран плода привели к

предположению о роли коллагена III типа в безрубцовом заживлении. Дальнейшие исследования на мышцах показали его участие в модуляции дифференцирования миофибробластов. Полное отсутствие коллагена III типа приводило к недостаточному заживлению ран. Экзогенно добавленный гель, состоящий из коллагена III типа, способствовал образованию грануляционной ткани и заживлению [47].

Коллаген IV типа образует гибкую трехмерную сетку, так как не содержит глицина, и вместе с ламинином, гепарансульфатом и протеогликанами образует базальную мембрану, обеспечивая плотную связь с поверхностью эпителиальных клеток [51]. Восстановление нормальной структуры поврежденной ткани возможно только при целостности базальной мембраны [23].

Коллаген VII является основным компонентом закрепляющих фибрилл, удерживающих эпидермис и дерму вместе [47].

Благодаря многим своим связывающим доменам, волокна фибронектина являются уникальным участником заживления ран. Фибронектин играет важную роль в организации и стабильности ВКМ. Показано, что он регулирует протеолитическую активность лизилоксидазы, фермента, ответственного за поперечную сшивку коллагеновых фибрилл и созревание коллагеновых волокон [24].

Эластические волокна образованы эластином, окруженным сетью микрофибрилл фибриллина, которые влияют на доступность TGF- $\beta$ . Растяжимые эластиновые волокна способствуют прочности и упругости тканей. Длинные перекрестносвязанные волокна эластина переплетены с относительно жесткими коллагеновыми [13].

ГАГ, связываясь с коровым белком, образуют протеогликаны. Протеогликаны, интегрированные в состав мембран, способны активироваться при взаимодействии с факторами роста, хемокинами или другими биологически активными веществами и регулировать воспаление, иммунный ответ, рост клеток и их дифференцировку. В свою очередь, ГАГ являются линейными полисахаридами, которые могут существовать независимо или в связи с

протеогликановой сердцевиной. Оба типа этих полимерных молекул имеют чрезвычайно изменчивые размеры [37].

Гиалуронан – полисахарид, образуемый на поверхности плазматической мембраны клетки гиалуронансинтазами, связывает воду примерно в 1000 раз больше своей массы и образует вязкий гидратированный гель. В дополнение к своей роли в поддержании гидратации тканей и осмотического равновесия, гиалуроновая кислота играет ключевую роль в регенеративном заживлении ран [13]. Высокомолекулярный гиалуронан (>500 кДа) ассоциирован с уменьшением воспаления, усилением экспрессии коллагена III типа, и возрастанием активности анти-фибротического TGF- $\beta$ 3 [52]. Низкомолекулярный гиалуронан (<400 кДа), продуцируемый эндотелиоцитами, способствует мобилизации лейкоцитов в очаг воспаления и стимулирует выработку ими провоспалительных цитокинов и хемокинов. Он ассоциирован с увеличением экспрессии коллагена I типа, усиленной пролиферацией фибробластов, и возрастанием их миофибробластической дифференциации [24, 33].

Протеогликаны дерматан, хондроитин, кератан и герпаран связаны, в отличие от гиалуронана, с сульфатами, но они также могут существовать в свободном несвязанном состоянии. Степень сульфатирования и распределения сульфатных групп вдоль полимерной цепи имеют решающее значение для взаимодействия с факторами роста [53].

Интегрины действуют как точка взаимодействия между цитоплазмой клетки и ВКМ. Кадгеринины, интегрины, селектины функционируют как трансмембранные рецепторы и обеспечивают взаимодействие между клетками и клетками, клетками и матриксом. Интегрины и кадгеринины, соединяя актин и промежуточные филаменты, связывают поверхность клетки с цитоскелетом и приводят к формированию фокальных комплексов адгезии. Комплексы интегрин-цитоскелет запускают внутриклеточные сигнальные пути протеинкиназы C, митоген-активируемой протеинкиназы и фосфатидилинозитол-3-киназы, которые регулируют пролиферацию, апоптоз и дифференцировку клеток. Гликопротеины клеточной адгезии кадгеринины участвуют во взаимодействии между клетками

одного типа и обеспечивают связь их плазматических мембран, формируя пояски сцепления и десмосомы. Формирование десмосом очень важно при миграции кератиноцитов в процессе реэпителизации кожных ран. Связь кадгеринов с цитоскелетом осуществляется с помощью катенинов. Данный вид межклеточных взаимодействий играет основную роль в регуляции миграции, пролиферации и дифференцировки клеток [24].

Таким образом, структурные и растворимые компоненты ВКМ отвечают за регулирование тканевого гомеостаза и передачу клеточных сигналов на каждой фазе заживления.

### **1.3 Подходы тканевой инженерии к заживлению глубоких повреждений кожи**

Традиционные стратегии лечения ран предусматривают ежедневное наблюдение, иссечение некротизированных тканей, а также применение средств, поглощающих раневую экссудат, предотвращающих загрязнение и сохраняющих теплую и влажную среду, полупроницаемую для кислорода [54].

Метод пересадки аутологичной кожи применяют для лечения глубоких обширных или длительно незаживающих ран. Однако приживление аутотрансплантатов, даже на сосудистой ножке, не всегда реализуется, особенно у пациентов с сопутствующей эндокринной, иммунной и метаболической патологией [55]. Ограниченность донорских сайтов для получения аутотрансплантатов является неустранимым препятствием для применения метода. Отторжение кожных аллотрансплантатов, трупных дермальных аллотрансплантатов по-прежнему остается серьезной проблемой [56]. Многообещающие результаты экспериментальной клеточной терапии ран на практике оказались существенно ограниченными различными факторами риска тромбообразования, возникновения нежелательных иммунных реакций, а также опухолевого роста [35].

Альтернативные подходы к восстановлению утраченных тканей способна предложить тканевая инженерия [23, 57]. Концепция, заключающаяся в

создании в лабораторных условиях эквивалентов утраченных тканей и органов и последующей их имплантации реципиенту потенциально способна возместить дефицит донорского материала. Тем не менее, характер ранения и динамика физиологических и патологических процессов, протекающих после повреждения, требуют немедленного применения средств, влияющих на заживление [6, 7].

Глубокое понимание взаимодействий клеток с ВКМ в процессе заживления привело к развитию самостоятельной отрасли регенеративной медицины – создание матриксов – биомиметиков ВКМ. Одной из наиболее привлекательных стратегий является применение технологии децеллюляризации тканей для создания таких матриксов. Освобождение от клеток донора позволяет использовать компоненты нативного ВКМ с фиксированными в них регенеративными молекулами [58]. Имплантированный в зону дефекта, матрикс обеспечивает временную индуктивную нишу для адгезии и пролиферации собственных клеток реципиента и способствует регенерации [4, 58].

Для стимуляции регенерации применяют матриксы на основе ВКМ аллогенного и ксеногенного происхождения, такие как: Epic<sup>TM</sup>, Prima<sup>TM</sup> Plus, Hancock® II, Mosaic®, Freestyle®, Perimount®, CopiOs®, Zimmer Collagen Repair Patch<sup>TM</sup>, MatriStem®, Oasis®, Restore<sup>TM</sup>, FortaFlex®, Strattice<sup>TM</sup>, TissueMend®, CorMatrix<sup>TM</sup>, Meso BioMatrix<sup>TM</sup>, Permacol, Synergraft®, Lyoplast®, OrthAdapt®, Alloderm, Karoderm, SureDerm, IOPatch<sup>TM</sup> и др. [46, 58, 59, 60, 61]. Возможная опасность их использования связана с потенциальными иммунными реакциями отторжения и опасностью передачи инфекционных агентов [62, 63, 64].

Низкая иммуногенность децеллюляризованных тканей обусловлена, главным образом, отсутствием генетического материала донора биоматериала или остаточных количеств внутриклеточных молекул (репертуар которых неизвестен). Даже аутологичные клетки при повреждении выделяют внутриклеточные молекулы, которые идентифицируются как сигналы

опасности (молекулы молекулярного паттерна, связанные с повреждением, или «DAMP»), запускающие местные и системные воспалительные реакции [4]. Применение различных методов и протоколов децеллюляризации тканей обеспечивает надежное очищение от генетического материала донора, но, в то же время, может приводить к потере ценнейших компонентов и изменению структуры белков ВКМ. Эффективное удаление клеток при сохранности микроструктуры и состава ВКМ обеспечивают регенеративный потенциал готового продукта [65].

Содержание двухцепочечной ДНК напрямую коррелирует с неблагоприятными реакциями реципиента на имплантацию бесклеточного продукта. Р.М. Срао et al. экспериментально проверили и предложили минимальные критерии остаточного содержания клеток и ДНК, следование которым исключает неблагоприятные последствия имплантации продукта. Это отсутствие видимого ядерного материала в гистологических срезах препарата, окрашенных ядерным флуоресцентным красителем 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) и гематоксилином и эозином, и остаточное количество двухцепочечной ДНК менее 50 нг/мг сухого веса бесклеточного продукта [66].

Для обеспечения лизиса клеточного материала применяют физические, химические и ферментативные методы [66, 67, 68]. Применение замораживания и размораживания, высоких температур, лиофилизации, механического измельчения или перфузии под давлением может приводить к нарушению структуры коллагена (разбуханию и денатурации). Использование хелатирующих, поверхностно-активных веществ, растворов кислот, щелочей и спиртов может приводить к неудовлетворительной биосовместимости вследствие недостаточного удаления остатков химических веществ [69, 70]. Применение ферментативных методов децеллюляризации также может быть сопряжено с потерей структуры ВКМ [71].

Избежать вовсе реакции иммунной системы реципиента на внедрение бесклеточного продукта невозможно. Однако вид возникающего иммунного ответа при имплантации децеллюляризованной ткани определяет возможность

достижения конструктивного и функционального результата заживления. Парадигма соотношения про- и противовоспалительных фенотипов тканевых макрофагов предоставляет основу для понимания сложной роли клеточных популяций в иммунном ответе на присутствие бесклеточного продукта [4]. Образование плотной соединительнотканной капсулы и проявление реакции «на инородное тело» являются нежелательными проявлениями реакций организма-реципиента на применение матрикса. Невозможность взаимодействия с тканями реципиента и сообщения с сосудисто-нервными структурами приводит к отсутствию его интеграции и снижению регенеративного потенциала [30, 31].

Исследование A.J. Allman et al., опубликованное в 2001 году, показало, что продукт на основе ВКМ способен модулировать иммунный ответ в зоне имплантации [72]. Исследование J.E. Valentine et al. расширило это представление и показало, что реакция макрофагов определяет исход конструктивного ремоделирования имплантированного в зону дефекта продукта [73]. Дальнейшие исследования подтверждали данное предположение и показывали, что регенеративные свойства матриксов, полученных путем децеллюляризации таких тканей, как дерма, подслизистая оболочка тонкого кишечника, ткани мочевого пузыря, печени и других детерминированы их способностью модулировать иммунные реакции реципиента, чего не было обнаружено при использовании синтетических матриксов. Высокое соотношение M2/M1-макрофагов в ранние периоды заживления способствовали благоприятному результату конструктивного ремоделирования в последующем [30, 31].

Сигналы механотрансдукции, инициируемые матриксами, оказывают регулирующее влияние на процессы миграции, пролиферации и дифференцировки клеток и даже могут быть задействованы в регуляции фенотипа иммунных клеток. Эффективность применения децеллюляризованных тканей также может быть следствием активации эндогенных сигнальных путей растворимыми факторами [30, 31]. J.L. Dziki et

al. исследовали влияние гидрогелевых форм на основе солюбилизованных децеллюляризованных тканей различного происхождения на дифференцировку макрофагов костномозгового происхождения самок мышей *C<sub>57</sub>bl<sub>6</sub> in vitro*. Авторы обнаружили, что гидрогели, полученные из ВКМ разных видов тканей, имеют разные составы и способствуют разным паттернам экспрессии поверхностных маркеров макрофагов. В частности, матриксы из подслизистого слоя тонкого кишечника свиньи, из тканей мочевого пузыря, головного мозга, пищевода и толстой кишки человека способствовали преобладанию M2-подобного фенотипа мышинных макрофагов. Напротив, действие продуктов из ВКМ кожи человека было ассоциировано с преобладанием M1-подобного фенотипа макрофагов. Продукты из ВКМ скелетных мышц и печени не показали значительного влияния на экспрессию поверхностных маркеров макрофагов по сравнению с необработанным контролем. В данном исследовании ни один из продуктов на основе ВКМ не вызывал снижения жизнеспособности макрофагов мышей костномозгового происхождения более чем на 20%. Макрофаги, обработанные солюбилизованными формами децеллюляризованных тканей, обладали повышенным антимикробным действием по сравнению с необработанным контролем [30, 31].

Иммуномодулирующий эффект при применении матриксов на основе децеллюляризованных тканей показан во влиянии на клетки врожденной и адаптивной иммунной системы. На модели объемной потери мышечной массы K. Sadtler et al. показали, что взаимодействие между макрофагами и T-регуляторными клетками инициировано продуктами деградации бесклеточного матрикса [74]. При этом В.М. Sikari et al. и L. Huleichel et al. показали ассоциацию между продуктами деградации матриксов на основе децеллюляризованных тканей и фенотипом макрофагов, экспрессией ими противовоспалительных генов и производством белков [75, 76].

Естественная биodeградация имплантированного биомиметика ВКМ со временем исключает необходимость формирования ответа на «инородное тело» (хорошо описанного в контексте синтетических имплантатов) или его

инкапсуляцию. При этом обработка продукта из ВКМ химическими сшивающими веществами, способствующими устойчивости к ферментативному расщеплению, задерживает или предотвращает их деградацию, подавляя конструктивное ремоделирование. К тому же химические сшивающие агенты изменяют ультраструктуру и топологию поверхности белков ВКМ [77].

Необходимо отметить, что исследование поверхностных маркеров макрофагов представляется непростой задачей и недостаточно точной для характеристики функциональных и паракринных эффектов этих клеток. Поскольку дихотомия их фенотипов является чрезмерным упрощением, исследования возможны только *in vitro*, что заметно влияет на результаты. Следует учитывать источник клеточного материала, подвергнутого исследованию, и его физиологическое состояние, условия поддержания жизнеспособности клеточной популяции *in vitro*, условия активации клеток и интерпретации результатов [4].

Существуют различные формы бесклеточных продуктов на основе децеллюляризованных тканей, такие как пленки, волокна, губки, гидрогели и мелкодисперсные частицы, формирование которых предусматривает использование дополнительных методов обработки биоматериала. Измельченные порошкообразные формы могут быть конъюгированы с фармакологическими агентами для достижения более сложных профилей высвобождения лекарств. Смешивание порошкообразных продуктов из ВКМ с неорганическими материалами, придающими продукту жесткость, особенно полезно при их применении с целью восполнения дефектов костной ткани [78].

В некоторых случаях использование инъекционных форм гидрогелей ВКМ, обладающих способностью к *in situ* полимеризации, является более целесообразными, так как подобные материалы могут легко подстраиваться под рельеф поверхности и объем поврежденного участка. Осмотические силы способствуют растяжению полимерной сетки гидрогеля при его набухании. Для этого децеллюляризованные продукты могут быть ферментативно

солюбилизованы в форму гидрогеля, который самособирается в трехмерную конструкцию при физиологическом рН и температуре [79]. Инъекционные гидрогели широко применяются для доставки белков, факторов роста, цитокинов, микроРНК и других иммуномодулирующих агентов в очаг повреждения. Гидрогели из полимеров природного (коллаген, фибрин, эластин, гиалуроновая кислота, фукоиданы, каррагинан, хитозан и т.д.) и синтетического происхождения (полиэтиленгликоль или поливиниловый спирт и т.д.) или даже из самособирающихся пептидов позволяют создавать на их основе продукты, дополненные биологически активными молекулами и клеточным материалом. Однако эти стратегии на сегодняшний день имеют ограниченное клиническое применение, связанное со сложностями контролируемого высвобождения биологически активных молекул [35].

Физические и химические свойства разных форм бесклеточных продуктов способны модулировать реакции микроокружения в зоне их имплантации. Скорость деградации, гидрофильность и топография поверхности способны оказывать влияние на клетки реципиента. Было обнаружено, что гидрофобные заряженные поверхности более привлекательны для адгезии макрофагов и секреции ими большего количества цитокинов по сравнению с гидрофильными нейтральными поверхностями. К тому же макрофаги изменяли экспрессию поверхностных белков в зависимости от характера функциональных групп химических веществ на поверхности материала [80].

Таким образом, тканевая инженерия может предложить методы воздействия на процессы заживления обширных повреждений кожи, дополняющие традиционное лечение или являющиеся самостоятельными средствами терапии. Применение биомиметиков ВКМ, изготовленных из децеллюляризованных тканей, представляется перспективным направлением. При этом разные протоколы децеллюляризации вносят вклад в сохранение профиля белков ВКМ и их микроструктуры.

#### **1.4 Поиск оптимального биоматериала для создания матрикса, предназначенного для заживления глубоких повреждений кожи**

Для лечения глубоких повреждений кожи и мягких тканей целесообразным представляется использование матрикса децеллюляризованной донорской кожи. Однако использование трупного биоматериала имеет ряд недостатков. Суммарные эффекты действия внешних факторов, интенсивности обменных процессов и функционирования регулирующих систем организма влияют на кожу в течение жизни донора влияют на состав ВКМ и соотношение его компонентов. Уменьшение содержания коллагенов IV и VII типов способствует ослаблению связей между дермой и эпидермисом. Присоединение молекул глюкозы и фруктозы к коллагенам и белкам ВКМ угнетает их сократительную способность и делает их резистентными к ремоделированию. Процессы фотостарения и окислительного стресса являются причиной фрагментации коллагенов и химической модификации аминокислотных остатков. Уменьшение содержания фибронектина ухудшает связывание клеток через интегриновые рецепторы с ВКМ [13]. Возрастные изменения донорских тканей неизбежно ухудшают свойства изготовленных из них матриксов и снижают их регенеративный потенциал. Кроме того, в соответствии Федеральным законом от 23 июня 2016 года №180 «О биомедицинских клеточных продуктах» (Статьи 33-35) устанавливаются строгие ограничения на извлечение для дальнейшего использования тканей умерших людей [81].

Поскольку максимальный возраст крупных животных-доноров биологического материала существенно меньше возраста человека (выступающего донором биоматериала для создания на его основе децеллюляризованного продукта), многие исследователи используют именно ксеногенные ткани [82, 83]. В соответствии с Федеральным законом от 23 июня 2016 года №180 «О биомедицинских клеточных продуктах», ксеногенные клеточные биопродукты запрещены к трансплантации, однако запрет не распространяется на бесклеточные продукты. В мире ведутся исследования по

созданию бесклеточных продуктов из органов и тканей животного происхождения в расчете, что полное удаление клеток и ядер из них может обеспечить неиммуногенность продукта из ксеногенного биоматериала. Однако существуют риски возникновения иммунных реакций (из-за межвидовых белковых различий) и передачи инфекционных агентов при использовании у человека ксеногенных материалов [83].

Состав эмбриональных и неонатальных тканей заметно отличается от тканей взрослых особей, при этом имеет больший регенеративный потенциал, поскольку играет важную роль в морфогенезе тканей [4]. Безрубцовый характер заживления ран плода сохраняется примерно до середины третьего триместра внутриутробного развития, после чего происходит переход к постнатальному типу заживления ран с образованием нежного эластичного рубца [84, 85, 86].

Интерес к использованию экстраэмбриональных тканей (включая плаценту, амниотическую оболочку и пуповину) в качестве сырья для применения в регенеративной медицине возобновился с 1990-х годов [87, 88, 89, 91, 91, 92, 93, 95, 96]. Например, из плаценты возможно получение экстрактов белков, ферментов, жирных кислот и других метаболитов, полезных для заживления ран [15].

В то время как клиническое применение плодных оболочек хорошо описано, использование ткани пуповины является относительно новым. Пуповина человека широко используется для получения мезенхимальных стромальных клеток (МСК) и эндотелиальных клеток, а также может служить источником гиалуроновой кислоты [79, 97, 98, 99]. Ее сосуды не имеют эластической мембраны и защищены гладкомышечными клетками и мукоидной соединительной тканью, называемой Вартоновым студнем (ВС). Эта твердая слизистая соединительная ткань пуповины человека, покрытая слоем амниотического эпителия, является естественным резервуаром МСК [15]. ВС состоит в основном из коллагенов (более 500 мг/г ткани), протеогликанов и ГАГ, таких как гиалуроновая кислота и гепарансульфат, иммобилизованных и встроенных в коллагеновую сеть. Пропорциональное соотношение коллагенов в

составе ВС составляет: тип I (47%), III (40%), V (12%) [15, 100]. До 70% содержания ГАГ в пуповине составляет гиалуроновая кислота (приблизительно 4 мг/мл), что придает ткани особую гидрофильность и обеспечивает поддержание стабильности кровотока по сосудам пуповины в условиях скручивания и сжатия во время внутриутробного развития плода [15]. ВКМ пуповины содержит множество различных факторов роста, включая  $\alpha$ FGF,  $\beta$ FGF, инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), PDGF, EGFs TGF- $\beta$ 1, MMP и TIMP, способных к высвобождению во время расщепления [17]. Уникальная особенность тканей фетального фенотипа к ранозаживлению без рубцевания может быть ассоциирована с более высоким содержанием в них противифибротической изоформы TGF- $\beta$ 3, относительно изоформ TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2, присущих постнатальным тканям [84].

Для стимулирования регенерации разных тканей из ВКМ пуповины могут быть изготовлены различные формы продуктов, включая пластины различной толщины, порошки, гидрогелевые композиции т. д. Возможно дополнение амниотическим материалом или ВКМ минерализированной или деминерализованной кости. Могут быть созданы комбинации биоматериала пуповины с фармацевтическими носителями.

Некоторым недостатком ВС является его доступность в течение короткого периода времени сразу после родов. Однако криоконсервация пуповины с целью последующего устранения клеток из Вартонова студня может легко преодолевать этот относительный недостаток [101, 102, 103, 104, 105].

Ряд исследований показали, что децеллюляризованный Вартонов студень представляет собой биосовместимый каркас с подходящими свойствами для восстановления и регенерации хрящей [106], печени [107], нервной ткани [79] и кожных ран [108]. Для простоты транспортировки, логистики и хранения бесклеточные продукты могут быть подвергнуты лиофилизации и стерилизации.

Одним из рекомендованных параметров эффективности децеллюляризации является содержание в продукте остаточных количеств ДНК не более 50 нг/мг сухого продукта [66]. Другие исследования сообщали о некотором разрушении

структурных белков ВКМ Вартонова студня при достижении такого качества децеллюляризации [109, 110, 111, 112]. Критерии эффективности децеллюляризации, цитируемые специалистами тканевой инженерии со ссылкой на исследования Р.М. Срапо et al., относятся к продуктам, изготовленным из тканей постнатального фенотипа с обилием зрелых высокодифференцированных клеток в них. Однако есть данные о том, что ткань пуповины человека демонстрирует неиммуногенность даже при неполном удалении из нее клеток [5, 6, 112, 113]. Такая привлекательная комбинация иммунологических, биомеханических и биохимических характеристик делает ВС пуповины человека универсальным биоматериалом для изготовления продуктов для регенеративной медицины [8, 9, 106]. Исходя же из понимания возможностей дифференцировки МСК ВС нативной пуповины в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении, можно предположить, что бесклеточные продукты из пуповины, имитирующие ниши обитания МСК, могут иметь аналогичные и близкие сферы применения для регенерации костных, хрящевых и покровных тканей.

Таким образом, для изготовления матрикса, обладающего оптимальными свойствами, стимулирующими регенерацию, мы остановили свой выбор на биоматериале пуповины человека.

### **1.5 Децеллюляризованный Вартонов студень пуповины в тканевой инженерии и регенеративной медицине**

Уникальность состава биоматериала пуповины человека заключается не только в большом содержании коллагена III типа и высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, компонентов базальной мембраны, но и в большом содержании сульфатированных ГАГ и факторов роста. К тому же был показан регенеративный потенциал экстрагированных растворимых компонентов децеллюляризованного матрикса из пуповины [6]. В связи с этим использование технологий децеллюляризации, позволяющих не только

сохранить нативную ультраструктуру ВКМ, но и растворимые компоненты является предметом научного поиска [114].

Для обобщения фактических данных, касающиеся регенеративного потенциала децеллюляризованной стромы пуповины был произведен поиск литературы в электронных базах данных Medline/PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), Cochrane library (<https://www.cochrane.org>), eLIBRARY/Российский индекс научного цитирования (<https://www.elibrary.ru>) [114].

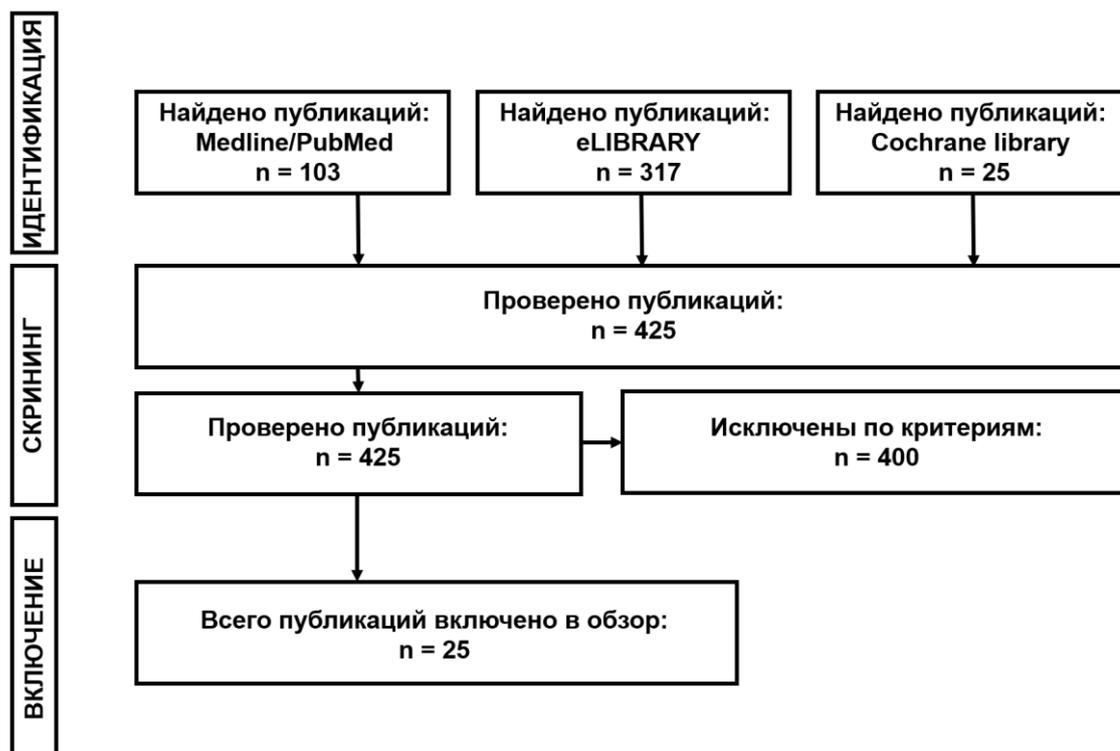
В качестве поискового запроса в Medline/PubMed были использованы термины: (umbil\*[title] AND decell\*[title]) OR (whart\*[title] AND decell\*[title]) OR (umbil\*[title] AND acell\*[title]) OR (whart\*[title] AND acell\*[title]) OR (umbil\*[title] AND extracel\*[title] AND matr\*[title]) OR (whart\*[title] AND extracel\*[title] AND matr\*[title]). Дата последнего поиска 19.03.2023 [114].

В качестве поискового запроса в Cochrane library были использованы термины (extracell\* AND umbil\*) OR (decell\* AND umbil\*). Дата последнего поиска 25.03.2023 [114].

В качестве поисковых запросов в eLIBRARY были использованы термины decell\* umbil\* (поисковый запрос 1), extracell\* matrix\* umbil\* (поисковый запрос 2), децеллюляризация и пуповина (поисковый запрос 3), "внеклеточный матрикс" и пуповина (поисковый запрос 4). Дата последнего поиска 25.03.2023 [114].

Критериями включения было присутствие в исследовании материалов, полученных из децеллюляризованной стромы пуповины человека. В анализе литературы были использованы полнотекстовые оригинальные статьи на английском и русском языках. Критериями исключения статей было использование децеллюляризованных сосудов (вен и артерий) пуповины, а также изучение культур клеток пуповины без использования ее ВКМ. Кроме того, в исследование не были включены материалы конференций, обзоры и препринты статей [114].

Процесс поиска литературы представлен на рисунке 1 [114].



**Рисунок 1 - Блок-схема поиска литературы, использованной для обзора [114]**

Первоначальный поиск привел к обнаружению 425 публикаций. Прежде всего, в результатах поиска публикаций в каждой из выбранных баз данных вручную были исключены статьи, посвященные децеллюляризации сосудов пуповины, использованию мезенхимальных клеток пуповины и их везикул. Далее были исключены обзоры литературы и 2 клинических исследования, в которых не было описания продукта, полученного из пуповины (не был подтвержден факт децеллюляризации) [115,116]. На последнем этапе были исключены 4 повтора: 3 публикации дублировались в базах данных PubMed и eLIBRARY [8, 9, 106, 117], одна публикация была дважды отражена в результате поискового запроса в PubMed (публикация [109] и ее корректировка [118]). В 3-х публикациях авторы использовали в качестве обработки ВС лишь центрифугирование. При этом количественного контроля содержания генетического материала представлено не было. Это послужило поводом для их исключения из рассмотрения в обзоре [5, 119, 120]. Результаты еще одного исследования также было решено не рассматривать, так как продукт,

полученный исследователями, представлял собой фракцию супернатанта, полученную после воздействия трипсина на ВС [121]. Таким образом, в исследование было включено 25 статей [7, 8, 9, 79, 106, 107, 109, 110, 117, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137]. В 8-ми были описаны только исследования *in vitro* [106, 107, 110, 117, 122, 124, 125, 129], в 4-х публикациях было описано только исследование *in vivo* (на животных) [126, 134, 136, 137] и в 10-ти исследованиях были проведены оба типа доклинических испытаний [7, 8, 9, 79, 109, 123, 127, 128, 130, 135]. Клинических исследований, отвечающих критериям включения, найдено не было [114].

Результаты опубликованных работ демонстрируют, что децеллюляризованный ВС (ДВС) относится к биосовместимому материалу, способного стимулировать пролиферацию клеточных культур и положительно влиять на процессы регенерации поврежденных органов и тканей (таблица 1) [114].

Таблица 1 - Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляри- зации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Basiri, 2019 [110]	Восстановление хрящевой ткани	Гидрогель на основе ДВС и фиброина шелка	ВС смешивали с деионизированн ой водой 16 ч., центрифугирова ли при 4°C, надосадочную жидкость хранили при- 80°C	Клетки эндометрия человека	Жизнеспособ- ность клеток	-	-	Продукт улучшал жизнеспособность изученных клеток
Gupta, 2021 [7]	Тканевая инженерия сосудов	Трубчатый двухслойн ый каркас, включающ ий фиброин и лиофилизо- ванный ДВС	ВС 1-2 см в деионизированн ой воде 4°C 16 ч., удаляли фрагменты крупнее 70 мкм, центрифугирова ли 5000 об. / мин., 10 мин 4°C, лиофилизовали	Эндотелио- циты, макрофаги человека	Цитотоксич- ность продукта	Подкожная имплантация кролику (n=6), имплантаты яремной вены кролика (n=3)	Гистологи- ческие исследования, анализ экс- прессии генов, доплеровская визуализация	Биосовместимый продукт вызывал рекрутирование клеток спустя месяц подкожной имплантации с экспрессией противовоспалите льных генов. Проподимость сосудистых имплантатов через 3 месяца

**Продолжение таблицы 1 - Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]**

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляри- зации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Li, 2019 [117]	Трансплантация гемопозити- ческих клеток	Фрагменты толщиной 3 мм	Удаляли сосуды пуповины, струму пуповины децеллюляризи- ровали растворами ПАВ, криоконсервиро- вали	Клетки CD34+	Проточная цитофлуорим- етрия, анализ экспрессии генов	-	-	Присутствие продукта способствует мегакариоци- тарной дифференцировке и поддерживает примитивные фенотипы гемопозитических клеток
Kehtari, 2018 [107]	Тканевая инженерия печени	Пористый матрикс	Пуповина в трис- буфере/ЭДТА при 4°C 16 ч., децеллюляризи- ровали 0,03% SDS 24 ч. при встряхивании, промывали, помещали в гипертонический раствор при 37°C 3 ч, промывали, сшивали уксусной кислотой, лиофилизовали	Плюрипотен- тные стволовые клетки человека	Жизнеспособ- ность, дифференцир- овка в гепатоциты	-	-	Способность бесклеточного продукта поддерживать дифференциацию в гепатоциты.

**Продолжение таблицы 1 - Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]**

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляризации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Azarbarz, 2022 [124]	Дифференцировка МСК в ИПК	Лиофилизированный ДВС, конъюгированный с желатином	Пуповину инкубировали в NaCl (1 М) 1 неделю, децеллюляризи- ровали 0,25% трипсин/ЭДТА 24 ч., 1% Triton X-100 5 суток. 24 ч., промывали PBS, лиофилизировали. ДВС конъюгировали с желатином в течение 1 ч. 37°C	МСК ВС	МСК ВС дифференциро- вали в ИПК. ИПК окрашивали дитизоном. Исследовали секрецию С- пептида и экспрессию генов, связанных с инсулином	-	-	Секреция клетками инсулина выше, чем в контроле. Присутствие продукта ассоциировано с увеличением дитизон- позитивных клеток и усилением экспрессии генов PDX-1, GLUT-2 и INS в ИСК
Xiao, 2017 [125]	Тканевая инженерия хряща	Цилиндры диаметром 8 мм, толщиной 2 мм	Гомогенизированные и ВС замораживали в воде (4-5 раз), центрифугировали при 3000 об. / мин. 30 мин, 5000 об/мин 30 мин, 7000 об/мин 30 мин, отбирали надосадочную жидкость, центрифугировали 10000 об/мин 30 мин, осадок лиофилизировали	Хондроциты кролика	Жизнеспособ- ность клеток, анализ экспрессии генов, продукция гликозаминог- ликанов и коллагена	-	-	Биосовместимый, биоактивный бесклеточный продукт способствовал активности хондроцитов <i>in vitro</i>

**Продолжение таблицы 1- Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]**

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляризации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Foltz, 2022 [126]	Регенерация хрящевой ткани трахеи	ДВС	Удаляли амниотическую оболочку, промывали PBS, децеллюляризовали 0,01% SDS и дезоксихолатом натрия, центрифугировали при 100 об. /мин., промывали PBS 37°C 24 ч., хранили при 4°C	-	-	Дефект трахеи кролика размером 10×20 мм, (n=10)	Гистологи- ческие исследования, определение относитель- ного содержания коллагенов -I и III типов, агрекана	Реакций отторжения продукта обнаружено не было. Индукции выработки коллагена и рекрутирования хондроцитов не было обнаружено. На 30 сутки не наблюдали значимых различий в содержании коллагенов Iи III типов и агрекана
Penolazzi, 2020 [106]	Восстановление межпозвоночных дисков	ДВС	Пуповину помещали в деионизированную воду 4°C 24 ч., децеллюляризовали 4% дезоксихолатом натрия 4 ч., обрабатывали ДНК-казой 3 ч. (трижды)	МСК, клетки дегенериро- ванного межпозвон- кового диска человека	Жизнеспо- собность и пролиферация клеток, анализ экспрессии генов	-	-	Поддержка клеток дегенерированного межпозвоночного диска и экспрессии критических регуляторов гомеостаза

**Продолжение таблицы 1- Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]**

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляризации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Jadalannagari, 2017 [109]	Тканевая инженерия	ДВС	Децеллюляризовали 0,005% Triton X-100, SDS, сукцинатом натрия, обрабатывали ДНК-казой 16 ч., удаляли ПАВ	МСК ВС, HUVEC	Цитотоксичность продукта, ПЦР	Полной толщины дефект теменной кости (5,0 мм в диаметре) мыши (n=4)	Гистологические исследования, визуализация живых клеток	Биосовместимый продукт, стимулирующий миграцию остеоцитов через 24 ч, а через 2 недели <i>in vivo</i>
Yuan, 2022 [127]	Восстановление сухожилий	Лиофилизированный ДВС, 20×10×2 мм	Децеллюляризовали 1% SDS 24 ч., 1% Triton X-100 24 ч., обрабатывали нуклеазами 12 ч., промывали, лиофилизовали	Теноциты кролика	Цитотоксичность продукта, пролиферация, миграция клеток	Дефект сухожилия кролика (n=54)	Гистологические исследования, анализ экспрессии генов	Биосовместимость с клетками на 7 сутки, стимуляция созревания сухожилия на 12 неделю после операции
Mann, 2020 [128]	Восстановление после коррекции расщепления позвоночника	Пластырь из ДВС	-	Первичные менингеальные клетки, неонатальные кератиноциты человека	Пролиферация клеток	Индуцированные ретиноидами расщепление позвоночника у плодов крыс	Гистологические исследования	Применение пластыря снижало острое воспаление и апоптоз клеток, усиливало пролиферацию клеток

**Продолжение таблицы 1- Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]**

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляризации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Lu, 2023 [123]	Заживление ран	ДВС, фрагмент 3×5-8 см	Децеллюляризи- ровали 0,1% SDS, промывали PBS и средой 199 48 ч. 100 об. /мин. 37°C	МСК жировой ткани крысы	Жизнеспособность, пролиферация клеток	Крысы (n=15)	Гистологи- ческие исследования, измерения объема хвоста	Продукт стимулировал пролиферацию клеток к 14 суткам и ускорял заживление ран хвоста крысы с уменьшением его объема к 5 недели наблюдения
Dubus, 2022 [8, 9]	Регенеративная медицина	Лиофили- зованный ДВС	Удаляли сосуды и амниотическую оболочку, децеллюляризи- ровали 1% Triton X-100 1 ч., обрабатывали ДНК-казой 24 ч. 37°C при перемешивании, промывали, лиофилизировали	МСК ВС, фибро- бласты, остеоциты, нейтро- филы и моноциты человека	Цитотоксич- ность, пролифе- рация, проточная цитометрия, продукция цитокинов	Подкожная имплантац ия крысам (n=4), регенерация кости свода черепа (n=2)	Гистологи- ческие исследования	Биосовместимый продукт не вызывал активирования метаболической активности нейтрофилов, способствовал противовоспалительной поляризации макрофагов <i>in vitro</i> , не вызывал улучшения регенерации кости

**Продолжение таблицы 1- Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]**

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляризации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Converse, 2017 [129]	Тканевая инженерия	Фрагменты ДВС	Пуповину помещали в гипертонический раствор 1 ч., децеллюляризовали Triton X-100 1 ч., помещали в гипертонический раствор 1 ч., деионизированную воду 1 ч., обрабатывали ферментом 12–16 ч., обрабатывали N-лауроилсаркозином 2 ч., этанолом 10 мин., удаляли остатки детергентов, криоконсервировали	МСК костного мозга, гемопоэ- тические и прогениторные клетки пуповины, линии клеток лейкемии человека HL-60, Kasumi I, MV 411	Заселение фрагментов ДВС клетками	-	-	Рецеллюляризиро- ванный продукт
Ramzan, 2022 [122]	Тканевая инженерия хряща	Гидрогель на основе ДВС	Пуповину подвергали осмотическому шоку, обрабатывали 0,05% трипсином 2 ч. при 37°C, 1% Triton X-100 24 ч. при перемешивании, промывали, лиофилизировали, измельчали, солюбилизировали пепсином 48 ч. при перемешивании, нейтрализовали, подвергали гелеобразованию	МСК ВС	Пролифе- рация и жизнеспособ- ность клеток, анализ экспрессии генов	-	-	На 7 сутки гидрогель на основе ДВС обеспечивал каркасную поддержку для пролиферации клеток и их дифференцировки в хондрогенном направлении на 28 сутки культивирования

**Продолжение таблицы 1- Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]**

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляризации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Косі, 2017 [79]	Восстановление нервной ткани	Гидрогель на основе ДВС	Обрабатывали 0,02% трипсин/0,05% ЭДТА, 0,1% надуксусной кислотой, 4% этанолом, лиофилизировали, солюбилизировали пепсином и нейтрализовывали	МСК костного мозга человека	Пролифе- рация и миграция клеток	Фокальная церебраль- ная ишемия крыс (n=4)	Гистоло- гические исследования	Цитосовмес- тимность <i>in vitro</i> , наблюдали активное заселение гидрогеля клетками реципиента <i>in vivo</i> (преобладающей клеточной популяцией были противовоспали- тельные макрофаги)
Výborný, 2019 [130]	Восстановление нерва	Гидрогель на основе ДВС, сшитый с использо- ванием генипина	Пуповину обрабатывали 0,02% трипсин/0,05% ЭДТА, 0,1% надуксусной кислотой, 4% этанолом, лиофилизировали, солюбилизировали пепсином, нейтрализовали, сшивали генипином	МСК ВС, фетальные нейрональные стволовые клетки человека	Жизнеспо- собность, пролифе- рация и дифферен- цировка клеток	Фотохими- ческое поражение коры	Гистоло- гические исследования	Гидрогель на основе ДВС, сшитый с использованием генипина, удерживался <i>in situ</i> до 2 недель без неблагоприятного тканевого ответа и воспаления

**Продолжение таблицы 1- Основные параметры и результаты исследований включенных публикаций [114]**

Исследование (фамилия, год)	Область применения	Описание продукта	Методы децеллюляризации	Исследования <i>in vitro</i>		Исследования <i>in vivo</i>		Результаты
				Объект	Методы	Объект	Методы	
Калюжная, 2019; Болгарчук 2020; Чеботарев 2020; Кондратенко 2021 [131, 132, 133, 134, 135, 136, 137]	Регенеративная медицина	Лиофилизаты ДВС и гидрогеля из ДВС, влажная форма гидрогеля	Удаление сосудов, гомогенаты децеллюляризовали SDS, промывали, лиофилизировали, солюбилизировали пепсином и получали жидкую форму. Лиофилизировали жидкую форму	Фибробласты человека, крыс, мышей, свиньи, морской свинки	Жизнеспособность	Полнослойные раны кожи мышей и свиньи, дефект хряща кролика	Гистологические исследования	Биосовместимые продукты способствуют формированию грануляционной ткани и эпителизации, заживлению гиалинового хряща

Примечание: SDS – додецилсульфат натрия; PBS – фосфатно-солевой буфер; HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены, BC – Вартонов студень, ДВС – децеллюляризованный Вартонов студень, ИПК – инсулин продуцирующие клетки, МСК – мезенхимальные стромальные клетки, ПАВ – поверхностно активные вещества, ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка, ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота [114].

P. Gupta et al. при создании матрикса для тканевой инженерии сосудов из фиброина шелка для улучшения свойств ремоделирования и иммуномодуляции ответа реципиента на внедрение полимерного материала функционализировали его ДВС. Порошок лиофилизованного ДВС смешивали с фиброином шелка (5мг ДВС на 1 мл раствора шелка) перед формованием матрицы. После лиофилизации пористый протез сосуда был покрыт нановолокнистым слоем. Раствор для получения материала методом электроспиннинга состоял из фиброина шелка и поликапролактона в гексафтор-2-пропанол. После сшивания с использованием этил(диметиламинопропил)карбодиимид/N-гидроксисукцинимид в 80%-ом этаноле в течение 12 ч. каркасы промывали в стерильной воде на шейкере 12 ч. и хранили при 4°C до дальнейшего использования [7]. A. Basiri et al. добавляли ДВС, полученный по схожей технологии, в гидрогель из фиброина шелка перед гелеобразованием. Полученный таким образом биоматериал проявлял механические свойства, подобные свойствам хряща [110, 114].

Исследователи (D. Li et al.) использовали ДВС в качестве клеточного носителя, поддерживающего фенотипы и дифференцировочный потенциал гемопоэтических клеток-предшественников [117]. M. Kehtari et al. продемонстрировали способность такого матрикса обеспечивать микроокружение, которое способствует гепатоцитарной дифференцировке плюрипотентных клеток, путем активации факторов транскрипции [107]. N. Azarbarz et al. представили результаты применения ДВС конъюгированного с желатином для 3D-системы культивирования клеток. При этом была показана дифференцировка МСК в инсулин-продуцирующие клетки, подтвержденная усилением экспрессии инсулин-специфических генов и увеличением высвобождения инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой [124, 114].

ВС богат пептидными факторами роста, участвующими в хондрогенезе. T. Xiao et al. показали, что ДВС человека может быть хорошим альтернативным биоматериалом для тканевой инженерии хряща [125]. Биомеханические свойства ДВС и его однородная пористая структура были достаточными для поддержки культивируемых на них хондроцитов кролика. Была продемонстрирована

продукция клетками ГАГ, коллагена I и II типов и агрекана [125]. В то же время в исследовании K. Foltz et al. при замещении дефекта трахеи не было обнаружено рекрутирования хондроцитов в биосовместимый ДВС и индукции выработки ими коллагена. При этом структура и физические характеристики биоматериала обеспечили необходимое поддержание проходимости трахеи [126]. Исследование, проведенное L. Penolazzi et al. показало терапевтический потенциал ДВС и его влияние на функционирование клеток дегенерирующего межпозвонкового диска. Авторами было выдвинуто предположение, что имплантация ДВС может быть достаточной для функционального восстановления дегенерирующих межпозвонковых дисков [106, 114].

В исследовании S. Jadalannagari et al. отметили на 2-е сутки миграцию МСК ВС в толщу ДВС. При этом авторы наблюдали пролиферацию клеток при культивировании на ДВС, которая, однако, была ниже, чем при культивировании на культуральном пластике. На модели дефекта плоской кости было показано, что ДВС человека способствовал адгезии и проникновению в биоматериал жизнеспособных остеоцитов [109]. Z. Yuan et al. использовали децеллюляризованную строму пуповины для заживления сухожилий. После удаления клеток ДВС сохранял значительное количество ГАГ и коллагена, сохранял микроструктуру и прочность на разрыв. Трехмерная пористая структура ДВС способствовала миграции, прикреплению и пролиферации теноцитов. В исследовании *in vivo* децеллюляризованный продукт способствовал регенерации сухожилий [127, 114].

Интересно исследование L. Mann et al., в котором было установлено стимулирующее действие криоконсервированного ДВС человека на восстановление целостности позвоночника крысы после внутриутробной коррекции его расщепления. Полученный биомиметик ВКМ улучшал организованный рост клеток и уменьшал острое воспаление [128]. В другом исследовании тканеинженерное покрытие, состоящее из МСК жировой ткани крысы и ДВС человека, ускоряло заживление раны хвоста крысы. Регистрировали уменьшение объема хвоста, улучшение ангиогенеза и лимфангиогенеза [123, 114].

Некоторые исследователи подчеркивают применимость продуктов из пуповины человека для стимулирования регенерации разных тканей. M. Dubus et al. методом масс-спектрометрии в изготовленном лиофилизированном ДВС показали присутствие структурных и адгезивных белков, участвующих в процессе заживления ран [8, 9]. В культуральной среде после инкубации в ней ДВС были выявлены высокие уровни факторов роста. Подобный эффект для нативной пуповины обнаружен не был. При этом высвобождение биоактивных молекул из бесклеточного продукта не приводило к активации фагоцитов и накопления ими активных форм кислорода. Стромальные клетки ВС и фибробласты человека, культивированные в присутствии ДВС, сохраняли высокую жизнеспособность. При подкожной имплантации крысам не было обнаружено воспалительной реакции и образования соединительнотканной капсулы или реакции на «инородное тело» с присутствием многоядерных гигантских клеток. Имплантированный подкожно изготовленный продукт из пуповины человека полностью подвергался ремоделированию в течение трех недель. Макрофаги мыши после 72 ч контакта с ДВС продуцировали противовоспалительные медиаторы в значимо большем количестве по сравнению с контролем. Действие нативной пуповины человека на макрофаги мышей в аналогичных условиях приводило к доминирующей секреции ими провоспалительных медиаторов [8, 9]. В этих же работах установлена антибактериальная активность ДВС, проявляющаяся наличием зоны ингибирования роста микроорганизмов и снижением адгезии бактерий. A.G. Converse et al. подробно описали процедуры изготовления ТИК из ДВС в виде пластин с последующей их рецеллюляризацией [129, 114].

В 4-х публикациях описано изготовление и свойства солюбилизированных форм ДВС. Z. Koci et al. для приготовления гидрогеля бесклеточный порошкообразный ВС солюбилизировали солянокислым пепсином. Полученная форма продукта содержала большее количество сульфатированных ГАГ, по сравнению с продуктом, приготовленным по аналогичной технологии из мочевого пузыря, спинного и головного мозга свиньи. Продукты из ДВС демонстрировали

короткое время гелеобразования, что свидетельствует о быстрой самосборке структурных молекул. Они поддерживали клеточный рост, пролиферацию и миграцию клеток *in vitro*. А спустя 24 часа после введения инъекционной формы ДВС в очаговое ишемическое поражение в двигательной зоне коры головного мозга крысы, в пределах участка поражения формировалась компактная гелевая структура, заселенная плотным слоем эндогенных клеток. Макрофаги были преобладающим типом клеток, присутствующим внутри дефекта, при этом фенотип макрофагов M2 (CD 206) составил  $77,1 \pm 6,5\%$  от всех макрофагов, содержащихся в геле [79, 114].

F. Ramzan et al. получали гидрогелевую форму ферментативным перевариванием с использованием пепсина в соляной кислоте с последующим гелеобразованием. Полученный таким образом гель из ДВС функционировал как трехмерный матрикс, который обеспечивал необходимое микроокружение для адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировки МСК в хондрогенную линию *in vitro* [122, 114].

K. Vyborny et al. для восстановления поражения коры головного мозга крысы использовали солубилизованную форму гидрогеля из химически сшитого ДВС. В экспериментах *in vitro* было показано отсутствие цитотоксических свойств полученного продукта, а в эксперименте *in vivo* было показано гелеобразование *in situ* без неблагоприятных воспалительных реакций [114, 130].

Группой исследователей из ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова под руководством И.К. Калюжной были запатентованы биосовместимые изделия/продукты из ДВС в лиофилизированной и солубилизированной гидрогелевой (которая может быть лиофилизована) формах. Процедура децеллюляризации при этом может быть проведена с использованием додецилсульфата натрия или 0,1 N гидроксидом натрия [114, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137].

Таким образом, в проанализированных публикациях показана возможность использования биосовместимых и биоактивных продуктов на основе ДВС в различных областях регенеративной медицины и клеточных технологий:

источник биоактивных молекул при культивировании клеток человека, клеточная иммунотерапия, заживление ран, трансплантация гемопоэтических клеток, дифференцировка МСК в ИПК, восстановление хрящевой ткани, межпозвоночных дисков, сухожилий и нервной ткани, тканевая инженерия сосудов, печени и хряща, а также восстановление после коррекции расщепления позвоночника [114].

### **1.6 Модели для тестирования продуктов, влияющих на заживление полнослойных ран кожи**

Анализ, проведенный L.K.S. Parnell с соавторами 1521 статей, опубликованных за 25 лет в журналах *Wound Repair and Regeneration* (Соединенное Королевство) в период с 1993 по 2017 годы и *Advances in Wound Care* (США) с 2012 по 2017 годы, показал тенденции использования моделей для исследований процессов заживления кожных ран [138]. Результаты, полученные на моделях *in vitro* и *in vivo* с использованием мелких грызунов, показывают 53-57% соответствия результатам исследований заживления кожных ран у людей, в то время как результаты, полученные на моделях с использованием свиней, показывают 78% соответствия. Модели эксплантов *ex vivo* используются гораздо реже. Их преимуществом является стандартизация условий, сохранение целостности базальной мембраны (отсутствует в трехмерных моделях *in vitro*). Существуют математические модели поведения клеток или молекул в процессе заживления [139], а технологии «орган на чипе» потенциально способны полностью исключить потребность в животных моделях [140].

Модели кожных ран *in vivo* идеально подходят для исследования патофизиологии заживления у живых субъектов. Различия в анатомо-физиологических особенностях строения кожи, воспалительной реакции, иммунной системе и метаболизме – это лишь некоторые из проблем, ограничивающих применимость животных моделей [141]. Использование мелких грызунов для моделирования ран - популярный выбор большинства

исследователей, поскольку они недороги, доступны и просты в содержании. Полнослойные кожные раны у мышей могут быть смоделированы на спине, голове, ухе, хвосте и дистальных отделах конечностей [141,142]. Диаметр ран чаще всего составляет 5-8 мм. Заживление ран у мышей в основном происходит за счет контракции слоя *ranniculus carnosus* и значительно отличается от заживления ран у человека. Для преодоления контракции используют шины или фиксацию узловыми швами к подлежащим тканям [143]. Имплантация пористого материала в подкожное пространство (модель мертвого пространства) позволяет оценить образование грануляционной ткани изолированно от заживления, контракции и эпителизации [139].

Лучшая животная модель *in vivo* для изучения заживления ран кожи – модель свиньи. Структура кожи свиней больше всего похожа на кожу человека. Люди и свиньи имеют одинаковую толщину эпидермиса, аналогичную структуру волосяных фолликулов и гистологическое расположение эпидермальных кератинов, дермального коллагена IV типа, виментина, фибронектина [140]. Свиньи обладают толстой дермой, которая структурно похожа на дерму человека, и редкие волосы, кожа у свиней прилегает к нижележащим структурам также как у людей [139]. Свиньи и люди имеют сходные резидентные иммунные клетки, включая дендритные, и молекулярные ответы на различные факторы роста. Раны у свиней заживают за счет эпителизации, как у человека, а большая площадь поверхности тела позволяет наносить несколько ран на одном животном. Это позволяет забирать биопсийный материал в разные сроки и сравнивать разные методы лечения. Недостатками данной модели являются значительные затраты на содержание, анестезию и сложности в обращении с крупным животным. Однако есть особенности, которые следует учитывать при интерпретации данных, полученных на свинье. У свиней есть только апокринные железы, в то время как потовые железы у человека являются источником кератиноцитов при заживлении [140]. Несмотря на сходство с кожей человека, в коже свиней наблюдаются значительные структурные различия, такие как меньшее количество сосудов в дерме [139].

Морских свинок используют чаще всего для изучения влияния дефицита витамина С на заживление ран, потому что они, как и люди, нуждаются в поступлении витамина С из пищи. Приматов используют крайне редко, в связи с высокой стоимостью [141].

В настоящее время использование моделей *in silico* ограничено, так как отсутствуют четкие критерии стандартизации и валидации. Экстраполяция результатов, полученных *in vitro*, на организм *in vivo* затруднительна. Модели *ex vivo* частично воспроизводят условия при заживлении, но предоставляют собой лишь незначительную часть многостадийного и длительного процесса заживления. Модели *in vivo*, несмотря на недостатки и невозможность в полной мере воспроизвести условия заживления и патологии кожных ран у человека, все еще остаются единственным адекватным методом тестирования новых лекарственных средств и изделий [140].

Суммируя описанные литературные данные, можно заключить, что тканевая инженерия предлагает альтернативные способы стимуляции заживления глубоких и обширных повреждений кожи. Причем одними из наиболее перспективных биомиметиков ВКМ являются децеллюляризованные ткани благодаря сохранению компонентов, принимающих участие в регуляции локального тканевого гомеостаза и передаче клеточных сигналов. Выбор метода получения бесклеточного матрикса представляется важной задачей и в значительной степени определяет терапевтические свойства продукта. Благодаря аллогенному происхождению и отсутствию этических ограничений пуповина человека является подходящим биоматериалом для изготовления бесклеточного медицинского изделия. Характеристики структурных белков ВКМ, не подвергнутых возрастным изменениям и наличие большого количества биологически активных молекул, способствующих регенерации, определяют уникальность данного биоматериала. Для окончательной оценки функциональных свойств биомиметика ВКМ на основе децеллюляризованной пуповины целесообразно использовать *in vivo* модели полнослойной раны у мышей с антиконтрационным кольцом и у свиньи.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Объекты исследования

Пуповины человека были получены от здоровых доношенных новорожденных после самопроизвольных родов с информированным согласием матерей и с использованием руководящих принципов, утвержденных Этическим Комитетом при Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, протокол №230 от 17 декабря 2019 г. (Санкт-Петербург, Россия) [131, 144].

### 2.2 Изготовление матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

Анализ опубликованных работ, в которых описаны результаты исследований регенеративных свойств матриксов из децеллюляризованной пуповины человека, показал возможность применения разных протоколов их получения. Для максимальной сохранности уникального компонентного состава ВКМ ВС нами был выбран относительно простой режим удаления клеток для получения матрикса (рисунок 2).



**Рисунок 2 – Схема изготовления матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека**

В стерильных условиях были осторожно удалены сосуды пуповины. Механическое удаление сосудов пуповины было необходимо для исключения контаминации зрелыми клетками. Однако удаление амниотической оболочки,

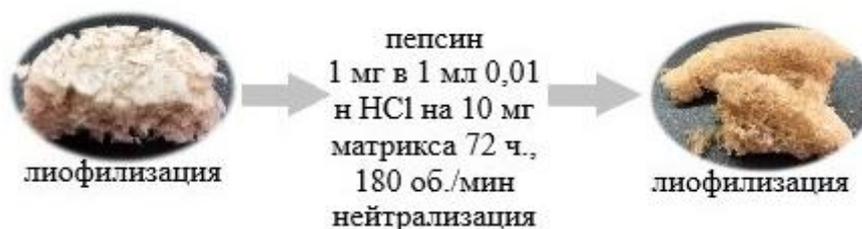
покрывающей пуповину, сочли нецелесообразным, так как ее базальная мембрана представлена теми же компонентами, что и базальная мембрана кожи.

После замораживания/оттаивания ( $-20^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$ ), обработки 3% перекисью водорода с последующим промыванием деионизированной водой (Milli-Q Advantage A10, США). ВС измельчали блендером (Bosch, Германия) и гомогенизировали (gentle MACS<sup>TM</sup> Dissociator Milteniy Biotech, Германия), программа «h-cord-01-01». Удаление клеток осуществляли с помощью 0,05% раствора SDS (Биолот, Россия) в течение 24 часов при комнатной температуре в шейкере со скоростью 140 об/мин (Biosan, Латвия). Остатки SDS удаляли промывкой фосфатным буфером pH 7,35 (Биолот, Россия) [135].

Матрикс лиофилизировали (ZirbusVaCo5II, Германия), облучали ультрафиолетом в боксе микробиологической безопасности LAMSYSTEMS (Россия) мощностью потока UV-C излучения 12 Вт в течение 15 минут и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  [135, 144].

### **2.3 Изготовление матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека с применением ферментативного гидролиза пепсином**

Одним из факторов, определяющих регенеративный потенциал пуповины человека, является присутствие в ней большого количества факторов роста [15, 145]. Из литературы известно, что факторы роста продуцируются клетками в неактивной форме, они фиксированы в компонентах ВКМ и высвобождаются при его деградации [8, 9]. Исходя из данного предположения, для изготовления второго матрикса был применен дополнительный этап ферментативного гидролиза солянокислым пепсином (рисунок 3).



**Рисунок 3 - Схема изготовления матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, обработанного солянокислым пепсином**

Для изготовления второго матрикса 10 мг сухого матрикса (приготовленного по описанной выше технологии) солюбилизировали раствором пепсина (Thermo Fisher Scientific, США) из расчета 1 мг фермента в 1 мл 0,01 N HCl, pH 2,0, в течение 72 ч при комнатной температуре и перемешивании 180 оборотов/мин. Нейтрализацию пепсина проводили 0,1 N раствором NaOH до pH 7,4 [134, 146].

Второй матрикс также лиофилизировали и обрабатывали ультрафиолетом.

## 2.4 Гистологические исследования

Образцы лиофилизированных матриксов и нативной пуповины заливали в парафин (станция для заливки биологических тканей парафином HistoStar, Thermo Fisher Scientific, США). Срезы толщиной 0,5-1,5 мкм (автоматический ротационный микротом в комплекте с системой переноса срезов STS HM 355S Thermo Fisher Scientific, США) помещали на обычные предметные стекла (Biovitrum, Россия) или на стекла с адгезивным покрытием (МиниЛаб, Россия) для иммуногистохимических исследований.

После депарафинирования препараты окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим (pH 2,5) в соответствии с инструкциями производителя (Biovitrum, Россия). После обезвоживания препараты закрывали покровными стеклами (Thermo Fisher Scientific, США). Результаты окрашивания оценивали на разных увеличениях на микроскопе Carl Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия).

Для подтверждения окрашивания ГАГ использовали раствор гиалуронидазы 1280МЕ/мл (препарат «Лидаза», Микроген, Россия). Гистологические срезы матрикса после депарафинизации и промывания в дистиллированной воде инкубировали с раствором гиалуронидазы во влажной камере в течение 72 часов. В качестве контроля использовали инкубацию в аналогичных условиях с деионизированной водой. После промывания в дистиллированной воде все препараты окрашивали альциановым синим рН 2,5. Альциановый синий при рН 2,5 окрашивает сульфатированные и карбоксилированные мукополисахариды и протеогликаны.

## 2.5 Иммуногистохимические исследования

Для иммуногистохимического исследования на присутствие в матриксе коллагена IV типа и ламинина депарафинированные срезы подвергали демаскировке антигена в 10 мМ трис-ЭДТА буфера при рН 9,0. Затем определяли специфическую экспрессию антигена с помощью системы EnVision на основе пероксидазы (Dako, Дания) согласно инструкции производителя. Сайты неспецифического связывания блокировали с использованием 10% нормальной козьей сыворотки (Dako, Дания). Ткани инкубировали в течение 2 часов с первичными мышинными антителами, направленными против человеческого ламинина (1/50; LAM-89, Leica, Германия), коллагена IV типа (1/25; CIV22, ДАКО, Дания). Для визуализации связывания антител добавляли субстрат хромогена диаминобензидина (DAB), после чего ткани контрастировали с гематоксилином Майера [133].

Для идентификации в матриксе TGF $\beta$ 3 использовали моноклональные мышинные антитела к TGF- $\beta$ 3 (1/30; МАВ949Hu22; Cloud-clone Corp., Китай) в растворителе для антител (Diagnostic BioSystems, США), а также пользовались набором вспомогательных реагентов для иммуногистохимии (со стрептавидин-пероксидазой) (IS086; Cloud-clone Corp., Китай) по инструкциям производителей.

Для идентификации в матриксе фибронектина использовали поликлональные кроличьи антитела (1/50; AF0738; Affinity Biosciences, Китай) в растворителе для антител (Diagnostic BioSystems, США). Демаскировку антигена проводили в микроволновке с 10 мМ трис-ЭДТА буфером (pH 9,0; Diagnostic BioSystems, США) в течение 15 минут с последующим охлаждением при комнатной температуре и промывкой фосфатным буфером и блокированием неспецифического связывания (Diagnostic BioSystems, США) по инструкции производителя. Для визуализации использовали поликлональные анти-кроличьи антитела конъюгированные с Alexa Fluor 488 (1/1000; SAA544Rb11; Cloud-clone Corp., Китай).

Окрашивание без первичных антител служило отрицательным контролем. Затем окрашенные срезы обезвоживали и закрывали покровными стеклами. Для фиксации результатов окрашивания использовали световую микроскопию (Axio Scope A1; Carl Zeiss, Германия) при использовании хромогена DAB и флюоресцентную микроскопию (Axio Observer; Carl Zeiss, Германия) при использовании Alexa Fluor 488 [133].

## **2.6 Флюориметрическое окрашивание двуцепочечной ДНК для оценки полноты децеллюляризации**

Отсутствие ядер клеток в децеллюляризованном влажном материале пуповины подтверждали окрашиванием 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, Invitrogen, Соединенное Королевство). Концентрация красителя в рабочем растворе составила 0,01 мг/мл. Результаты регистрировали на микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss, Германия), сравнивали с биоматериалом нативной пуповины, окрашенной тем же красителем. Длина волны возбуждения 358 нм, максимум излучения – 461 нм [134].

## 2.7 Определение количества ДНК

Для количественного определения содержания остаточного ДНК из предварительно взвешенных образцов лиофильно высушенных матрикса и измельченной пуповины ДНК извлекали с использованием набора ДНК-DU-250 (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Затем экстрагированную ДНК оценивали на спектрофотометре Nanodrop (Thermo Scientific, США) с коэффициентом поглощения 260/280 нм. Концентрацию ДНК рассчитывали в соответствии с массой ткани (нг ДНК/мг сухой ткани) [132].

## 2.8 Окрашивание фрагментов ДНК бромистым этидием

Размер фрагментов остаточной ДНК анализировали окрашиванием бромистым этидием. Для этого 10 мкл экстрагированной ДНК и стандарта молекулярных весов (от 100 до 1500 пар нуклеотидов; Sib Enzyme; Россия) загружали в лунки однопроцентного агарозного геля (Sigma-Aldrich, США) с 5 мкл глицерина (Экос, Россия). Электрофорез проводили в горизонтальной камере 7×7 см, mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США) в однократном трис-ацетатном буфере при 70 В в течение 1 ч. Использовали систему визуализации геля ChemiDoc XRS+ с программным обеспечением (Bio-Rad, США).

## 2.9 Методы электронной микроскопии

Образцы матриксов и нативной пуповины 15 мм диаметром, толщиной 2 мм фиксировали в 2,5% глютаральдегиде (Sigma, США) в течение 12 часов, после чего каждый из них был погружен в среду 1% тетроксид осмия (Sigma, США) на 1 час, обезвожен этанолом возрастающей концентрации и высушен. Образцы затем были залиты в эпоксидную смолу (Araldite, Великобритания) для изучения структуры методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) Merlin Carl Zeiss (Германия) [133].

Лиофилизированные матриксы и нативная пуповина были исследованы методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью растровых электронных микроскопов JSM-7001F и JSM-639 (JEOL, Япония) в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 5 кВ и токе пучка 10 нА. Для обеспечения стока заряда методом магнетронного распыления на установке Emitech K950 (Quorum Technologies, Великобритания) наносили слой золота толщиной 30 нм [133].

## **2.10 Количественное определение содержания гликозаминогликанов**

Количество ГАГ определяли используя краситель 1,9-диметилметиленовый синий (Sigma-Aldrich, США) по 200 мкл раствора красителя (125 мкг/мл фосфатного буфера). Лиофилизированные образцы матриксов и нативной пуповины (n=9) после взвешивания растворяли в папаине (Sigma-Aldrich, США) при 65°C в течение 12 часов. Для анализа использовали 20 мкл надосадочной жидкости (1000 г 10 минут; LMC-4200R BioSan, Латвия). Для определения использовали 96-луночный планшет. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре Tecan (Trading AG, Швейцария) при длине волны 525 нм. Краситель, связываясь с ГАГ меняет цвет. Концентрации ГАГ определяли по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям хондроитин сульфата (Sigma-Aldrich, США) в диапазоне 0-50 мкг/мл. Результаты измерений выражали в мкг ГАГ на мг сухого веса [147].

## **2.11 Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье**

Спектры поглощения лиофилизированных образцов матрикса и нативной пуповины регистрировали в диапазоне волновых чисел 4000 – 500 см<sup>-1</sup> на спектрометре Bruker Alpha (Германия) со спектральным разрешением 2 см<sup>-1</sup> по 45 сканов, расположенных на разных участках лиофилизированных образцов.

Измерения проводились при  $21\pm 1^\circ\text{C}$  в кондиционируемом помещении. При анализе спектров вычисляли соотношение поглощения Амид I к Амиду II.

### **2.12 Исследование биодegradации матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека *in vitro***

Изучение влияния растворов 0,1% коллагеназы гепатопанкреаса краба 159 ЕД/мл (Биолот, Россия) и гиалуронидазы 1280 МЕ/мл («Лидаза», Микроген, Россия) на матрикс проводили с регистрацией результатов по потере массы образцов и методом СЭМ, а также исследовали спектральные характеристики ИКСПФ.

Образцы матрикса (n=9) взвешивали в микропробирках (Eppendorf, Германия). К образцам добавляли растворы коллагеназы или гиалуронидазы, к контрольным образцам – стерильный фосфатный буфер, pH 7,4 в соотношении 1:20. Лиофилизаты ферментов растворяли стерильным фосфатным буфером. Инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  (термостат «Термит», Россия) при закрытых крышках. Спустя 24 и 72 часа от начала инкубации образцы охлаждали и отбирали супернатант (LMC-4200R BioSan, Латвия; 1500 оборотов/мин). Осадок лиофилизировали в течение 48 часов (ZirbusVaCo5II, Germany) и взвешивали в эппендорфах. Потери массы продукта выражали в процентах к исходной массе образца. Далее лиофилизированные образцы исследовали методами СЭМ и ИКСПФ по вышеописанным методикам.

### 2.13 Исследование набухаемости матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

Для исследования способности матрикса впитывать влагу его измельчали в ступке и просеивали через сито (1 мм). Степень набухания образцов (n=10) определяли методом абсорбции жидкости. 100 мг матрикса погружали в 10 мл физиологического раствора (ГРОТЕКС, Россия) и инкубировали при 37°C. Спустя 60 минут гидратированные образцы взвешивали после удаления избытка физиологического раствора. Коэффициент равновесного набухания (Q) рассчитывали по формуле:

$$Q = (m_i - m) / m, \quad (1),$$

где: m – масса сухого образца

$m_i$  – масса влажного образца

### 2.14 Исследования на клетках человека и животных *in vitro*

Для оценки и сравнения цитотоксического действия матриксов из ДВС были проведены исследования на фибробластах кожи человека. Дермальные фибробласты из кожи лица взрослых доноров после косметологических операций были выделены в Институте цитологии Российской Академии Наук (Санкт-Петербург). Клетки 3-5 пассажей культивировали в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в питательной среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка (ЭСТ, HyClone, США) и 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США) [144].

Влияние образцов лиофилизированных матриксов на дермальные фибробласты оценивали с использованием «вытяжек», полученных посредством преинкубации в питательной среде исследуемого образца. Для получения «вытяжек» была выбрана концентрация 1 мг лиофилизированного биоматериала на 1 мл питательной среды. Для этого 10 мг каждого образца помещали в

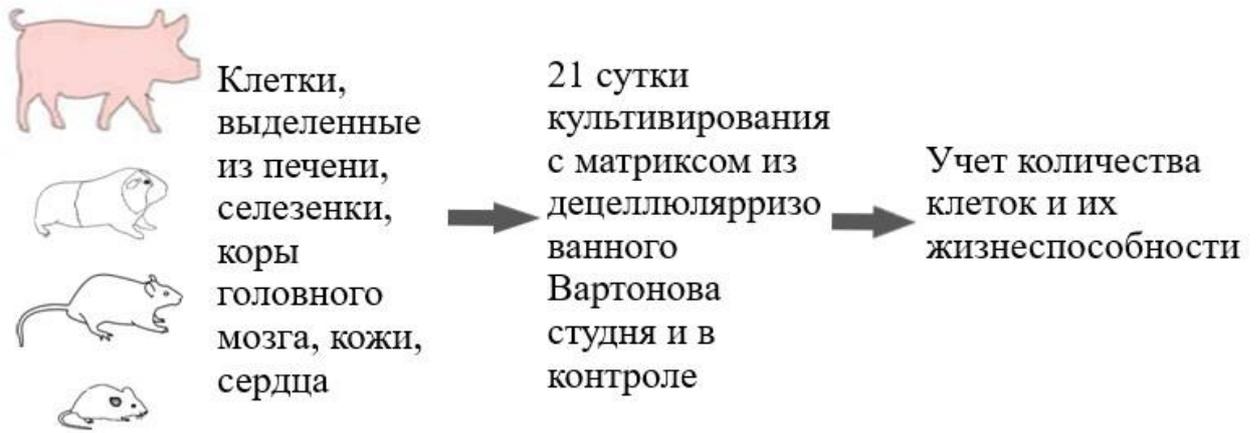
контейнеры с крышкой и после облучения ультрафиолетом в каждый контейнер добавляли по 10 мл питательной среды DMEM/F12. Срок инкубации образцов в питательной среде составил 1 сутки [144].

Анализ с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромистого (МТТ) выявляет способность митохондриальных ферментов жизнеспособных клеток изменять исходный цвет реактива на пурпурный благодаря образованию формазана. Оптическая плотность раствора формазана линейно зависит от количества живых клеток. Изменения оптической плотности опытных проб относительно контрольных свидетельствует о влиянии исследуемого агента на культивируемые клетки [144].

Дермальные фибробласты человека культивировали в 96-луночных планшетах (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 7 тыс. клеток на лунку в 200 мкл питательной среды. После адгезии клеток стандартную питательную среду заменяли на «вытяжку» из соответствующего образца [144].

Клетки в «вытяжках» и в стандартных средах культивировали в течение 72 часов, после чего среды заменяли на среду с добавлением 200 мкл на лунку реагента МТТ в концентрации 0,5 мг/мл. После инкубации в течение 4 часов в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> среду с МТТ удаляли, в каждую лунку добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (Татхимфармпрепараты, Россия). Образующийся в течение 20 мин при постоянном шейкировании формазан экстрагировали. Оптическую плотность раствора формазана в диметилсульфоксиде измеряли с помощью анализатора Fluorofot «Charity» (Россия) при длине волны 570 нм и длине волны 630 нм. Оптическую плотность в лунках контроля принимали за 100% клеточной жизнеспособности [144].

С целью оценки влияния матрикса из ДВС на рост и жизнеспособность клеточных популяций, выделенных из тканевых эксплантов, были проведены две серии экспериментов. Использовали фрагменты тканей из разных частей разных органов (коры полушарий головного мозга, печени, селезенки, сердца и кожи) свиньи, морских свинок, крыс и мышей (рисунок 4).



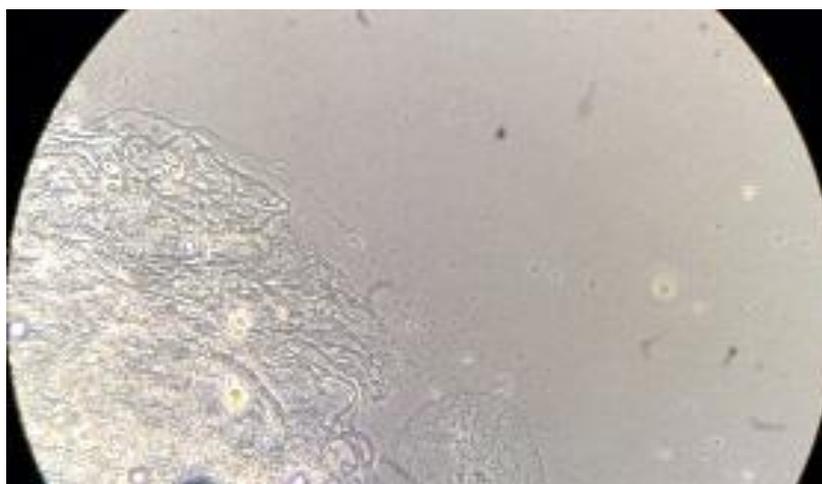
***Рисунок 4 – Схема исследований *in vitro* роста и жизнеспособности клеток, выделенных из печени, селезенки, коры головного мозга, кожи и сердца свиньи, морских свинок, крыс и мышей в присутствии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека и в контроле***

Исследование было проведено с использованием руководящих принципов, утвержденных Этическим Комитетом при Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, протокол № 263 от 31 мая 2022 г. (Санкт-Петербург, Россия). Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей) [148]. Свинью вывели из эксперимента передозировкой 1% раствора пропофола (Энбифол, Россия), двух морских свинок, двух крыс и двух мышей – парами эфира (Кузбассоргхим, Россия).

Фрагменты тканей размером около 1 мм<sup>3</sup>, извлеченные в стерильных условиях и трижды промытые физиологическим раствором с добавлением пенициллина и стрептомицина (Биолот, Россия), центрифугировали (LMC-4200R BioSan; Латвия) при 3500 об/мин в течение 10 мин. На дне чашек Петри для культур клеток (Jet Biofil, Китай) на расстоянии 3 мм друг от друга располагали по 10 эксплантов, чашки помещали в термостат (Binder BD 115, Германия) при температуре 37±0,1°C на 30 минут для прикрепления. Далее добавляли по 3 мл

питательной среды в каждую чашку. Культуральная среда (pH 7,3) содержала 35 % раствора Хенкса (Биолот, Россия), 35% среды Игла MEM с L-глутамином (Биолот, Россия), 25% ЭТС (HyClone, США), глюкозу 0,6% (Гротекс, Россия), инсулин 0,5 ЕД/мл (Фармстандарт, Россия), гентамицин для культур клеток 100 ЕД/мл (Биолот, Россия) [144].

В течение первых трех суток происходило выселение клеток от края экспланта (рисунок 5).



***Рисунок 5 – Край экспланта кожи свиньи на 3-и сутки культивирования. Инвертированная микроскопия. Ув.×400***

После получения популяции клеток фибробластоподобной морфологии культуру вели с пересевами каждые 7 суток с разведением 1:5 в культуральных флаконах 25 см<sup>2</sup> (Thermo scientific, США). Наблюдения за ростом клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа Primovert (Carl Zeiss, Германия). Матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (1мг/мл) был помещен и в экспериментальные чашки Петри при выделении клеток и в экспериментальные флаконы при культивировании на протяжении всего исследования [135].

Клеточный материал 4-го пассажа (21 сутки от начала культивирования) открепляли от пластика раствором трипсин-Версена 0,02% (Биолот, Россия) в соотношении 1:3 при температуре 37°C в течение 5-7 минут. После инактивации трипсина питательной средой с ЭТС клеточный материал осаждали

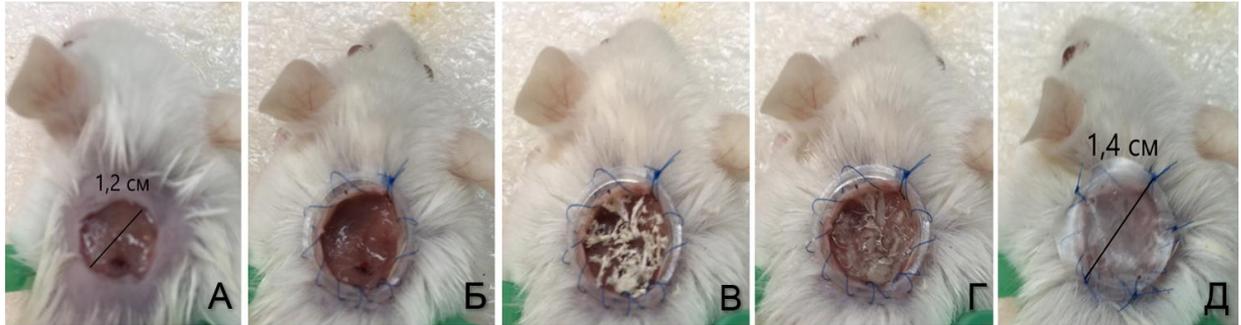
центрифугированием при 3500 об/мин в течение 5 минут. Дважды отмывали питательной средой. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали, производили подсчет клеток в камере Горяева по общепринятой методике. Определение жизнеспособности клеток производили методом суправитальной окраски 0,4% раствором красителя трипанового синего (Биолот, Россия) в течение 30-60 секунд. Далее подсчитывали число живых (не окрашенных) и погибших (окрашенных синих) клеток на 100 кариоцитов. Рассчитывали процент гибели клеток. Все расчеты производили в 4-х опытных и 4-х контрольных флаконах [135].

### **2.15 Исследование влияния матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека на динамику заживления полнослойных кожных ран *in vivo***

Биологические свойства матрикса из ДВС *in vivo* исследовали на двух видах животных моделей. В данном исследовании было использовано 64 белых беспородных мышей обоего пола (равное количество самок и самцов) массой  $24,2 \pm 0,4$  г, полученных из питомника «Раполово» Ленинградской области. Животных содержали в отдельных клетках. Температура в виварии составляла  $22,0 \pm 3,0^\circ\text{C}$  с относительной влажностью от 30% до 70% при искусственном освещении: 12 ч – свет и 12 ч – темнота. Для кормления использовали стандартные лабораторные диеты с неограниченным количеством питьевой воды [149].

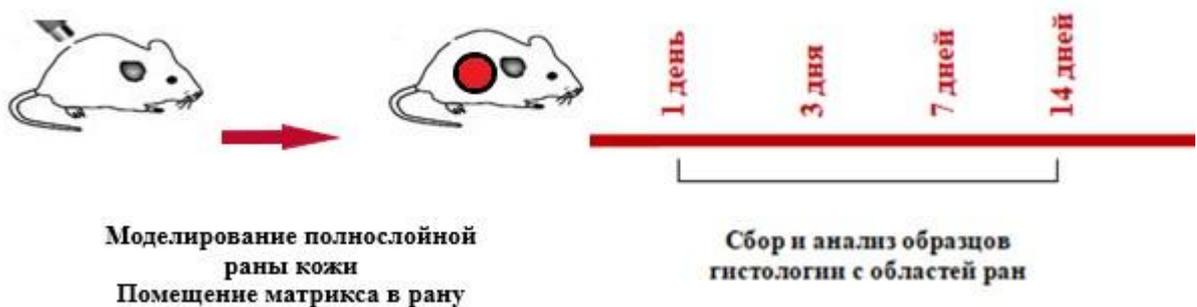
Анестезированным (Ксила, Эстония, в дозировке 100 мг/кг) животным в асептических условиях на предварительно освобожденную от шерсти область холки скальпелем наносили полнослойную кожную рану диаметром 1,2 см (рисунок 6А). Для предотвращения стягивания кожи хирургической нитью 6-0 Surgipro II (Medtronic, США) силиконовые кольца диаметром 1,4 см были пришиты к краям дефектов кожи (рисунок 6Б). Выбранным случайным образом животным опытных группы в рану помещали лиофилизированный стерильный

матрикс (n=32) массой около 0,01 г, увлажненный 0,2 мл раствора стерильного фосфатного буфера pH 7,4 (рисунок 6В и Г). Для предотвращения высыхания и загрязнения и дефект кожи бесконтактно закрывали парафиновой пленкой (рисунок 6Д). Животным контрольной группы (n=32) производили аналогичные манипуляции, но без помещения матрикса в рану [135].



**Рисунок 6 – Вид моделированного полнослойного дефекта кожи мышей:**  
**А – полнослойная кожная рана, диаметром 1,2 см; Б – силиконовое антиконтракционное кольцо диаметром 1,4 см; В – лиофилизированный матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека в области раны; Г – матрикс увлажнен раствором фосфатного буфера; Д – дефект бесконтактно закрыт парафиновой пленкой [135]**

Животные содержались в клетках по одной особи. Оценку общего состояния, подвижности, потребления корма и воды, а также наличия общих и местных признаков воспаления проводили ежедневно. На 1, 3, 7, 14-е сутки от начала эксперимента по 8 животных выводили из эксперимента передозировкой паров эфира (Рисунок 7) [135].



**Рисунок 7 – Схема исследования динамики заживления полнослойных кожных ран у мышей *in vivo***

Ткани в области раны после извлечения фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 часов. После гистологической обработки в спиртах

различной концентрации образцы заливали в парафин. Изготавливали срезы толщиной 3-4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином и по Гейденгайну (Biovitrum, Россия) по инструкциям производителя. Определяли удельную площадь сосудов (и их средний диаметр) в тканях окружающих раневой дефект [150]. Для подсчета каждого морфометрического показателя исследовали по 5 полей зрения в каждом срезе, общее количество измерений (n=10) [135].

Самец свиньи № 43-40 массой 22,5 кг в начале эксперимента, был получен из питомника Института цитологии и генетики Российской Академии Наук (рисунок 8).



***Рисунок 8 – Самец свиньи № 43-40***

Для наркоза использовали внутримышечно Золетил 100 (Virbac, Франция, 10 мг/кг) и Ксилазин (Ксила, Эстония, 0,1 мл/кг). После тщательного удаления шерсти на спине и обработки кожи 70% раствором этилового спирта дермопанчем DMP08 диаметром 8 мм (SteryLab, Италия) наносили две полнослойные кожные дефекты глубиной 1 см. В опытную рану помещали 0,01 г лиофилизованного матрикса из ДВС. Наблюдение за поведением животного, местные кожные реакции регистрировали ежедневно. Спустя 7 суток забирали биопсию со всех опытных и контрольных ран. Биопсийный материал фиксировали в нейтральном формалине в течение 24 часов, заливали в парафин и изготавливали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Гейденгайну и по Массону [151].

## 2.16 Методы статистического анализа

Подсчет морфометрических показателей проводили в программе ImageJ (1,53e, National Institutes of Health, США). Для статистической обработки всех количественных данных использовали пакет прикладных программ Statistica 7.0, ANOVA с апостериорным анализом Бонферони. Разницу считали статистически значимой на уровне  $p < 0,05$ . Количественные данные представлены в виде в виде среднего и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). Масса животных и температура вивария представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ( $M \pm m$ ) [152, 153].

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

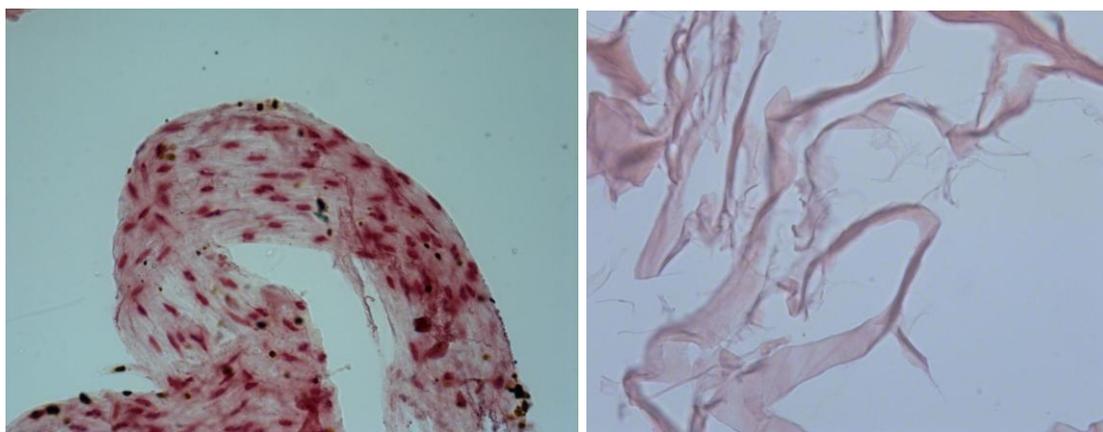
### 3.1 Выбор технологии изготовления матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

#### *3.1.1 Подтверждение полноты децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека*

Учитывая влияние способа обработки биоматериала Вартонова студня на доступность факторов роста, были изготовлены два варианта бесклеточного матрикса [8, 9]. Для изготовления второго варианта матрикса обработке пепсином подвергались образцы ДВС (рисунок 3). Поэтому исследованию на содержание остаточного ДНК подвергались только образцы матрикса, изготовленного без применения этапа ферментативного гидролиза солянокислым пепсином (рисунок 2).

Децеллюляризованный матрикс из ВС пуповины человека соответствовал минимальным критериям остаточного содержания генетического материала донора (рисунки 9 - 12) [66].

Как видно на рисунке 9А в исходном материале Вартонова студня пуповины человека, окрашенного гематоксилином и эзином, присутствует большое количество клеток, в то время как в ДВС наличия ядер клеток не визуализируется (рисунок 9Б).

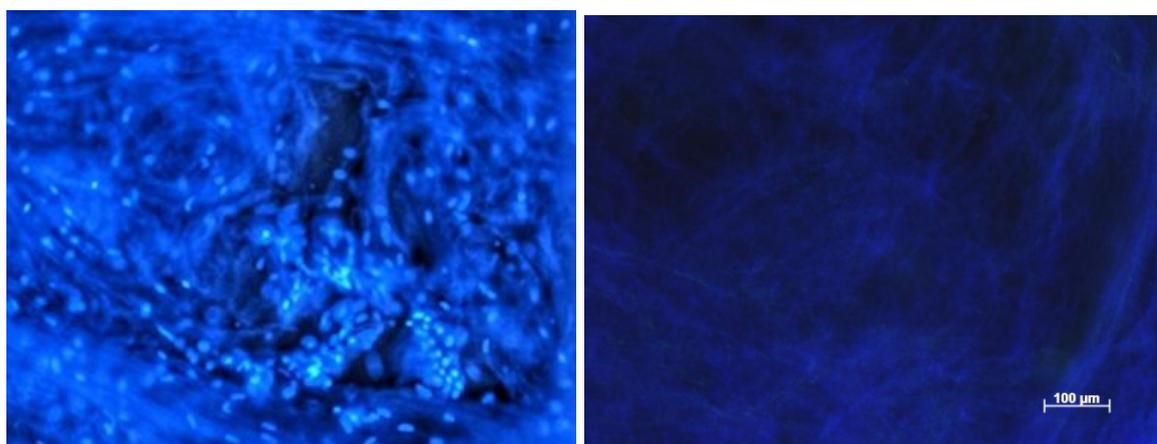


А

Б

**Рисунок 9 – Окраска гематоксилином и эозином лиофилизированных нативной пуповины человека (А) и матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня (Б); Ув.  $\times 400$**

Окрашивание DAPI также не выявило видимых ядер клеток в матриксе из ДВС (рисунок 10Б), по сравнению с материалом нативной пуповины (рисунок 10А).

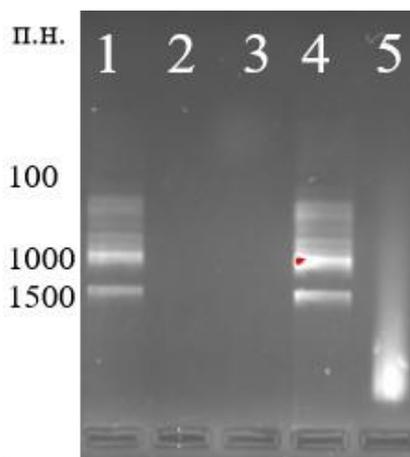


А

Б

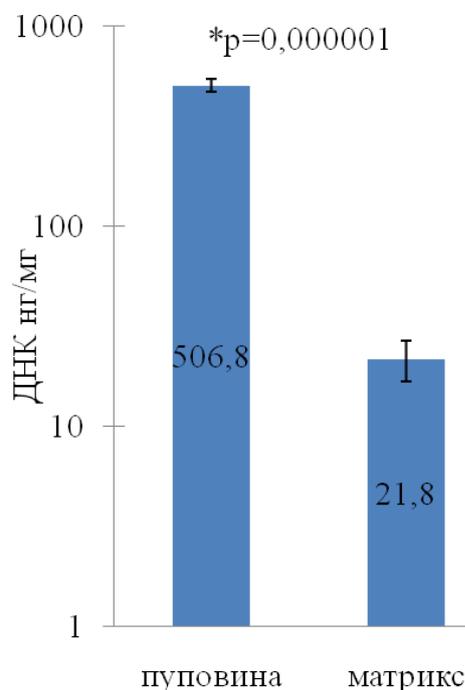
**Рисунок 10 – Окраска DAPI лиофилизированных нативной пуповины человека (А) и матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня (Б); Ув.  $\times 400$**

Результаты электрофореза в геле агарозы показали наличие ДНК с высокой молекулярной массой в нативной ткани пуповины (рисунок 11, №5), в то время как ДНК, выделенная из децеллюляризованных образцов матрикса, продемонстрировала отсутствие генетического материала (рисунок 11, №2 и 3), что подтверждает элиминацию ДНК.



**Рисунок 11 – Окрашивание фрагментов ДНК бромистым этидием, электрофорез в геле агарозы (1, 4 – эталоны длины молекулы ДНК, 2, 3 – матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, 5 – нативная пуповина)**

Содержание остаточного ДНК в ДВС составило  $21,8 \pm 5,0$  нг/мг высушенного матрикса. Что было статистически значимо ниже ( $p=0,000001$ ) по сравнению с содержанием ДНК в нативной пуповине  $506,8 \pm 39,1$  нг/мг лиофилизированной пуповины (рисунок 12).



**Рисунок 12 – Содержание ДНК в нативной пуповине и матриксе из децеллюляризованной пуповины человека, нг/мг лиофилизата**

Таким образом, разработанная технология децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека обеспечивает удаление около 96% ДНК, что свидетельствует о ее эффективности и, соответственно, низкой способности матрикса вызывать нежелательные иммунные реакции [66].

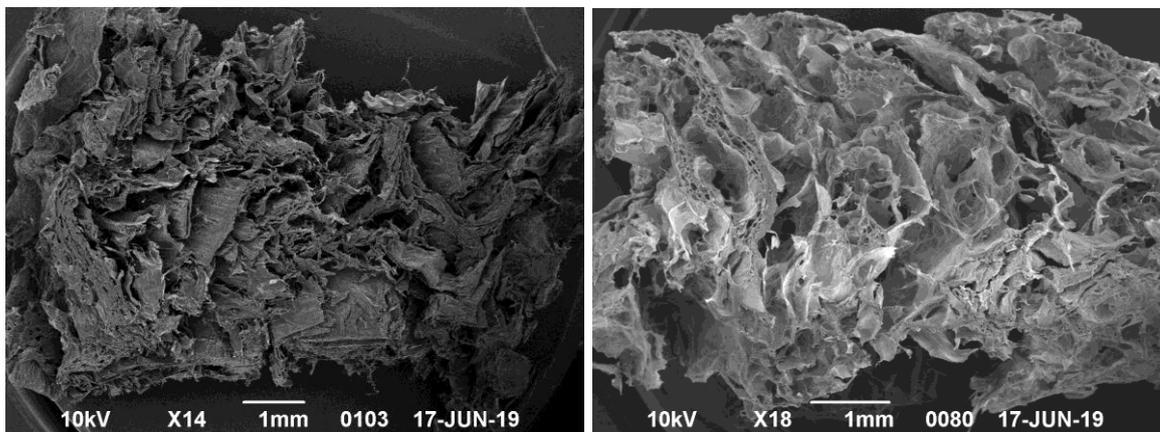
### ***3.1.2 Исследования морфологии матриксов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека***

Применение разных протоколов изготовления бесклеточных матриксов не только вносит вклад в сохранение профиля белков ВКМ, но и заметно изменяет рельеф поверхности и адсорбционные свойства матрикса. Поскольку топография поверхности бесклеточного матрикса и его микроструктура способны оказывать влияние на функциональную активность клеток реципиента, была исследована морфология матриксов из ДВС, приготовленных по двум технологиям (рисунок 13).



***Рисунок 13 - Внешний вид матриксов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека. Размер масштабной линейки - 1 см***

Микрофотографии СЭМ демонстрируют переменную пористость двух матриксов (рисунок 14).

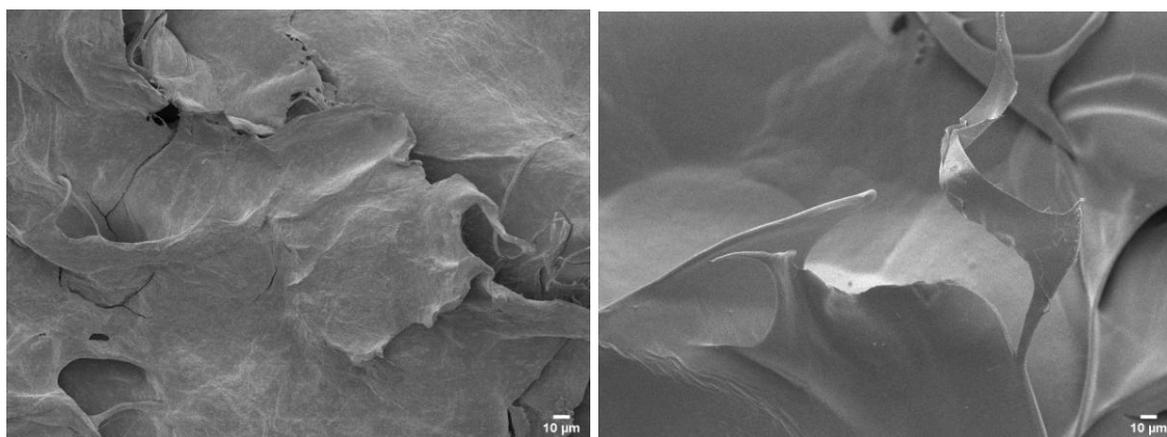


А

Б

**Рисунок 14 - Пористая структура матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (А) и матрикса, изготовленного с применением ферментативного гидролиза пепсином (Б). Сканирующая электронная микроскопия, размер масштабной линейки - 1 мм**

Продемонстрирована рельефная неоднородная поверхность матрикса из ДВС (рисунок 15А). Рельеф поверхности децеллюляризованного матрикса, изготовленного с применением ферментативного гидролиза пепсином показал более гомогенную структуру (рисунок 15Б).



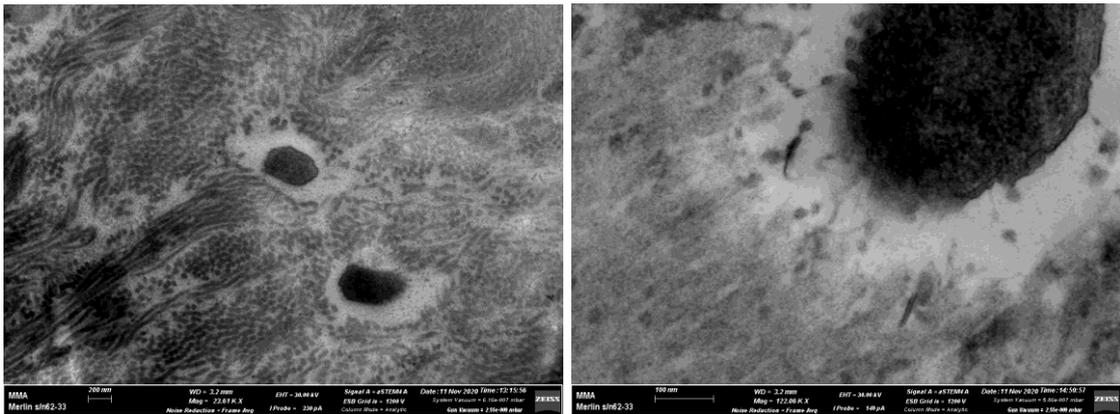
А

Б

**Рисунок 15 - Поверхность матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (А) и матрикса, изготовленного с применением ферментативного гидролиза пепсином (Б). Сканирующая электронная микроскопия, размер масштабной линейки – 10 μм**

Пористость и шероховатость поверхности являются важными параметрами для миграции, адгезии клеток и их пролиферации на поверхности матрикса. Переменная пористость способствует циркуляции жидкостей и питательных веществ, что необходимо для пролиферации клеток.

Основную массу ткани пуповины составляют коллагены, что продемонстрировано на микрофотографиях ТЭМ нативной пуповины (рисунок 16) [133].

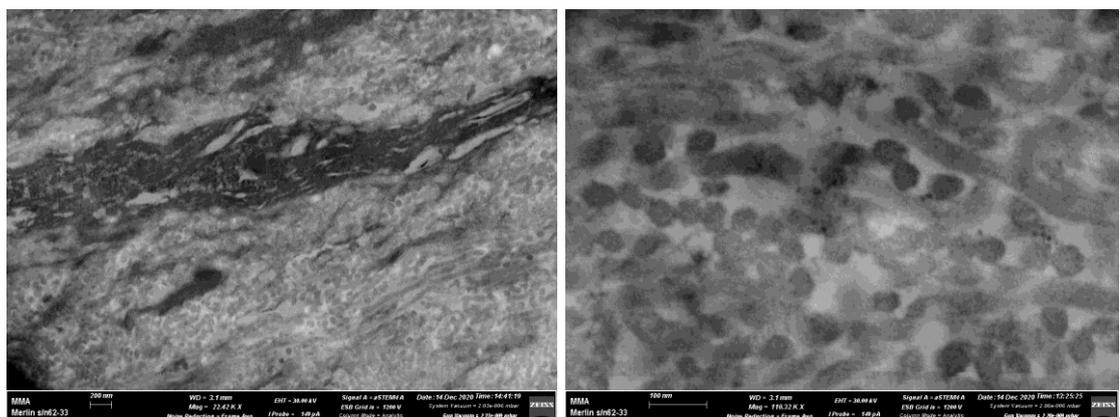


А

Б

**Рисунок 16 – Микрофотографии нативной пуповины. Трансмиссионная электронная микроскопия, размер масштабной линейки – 200 нм (А) и 100 нм (Б)**

Процедура децеллюляризации ВС существенно не повлияла на конфигурацию волокон коллагена в матриксе (рисунок 17А и Б).

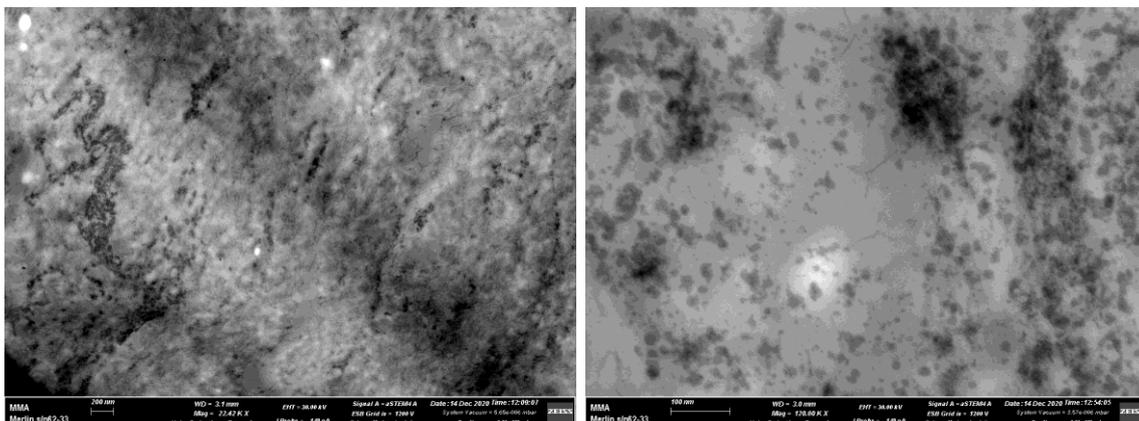


А

Б

**Рисунок 17 – Микрофотографии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека. Трансмиссионная электронная микроскопия, размер масштабной линейки – 200 нм (А) и 100 нм (Б)**

Последующая обработка матрикса пепсином приводила к частичной утрате микроструктуры ВКМ (рисунок 18А и Б).

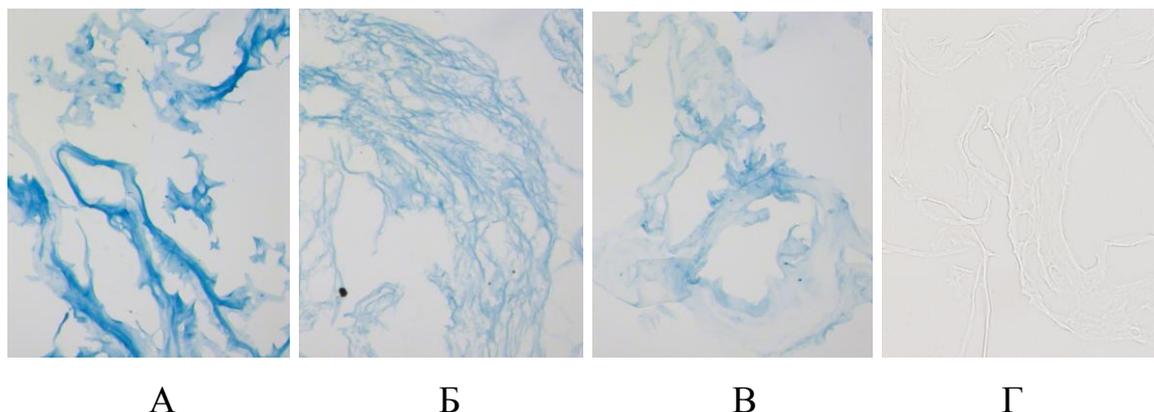


А

Б

***Рисунок 18 – Микрофотографии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня, изготовленного с применением ферментативного гидролиза пепсином. Трансмиссионная электронная микроскопия, размер масштабной линейки – 200 нм (А) и 100 нм (Б)***

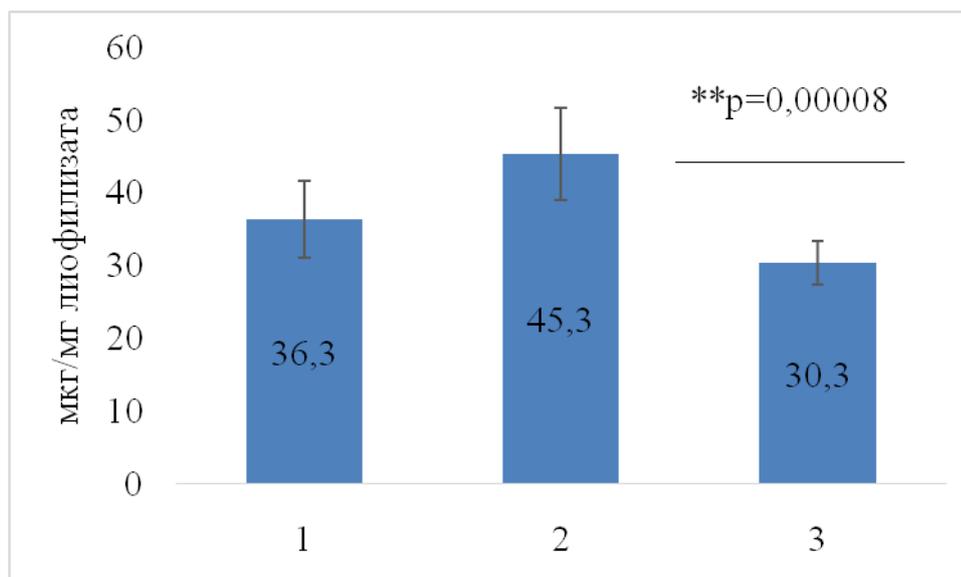
Одной из функций Вартонова студня является обеспечение кровотока по сосудам пуповины, даже в условиях скручивания и сжимания во время внутриутробного развития плода. Это возможно за счет большого содержания ГАГ, встроенных в коллагеновую сеть [15]. Сохранность ГАГ после децеллюляризации подтверждена гистохимическим окрашиванием альциановым синим и подтверждено отсутствием такого окрашивания после обработки препаратов раствором гиалуронидазы (рисунок 19).



**Рисунок 19 – Гликозаминогликаны в нативной пуповине (А), бесклеточных матриксе (Б) и матриксе, приготовленном с использованием ферментативного гидролиза пепсином (В), отсутствие окрашивания после действия на матрикс гиалуронидазы (Г). Окрашивание альциановым синим, рН 2,5; Ув.  $\times 100$**

Эффективность и качество децеллюляризации определяется удалением ДНК и сохранением не только микроструктуры коллагена, но и сульфатированных ГАГ. Отрицательно заряженные молекулы сульфатированных ГАГ, взаимодействуя с факторами роста, способствуют их медленному высвобождению и постоянной локальной концентрации в месте имплантации матрикса. Это имеет особенное значение для активации клеток и стимуляции заживления [53].

Было обнаружено, что матрикс из ДВС содержит сульфатированные ГАГ в больших количествах, чем в нативной пуповине (рисунок 20). Данное явление объясняется увеличением доли ГАГ в единице массы высушенной ткани, вследствие удаления клеток пуповины. Что согласуется с опубликованными ранее данными [9, 122]. При обработке матрикса из ДВС раствором солянокислого пепсина обнаружено снижение содержания сульфатированных ГАГ по сравнению с их содержанием в матриксе из ДВС ( $p=0,00008$ ; рисунок 20).

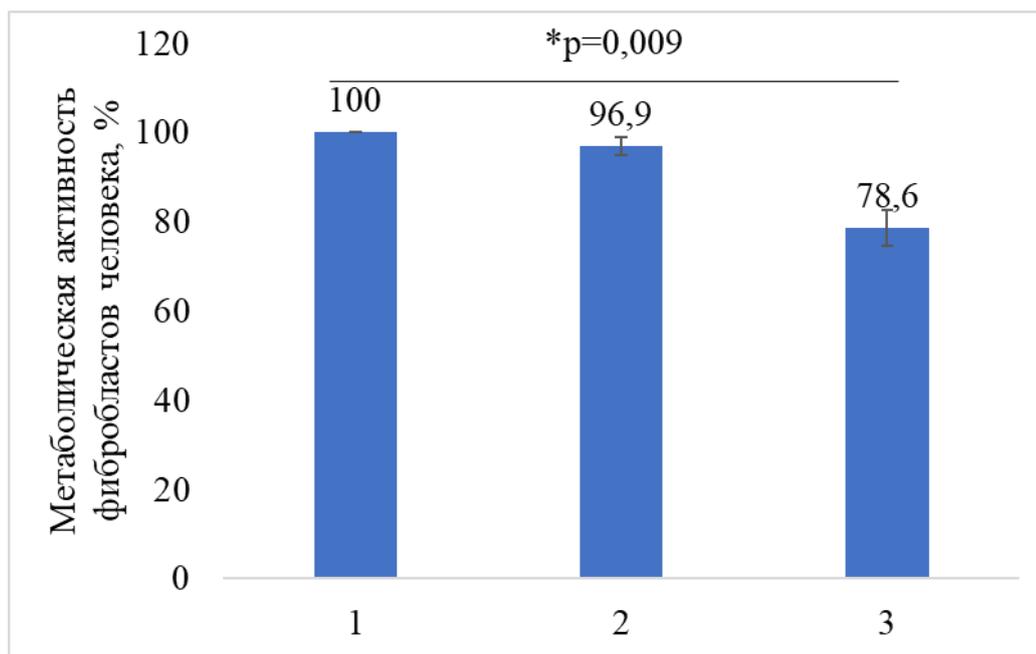


**Рисунок 20 – Содержание сульфатированных гликозаминогликанов в матриксе из децеллюляризованного Вартонова студня (2), матриксе, изготовленном с применением ферментативного гидролиза солянокислым пепсином (3) и нативной пуповине (1)**

Таким образом, показаны различия в микроструктуре топографии поверхности матриксов и статистически достоверное снижение количества сульфатированных ГАГ после применения этапа ферментативного гидролиза пепсином в процессе его изготовления.

### **3.1.3 Исследование метаболической активности фибробластов дермы человека, под действием «вытяжек» из матриксов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека**

Исследование метаболической активности дермальных фибробластов человека (МТТ-тест) не обнаружило угнетающего действия «вытяжки» из матрикса из ДВС, показатели были сопоставимы с контролем. Метаболическая активность клеток, подвергшихся действию «вытяжки» из матрикса, приготовленного с применением ферментативного гидролиза солянокислым пепсином, была ниже по сравнению с контролем ( $p=0,009$ ) (рисунок 21).



**Рисунок 21 – Метаболическая активность фибробластов дермы человека при культивировании в стандартных условиях (1), в «вытяжках» из матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (2) и матрикса, приготовленного с применением ферментативного гидролиза пепсином (3)**

Нетоксичность бесклеточного матрикса в значительной степени зависит от качественного удаления агентов децеллюляризации. S. Cebotari et al. показали, что концентрация остаточного детергента <50 мг/л является приемлемой для обеспечения нетоксичности [154]. Нами выбран водорастворимый детергент SDS именно потому, что он может быть эффективно отмыт водными растворами из обрабатываемой ткани. Мы не измеряли остаточное количество SDS в матриксах. Тем не менее, проведенные нами исследования *in vitro* на клетках человека продемонстрировали отсутствие цитотоксических свойств матрикса из ДВС.

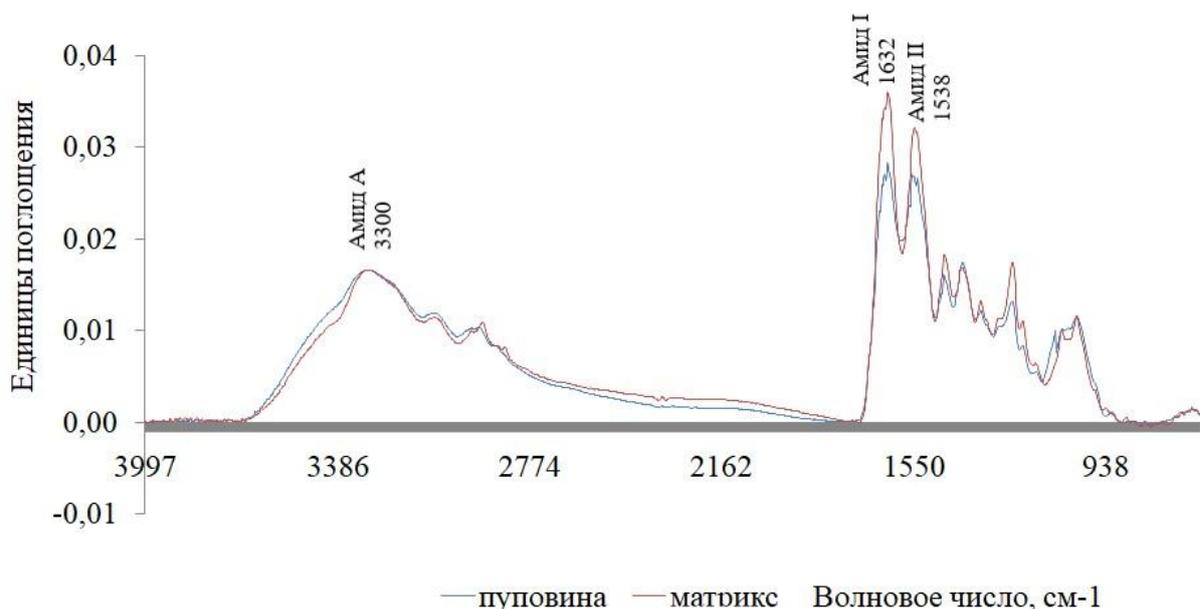
Таким образом, бесклеточные матриксы из ДВС пуповины человека обладают пористой структурой, состоят из коллагена, сохраняют в своем составе ГАГ (несульфатированные и сульфатированные). При этом обработка пепсином обуславливает снижение уровня сульфатированных ГАГ. Также метаболическая активность клеток, культивированных с использованием «вытяжки» из матрикса, приготовленного с применением ферментативного гидролиза пепсином, была статистически значимо ниже по сравнению с контролем. В связи с этим для дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo* был выбран лиофилизированный матрикс

на основе ДВС, приготовленный без применения этапа обработки пепсином. Отметим, что исключение из технологии изготовления пепсина свиного происхождения позволяет создать максимально гомологичный продукт.

### 3.2 Состав и свойства матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

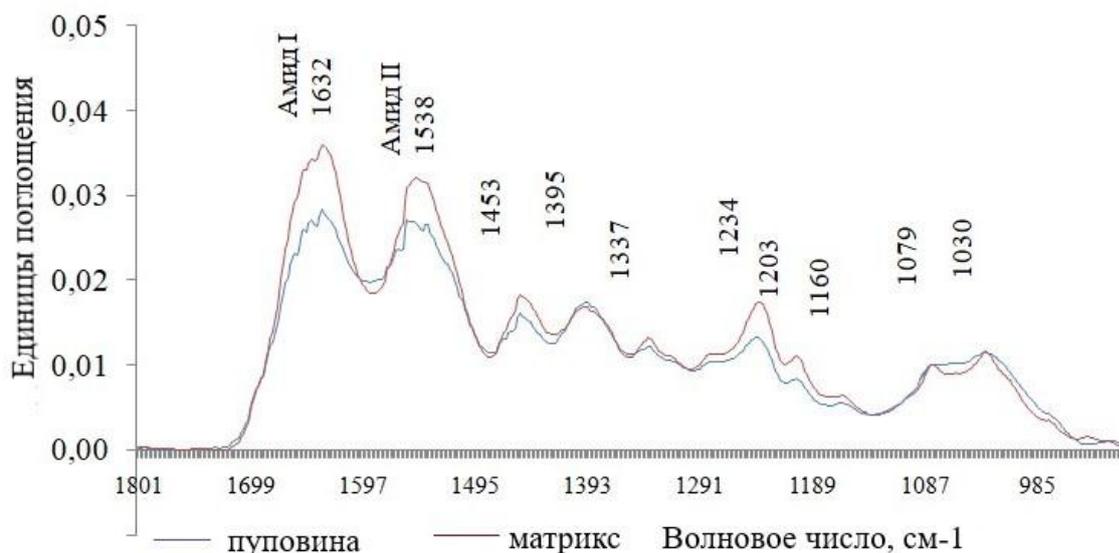
#### 3.2.1 Компоненты матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

Общий вид спектров инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКСПФ) матрикса из ДВС и нативной пуповины были близки к описанным в литературе для спектров коллагена (рисунок 22).



**Рисунок 22 – Инфракрасные спектры с Фурье преобразованием нативной пуповины и матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека**

Показаны пики характерные для высокомолекулярных органических соединений, предположительно состоящих из алифатических мономеров, соединенных пептидной связью (рисунок 23) [20, 155, 156].



**Рисунок 23 – Инфракрасные спектры с Фурье преобразованием нативной пуповины и матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека. Область от  $1800 \text{ см}^{-1}$**

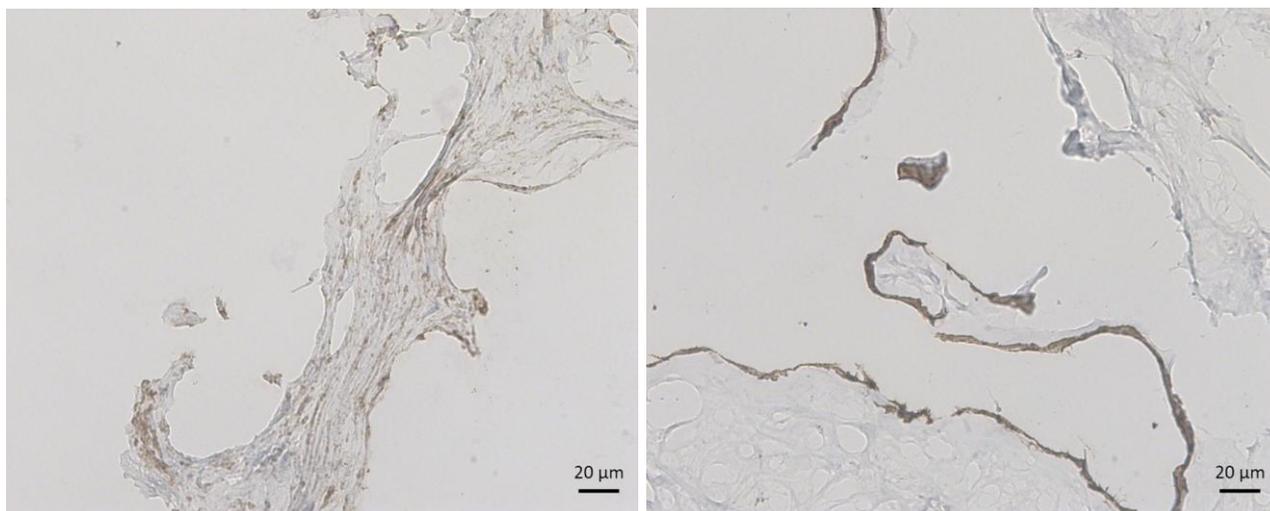
Основные пики показаны в областях Амидов I и II (таблица 2). Сильный сигнал в области Амид II соответствует валентным и деформационным колебаниям аминогрупп. Присутствие сильных сигналов в области Амид I свидетельствует о наличии карбоксильных групп. Пики в областях поглощения между  $1170$  и  $800 \text{ см}^{-1}$  ответственны за углеводные фрагменты коллагена и ГАГ. [8, 9].

**Таблица 2 – Характерные пики инфракрасных спектров с Фурье преобразованием пуповины и матрикса из децеллюляризованного вартонова студня пуповины человека**

Пуповина	Матрикс	Область спектра	Основное ассоциированное соединение
3278,80	3287,67	Амид А	Водородные связи, $-\text{CH}_3$ , $-\text{CH}_2$
2931,74	2929,18	Амид В	
1633,06	1632,84	Амид I	Коллаген, $-\text{C}=\text{O}$
1538,20	1538,96	Амид II	Коллаген, $-\text{NH}_2$
1453,78	1453,02	-	$-\text{CH}_3$
1337,09	1336,75	Амид III	Коллаген
1234,95	1235,51	Амид III	Коллаген, ГАГ
1203,86	1203,06	Амид III	Коллаген
1158,94	1160,91	-	Углеводная часть коллагена, ГАГ
1077,12	1079,42	-	Коллаген, сульфатированные ГАГ
1030,70	1031,42	-	Коллаген, ГАГ

Примечание: ГАГ – гликозаминогликаны

В составе бесклеточного матрикса методом иммуногистохимического окрашивания было показано присутствие коллагена IV типа и ламинина (рисунок 24А и 24Б соответственно). Являясь сложным адгезионным белком, ламинин совместно с нефибриллярным коллагеном IV типа участвует образование сети базальной мембраны эпителия [24, 157].



А

Б

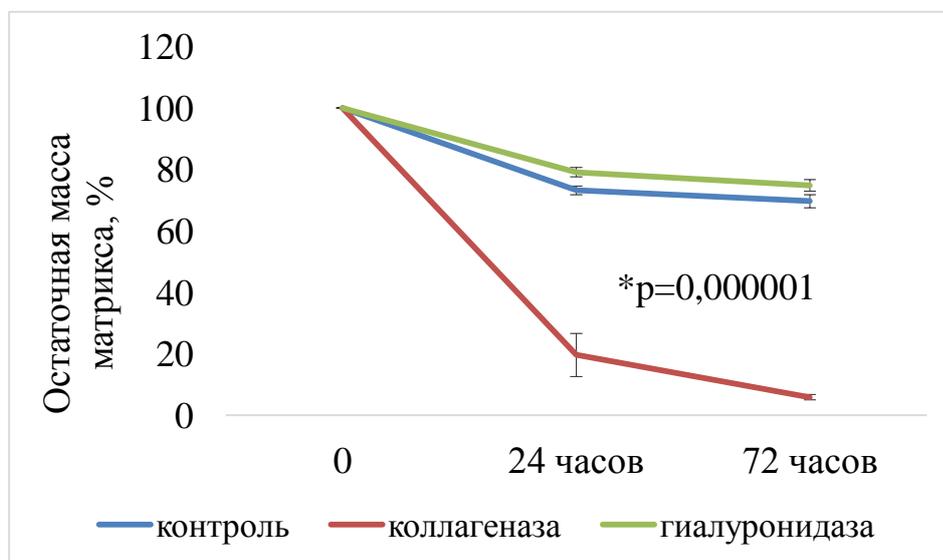
**Рисунок 24 – Иммуногистохимическое окрашивание матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека антителами к коллагену IV типа (А) и ламинину (Б), Ув.×400**

Чрезвычайное значение для заживления ран кожи имеет обнаруженный в бесклеточном матриксе фибронектин (рисунок 25А). Этот гликопротеин экспонирует RGD-последовательность аминокислот, которая связывается с  $\alpha_v\beta_3$ -интегрином фибробластов, стимулируя тем самым их миграцию в рану. Также было показано, что фибронектин регулирует протеолитическую активность лизилоксидазы и созревание коллагена [24].



### 3.2.2 Биодegradация и набухание матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

Способность матрикса из ДВС к расщеплению коллагеназой и гиалуронидазой была показана *in vitro* (рисунок 26). Естественная биодegradация имплантированного матрикса со временем исключает необходимость формирования ответа на «инородное тело» (хорошо описанного в контексте синтетических имплантатов) или его инкапсуляцию [77].

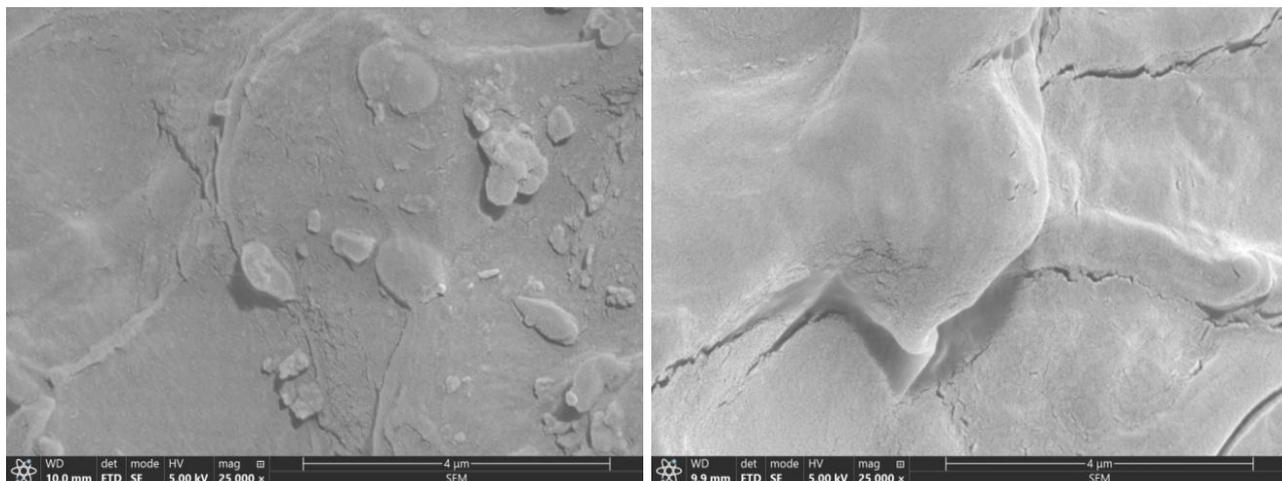


**Рисунок 26 – Остаточная масса образцов матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека после инкубации в растворах ферментов и в контроле**

Уже в течение 24 часов в условиях ферментативной обработки коллагеназой происходило уменьшение массы образцов на  $82,3 \pm 7,0\%$ . Инкубация с коллагеназой в течение 72 часов привела к потере веса образцов на  $94,3 \pm 0,9\%$  (рисунок 26).

Лиофильно высушенные образцы матрикса, которые подвергались действию коллагеназы, были исследованы методами СЭМ и ИКСПФ. 24 часовая инкубация с коллагеназой не приводила к значительному изменению структуры поверхности матрикса (рисунок 27А) по сравнению со структурой поверхности исходного матрикса из ДВС (рисунок 15А). Инкубация матрикса из ДВС в растворе

коллагеназы в течение 72-х часов приводила к значительному сглаживанию его поверхности (рисунок 27Б).

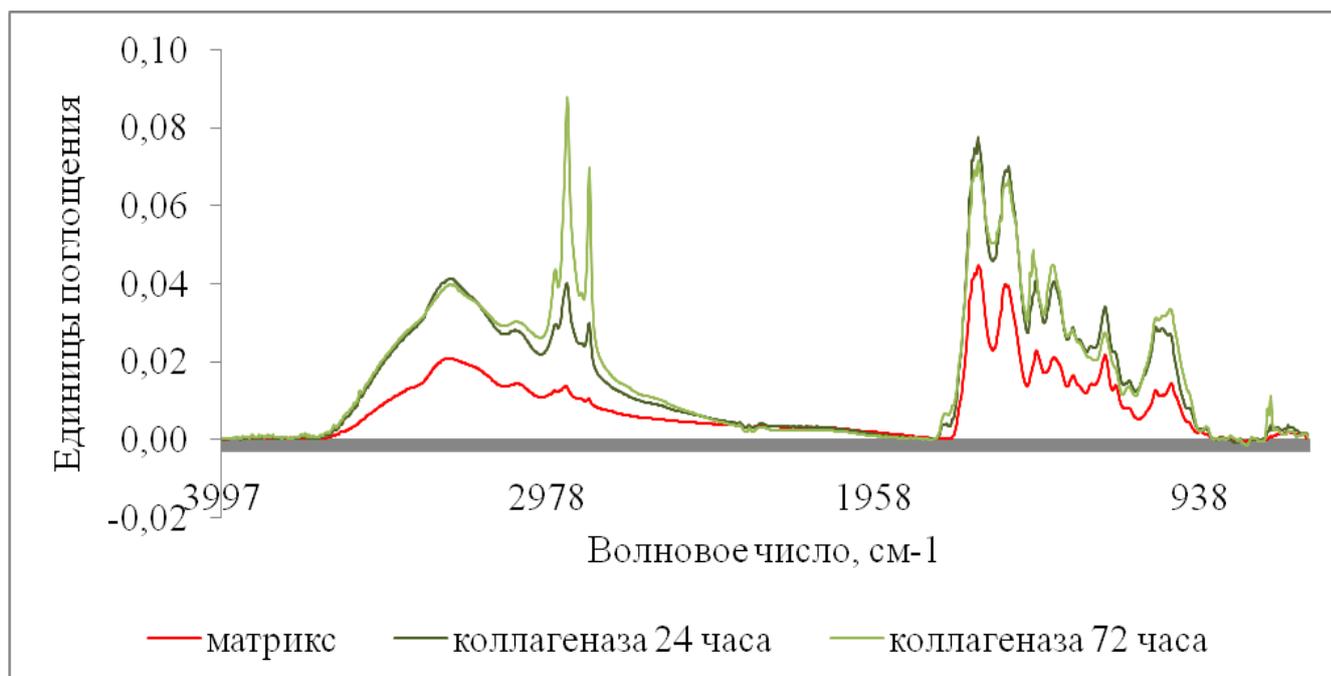


А

Б

**Рисунок 27 – Матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека после инкубации с коллагеназой в течение 24-х (А) и 72-х (Б) часов. Сканирующая электронная микроскопия, размер масштабной линейки – 4 µm**

Спектры ИКСПФ лиофилизированных образцов матрикса, подвергнутого расщеплению коллагеназой с различным временем инкубации, имели заметные отличия (рисунок 28). С увеличением экспозиции в растворе фермента происходило кратное увеличение величины поглощения всех сигналов спектра. Однако существенного изменения коэффициента соотношения Амид I/Амид II не происходило (1,10 после 24-х часовой инкубации и 1,07 после 72-х часовой инкубации с коллагеназой). При этом увеличение интенсивности сигналов в диапазоне  $2800-3000\text{ см}^{-1}$ , становится наибольшим на спектре после 72-х часовой инкубации. Такие изменения внешнего вида спектров могут быть следствием фрагментации молекул коллагена [158].



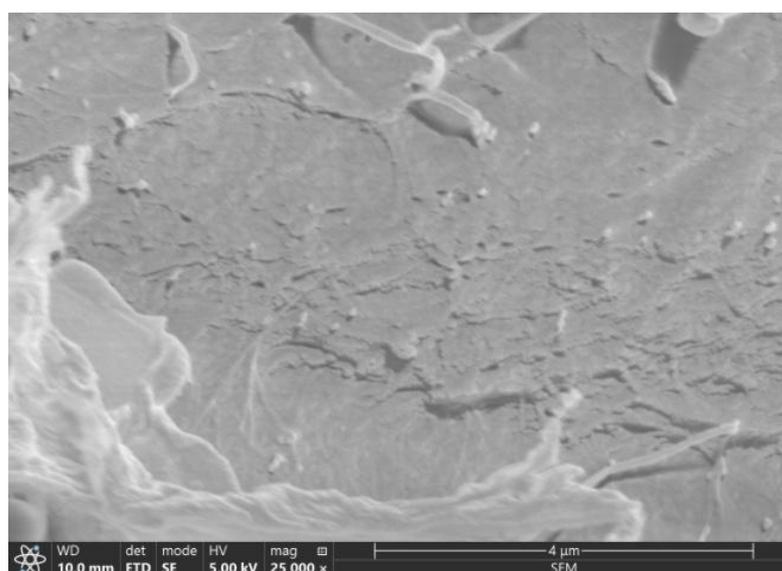
***Рисунок 28 – Динамика изменений спектров инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека после действия коллагеназы***

Основные пики также показаны в областях Амидов I и II (таблица 3). Отмечается смещение пиков Амидов A и B в правую часть спектра, а Амидов I, II и III – влево. При этом после трех суток инкубации в растворе коллагеназы не наблюдается отчетливое выделение пика в области спектра  $1203-1205 \text{ см}^{-1}$ . Пики, ответственные за углеводные фрагменты коллагена и ГАГ сохраняются после 72-часовой инкубации с коллагеназой, но несколько смещены влево.

**Таблица 3 – Характерные пики инфракрасных спектров с Фурье преобразованием матрикса из децеллюляризованного вартонова студня пуповины человека и матрикса после обработки коллагеназой**

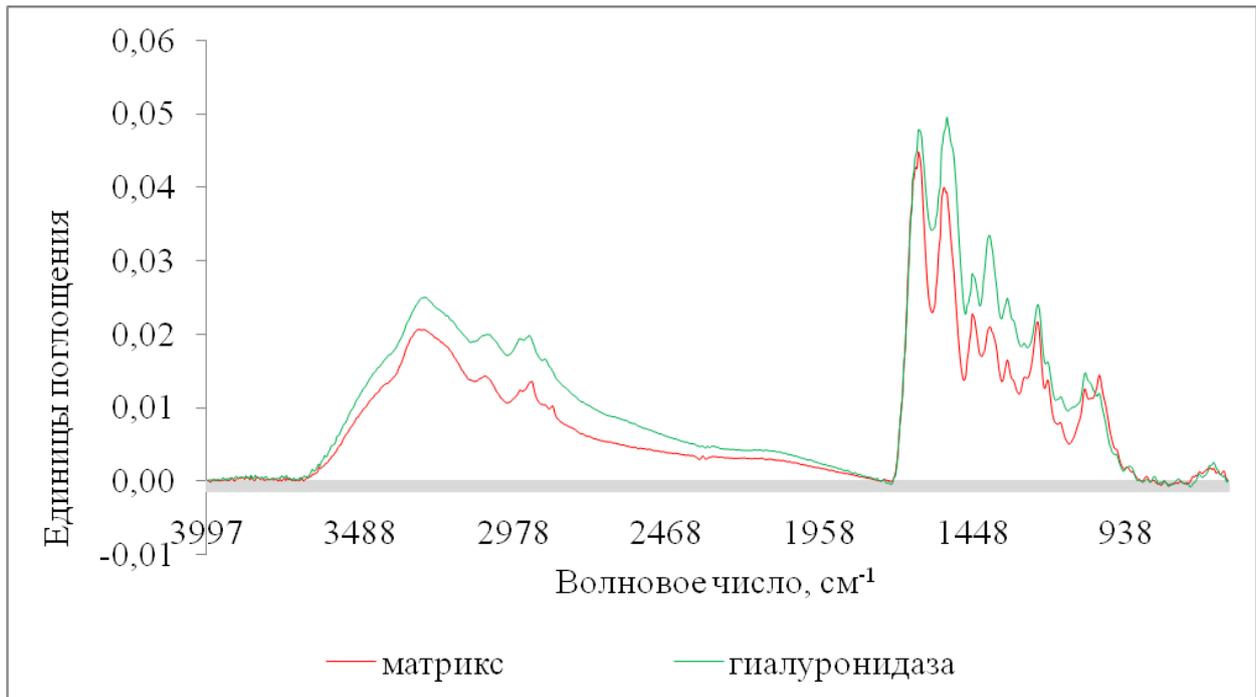
Матрикс	Инкубация с коллагеназой		Область спектра	Основное ассоциированное соединение
	24 часа	72 часа		
3287,67	3283,64	3283,64	Амид А	Водородные связи, $-\text{CH}_3$ , $-\text{CH}_2$
2929,18	2918,56	2916,52	Амид В	
1632,84	1633,66	1633,66	Амид I	Коллаген, $-\text{C}=\text{O}$
1538,96	1539,84	1539,84	Амид II	Коллаген, $-\text{NH}_2$
1453,02	1454,18	1462,34	-	$-\text{CH}_3$
1336,75	1337,93	1337,93	Амид III	Коллаген
1235,51	1237,99	1237,99	Амид III	Коллаген, ГАГ
1203,06	1205,36	-	Амид III	Коллаген
1160,91	1162,53	1162,53	-	Углеводная часть коллагена, ГАГ
1079,42	1078,91	1078,91	-	Коллаген, сульфатированные ГАГ
1031,42	1036,08	1034,04	-	Коллаген, ГАГ

После 72-х часов инкубации матрикса с раствором гиалуронидазы не происходило существенной потери веса образцов (рисунок 26), шероховатость поверхности сохранялась (рисунок 29).



**Рисунок 29 – Матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека после инкубации с гиалуронидазой в течение 72-х часов. Сканирующая электронная микроскопия, размер масштабной линейки – 4 мкм**

Спектры ИКСПФ лиофилизированных образцов матрикса и матрикса после 72 часов инкубации с гиалуронидазой имели различия пиков в спектральных областях, на выраженность которых влияет присутствие ГАГ. После воздействия гиалуронидазы наблюдали снижение поглощения в спектральной области 1135-700. Особенно заметно снизилось поглощение в областях пиков 1078, 1032 и 885, что подтверждает отсутствие сложных углеводов (рисунок 30).



**Рисунок 30 – Динамика изменений спектров инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека после действия гиалуронидазы**

Отчетливо увеличилась интенсивность поглощения в спектральной области Амида II. Соотношение Амида I/Амиду II после инкубации в гиалуронидазе составило 0,97 (таблица 4). Отмечено небольшое смещение пиков приписываемых областям Амидов А и В. Пики Амида I и Амида II также имели смещение вправо. Выделялся пик 1397 после инкубации в гиалуронидазе. Пики, приписываемые к Амиду III, выявлялись в тех же областях спектра.

**Таблица 4 – Характерные пики инфракрасных спектров с Фурье преобразованием матрикса из децеллюляризованного вартонова студня пуповины человека и матрикса после обработки гиалуронидазой**

Матрикс	Инкубация с гиалуронидазой	Область спектра	Основное ассоциированное соединение
3287,67	3271,40	Амид А	Водородные связи, $-\text{CH}_3$ , $-\text{CH}_2$
2929,18	2926,72	Амид В	
1632,84	1631,62	Амид I	Коллаген, $-\text{C}=\text{O}$
1538,96	1537,80	Амид II	Коллаген, $-\text{NH}_2$
1453,02	1454,18	-	$-\text{CH}_3$
-	1397,07	-	-
1336,75	1337,93	Амид III	Коллаген
1235,51	1235,95	Амид III	Коллаген, ГАГ
1203,06	1203,32	Амид III	Коллаген
1160,91	1160,49	-	Углеводная часть коллагена, ГАГ
1079,42	1078,91	-	Коллаген, сульфатированные ГАГ
1031,42	-	-	Коллаген, ГАГ

При контакте с физиологическим раствором при  $37^\circ\text{C}$  в течение 1 часа матрикс из ДВС увеличивает свою массу в  $16,1 \pm 2,0$  раза. Наибольшее количество влаги матрикс впитывает в первые 10 минут контакта. Погруженный в раствор матрикс набухает до тех пор, пока осмотические силы, способствующие растяжению полимерной сетки коллагена, не будут уравновешены упругими силами растянутых сегментов полимера [122]. Пористая морфология матрикса и присутствие в нем ГАГ способствуют впитыванию влаги и обеспечивают достаточную площадь для роста и миграции клеток, а также способствуют впитыванию образующегося в ране экссудата [135].

Известно, что биodeградируемость бесклеточного продукта зависит от его механической жесткости, как природного свойства, так и созданного искусственно химическим «сшиванием» структурных молекул. Для повышения механической стабильности многие исследователи используют дополнительные процедуры, обеспечивающие протеолитическую устойчивость и снижение скорости деградации изделия. Применение агентов, вызывающих образование ковалентных связей между карбоксильными и аминогруппами молекул коллагена, приводит к уменьшению свойств набухаемости и увеличению устойчивости к ферментативному расщеплению. Негативной стороной искусственно «сшитых» каркасов является то, что имплантированное инородное тело, не поддающееся фагоцитозу и деградации, провоцирует клетки воспаления длительно присутствовать в ране, приводя к хронизации процесса [4].

Поскольку матрикс из ДВС предполагается использовать в качестве не извлекаемого имплантата, была исследована его способность к полной биodeградации для оценки биологической безопасности. В то же время скорость биodeструкции матрикса в условиях *in vivo* остается не изученной полностью, поскольку модели *in vitro* не отражают всех аспектов биodeградации материала в организме. И при необходимости могут быть применены подходящие методы перекрестного сшивания матрикса для достижения баланса между стабильностью и функциональным ремоделированием [77].

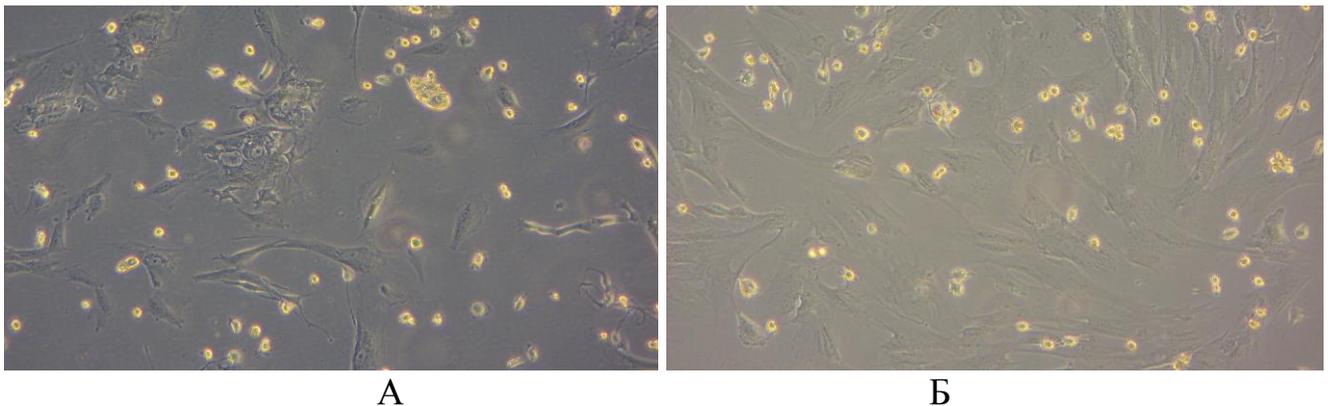
Таким образом, матрикс из ДВС пуповины человека состоит из коллагенов, ГАГ и является биodeградируемым, обладает свойством поглощать влагу (а значит и раневой экссудат). Данные свойства матрикса являются необходимыми для биосовместимости медицинского изделия из ДВС, предназначенного для стимулирования регенерации кожи, и его интеграции в окружающие ткани реципиента.

### 3.3 Влияние матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека на рост и жизнеспособность клеток свиньи, морских свинок, крыс и мышей *in vitro*

Перед тем как приступить к исследованиям биологической активности матрикса из ДВС пуповины человека *in vivo*, мы провели исследования его биосовместимости на клетках, выделенных из печени, селезенки, головного мозга, кожи и сердца свиньи, морских свинок, крыс и мышей *in vitro* (рисунок 4).

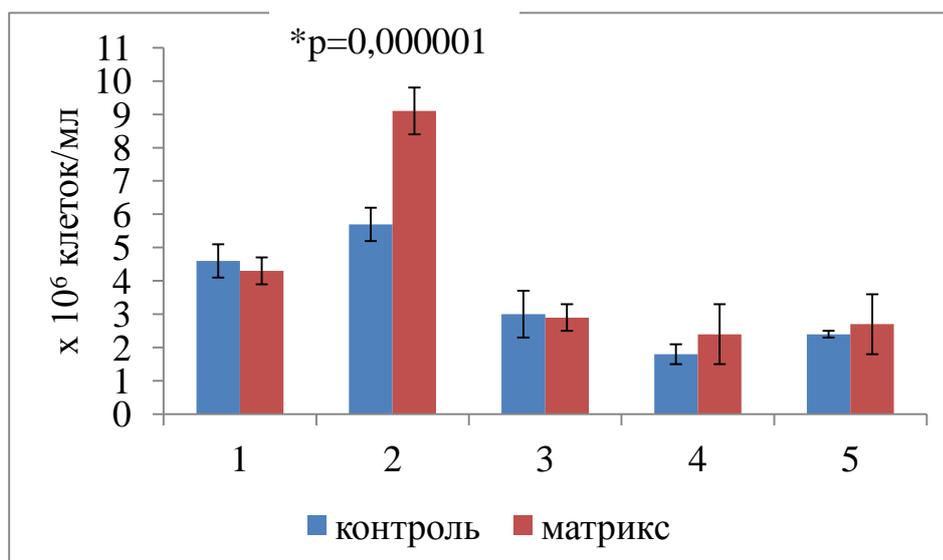
Клетки фибробластоподобной морфологии отличаются высокой неоднородностью свойств. Вероятно, что в процессе заживления и формирования грануляционной ткани одновременно задействованы множественные субпопуляции фибробластов, обладающих разной способностью к отложению ВКМ и дифференцировке. Фибробласты в разных участках кожи могут иметь различное происхождение и ни один из поверхностных маркеров не присущ всем линиям фибробластов [24].

При подсчете показателей на 21 сутки культивирования не было обнаружено угнетающего воздействия матрикса из ДВС пуповины человека на рост и жизнеспособность всех популяций выделенных клеток.



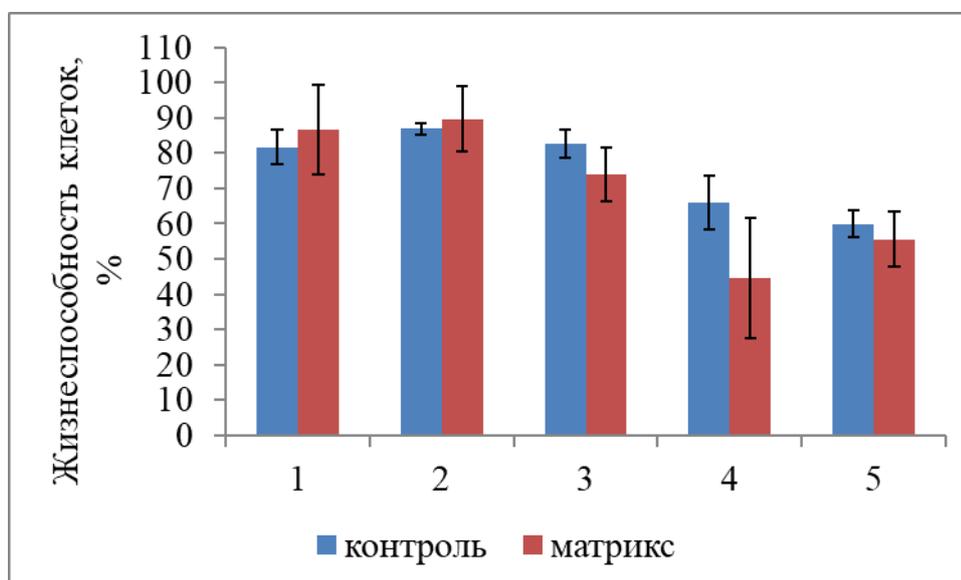
**Рисунок 31 – Клетки коры головного мозга свиньи на 21-е сутки культивирования. А – контроль; Б – в присутствии бесклеточного матрикса из пуповины человека. Инвертированная микроскопия. Ув.×400**

Количество клеток коры головного мозга свиньи (рисунок 31) статистически значимо было больше при подсчете на 21-е сутки в присутствии матрикса из ДВС (\* $p=0,0000001$ ) по сравнению с контролем (рисунок 32).



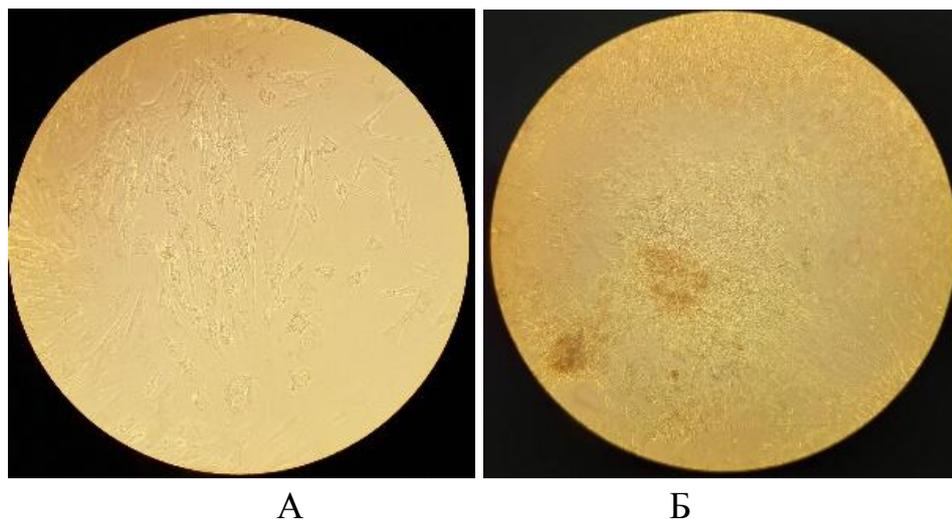
**Рисунок 32 – Количество клеток, выделенных из селезенки (1), коры головного мозга (2), печени (3), кожи (4) и сердца (5) свиньи при подсчете на 21-е сутки,  $\times 10^6$  клеток/мл**

Присутствие бесклеточного матрикса из пуповины человека при культивировании клеток свиньи статистически значимо не влияло на их жизнеспособность (рисунок 33).



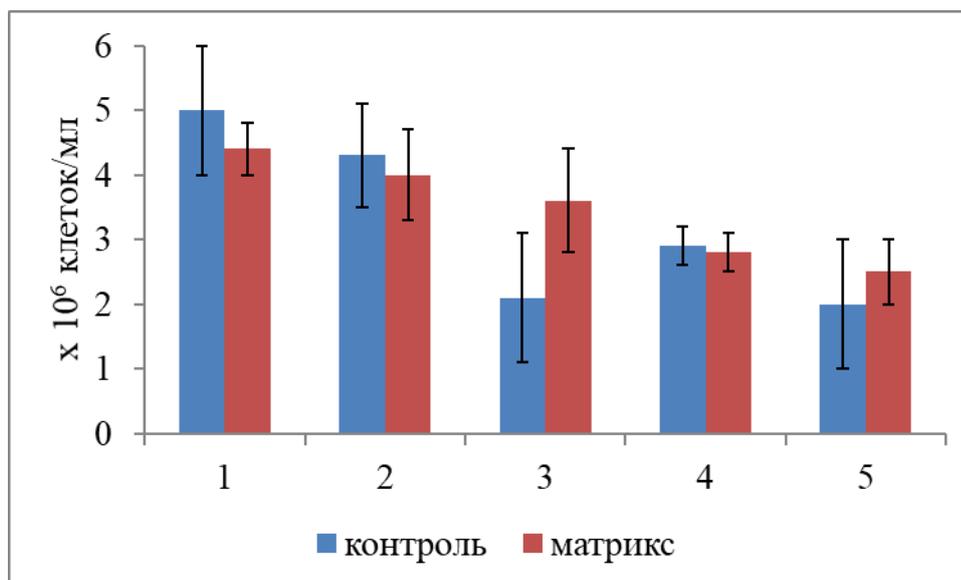
**Рисунок 33 – Жизнеспособность клеток, выделенных из селезенки (1), коры головного мозга (2), печени (3), кожи (4) и сердца (5) свиньи при подсчете на 21-е сутки, %**

Матрикс из ДВС обнаружил биосовместимость при культивировании клеток морских свинок в его присутствии (рисунок 34)



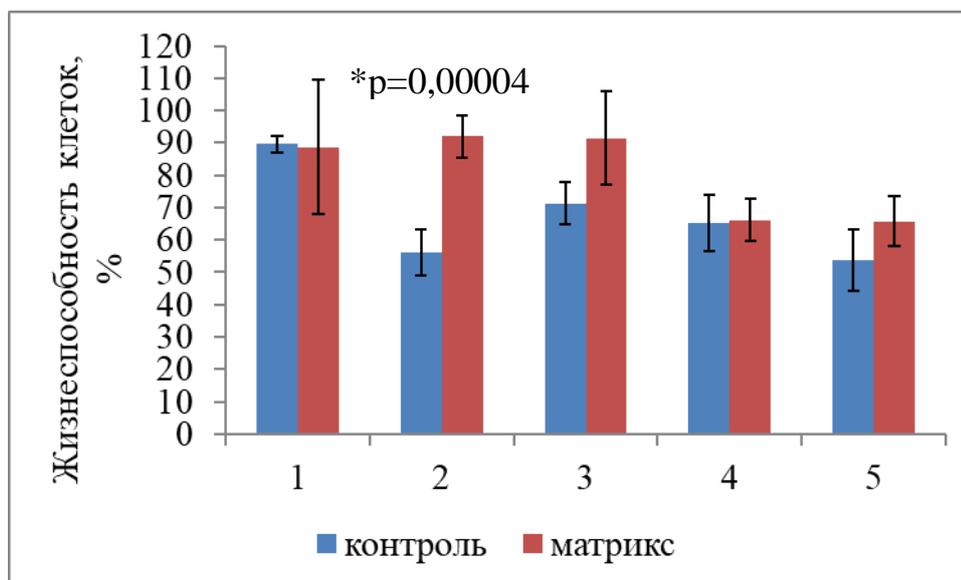
**Рисунок 34** – Клетки коры головного мозга морской свинки на 21-е сутки культивирования. А – контроль; Б – в присутствии бесклеточного матрикса из пуповины человека. Инвертированная микроскопия. Ув.×10

Не выявлено статистически значимого изменения количества клеток при культивировании в присутствии матрикса по сравнению с контролем (рисунок 35).



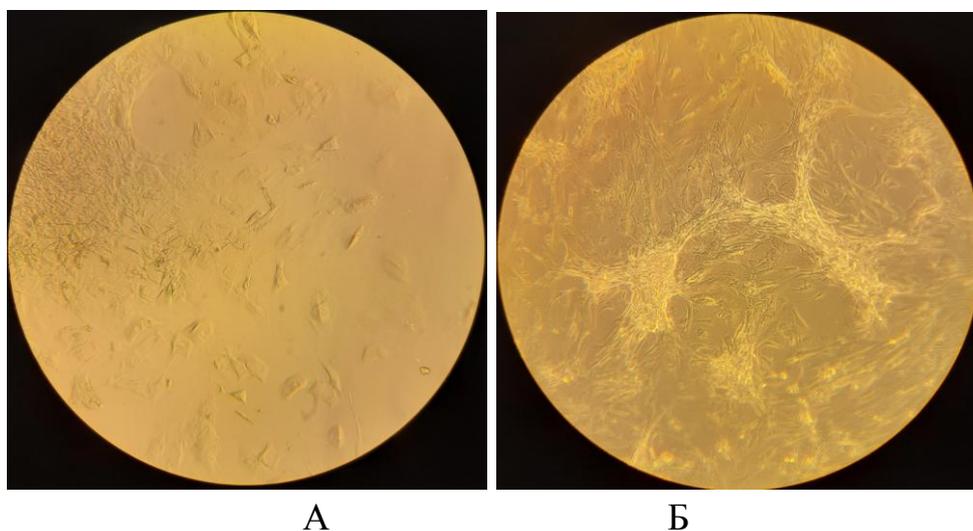
**Рисунок 35** – Количество клеток, выделенных из селезенки (1), коры головного мозга (2), печени (3), кожи (4) и сердца (5) морской свинки при подсчете на 21-е сутки, ×10<sup>6</sup> клеток/мл

Наблюдали также увеличение жизнеспособности клеток коры головного мозга морских свинок (\*p=0,00004, рисунок 36), культивированных в присутствии бесклеточного матрикса из пуповины человека.



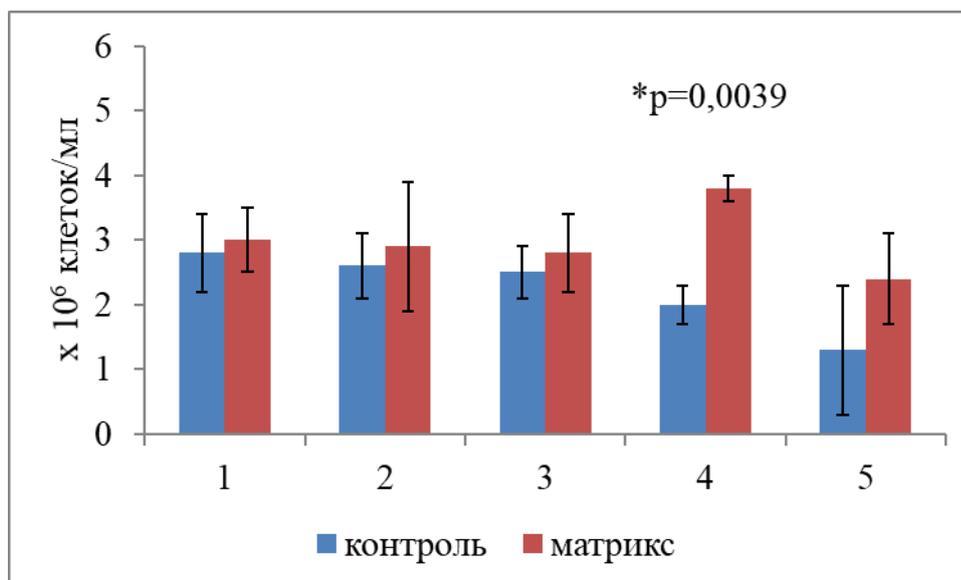
**Рисунок 36 - Жизнеспособность клеток, выделенных из селезенки (1), коры головного мозга (2), печени (3), кожи (4) и сердца (5) морской свинки при подсчете на 21-е сутки, %**

Исследования влияния матрикса из ДВС пуповины человека на рост культур клеток, выделенных из органов и тканей мышей, показал следующие результаты (рисунок 37).



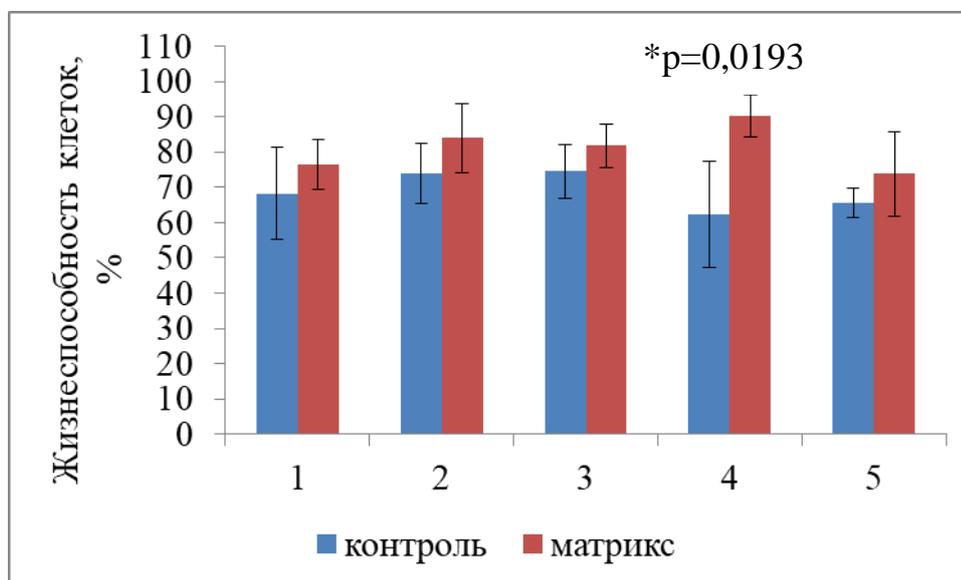
**Рисунок 37 – Клетки кожи мышей на 21-е сутки культивирования. А – контроль; Б – в присутствии бесклеточного матрикса из пуповины человека. Инвертированная микроскопия. Ув.×10**

Было обнаружено статистически значимое увеличение количества (\* $p=0,0039$ ) клеток кожи мышей при культивировании в присутствии бесклеточного матрикса из пуповины человека по сравнению с контролем на 21-е сутки (рисунок 38).



**Рисунок 38 – Количество клеток, выделенных из селезенки (1), коры головного мозга (2), печени (3), кожи (4) и сердца (5) мышей при подсчете на 21-е сутки,  $\times 10^6$  клеток/мл**

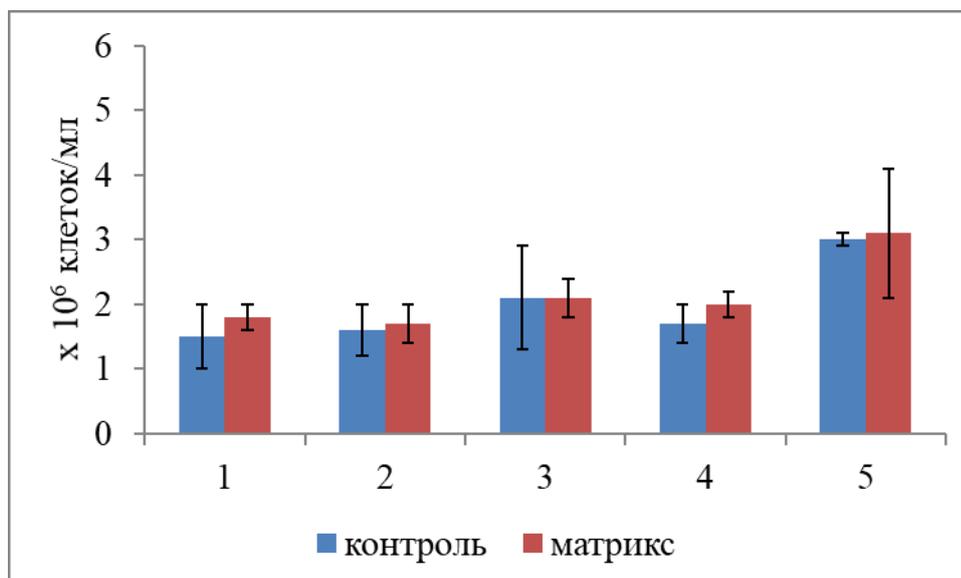
Жизнеспособность клеток кожи мышей, культивированных в присутствии матрикса из ДВС также показала статистически значимо больший результат по сравнению с контролем (\* $p=0,0193$ , рисунок 39).



**Рисунок 39 - Жизнеспособность клеток, выделенных из селезенки (1), коры головного мозга (2), печени (3), кожи (4) и сердца (5) мышей при подсчете на 21-е сутки, %**

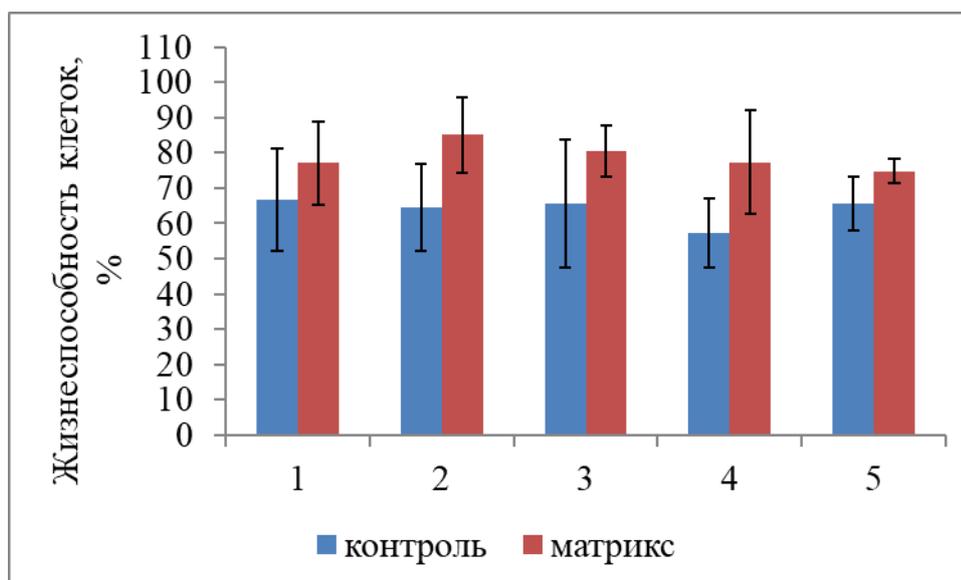
При подсчете количества клеток разных органов крыс, культивированных в стандартных условиях и в присутствии бесклеточного матрикса из пуповины

человека, на 21-сутки не было обнаружено статистически значимых различий (рисунок 40).



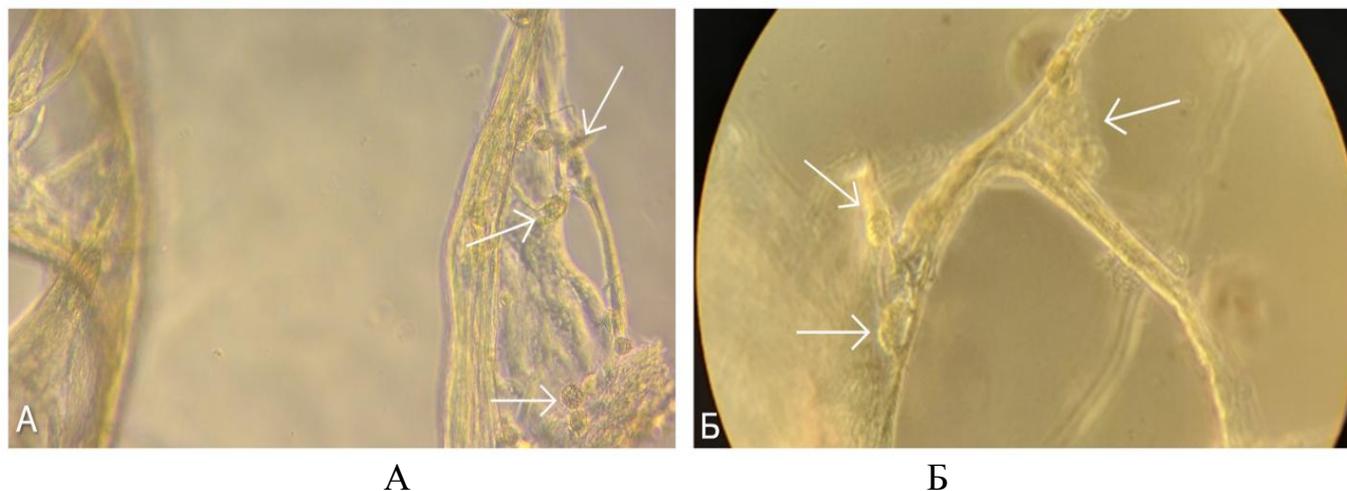
**Рисунок 40** – Количество клеток, выделенных из селезенки (1), коры головного мозга (2), печени (3), кожи (4) и сердца (5) крыс при подсчете на 21-е сутки,  $\times 10^6$  клеток/мл

Жизнеспособность клеток крыс, культивированных в присутствии матрикса из ДВС, также не показала статистически значимых различий с контролем (рисунок 41).



**Рисунок 41** – Жизнеспособность клеток, выделенных из селезенки (1), коры головного мозга (2), печени (3), кожи (4) и сердца (5) крыс при подсчете на 21-е сутки, %

Клетки коры больших полушарий свиньи и селезенки морской свинки прикреплялись к матриксу из пуповины на 21-е сутки культивирования (рисунок 42).



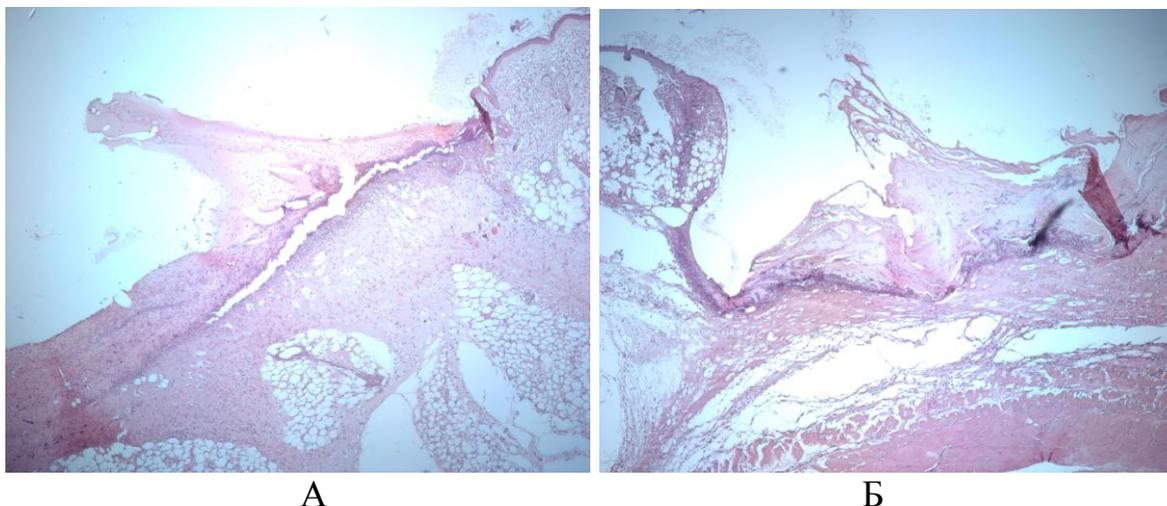
**Рисунок 42 – Адгезия клеток к матриксу из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (стрелка) на 21-е сутки: А – клеток коры мозга свиньи; Б – клеток селезенки морской свинки. Инвертированная микроскопия. Ув.× 400 [144]**

Учитывая факт, что матрикс из ДВС состоит из белков и пептидов человеческого происхождения, а для изучения его влияния на процессы заживления *in vivo* используют животные модели, была сделана попытка избежать видовой неспецифичности путем использования в качестве моделей *in vitro* клеточного материала разных лабораторных животных. Культивирование всех выделенных клеток не обнаружило негативного влияния матрикса из ДВС пуповины человека на их рост и жизнеспособность. Проведенный этап исследований биосовместимости матрикса из ДВС *in vitro* позволяет приступить к исследованиям на животных моделях *in vivo*.

### 3.4 Влияние матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины на заживление полнослойных кожных ран у мышей

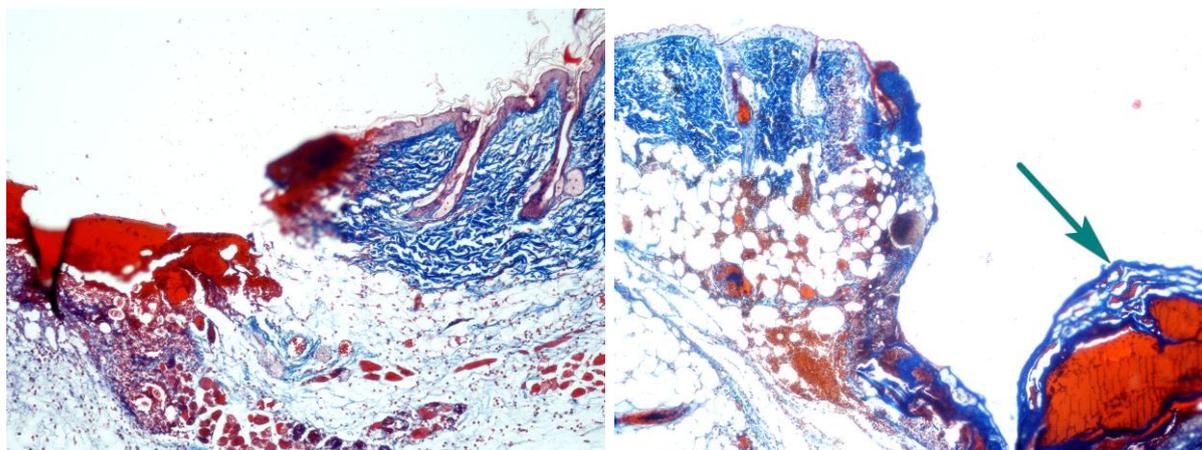
Исследования влияния средств, влияющих на всю совокупность сложных патофизиологических процессов, протекающих при заживлении раны, возможно только на живых моделях *in vivo*. Традиционно для моделирования полнослойных ран кожи используют мелких грызунов [141]. Особенности строения кожи грызунов требуют ограничения контракции [143]. Так как применение дополнительных приспособлений, ограничивающих стягивание кожи возможно на срок до 14 дней, анализ процессов заживления под влиянием матрикса из ДВС *in vivo* мы проводили на основании динамики образования и созревания грануляционной ткани, исследования активности капиллярогенеза в тканях, окружающих рану [135].

В течение первых суток после первичной альтерации возникшая сосудистая реакция в тканях, окружающих зону дефекта, имела незначительные отличия в опыте и контроле (рисунок 43А и Б) [135].



**Рисунок 43 – Области полнослойных раневых дефектов через 1 сутки в контроле (А) и в присутствии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.×50**

Наблюдали расширение просвета артериол и капилляров с явлениями стаза и периваскулярного отека с эмиграцией гранулоцитов в области дефекта (рисунок 44А и Б). В ранах мышей опытных групп визуализируются матрикс (рисунок 44Б, указано стрелками) [135].

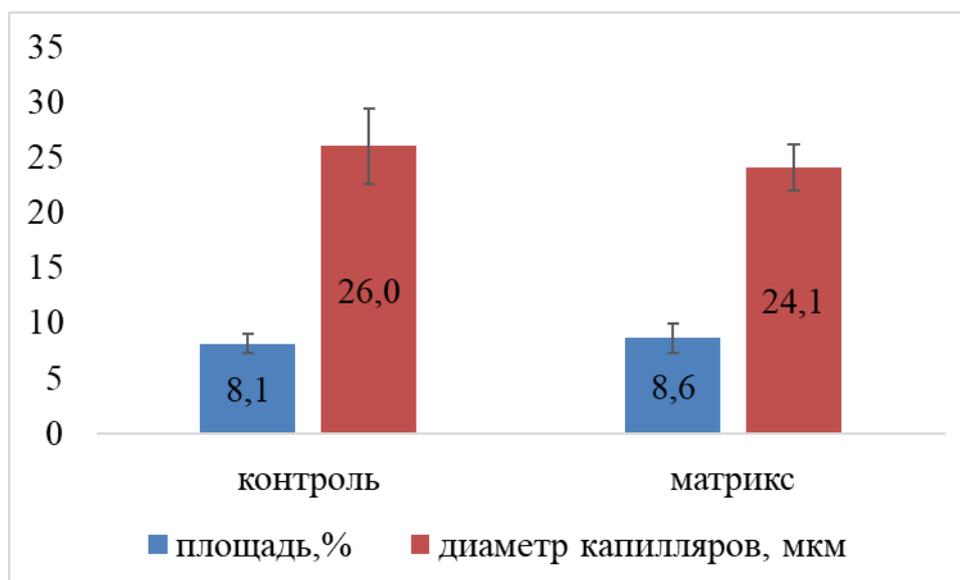


А

Б

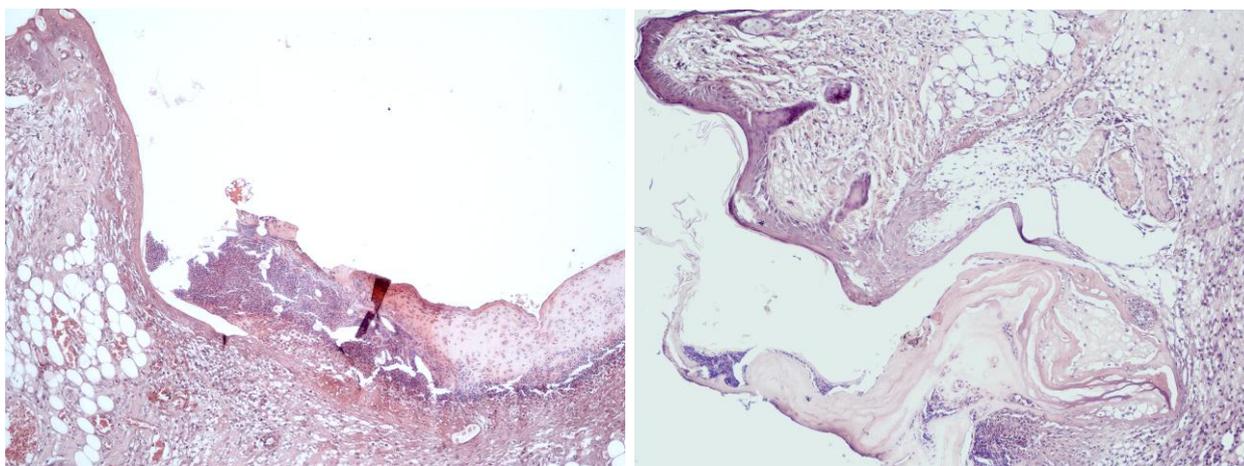
**Рисунок 44 – Области полнослойных раневых дефектов через 1 сутки. А – контроль; Б – матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (зеленая стрелка) в области раны в области раны (Б). Окраска по Гейденгайну. Ув.×100**

Выраженность сосудистых реакций, вызванная первичной альтерацией тканей, не имела различий в опыте и контроле (рисунок 45) [135].



**Рисунок 45 – Показатели характеризующие выраженность сосудистых реакций в тканях, окружающих дефект через 1 сутки от операции**

На третьи сутки от операции наблюдали образование грануляционной ткани с большим количеством молодых тонкостенных сосудов, как в опыте (рисунок 46Б), так и в контроле (рисунок 46А) [135].

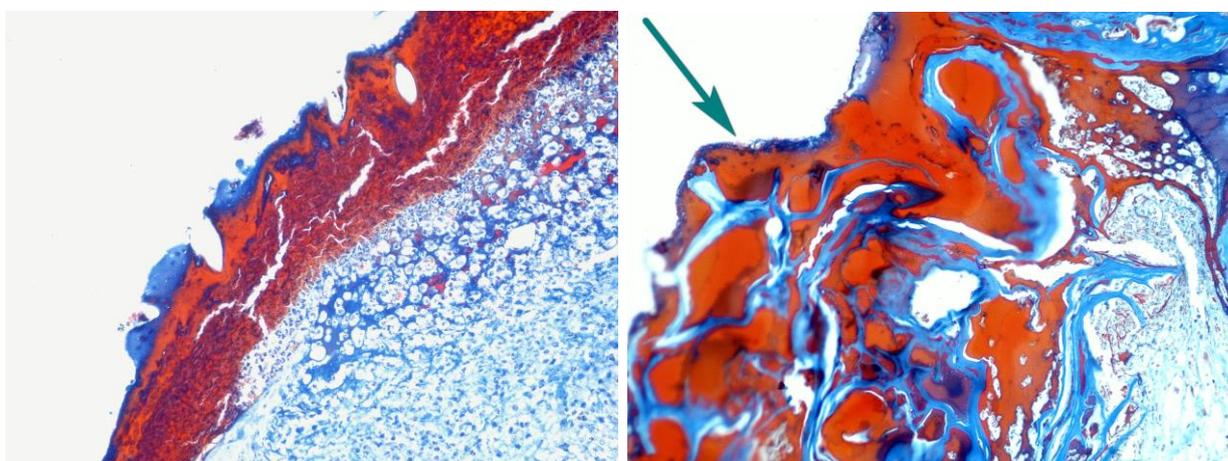


А

Б

**Рисунок 46 – Области полнослойных раневых дефектов через 3 суток в контроле (А) и в присутствии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.×100**

Матрикс был вмонтирован в состав струпа, закрывающего рану (Рисунок 47Б). В тканях, окружающих дефект, наблюдали явления венозного застоя и периваскулярного отека. На этом сроке исследования наблюдали умеренную инфильтрацию мононуклеарных фагоцитов в тканях всех групп (рисунок 47А и Б) [135].

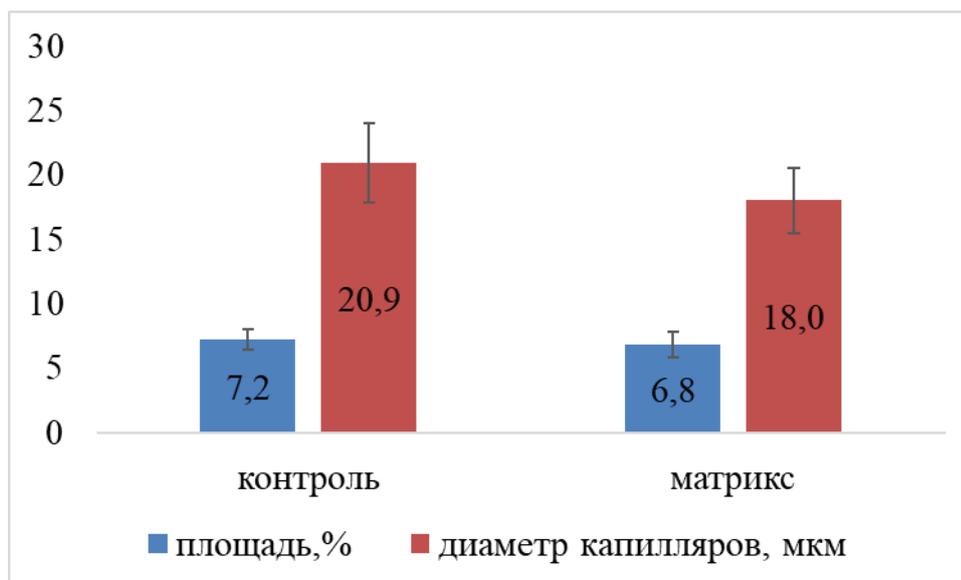


А

Б

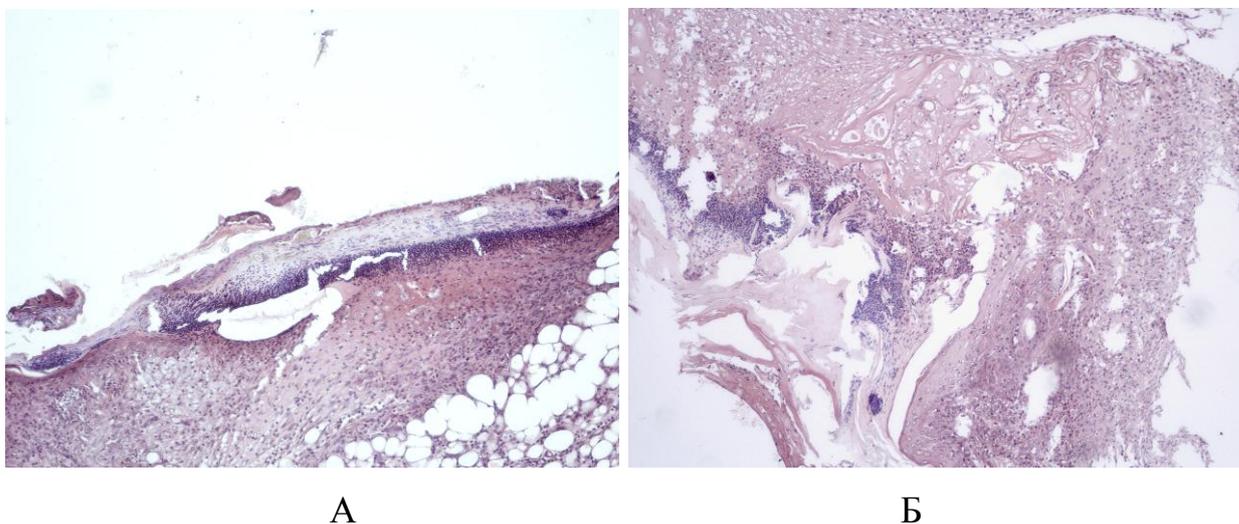
**Рисунок 47 – Области полнослойных раневых дефектов через 3 суток в контроле (А) и в присутствии матрикса (зеленая стрелка) из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Окраска по Гейденгайну. Ув.×200**

Показатели, характеризующие сосудистые реакции в окружающих зону дефекта в тканях на третьи сутки, также не имели различий в опыте и контроле (рисунок 48) [135].



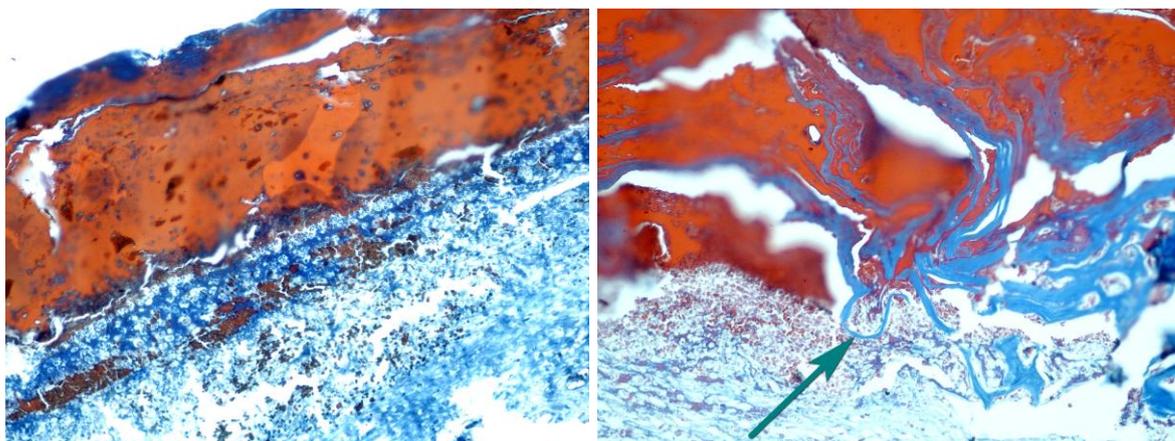
**Рисунок 48 – Показатели характеризующие выраженность сосудистых реакций в тканях, окружающих дефект через 3 суток от операции**

К седьмым суткам после имплантации матрикса у животных опытных групп (рисунок 49Б) отмечали более интенсивное заполнение пространства раневого дефекта грануляционной тканью по сравнению с контролем, у мышей с антиконтракционным кольцом, но без матрикса в ране (рисунок 49А) [135].



**Рисунок 49 – Области полнослойных раневых дефектов через 7 суток в контроле (А) и в присутствии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.×100**

Фрагменты матрикса визуализируются в толще грануляционной ткани и не окружены при этом клетками-фагоцитами (рисунок 50Б). В составе грануляционной ткани наблюдали созревающие сосуды и активную пролиферацию фибробластов в препаратах всех групп (рисунок 50) [135].

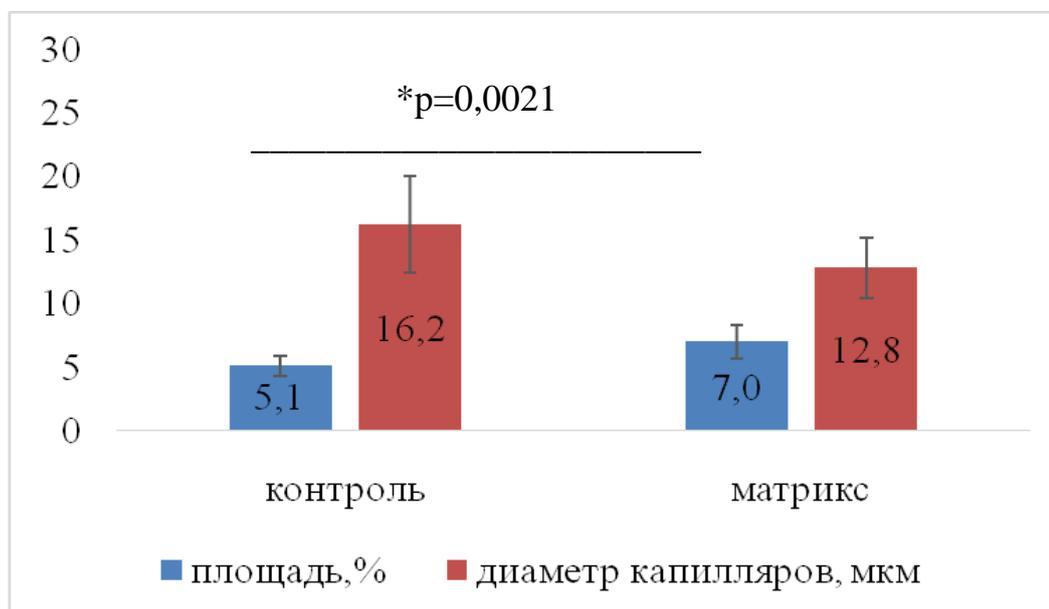


А

Б

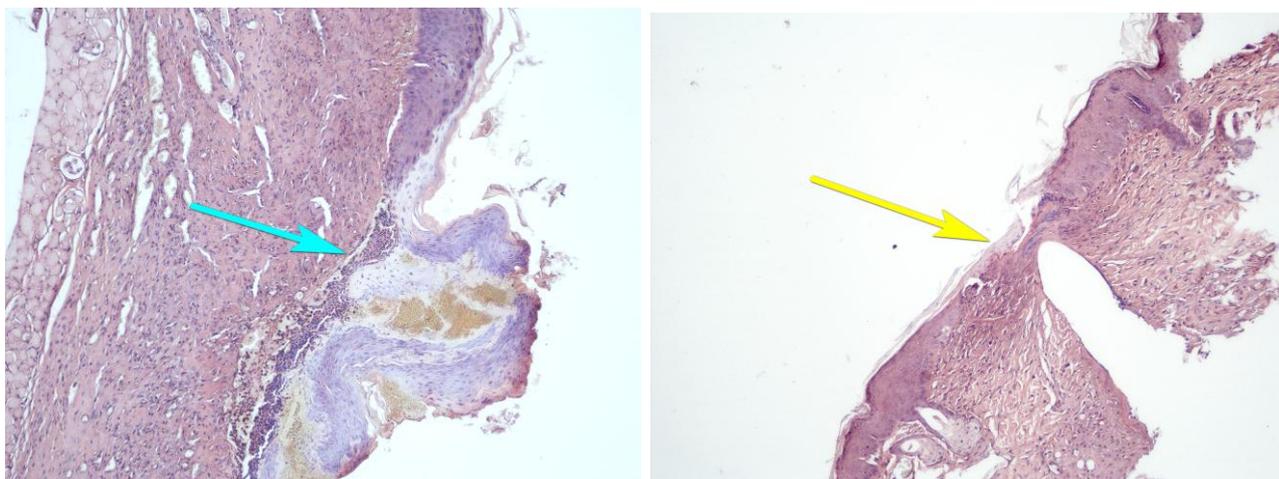
**Рисунок 50** – Области полнослойных раневых дефектов через 7 суток в контроле (А) и в присутствии матрикса (зеленая стрелка) из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Окраска по Гейденгайну. Ув.×200

Плотность капиллярного русла в тканях, окружающих рану, у мышей опытной группы через 7 суток была большей по сравнению с контролем, что в фазу угасания сосудистых реакций может свидетельствовать об образовании новых капилляров (рисунок 51) [135].



**Рисунок 51** – Показатели характеризующие выраженность сосудистых реакций в тканях, окружающих дефект через 7 суток от операции

Спустя две недели над раневыми дефектами, содержащими матрикс, сформирован слой эпителия (рисунок 52Б, желтая стрелка), в отличие от ран в контроле (рисунок 52А, голубая стрелка). Интенсивных воспалительных реакций в областях ран, а также клеточных реакций на присутствие «инородного тела» у животных опытной группы не было обнаружено [135].

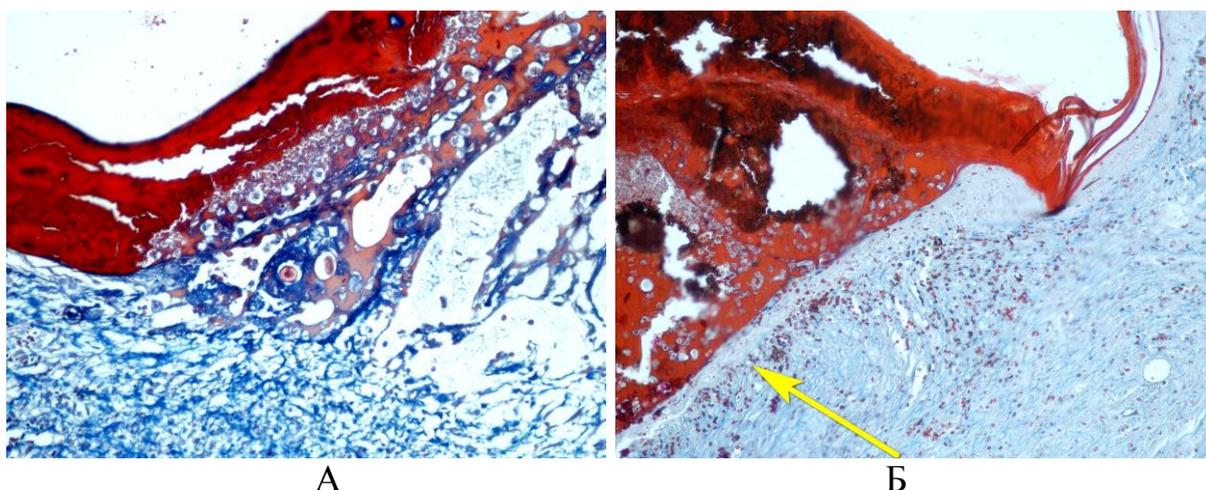


А

Б

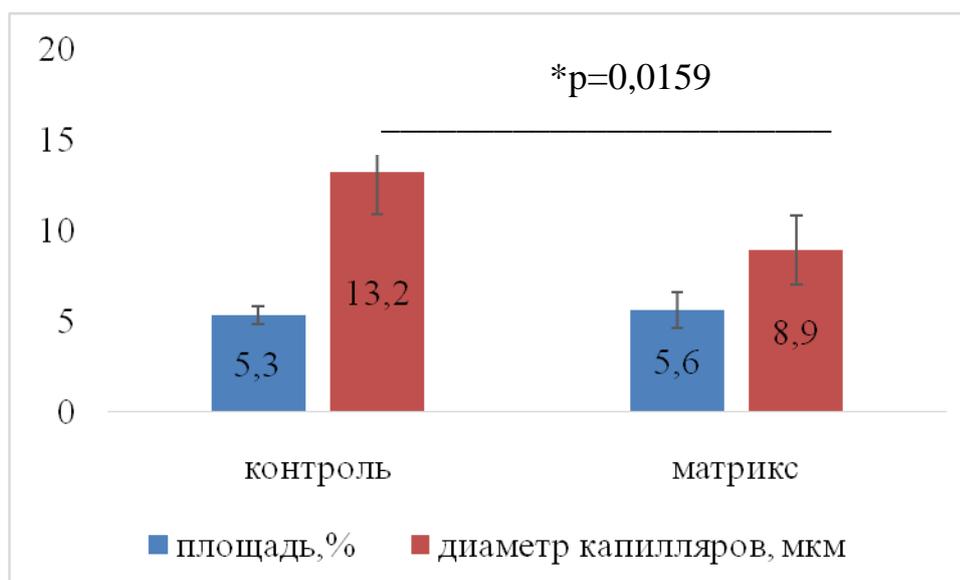
**Рисунок 52 – Области полнослойных раневых дефектов через 14 суток в контроле (А) и в присутствии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Полноценный слой эпителия (желтая стрелка) и неполная эпителизация (голубая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.×100**

Постепенная деградация помещенного в раны матрикса сопровождалась активным заполнением ложа раневого дефекта грануляционной тканью и ее созреванием (рисунок 53Б). На 14-е сутки от операции области тканевых дефектов, в которые помещали матрикс, полностью заполнены грануляционной тканью, содержащей в поле зрения большое количество зрелых сосудов. В контрольной группе область раны также выполнена грануляционной тканью, но ее высота неоднородна, а плотность сосудов меньшая (рисунок 53А) [135].



**Рисунок 53** – Области полнослойных раневых дефектов через 14 суток в контроле (А) и в присутствии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Полноценный слой эпителия (желтая стрелка). Окраска по Гейденгайну. Ув.×200

Показатели, характеризующие плотность сосудистого русла вокруг раны также показали отсутствие отека и рост новых капилляров (рисунок 54) [135].



**Рисунок 54** – Показатели характеризующие выраженность сосудистых реакций в тканях, окружающих дефект через 14 суток от операции

Являясь типовым патологическим процессом, воспалительная реакция развивается в тканях, имеющих развитую сосудистую сеть, в ответ на действие флогогенного агента и проявляется последовательными явлениями, направленными на устранение этиологического фактора и восстановление поврежденной ткани. В соответствии с принципом аутохтонности, раз начавшись,

воспаление протекает через все стадии независимо от действия повреждающего агента [135, 159].

Кратковременный спазм сосудов, окружающих рану, в момент повреждения сменяется явлениями артериальной, а затем и венозной гиперемии. Дезорганизация основного вещества соединительной ткани лизосомальными ферментами поврежденных клеток и ММР повышает проницаемость сосудов. Артериальная гиперемия и активация метаболизма в области раны приводит к созданию условий для эмиграции полиморфноядерных лейкоцитов. Высвобождение медиаторов воспаления и экспрессия молекул адгезии вызывает «краевое стояние» нейтрофильных лейкоцитов, а накопление хемоаттрактантов – их эмиграцию за пределы сосуда. В течение первых суток процессы замедления кровотока обеспечивают автономию в области повреждения и самоочищение раны путем фагоцитоза. Бактерицидное действие фагоцитов в ране осуществляется, в основном, посредством активных форм кислорода. Но чрезмерная их активность может оказывать негативное воздействие на процесс заживления [32, 135, 159].

Помещенный в рану матрикс из ДВС впитывал выделяющийся экссудат и частично заполнял дефект тканей, постепенно интегрируясь и замещая отсутствующий в ране ВКМ. При этом матрикс не влиял существенно на течение естественных процессов экссудации и фагоцитоза, что выразилось в отсутствии избыточного (относительно контроля) скопления нейтрофилов вблизи матрикса [135].

Капиллярогенез по периферии раневого дефекта, активное образование грануляционной ткани, рост и созревание ее сосудов в присутствии матрикса из ДВС в нашем эксперименте происходили активнее. Обнаруженное в экспериментах *in vitro* положительное влияние продукта на пролиферацию и жизнеспособность клеток животных и выявленная активная адгезия фибробластоподобных клеток к матриксу *in vitro* и *in vivo* могут быть следствием высвобождения биологически активных молекул в процессе биodeградации продукта, описанные в научных источниках [8, 109, 122, 135, 144].

Таким образом, в эксперименте *in vivo* показано, что заживление полнослойных кожных ран у мышей в присутствии матрикса из ДВС пуповины человека отличалось умеренно выраженными процессами альтерации, сосудистых реакций и селективной фокусировки лейкоцитов, близких к контролю. Это может свидетельствовать как об отсутствии иммунного ответа на матрикс *in situ*, так и об иммуномодулирующих его свойствах. Присутствие матрикса в ране сопровождалось увеличением числа капилляров в тканях, окружающих рану. Пролиферативная фаза заживления в присутствии матрикса протекала интенсивнее, чем в контроле. Уже на 7-е сутки отмечали активное созревание стенок сосудов грануляционной ткани. На 14-е сутки выявлено заполнение раны, содержащей матрикс, грануляционной тканью и эпителизация, в отличие от контроля [135].

### **3.5 Влияние матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины на заживление полнослойных кожных ран у свиньи**

Оптимальной моделью для изучения процессов заживления кожных ран является свинья [140]. Анатомическое строение кожи свиньи позволяет оценить заживление раны и образование слоя эпителия [160, 161, 162].

Имплантация матрикса из ДВС пуповины человека в область полнослойных дефектов кожи свиньи сопровождалась активным его пропитыванием жидкой частью крови и набуханием. Показанные пористость и присутствие в матриксе ГАГ способствуют увеличению его массы при контакте с кровью [122] (рисунок 55).



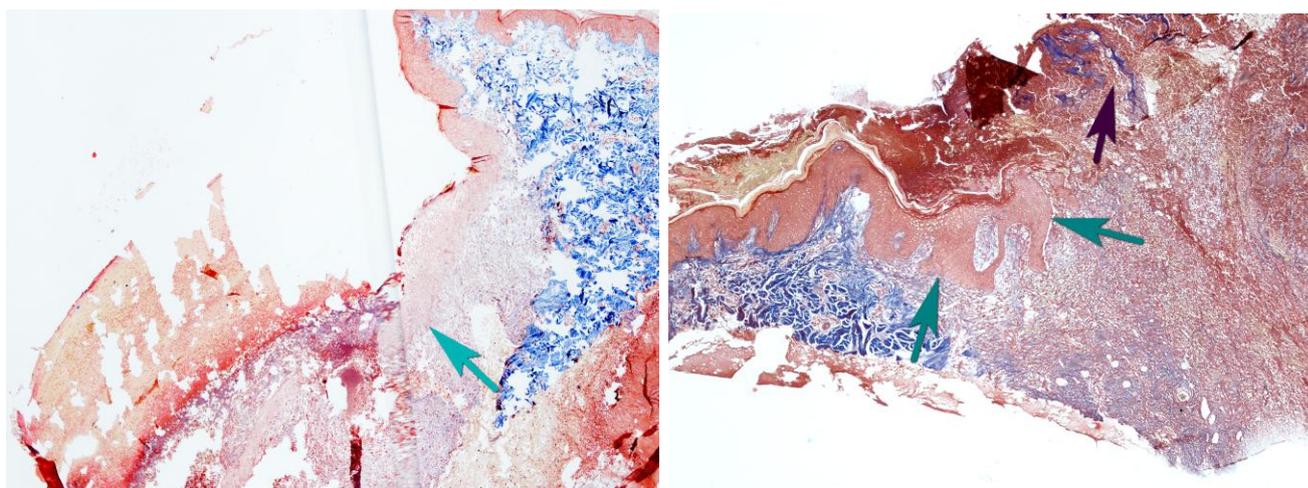
А

Б

**Рисунок 55 – Внешний вид полнослойных ран кон кожи свиньи в контроле (А) и при помещении в нее матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Диаметр ран 8 мм**

Бесклеточный матрикс из пуповины человека не вызвал чрезмерной воспалительной реакции. По данным опубликованных исследований, противовоспалительные свойства ткани пуповины могут быть следствием наличия в ней МСК, факторов роста и гиалуроновой кислоты высокого молекулярного веса [15, 151, 163].

Интенсивное заполнение пространства дефектов кожи грануляционной тканью наблюдали в опытных и контрольных ранах спустя неделю (рисунок 56). В ране, содержащей бесклеточный матрикс из пуповины человека под струпом наблюдали формирующийся слой эпителия (рисунок 56Б) [151].

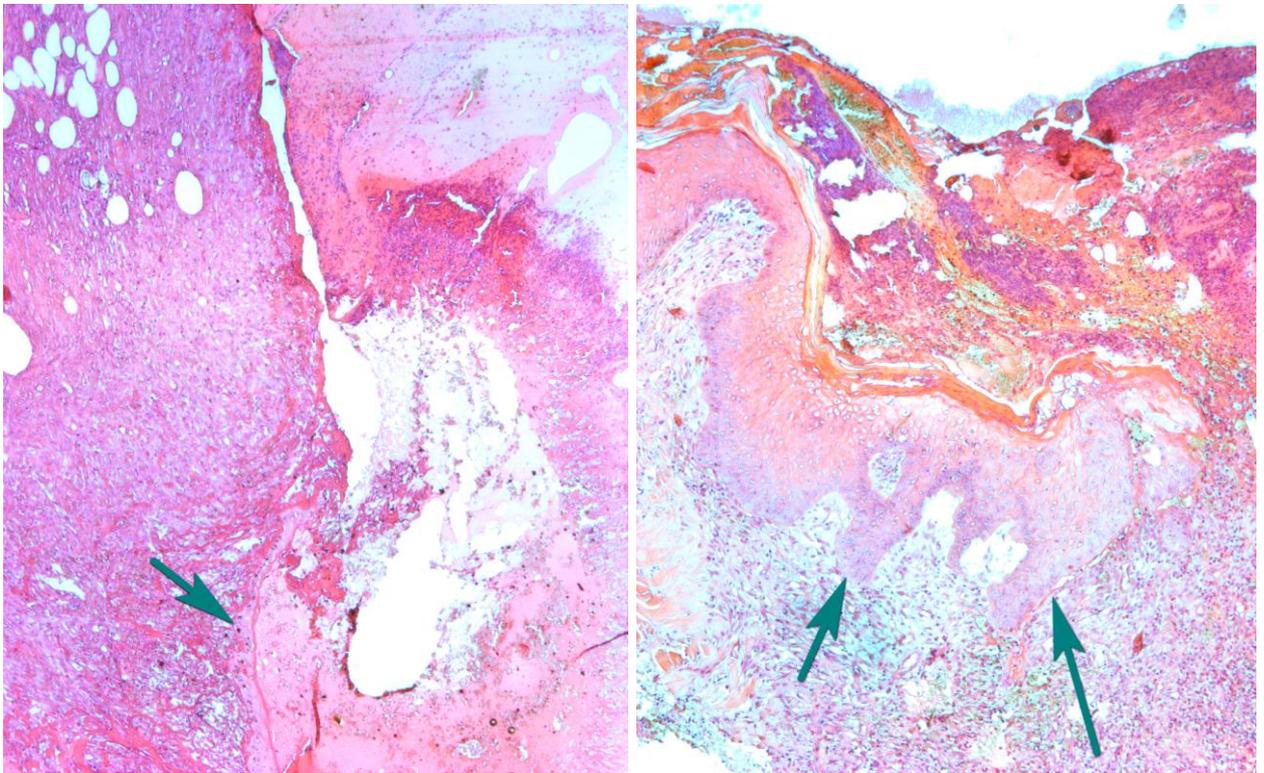


А

Б

**Рисунок 56 – Области полнослойных дефектов кожи свиньи через 1 неделю в контроле (А) и в присутствии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Зелеными стрелками указан слой эпителия, черной – матрикс. Окраска по Массону. Ув.×40**

В ранах, содержащих матрикс из ДВС пуповины человека, формирование эпителия представлялось более активным. Кератиноциты шиповатого слоя в ранах, содержащих бесклеточный матрикс, имели крупные округлые ядра (рисунок 57) [151].

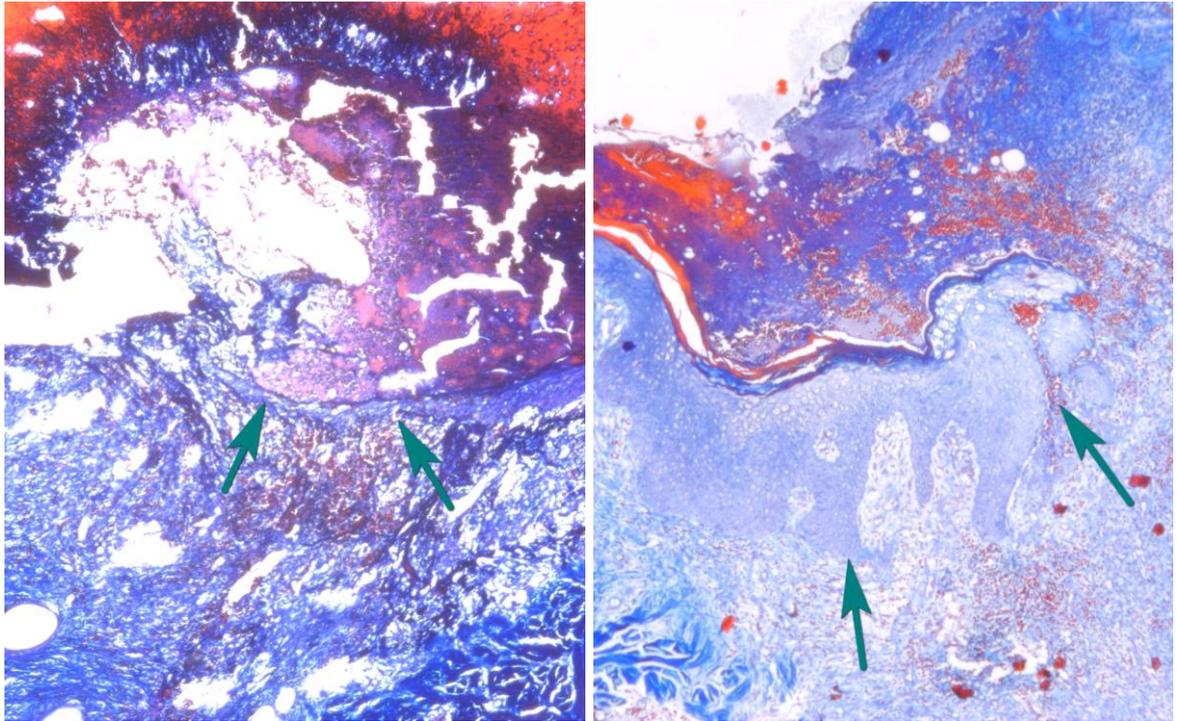


А

Б

**Рисунок 57 – Эпителий ран (зеленые стрелки) через неделю в контроле (А) и в присутствии матрикса из децелюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.×50**

В то время как эпителизация раны в контроле проходила медленно, слой клеток уплощенной формы формировался под струпом медленно (рисунок 58).



А

Б

**Рисунок 58 – Эпителий ран (зеленые стрелки) через неделю в контроле (А) и в присутствии матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека (Б). Окраска по Гейденгейну. Ув.×50**

Эпителизация является гарантом восстановления функций поврежденной кожи. В основе этих процессов лежат многочисленные биохимические механизмы и сигнальные пути, в которых ВКМ выполняет основную функцию. Лиофилизированный матрикс из ДВС пуповины человека, помещенный в раны, частично восполнял утраченный объем и служил субстратом для прикрепления клеток, выполняя механическую функцию [160]. Заполнение раневого пространства биоматериалом, способствующим ускорению миграции и адгезии клеток, а также обладающего иммуномодулирующими свойствами, способствует оптимальному заживлению и скорейшему восстановлению поврежденных тканей [164]. Фибронектин, присутствие которого в матриксе из ДВС в нашем исследовании было показано иммуногистохимически, играет неотъемлемую роль в заживлении, активируя миграцию и адгезию клеток [151].

При благоприятных условиях эпителизация раны начинается уже в течение нескольких часов после повреждения. Описано, что кератиноциты способны мигрировать, взаимодействуя с белками ВКМ грануляционной ткани.

Реэпителизация полнослойных кожных ран происходит исключительно из краев раны. Супрабазальный кератиноцит края поврежденного эпидермиса удлиняясь натягивается на расположенную под ним клетку базального слоя и достигая области раневого ложа приобретает способность к делению. Закрытие раневой поверхности происходит по мере того как следующий кератиноцит супрабазального слоя края раны подвергнется аналогичному процессу. Базальные кератиноциты продвигающегося слоя эпидермиса обладают повышенной митотической активностью, имеют меньшее количество десмосом и большее количество щелевых контактов. При разрушении базальной мембраны человеческие кератиноциты мигрируют по временной матрице, при этом было показано, что их формирующиеся цитоплазматические отростки окружены ламинином [151, 165].

Согласно общепринятому представлению, фибробласты и эндотелиоциты дермы врастают в первичный сгусток, заполняющий раневое пространство, а эпидермис нарастает сверху, покрывая грануляционную ткань [113]. Существует предположение, что фибробласты и перициты способны мигрировать из подкожных слоев, волосяных фолликулов и потовых желез, а не из относительно бессосудистой и мало заселенной клетками сетчатой дермы [160]. В нашем исследовании механическое заполнение области дефекта и постепенная интеграция и реваскуляризация матрикса из ДВС пуповины человека, с образованием собственного ВКМ способствовало уменьшению сроков образования зрелого эпидермиса [151].

Качественный состав временной матрицы и ее последовательные изменения также влияют на скорость эпителизации раны. Матрикс из пуповины человека, имплантированный в раневое ложе, визуализировался в толще грануляционной ткани на начальных сроках исследования. При этом важно, что вокруг подвергающихся ремоделированию матрикса не формировалась плотная соединительнотканная капсула и не была обнаружена массивная инфильтрация лейкоцитарными клетками [151].

По данным литературы известно, что в децеллюляризованном и лиофилизованном матриксе из пуповины содержится большее количество факторов роста по сравнению с исходным биоматериалом пуповины. А их высвобождение при биодеградации продукта, способствует миграции эндотелиоцитов и капиллярогенезу [7, 8, 9]. Постепенное ремоделирование матрикса позволяет фиксированным к каркасным белкам факторам роста поддерживать в зоне имплантации большие их концентрации [151]. Показанное в нашем исследовании присутствие в матриксе из ДВС пуповины человека TGF- $\beta$ 3 является еще одним фактором способствующим эпителизации. В опубликованных результатах экспериментов на мышах было продемонстрировано, что местное применение антител, нейтрализующих TGF- $\beta$ 3, приводило к задержке миграции кератиноцитов [166].

Таким образом, в эксперименте *in vivo* на модели животного, обладающего кожей максимально схожей с кожей человека, показано, что имплантация матрикса из ДВС пуповины человека в полнослойные кожные раны не сопровождалась нежелательными реакциями отторжения. Присутствие матрикса в ранах на ранних этапах заживления способствовало остановке кровотечения и механическому заполнению дефекта. Структура и компонентный состав обеспечивали биоинтеграцию матрикса в окружающие ткани и способствовали эффективному заживлению. Являясь каркасом для формирования грануляционной ткани, матрикс из ДВС пуповины человека подвергался постепенному ремоделированию без проявления признаков усиленного воспаления. Эпителий в ранах, содержащих матрикс из ДВС пуповины человека, формировался активнее, чем в контроле [151].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований показана возможность изготовления медицинского изделия из пуповины человека, способствующего заживлению глубоких повреждений кожи. Учитывая необходимость стерилизации, хранения, а также условий применения, целесообразно использование лиофилизованной формы матрикса из ДВС пуповины человека. Технология изготовления без применения этапа ферментативного гидролиза солянокислым пепсином относительно проста и позволяет создать гомологичный продукт. Выбранный нами режим децеллюляризации ВС пуповины позволил, при удалении 96% ДНК, сохранить в достаточных количествах ГАГ (в том числе сульфатированные) и компоненты базальных мембран (коллаген IV типа и ламинин), фибронектин и TGF- $\beta$ 3. Пористость и особенности ультраструктуры матрикса из ДВС обеспечили адсорбцию экссудата, адгезивные свойства для клеток реципиентов (мышь и свинья). Исследования биосовместимости матрикса из ДВС пуповины человека на клетках, выделенных из печени, селезенки, головного мозга, кожи и сердца свиньи, морских свинок, крыс и мышей, а также на клетках человека показали отсутствие его цитотоксических свойств.

Матрикс из ДВС пуповины человека способен полностью деградировать, что было показано в экспериментах *in vitro*, так как его основную массу составляют коллагены и ГАГ ВС. Сохранность нативной структуры волокон ВС пуповины человека после децеллюляризации позволила создать максимально биосовместимый продукт. Присутствие ГАГ, в особенности сульфатированных, в составе матрикса благоприятно для длительного локального высвобождения фиксированных в продукте факторов роста.

В исследовании функциональной активности в отношении заживления полнослойных ран кожи, проведенном на двух видах животных, были показаны биосовместимость, биоинтеграция и регенеративный потенциал матрикса из ДВС пуповины человека.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан и экспериментально обоснован лабораторный регламент децеллюляризации пуповины человека, позволяющий получать лиофилизованную пористую форму матрикса с отсутствием клеток и клеточного детрита, содержащий ДНК менее 50 нг/ мг ткани и обеспечивающий сохранение структурных компонентов пуповины человека.
2. Включение стадии ферментативного гидролиза в протокол получения матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека обуславливает снижение метаболической активности фибробластов дермы человека (на 16,5%) и приводит к потере гликозаминогликанов (на 33,1%).
3. Разработанный матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека характеризуется пористой структурой и присутствием в составе компонентов внеклеточного матрикса, таких, как гликозаминогликаны, коллаген IV типа, ламинин, фибронектин и TGF- $\beta$ 3.
4. Продемонстрирована биodeградация бесклеточного матрикса из пуповины человека в присутствии коллагеназы (потеря более 90% массы в течение 3 суток) и стабильность при инкубации в растворе гиалуронидазы и в нейтральной среде, а также способность к набуханию в  $16,1 \pm 2,0$  раза при контакте с физиологическим раствором при 37°C.
5. Матрикс из децеллюляризованной пуповины человека не обладает цитотоксичностью *in vitro*. Продемонстрировано стимулирующее действие матрикса из децеллюляризованной пуповины человека на пролиферацию клеток, выделенных из кожи мышей и коры головного мозга свиньи.
6. На экспериментальной модели полнослойных ран кожи (мышь, свинья) выявлена способность матрикса из децеллюляризованной пуповины человека стимулировать заживление.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При выборе технологии изготовления медицинского изделия из Вартонова студня применение децеллюляризации раствором додецилсульфата натрия в концентрации 0,05% позволяет при эффективном удалении клеток сохранить основной состав пуповины человека.
2. Исключение стадии ферментативного гидролиза солянокислым пепсином позволяет создать гомологичный, нецитотоксичный матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека. Добавление стадии ферментативного гидролиза солянокислым пепсином в технологию изготовления биodeградируемого матрикса приводит к значительной потере гликозаминогликанов. Вытяжка из матрикса на основе децеллюляризованной пуповины человека, полученного с использованием ферментативного гидролиза солянокислым пепсином, снижает метаболическую активность фибробластов человека *in vitro*.
3. Лиофилизированный матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека может быть использован в качестве временно функционирующего биodeградируемого гигроскопичного медицинского изделия, способствующего образованию грануляционной ткани и восстановлению эпителия поврежденной кожи.

**СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВС – Вартонов студень

ГАГ – гликозаминогликаны

ДВС – децеллюляризованный Вартонов студень

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКСПФ – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

ИПК – инсулин продуцирующие клетки

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

ПАВ – поверхностно активные вещества

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ДАВ – диаминобензидин

DAMP – молекулы молекулярного паттерна, связанные с повреждением

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол

EGF – фактор роста эпителиоцитов

FGF – фактор роста фибробластов

HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены

IGF – инсулиноподобный фактор роста

IL – интерлейкин

MMP – металломатриксная протеиназа

PBS – фосфатно-солевой буфер

PDGF – фактор роста тромбоцитов

RGD – аргинил-глицил-аспарагиновая кислота

SDS – додецил сульфат натрия

TGF – трансформирующий фактор роста

TIMP – ингибитор металломатриксной протеиназы

TNF – фактор роста опухоли

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

$\alpha$ -SMA – гладкомышечный актин  $\alpha$

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Трансплантация тканевых эквивалентов в лечении некоторых повреждений кожи / Е.М. Фоминых, В.Н. Митрофанов, О.П. Живцов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т.22. – №1. – С.165-173..
2. Готье, С.В. Правовые и организационные основы донорства и трансплантации органов в российской федерации / С.В. Готье, С.М. Хомяков // Госпитальная медицина: наука и практика. – 2018. – Т.1. – №5. – С. 61-74.
3. Биосовместимые и матриксные свойства полилактидных губок / В.И. Севастьянов, А.М. Григорьев, Ю.Б. Басок и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т.20. – №2. – С. 82-90.
4. Badylak, S.F. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host respons / S.F. Badylak // Annals of Biomedical Engineering. – 2014. – Vol.42. – №7. – P. 1517-1527.
5. Acellular gelatinous material of human umbilical cord enhances wound healing: a candidate remedy for deficient wound healing./ N. Bakhtyar, M. G. Jeschke, L. Mainville [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2017. – Vol.8. – №200.
6. Exosomes from acellular Wharton's jelly of the human umbilical cord promotes skin wound healing / N. Bakhtyar, M.G. Jeschke, E. Herer [et al.] // Stem Cell Research and Therapy. – 2018. – Vol.9. – №1. – №193.
7. Functionalized silk vascular grafts with decellularized human Wharton's jelly improves remodeling via immunomodulation in rabbit jugular vein / P. Gupta, G.R. Chaudhuri, G. Janani [et al.] // Advanced Healthcare Materials. – 2021. Vol.10. – №19. – №2100750.
8. Antibacterial and immunomodulatory properties of acellular Wharton's jelly matrix. / M. Dubus, L. Scomazzon, J. Chevrier [et al.] // Biomedicines. – 2022. – Vol.10. – №2. – №227.
9. Decellularization of Wharton's jelly increases its bioactivity and antibacterial properties. / M. Dubus, L. Scomazzon, J. Chevrier [et al.] // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol.10. – №828424.

10. Fayon, A. Characterization of an innovative biomaterial derived from human Wharton's jelly as a new promising coating for tissue engineering applications. / A. Fayon, D. Helle, G. Francius // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol.10. – №884069.
11. Плешков, А.С. К вопросу об истории применения донорской кожи для лечения ран / А.С. Плешков // *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*. – 2016. – №2. – С.34–46.
12. Плешков, А.С. Применение донорской кожи для лечения ожогов / А.С. Плешков // *Трансплантология*. – 2016. – №1. – С.36-46.
13. Морфофункциональная характеристика дермы кожи и ее изменения при старении (обзор литературы) / С.С. Целуйко, Е.А. Малюк, Л.С. Корнеева и др. // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. – 2016. – №60. – С.111-116.
14. Sykes, M. Developing pig-to-human organ transplants / M. Sykes // *Science*. – 2022. – Vol.378. – P.135-136.
15. Placental tissues as biomaterials in regenerative medicine. / A. Roy, M. Mantay, C. Brannan [et al.] // *Biomed Research International*. – 2022. – Vol. 21. – №6751456.
16. Sabol, T.J. Standardized reporting of amnion and amnion/chorion allograft data for wound care / T.J. Sabol, G.S. Tran, J. Matuszewski [et al.] // *Health Science Reports*. – 2022. – Vol.5. – №5. – №794.
17. Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications. / A. Gupta, S.F. El-Amin, H.J. Levy [et al.] // *Journal of Orthopaedic Surgery*. – 2020. – Vol.15. – №49.
18. Deus, I.A. Perinatal tissues and cells in tissue engineering and regenerative medicine / I.A. Deus, J.F. Mano, C.A. Custódio // *Acta Biomaterialia*. – 2020. – Vol.110. – P.1-14.
19. Design and biofabrication of dermal regeneration scaffolds: role of oligomeric collagen fibril density and architecture / D.O. Sohutskey, K.P. Buno, S.S. Tholpady [et al.] // *Regenerative Medicine*. – 2020. – Vol.15. – №2. – P.1295-1312.
20. Effective decellularisation of human saphenous veins for biocompatible arterial tissue engineering applications: Bench optimisation and feasibility in vivo testing / N.S.

- Sulaiman, A.R. Bond, V.D. Bruno [et al.] // Journal of tissue engineering. – 2021. – Vol.12. – №2041731420987529.
21. Collagen/glycosaminoglycan-based matrices for controlling skin cell responses / U. Anderegg, N. Halfter, M. Schnabelrauch [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2021. – Vol.402. – №11. P.1325-1335.
22. Механизмы ранозаживляющего действия нативного коллагена I типа в модели ишемизированных полнослойных ран кожи на примере медицинского изделия «Коллост» (Часть I) / А.А. Андреев-Андриевский, А.А. Болгарина, В.Н. Манских и др. // Хирургия. Журнал имени Н.И. Пирогова. – 2020. – №10. – С.79-87.
23. Bioactive materials promote wound healing through modulation of cell behaviors. / R. Li, K. Liu, X. Huang [et al.] // Advanced Science (Weinheim). – 2022. – Vol.9. - №10. – e2105152.
24. Tracy, L.E. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. / L.E. Tracy, R.A. Minasian, E.J. Caterson // Advances in Wound Care (New Rochelle). – 2016. – Vol.5. – №3. – P.119-136.
25. Лечение обширного дефекта передней брюшной стенки при минно-взрывном ранении с применением метода дозированного тканевого растяжения / С.Н. Пятаков, А.А. Завражнов, С.Н. Пятакова и др. // Политравма. – 2017. – №4. – С.31-37.
26. Возможности применения биоинженерных заменителей кожи в комбустиологии (обзор литературы) / С.Г. Шаповалов, А.В. Кчеусо, Т.Е. Кошелев и др. // Медико-биологические и социальнопсихологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. – 2022. – №2. – С.82–92.
27. Рубцы кожи: современные представления об этиопатогенезе, клинике и диагностике / Д.В. Прохоров, А.А. Щербенёва, М.В. Нгема и др. // Крымский терапевтический журнал. – 2021. – №2. – С.18-24.
28. Scarring occurs at a critical depth of skin injury: precise measurement in a graduated dermal scratch in human volunteers. / C.S.J. Dunkin, J.M. Pleat, P.H. Gillespie [et al.] // Plastic and Reconstructive Surgery. – 2007. – Vol.119. – №6. – P.1722-1732.

29. Cañedo-Dorantes, L. Skin acute wound healing: a comprehensive review / L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala // *International Journal of Inflammation*. –2019. – №3706315.
30. Extracellular matrix bioscaffolds as immunomodulatory biomaterials. / J.L. Dziki, L. Huleihel, M.E. Scarritt [et al] // *Tissue Engineering Part A*. – 2017. – Vol.23. – P.1152-1159.
31. Solubilized extracellular matrix bioscaffolds derived from diverse source tissues differentially influence macrophage phenotype. / J.L. Dziki, D.S. Wang, C. Pineda [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2017. – Vol.105A. – P.138–147.
32. Влияние пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на заживление полнослойной кожной раны / А.В. Кочкина, К.А. Рогов, М.Г. Шарапов и др. // *Клиническая и экспериментальная морфология* – 2017. – Т.22. – №2. – С.52-58.
33. Hyaluronic acid-based wound dressings: a review. / M.F.P. Graça, S.P. Miguel, C.S.D. Cabral [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – Vol.241. №116364.
34. Милешина, С.Е. Влияние коллагеновых матрикинов на функциональное состояние лейкоцитов человека / С.Е. Милешина, А.А. Николин, И.Г. Козлов // *Иммунология*. – 2020. – Т.41. – №4. – С.295–303.
35. Kharaziha, M. Rational design of immunomodulatory hydrogels for chronic wound healing. / M. Kharaziha, A. Baidya, N. Annabi // *Advanced Materials*. – 2021. – Vol.33. – №39. – e2100176.
36. Ткачук, В.А. Регенерация тканей и онкогенез – сходство и различия / В.А. Ткачук // *Сибирский онкологический журнал*. – 2021. – Т.20. – №2. – С.5-12.
37. Hyaluronan/Collagen hydrogels with sulfated glycosaminoglycans maintain vegf165 activity and fine-tune endothelial cell response / S. Rother, G. Ruiz-Gómez, K. Balamurugan [et al.] // *ACS Applied Bio Materials*. – 2021. – Vol.4. – №1. – P.494-506.
38. Нейтрализация ангиопоэтина-2 и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) с терапевтической целью / Е.Н. Шамитова, К.Г. Матьков, Д.Д. Шихранова и др. // *Acta medica Eurasica*. – 2021. – №2. – С.64–79.

39. Snyder, D.L. Technology as sessment program prepared for: agency for healthcare research and quality. skin substitutes for treating chronic wounds. Technology Assessment Report: 540 Gaither Road Rockville, Maryland 20850 (FDA) / D.L. Snyder, N. Sullivan, K.M. Schoelles // (December 18, 2012).
40. Федоров, Д.Н. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика репаративных процессов в длительно не заживающих ранах / Д.В. Федоров, А.В. Васильев, А.А. Иванов // Архив патологии. – 2002. - №1. – С.8–11.
41. Метод анализа белков внеклеточного матрикса, синтезируемого клетками в культуре. / Л.В. Туроверова, М.Г. Хотин, Н.М. Юдинцева и др. // Цитология. – 2009. – Т.51. - №8. – С.691-696.
42. Биосовместимые и функциональные свойства тканеспецифической мелкодисперсной 3D-матрицы из децеллюляризованного хряща свиньи / Е.А. Немец, А.Э. Лажко, А.М. Григорьев и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т.24. - №4. С.73-84.
43. Aging and wound healing of the skin: a review of clinical and pathophysiological hallmarks / K.A. Khalid, A.F.M. Nawi, N. Zulkifli [et al.] // Life (Basel). – 2022. – Vol.12. – №12. – P.2142.
44. The role of extracellular matrix in skin wound healing. / N.N. Potekaev, O.B. Borzykh, G.V. Medvedev [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2021. – Vol.10. – №24. – P.5947.
45. Потехина, Ю.П. Структура и функции коллагена / Ю.П. Потехина // Российский остеопатический журнал. – 2016. – Т.1. – №32. – С.87–99.
46. Solarte David, V.A. Decellularized tissues for wound healing: towards closing the gap between scaffold design and effective extracellular matrix remodeling. / V.A. Solarte David, V.R. Güiza-Argüello, M.L. Arango-Rodríguez // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol.10. – P.821852.
47. Gould, L.J. Topical collagen-based biomaterials for chronic wounds: rationale and clinical application / L.J. Gould // Advances in wound care (New Rochelle). – 2016. – Vol.5. – №1. – P.19-31.

48. Островский, Н.В. Из истории создания научных основ планирования хирургических разрезов кожи / Н.В. Островский, Н.Г. Мальцева // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2018. – Т.65. – №2. – С.82-94.
49. Штыркова, Е.В. Фибробласты дермы. Источники дифференцировки, пролиферативная активность и методы ее стимуляции / Е.В. Штыркова // Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». – 2017. – №6. – С.43-50.
50. Jones, C. Fibroblast expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha_2\beta_1$  integrin and  $\alpha_v\beta_3$  integrin: influence of surface rigidity / C. Jones, H.P. Ehrlich // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2011. – Vol.91. – №1. – P.394-399.
51. Structural mechanism of laminin recognition by integrin / T. Arimori, N. Miyazaki, E. Mihara [et al.] // *Nature communications*. – 2021. – Vol.12. – P.4012.
52. Hyaluronic acid in the third millennium / A. Fallacara, E. Baldini, S. Manfredini [et al.] // *Polymers (Basel)*. – 2018. – Vol.10. – №7. – P.701.
53. Hyaluronan/collagen hydrogels containing sulfated hyaluronan improve wound healing by sustained release of heparin-binding EGF-like growth factor. / S. Thönes, S. Rother, T. Wippold [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2019. – Vol.86. – P.135-147.
54. Negut, I. Treatment strategies for infected wounds / I. Negut, V. Grumezescu, A. M. Grumezescu // *Molecules*. – 2018. – Vol.23. - №9. – P.2392.
55. Гипоксическое прекондиционирование донорской области кожного трансплантата: клинико-морфологическая оценка / Н.Ю. Орлинская, Д.В. Давыденко, М.В. Багрянцев и др. // *Современные технологии в медицине*. – 2018. – Т.10. – №3. – С.110-117.
56. Immunological challenges associated with artificial skin grafts: available solutions and stem cells in future design of synthetic skin. / S. Dixit, D.R. Baganizi, R. Sahu [et al.] // *Journal of Biological Engineering*. – 2017. – Vol.11. – №49.
57. Севастьянов, В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины. / Севастьянов В.И. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2014. – Т.16. – №3. – С.93-108.

58. Анализ мирового опыта использования биоматериалов пуповины в тканевой инженерии и 3D-биопечати / Л.И. Калюжная, Д.А. Земляной, Д.В. Товпеко и др. // Медицина и организация здравоохранения. – 2019. – Т.4. - №1. – С.40-55.
59. Epiflex(®) a new decellularised human skin tissue transplant: manufacture and properties / E. Rössner, M.D. Smith, B. Petschke [et al.] // Cell and Tissue Banking. – 2011. – Vol.12. – №3. – P.209-217.
60. Grafix diabetic foot ulcer study group. The efficacy and safety of Grafix(®) for the treatment of chronic diabetic foot ulcers: results of a multi-centre, controlled, randomised, blinded, clinical trial / L.A. Lavery, J. Fulmer, K.A. Shebetka [et al.] // International Wound Journal. – 2014. – Vol.11. – №5. – P.554-560.
61. Регенераторные свойства внеэмбриональных органов человека в тканевой инженерии / Л.И. Калюжная, О.Н. Харкевич, А.А. Шмидт и др. // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2018. – Т.64. – №4. – С.192-198.
62. Ксенотрансплантация: история, проблемы и перспективы развития / В.А. Гуляев, М.Ш. Хубутя, М.С. Новрузбеков и др. // Трансплантология. – 2019. – Т.11. – №1. – С.37–54.
63. Galili, U. Acceleration of wound healing by  $\alpha$ -gal nanoparticles interacting with the natural anti-Gal antibody / U. Galili // Journal of Immunology Research. – 2015. – № 589648. – P.13.
64. Gal- $\alpha$ -1,3-Gal epitope: role in cell biology and transplantation / K.Bohuslavskiy, G. Bozhok, E. Legach [et al.] // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2016.–Vol.26. – №1.–P.3–12.
65. Eweida, A.M. Naturally occurring extracellular matrix scaffolds for dermal regeneration: do they really need cells? / A.M. Eweida, M.K. Marei // Biomed Research International. – 2015. – № 839694.
66. Crapo, P.M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak // Biomaterials. – 2011. – Vol.32. – №12. – P.3233-3243.

67. Keane, T.J. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance / T.J. Keane, I.T. Swinehart, S.F. Badylak // *Methods*. – Vol.84. – P.25–34.
68. Cesur, N.P. Decellularization of tissues and organs / N.P. Cesur, V.Yalman, N. LaçınTürkoğlu // *Cumhuriyet Medical Journal*. – 2020. – Vol.42. – №2. – P.192–197.
69. Ghorbani, F. Detection of the residual concentration of sodium dodecyl sulfate in the decellularized whole rabbit kidney extracellular matrix / F. Ghorbani, M. Ekhtiari, B.M. Chaghervand // *Cell and Tissue Banking*. – 2022. – Vol.23. – №1. – P.119-128.
70. Zvarova, B. Residual detergent detection method for nondestructive cytocompatibility evaluation of decellularized whole lung scaffolds / B. Zvarova, F.E. Uhl, J.J. Uriarte // *Tissue Engineering Part C Methods*. – 2016. – Vol.22. – P.418–428.
71. Huang, Z. The challenge in using mesenchymal stromal cells for recellularization of decellularized cartilage / Z. Huang, O. Godkin, G. Schulze-Tanzil // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2016. – Vol.3. – P.50-67.
72. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response / A.J. Allman, T.B. McPherson, S.F. Badylak [et al.] // *Transplantation*. – 2001. – Vol.71. – P.1631.
73. Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds / J.E. Valentin, A.M. Stewart-Akers, T.W. Gilbert [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2009. – Vol.15. – P.1687.
74. Developing a pro-regenerative biomaterial scaffold microenvironment requires T helper 2 cells / K. Sadtler, K. Estrellas, B.W. Allen [et al.] // *Science*. – 2016. – Vol.352. – №6283. – P.366-370.
75. The effect of source animal age upon the in vivo remodeling characteristics of an extracellular matrix scaffold / B.M. Sicari, S.A. Johnson, B.F. Siu [et al.] // *Biomaterials*. – 2012. – Vol.33. – P.5524.
76. Matrixbound nanovesicles within ECM bioscaffolds / L. Huleihel, G.S. Hussey, J.D. Naranjo [et al.] // *Science Advances*. – 2016. – Vol.2. – e1600502.

77. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices / L.M. Delgado, Y. Bayon, A. Pandit [et al.] // *Tissue Engineering Part B Reviews*. – 2015. – Vol.21. – № 3. – P.298-313.
78. Utility of extracellular matrix powders in tissue engineering / L. Edgar, A. Altamimi, M. García Sánchez [et al.] // *Organogenesis*. – 2018. – Vol.14. – №4. – P.172-186.
79. Kočí, Z. Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues. / Z. Kočí, K. Výborný, J. Dubišová // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – 2017. – Vol.23. – № 6. – P.333-345.
80. Characterizing the macrophage response to immunomodulatory biomaterials through gene set analyses / S.E. Blatt, E.B. Lurier, G.E.Risser [et al.] // *Tissue Engineering Part C Methods*. – 2020. – Vol.26. – № 3. – P.156-169.
81. Федеральный закон "О биомедицинских клеточных продуктах" от 23.06.2016 N 180-ФЗ.
82. Kurtz, A. Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance / A. Kurtz, S.J. Oh // *Preventive Medicine*. – 2012. – Vol.54. – P.50
83. Optimized decellularization protocol including  $\alpha$ -Gal epitope reduction for fabrication of an acellular porcine annulus fibrosus scaffold / L.C. Wu, Y.J. Kuo, F.W. Sun [et al.] // *Cell Tissue Banking*. – 2017. – Vol.18. – №3. – P.383-396.
84. Lo, D.D. Scarless fetal skin wound healing update / D.D. Lo, A.S. Zimmermann, A. Nauta // *Birth Defects Research*. – 2012. – Vol.96. – P.237–47.
85. Yannas, I.V. Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early fetal regeneration. / I.V. Yannas // *Journal of the Royal Society Interface*. – 2005. – Vol.2. – P.403–417.
86. Leung, A. Fetal wound healing: implications for minimal scar formation / A. Leung, T.M. Crombleholme, S.G. Keswani // *Current Opinion in Pediatrics*. – 2015. – Vol.24. – №3. – P.371–378.
87. Пептидный экстракт плаценты и способ его изготовления: пат. 2355405 Рос. Федерация: МПК<sup>51</sup> А 61 К 35/50 / М.А. Шурдов, С.С. Богачев, В.А. Рогачев, О.В. Васькин, С.Н. Серегин; заявл. 27.11.2008; опубл. 20.05.2009

88. Модуляция репаративных процессов с помощью имплантации нанодисперсной плаценты: Монография / П.А. Перевозчиков, С.А. Борзенко, О.В. Карбань и др. – Ижевск: ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА, 2017. – 192 с.
89. Placental tissue grafts and improved methods of preparing and using the same. Patent No.: EP 2197270B8 / J. Russo. Date of Patent: Nov. 09, 2007
90. Laminated tissue grafts composed references cited of Wharton's jelly and methods of making and using the same. Patent No.: US 10350049B2 United States / B.S. Morse, S. Sith, R. Spencer [et al.]; MiMedx Group, Inc. Date of Patent: Jul.16, 2019
91. Placental tissue grafts produced by chemical dehydration/freeze-drying and methods for making and using same. Patent No.: WO 2013082412A1 World Intellectual Property Organization / J. Daniel, G. Ridge, R. Spencer [et al.]. MiMedx Group, Inc. Date of Patent: Jun. 06, 2013
92. Tissue grafts composed of micronized placental tissue and methods of making and using the same. Patent No.: US 9943551B2 United States / T.J. Koob, J. Daniel, R. ; MiMedx Group, Inc. Date of Patent: Mar. 15, 2013
93. The mechanism of cell interaction and response on decellularized human amniotic membrane: implications in wound healing / M. Bhatia, M. Pereira, H. Rana [et al.] // *Wounds*. – 2007. – Vol.19. – №8. – P.207-217.
94. The effect of cryopreserved human placental tissues on biofilm formation of wound-associated pathogens / Y. Mao, A. Singh-Varma, T. Hoffman [et al.] // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2018. – Vol.9. – №1. – P.3.
95. Antimicrobial activity of human fetal membranes: From biological function to clinical use / T. Ramuta, T. Sket, M. Starcic Erjavec [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – Vol.9. – P.691522.
96. Methods and criteria for validating the multimodal functions of perinatal derivatives when used in oncological and antimicrobial applications / A.R. Silini, T.Z. Ramuta, A.S. Pires [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol.10. – P.958669.

97. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика: биологические свойства и клиническое применение / И.В. Арутюнян, А.В. Макаров, А.В. Ельчанинов и др. // *Гены и Клетки*. – 2015. – Т.10. – №2. – С.30–38.
98. Костюнина, В.С. Культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, пуповины и плаценты отличаются по уровню экспрессии генов цитокинов, поддерживающих гемопоэз / В.С. Костюнина, Н.В. Петёвка, М.П. Потапнёв // *Гены и клетки*. – 2015. – Т.10. – №1. – С.61-68.
99. Применение клеток пуповинной крови и пуповины: достижения, проблемы и перспективы / И.В. Гилевич, И.С. Поляков, В.А. Порханов и др. // *Инновационная медицина Кубани*. – 2022. – №2. – С. 67-76.
100. Bańkowski, E. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis / E. Bańkowski, K. Sobolewski, L. Romanowicz // *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. – 1996. – Vol.66. – №2. – P.109-117.
101. A retrospective study of cryopreserved umbilical cord as an adjunctive therapy to promote the healing of chronic, complex foot ulcers with underlying osteomyelitis / W.J. Caputo, C. Vaquero, A. Monterosa [et al.] // *Wound Repair and Regeneration*. – 2016. – Vol.24. – №5. – P.885-893.
102. Raphael, A.A single-centre, retrospective study of cryopreserved umbilical cord/amniotic membrane tissue for the treatment of diabetic foot ulcers / A.A. Raphael // *Journal Wound Care*. – 2016. – Vol.25. – S10-S17.
103. An open-label trial of cryopreserved human umbilical cord in the treatment of complex diabetic foot ulcers complicated by osteomyelitis / W.A. Marston, J.C. Lantis, S.C. Wu [et al.] // *Wound Repair Regeneration*. – 2019. – Vol.27. – №6. – P.680-686.
104. A multicentre prospective randomised controlled comparative parallel study of dehydrated human umbilical cord (EpiCord) allograft for the treatment of diabetic foot ulcers. / W. Tettelbach, S. Cazzell, F. Sigal [et al.] // *International Wound Journal*. – 2019. – Vol.16. – №1. – P.122-130.

105. Couture, M.A. Single-center, Retrospective Study of Cryopreserved Umbilical Cord for Wound Healing in Patients Suffering From Chronic Wounds of the Foot and Ankle. / M.A. Couture // *Wounds*. – 2016. – Vol.28. – №7. – P.217-25.
106. Extracellular Matrix From Decellularized Wharton's Jelly Improves the Behavior of Cells From Degenerated Intervertebral Disc. / L. Penolazzi, M. Pozzobon, L. S. Bergamin [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol.8. – P.262.
107. Kehtari, M. Decellularized Wharton's jelly extracellular matrix as a promising scaffold for promoting hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells. / M. Kehtari, B. Beiki, B. Zeynali // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2019. – Vol.120. №4. – P.6683–6697.
108. Beiki, B. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing. / B. Beiki, B. Zeynali, E. Seyedjafari // *Materials Science and Engineering C – Materials for Biological Applications*. – 2017. – Vol.78. – P.627-638.
109. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. / S. Jadalannagari, G. Converse, C. McFall [et al.] // *PLOS One*. – 2017. – Vol.12. - №2. – e0172098.
110. Basiri, A. A silk fibroin/decellularized extract of Wharton's jelly hydrogel intended for cartilage tissue engineering. / A. Basiri, M. Farokhi, M. Azami M. // *Progress in Biomaterials*. – 2019. – Vol.8. – №1. – P.31–42.
111. Nanofibrous Wharton's jelly scaffold in combination with adipose-derived stem cells for cartilage engineering. / L. Lin, Y. Xu, Y. Li [et al.] // *Materials and Design*. – 2020. – Vol.186. – P.108216.
112. Evaluation of dehydrated human umbilical cord biological properties for wound care and soft tissue healing / J.D. Bullard, J. Lei, J.J. Lim [et al.] // *Journal Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*. – 2019. – Vol.107. – №4. – P.1035-1046.
113. Immunomodulation of skin repair: cell-based therapeutic strategies for skin replacement (a comprehensive review) / S. Tavakoli, M.A. Kisiel, T. Biedermann [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol.10. – №1. – P.118.

114. Децеллюляризованная строма пуповины в тканевой инженерии и регенеративной медицине: систематический обзор / Басок Ю.Б., Кондратенко А.А., Калюжная Л.И. и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т.25. - №2. – С.82-98.
115. <https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=IRCT20210612051545N3> [Internet]. World Health Organization: International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). [updated 2022 November 21; cited 2023 April 03]. Available from: <https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=IRCT20210612051545N3>
116. <https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=IRCT20210612051545N2> [Internet]. World Health Organization: International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). [updated 2022 November 21; cited 2023 April 03]. Available from: <https://trialsearch.who.int/Trial2.aspx?TrialID=IRCT20210612051545N2>
117. Decellularized Wharton jelly matrix: a biomimetic scaffold for *ex vivo* hematopoietic stem cell culture. / D. Li, G. Chiu, B. Lipe [et al.] // Blood Advances. – 2019. – Vol.7. – №3. – P.1011-1026.
118. PLOS ONE Staff. Correction: Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. PLoS One. 2017 Mar 7; 12(3): e0173827. doi: 10.1371/journal.pone.0173827. Erratum for: PLoS One. 2017 Feb 21; 12 (2): e0172098. PMID: 28267774
119. Effect of replacement of Wharton acellular jelly with fbs on the expression of megakaryocyte linear markers in hematopoietic stem cells CD34 / Z. Jalili, B. Emamgolizadeh, H. Abbaszadeh [et al.] // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2022. – Vol.23. №10. – P.3281-3286.
120. Acellular Wharton's jelly, potentials in t-cell subtypes differentiation, activation and proliferation / M. Talebi, H. Nozad Charoudeh, A.A. Movassaghpour Akbari [et al.] // Advanced Pharmaceutical Bulletin. – 2020. – Vol.10. – №4. P.617-622.
121. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: An untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering / P. Dan, E. Velot, G. Francius [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2017. – Vol.48. P.227-237.

122. Decellularized Human Umbilical Tissue Derived Hydrogels Promote Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. / F. Ramzan, S. Ekram, T. Frazier [et al.] // *Bioengineering*. – 2022. – Vol.9. – P.239.
123. A novel dressing composed of adipose stem cells and decellularized Wharton's jelly facilitated wound healing and relieved lymphedema by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis in a rat model / J.-H. Lu, K. Hsia, C.K. Su [et al.] // *Journal of functional biomaterials*. – 2023. Vol.14. – №2. – P.104.
124. Decellularized Wharton's jelly scaffold enhances differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-secreting cells / N. Azarbarz, L. Khorsandi, F. Nejaddehbashi [et al.] // *Tissue Cell*. – 2022. – Vol.79. – P.101938.
125. Fabrication and In Vitro study of tissue-engineered cartilage scaffold derived from Wharton's jelly extracellular matrix / T. Xiao, W. Guo, M. Chen [et al.] // *BioMed Research International*. – 2017. – P.5839071.
126. Decellularized Wharton jelly implants do not trigger collagen and cartilaginous tissue production in tracheal injury in rabbits / K.M. Foltz, A.E. Neto, J.C. Francisco [et al.] // *Life (Basel)*. – 2022. – Vol.12. – №7. – P.942.
127. Decellularized human umbilical cord Wharton jelly scaffold improves tendon regeneration in a rabbit rotator cuff tendon defect model / Z. Yuan, F. Cao, C. Gao [et al.] // *The American Journal of Sports Medicine*. – 2022. – Vol.50. – №2. P.371-383.
128. Cryopreserved human umbilical cord versus acellular dermal matrix patches for in utero fetal spina bifida repair in a pregnant rat model / L.K. Mann, J.H. Won, N.J. Trenton [et al.] // *Journal of neurosurgery. Spine*. – 2019. – Vol.32. – №2. – P.321-331.
129. Wharton's jelly matrix decellularization for tissue engineering applications / G.L. Converse, D. Li, E.E. Buse [et al.] // *Methods in Molecular Biology*. – 2018. – №1577. P.25-33.
130. Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair / K. Výborný, J. Vallová, Z. Kočí [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol.9. – №1. – P.10674.

131. Изготовление тканеинженерного бесклеточного матрикса пуповины человека / Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов, А.С. Фрумкина и др. // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2020. – Т.1. – №69. – С.124–130.
132. Оптимизация процедуры децеллюляризации соединительной ткани пуповины человека для создания тканеинженерного раневого покрытия / О.О. Болгарчук, Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов и др. // Известия Российской военно-медицинской академии. – 2020. – Т.39. – S3-1. – С.13-18.
133. Сохранность важнейших структурных компонентов пуповины человека после децеллюляризации как этапа изготовления высокорегенеративного раневого покрытия / А.А. Кондратенко, Л.И. Калюжная, М.О. Соколова и др. // Биотехнология. – 2021. – Т.37. – №5. – С.61–65.
134. Регенеративные эффекты гидрогеля из биоматериала пуповины человека в восстановлении повреждений суставного хряща / С.В. Чеботарев, Л.И. Калюжная, В.В. Хоминец и др. // Клиническая и экспериментальная хирургия. – 2020. – Т.8 – №4. – С.119-125.
135. Кондратенко, А.А. Биологические эффекты бесклеточного тканеинженерного продукта из пуповины человека / А.А. Кондратенко, Д.В. Товпеко, Л.И. Калюжная // Патогенез. – 2022. – Т.20. – № 4. – С.53-62.
136. Калюжная, Л.И. Гидрогель из пуповины человека в лечении дефектов суставного хряща в эксперименте / Л.И. Калюжная, С.В. Чеботарев // Известия Российской военно-медицинской академии. – 2020. – Т.39. – S3-1. – С.37-40.
137. Применение биоматериала из пуповины человека для восстановления повреждений суставного хряща / Л.И. Калюжная, В.В. Хоминец, С.В. Чеботарев и др. // Профилактическая и клиническая медицина. – 2019. – Т.73. – №4. – С.45-52.
138. Parnell, L.K.S. The evolution of animal models in wound healing research: 1993-2017 / L.K.S. Parnell, S.W. Volk // *Advances and Wound Care* (New Rochelle). – 2019. – Vol.8. – №12. – P.692-702.
139. Wound healing and cutaneous scarring models of the human skin. *Skin Tissue Models* / M. Ashrafi, A. Hague, M. Baguneid [et al.] // Academic Press – 2018.–P.201-221.

140. Descriptive vs mechanistic scientific approach to study wound healing and its inhibition: Is there a value of translational research involving human subjects? / I. Pastar, L.L. Wong, A.N. Egger [et al.] // *Experimental Dermatology*. – 2018. – Vol.27. – №5. – P.551-562.
141. Grada, A. Research techniques made simple: animal models of wound healing / A. Grada, J. Mervis, V. Falanga // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2018. – Vol.138. – №10. – P.2095-2105.
142. Accelerated wound healing in mice by on-site production and delivery of CXCL12 by transformed lactic acid bacteria / E. Vågesjö, E. Öhnstedt, A. Mortier [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2018. – Vol.115. – №8. – P.1895-1900.
143. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment / D.S. Masson-Meyers, T.A.M. Andrade, G.F. Caetano [et al.] // *International Journal of Experimental Pathology*. – 2020. – Vol.101. – P.21-37.
144. Влияние бесклеточного матрикса пуповины человека на динамику роста и жизнеспособность культивируемых клеток человека и животных *ex vivo* / Л.И. Калюжная, М.О. Соколова, В.Е. Чернов и др. // *Гены и клетки*. – 2021. – Т.16. – №3. – С.72-79.
145. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors / K. Sobolewski, A. Małkowski, E. Bańkowski [et al.] // *Placenta*. – 2005. – Vol.26. – №10. – P.747-752.
146. Marques, M.R. Enzymes in the dissolution testing of gelatin capsules / M.R. Marques // *AAPS PharmSciTech*. – 2014. – Vol.15. – №6. – P.1410-1416.
147. Кириллова, А.Д. Тканеспецифические матриксы из децеллюляризованных фрагментов печени и суставного хряща для тканевой инженерии: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 3.1.14 / А.Д. Кириллова; национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова. – Москва, 2021. – 27с.
148. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сент. 2010г. о защите животных, использующихся для научных целей [Электронный ресурс]. Гарант: информационно-правовое обеспечение. Режим

доступа: <http://base.garant.ru/70350564/ce210ed70e5daea1ed719396b4dabe87/> (дата обращения: 22.10.2022г.)

149. ГОСТ ISO 10993-3, Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными.

150. Коняева, А.Д. Морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла в слизистой оболочке полости рта в ходе заживления раневого дефекта при использовании полимерной мембраны / А.Д. Коняева, Е.Ю. Варакута, А.Е. Лейман // Биомедицина. – 2021. – Т.17. – №4. – С.57-67.

151. Биологические и функциональные свойства лиофилизированных форм тканеинженерных матриц из пуповины человека / А.А. Кондратенко, Л.И. Калужная, Д.В. Товпеко и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т.25. – №1. – С.113-122.

152. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.

153. Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев, М.В. Резванцев. – 3-е изд., доп. – СПб.: ВМедА, 2011. – 318 с.

154. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells / S. Cebotari, I. Tudorache, T. Jaekel [et al.] // Artificial Organs. – 2010. – Vol.34 – №3. – P. 206–210.

155. Fourier transform infrared spectroscopy of the animal tissues / V. Kumar, S.D. Vora, F. A. Asodiya [et al.] // In: Arcos, J.M.V., editor. Real Perspective of Fourier Transforms and Current Developments in Superconductivity [Internet]. London: IntechOpen; 2020.

156. Collagen scaffolds treated by hydrogen peroxide for cell cultivation / Y. Nashchekina, P. Nikonov, N. Mikhailova [et al.] // Polymers. – 2021. – Vol.13. – №23. – P.4134.

157. Компоненты внеклеточного матрикса в восстановлении поврежденных тканей: биохимические взаимодействия и протективный эффект / К.И. Мелконян,

- А.О.Бирюкова, Н.Н. Улитина и др. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2019. – Т.9. – №4. – С.55-62.
158. Гриненко, Е.В. Инструментальные методы анализа органических соединений. Инфракрасная спектроскопия: методические указания / Е.В. Гриненко, Д.С. Рябухин, А.В. Васильев. – СПб.: СПбГЛТУ, 2014. – 60 с.
159. Чурилов, Л.П. О системном подходе в общей патологии: необходимость и принципы патоинформатики / Л.П. Чурилов // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. – 2009. – Т.11. – №3. – С.5-22.
160. Wound healing properties of a fibrin-based dermal replacement scaffold / S.J. Brown, F. Surti, P. Sibbons [et al.] // Biomedical Physics and Engineering. Express. – 2021. – Vol.8. – №1.
161. Rittié, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. / L. Rittié // Journal of Cell Communication and Signaling. – 2016. – Vol.10. – №2. – P.103-120.
162. Application of stable continuous external electric field promotes wound healing in pig wound model / Y. Liang, H. Tian, J. Liu [et al.] // Bioelectrochemistry. – 2020. – Vol.135. – P.107578.
163. Melrose, J. Glycosaminoglycans in wound healing. / J. Melrose // Bone and Tissue Regeneration Insights. – 2016. – Vol.7. – P.29–50.
164. Patten, J. Fibronectin in development and wound healing / J. Patten, K. Wang // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2021. – Vol.170. – P.353-368.
165. Rousselle, P. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. / P. Rousselle, M. Montmasson, C. Garnier // Matrix Biology. – 2019. – Vol.75-76. – P.12-26.
166. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair in vivo / M. Le, R. Naridze, J. Morrison J [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol.10. – №10. – e48040.

Приложение А  
(рекомендуемое)

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и  
искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель директора  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
«Национальный медицинский  
исследовательский центр  
трансплантологии и  
искусственных органов имени  
академика В.И. Шумакова»,  
д.м.н., профессор

  
О.П. Шевченко  
«08» июня 2023 г.

**ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ МАТРИКСА ИЗ  
ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА**

## **А.1 ВВЕДЕНИЕ**

Настоящий лабораторный регламент устанавливает порядок выполнения процедур и манипуляций по децеллюляризации Вартонова студня (ВС) пуповины человека и изготовлению из него лиофилизованной формы матрикса. Соблюдение описанных в данном лабораторном регламенте параметров процессов и операций, обеспечивает получение образцов биосовместимого и функционально активного бесклеточного матрикса, с сохранением основных белков внеклеточного матрикса (ВКМ) пуповины человека. Матрикс из децеллюляризованного ВС (ДВС) используется в качестве дополнительного терапевтического средства, для лечения глубоких ран кожи и мягких тканей.

## **А.2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ**

Регламент используется в качестве основного нормативного технического документа при изготовлении матрикса из ДВС всеми сотрудниками лаборатории. При отклонениях в параметрах процессов и операций при изготовлении матрикса, а также в его качестве ответственный персонал обязан своевременно сообщать об этом руководителю исследования.

## **А.3 НОРМАТИВНАЯ БАЗА**

- Федеральный Закон Российской Федерации от 21.11.2011 г. №323 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
- Постановление Правительства Российской Федерации от 09.02.2022 г. №136 «Об утверждении требований к внедрению, поддержанию и оценке системы управления качеством медицинских изделий в зависимости от потенциального риска их применения.
- Федеральный Закон Российской Федерации № 52 от 30.03.1999 г. «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

- Санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.7.728-99.
- ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».
- Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».
- ГОСТ ISO 10993 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий».
- ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

#### **А.4 ОБЩИЕ ПРАВИЛА ПРОТОКОЛА**

Ответственные, из числа работников лаборатории, за охрану труда и технику безопасности ознакамливают сотрудников с должностными инструкциями и приказами, проводят вводный инструктаж и обязательное обучение на рабочем месте.

Хранение реактивов осуществляется в специально оборудованных, вентилируемых складах, в соответствии с разработанной для этого схемой. Химические вещества хранятся в специальной посуде, исключающей загрязнение и реагирование с другими веществами, с обязательным указанием названия, квалификации и срока годности.

Работа с биоматериалом пуповины человека, культурами клеток животных и человека требует соблюдения правил асептики и осуществляется только в стерильной рабочей зоне. Этапы работы, такие как препарирование пуповины человека, приготовление среды для культивирования клеток, наработка клеточной биомассы и определение ее метаболической активности после воздействия «вытяжек» из матрикса включают обязательную санитарную обработку с применением дезинфицирующих агентов и облучателей.

Порядок сбора и утилизации биологических отходов определяется правилами и нормами СанПиН 2.1.7.728-99.

## А.5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для изготовления биосовместимого и функционально активного матрикса из ДВС пуповины человека необходимы:

### **Оборудование:**

- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (Lamsystems, Россия);
- центрифуга (Biosan, Латвия);
- гомогенизатор (gentle MACS™ Dissociator Milteniy Biotech, Германия);
- шейкер-термостат (Biosan, Латвия);
- лиофилизатор (ZirbusVaCo5II, Германия);
- станция для заливки биологических тканей парафином (HistoStar, Thermo Fisher Scientific, США);
- аналитические весы (ГОСМЕТР ВЛ-64, Россия);
- вытяжной шкаф (СпецБалт мебель, Россия);
- инвертированный микроскоп (Primovert, Zeiss, Германия);
- люминесцентный микроскоп (Axio Observer, Zeiss, Германия);
- автоматический ротационный микротом в комплекте с системой переноса срезов (STS HM 355S, Thermo Fisher Scientific, США);
- морозильная камера (Liebherr, Германия);
- микропланшетный ридер с программным обеспечением (Tecan Trading AG, Швейцария);
- спектрофотометр (Nanodrop, Thermo Scientific, США);
- камера Горяева (МиниМед, Россия);
- блендер (Bosch, Германия);

### **Инструменты:**

- хирургические пинцеты (ЭИС Плюс, Россия);
- ножницы (Surgicon, Пакистан);
- автоматическая микропипетка (Ленпипет, Россия);
- криоприбирки (CryoPure, Германия);
- бумажные фильтры (Экротхим, Россия);

- чашки Петри диаметром 60 мм (Jet Biofil, Китай);
- центрифужные пробирки объемом 15 мл (Jet Biofil, Китай);
- культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> (Jet Biofil, Китай);
- серологические пипетки объемом 1 мл, 5 мл (Jet Biofil, Китай);
- 96-луночные планшеты (Jet Biofil, Китай);
- предметные стекла с адгезивной поверхностью (АреxLab, Россия)
- покровные стекла (Минилаб, Россия);

### **Среды и реактивы:**

- додецилсульфата натрия (SDS) (Биолот, Россия);
- фосфатно-солевой буфер (PBS) (Биолот, Россия);
- деионизированная вода (Аквафор, Россия);
- 3% перекись водорода (Самарамедпром, Россия);
- набор для выделения ДНК-DU-250 (Биолабмикс, Россия);
- сыворотка крови эмбриональная телячья (ЭТС) («HyClone», США);
- питательная среда DMEM, содержащая глюкозу 1,0 г/л (Биолот, Россия);
- 10%-ный забуференный раствор формалина (Biovitrum, Россия);
- флуоресцентный краситель DAPI (Sigma-Aldrich, США);
- раствор трипсин-Версена 0,02% (Биолот, Россия);
- 10 mM трис-ЭДТА буфер, pH 9,0 (Diagnostic BioSystems, США);
- раствор для блокирования сайтов неспецифического связывания (Diagnostic BioSystems, США);
- антитела против ламинина (LAM-89, Leica, Германия);
- антитела против коллагена IV типа (CIV22, ДАКО, Дания);
- антитела против TGF- $\beta$ 3 (MAV949Hu22; Cloud-clone Corp., Китай);
- антитела против фибронектина (AF0738; Affinity Biosciences, Китай);
- набор реактивов системы визуализации HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit («Abcam», Великобритания);
- антитела конъюгированные с Alexa Fluor 488 (SAA544Rb11; Cloud-clone Corp., Китай);
- 1,9-диметил метиленовый синий (Sigma-Aldrich, США);

- папаин (Sigma-Aldrich, США);
- хондроитин сульфат (Sigma-Aldrich, США);
- 1% пенициллин-стрептомицин (Биолот, Россия);
- 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромистый (Sigma-Aldrich, США);
- диметилсульфоксид (Татхимфармпрепараты, Россия);
- трипановый синий (Биолот, Россия).

#### **А.6 ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА**

Пуповины человека получают от здоровых доношенных новорожденных после самопроизвольных родов или после операции Кесарева сечения, с информированным согласием матерей и с использованием руководящих принципов, утвержденных локальным Этическим Комитетом.

В стерильных условиях с помощью стерильных пинцетов раздвигают ткань пуповины и осторожно удаляют сосуды пуповины, не допуская контаминации кровью.

После 2-3 циклов замораживания/оттаивания ( $-20^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$ ) ткань пуповины обрабатывают 3% перекисью водорода с последующим промыванием деионизированной водой. ВС измельчают ножницами на фрагменты  $1 \times 2 \times 2$  см и блендером, гомогенизируют (программа «h-cord-01-01»).

Децеллюляризацию осуществляют с помощью 0,05% раствора SDS в течение 24 часов при комнатной температуре в шейкере со скоростью 140 об/мин. Остатки SDS удаляют промывкой PBS (pH=7,35; Биолот, Россия).

Финальную лиофилизацию матрикса проводят до полного высушивания в течение 48 часов с последующим облучением ультрафиолетом в боксе микробиологической безопасности мощностью потока UV-C излучения 12 Вт в течение 15 минут и хранят герметично упакованными при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **А.7 ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИКСА НА СОДЕРЖАНИЕ ОСТАТОЧНОГО КОЛИЧЕСТВА ДНК**

Для качественного определения полноты удаления клеточного (ядерного) материала из децеллюляризованных образцов используют специфический метод гистологического анализа. Ядра клеток в нативной и децеллюляризованной пуповины визуализируют флуоресцентным окрашиванием DAPI. Стекла с парафиновыми срезами толщиной 4-5 мкм, полученные на микротоме, депарафинируют, проводя через ксилол и спирты нисходящей концентрации (96%, 96%, 80%, 70%) и регидратируют в дистиллированной воде. Однократно отмывают в PBS в течение 5 минут. Стекла аккуратно осушают фильтровальной бумагой и наносят рабочий раствор DAPI, инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 15 минут. Концентрация красителя в рабочем растворе составляет 0,01 мг/мл. Аккуратно удаляют излишки окрашивающего раствора и наносят водную заключающую среду и накрывают покровным стеклом. Результаты регистрируют, сравнивают с биоматериалом нативной пуповины, окрашенной тем же красителем. Длина волны возбуждения 358 нм, максимум излучения – 461 нм.

Для количественного определения содержания остаточного ДНК из предварительно взвешенных образцов лиофильно высушенного матрикса извлекают ДНК в соответствии с протоколом производителя. Затем экстрагированную ДНК оценивают на спектрофотометре Nanodrop с коэффициентом поглощения 260/280 нм. Концентрацию ДНК рассчитывают в соответствии с массой ткани (нг ДНК/мг сухого вещества).

## **А.8 ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА МАТРИКСА ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВАРТОНОВА СТУДНЯ ЧЕЛОВЕКА**

Образцы матрикса из ДВС подвергают морфологическому исследованию с помощью иммуногистологических методов окрашивания. Образцы фиксируют в 10% растворе формалина, промывают в проточной воде и обезвоживают в изопропиловых спиртах восходящей концентрации, заливают в парафин. В депарафинированных срезах на стеклах с адгезивным покрытием идентифицируют коллаген IV типа, ламинин, фибронектин и TGF- $\beta$ 3.

После демаскировки антигена в 10 мМ трис-ЭДТА буфере при pH 9,0 в течение 15 минут с последующим охлаждением при комнатной температуре и промывкой фосфатным буфером и блокированием сайтов неспецифического связывания по инструкции производителя, ткани инкубируют в течение 2 часов с первыми антителами, направленными против человеческого ламинина (1/50), коллагена IV типа (1/25), TGF- $\beta$ 3 (1/30) и фибронектина (1/50). Для идентификации используют соответствующие вторые антитела конъюгированные с системой визуализации. Окрашенные срезы обезвоживают и закрывают покровными стеклами. Для фиксации результатов окрашивания использовали световую микроскопию при использовании хромогена диаминобензидина и флюоресцентную микроскопию при использовании флюоресцентной метки.

Для количественного определения гликозаминогликанов (ГАГ) используют тиазиновый краситель 1,9-диметил метиленовый синий. Предварительно взвешенные высушенные образцы матриксов и нативной пуповины растворяют в папаине при 65°C в течение 12 часов. Для анализа используют надосадочную жидкость (1000 г 10 минут). В лунки 96-луночного планшета вносят по 20 мкл надосадочной жидкости и 200 мкл раствора красителя (125 мкг/мл фосфатного буфера) с последующим определением оптической плотности при длине волны 525 нм. Концентрации ГАГ определяли по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям хондроитин сульфата в диапазоне 0-50 мкг/мл. Результаты измерений выражают в мкг ГАГ на мг сухого веса.

## А.9 ИССЛЕДОВАНИЕ МАТРИКСА ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВАРТОНОВА СТУДНЯ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

Цитотоксичность образцов матрикса из ДВС *in vitro* оценивается влиянием «вытяжки» из ДВС на метаболическую активность дермальных фибробластов человека.

Для получения «вытяжек» (1 мг/1 мл) 10 мг лиофилизированного матрикса из ДВС помещали в контейнеры с крышкой и добавляли 10 мл питательной среды DMEM. Срок инкубации образцов в питательной среде составил 1 сут при 4°С в холодильной камере.

Клетки 3-5 пассажей культивируют в инкубаторе при 37°С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в питательной среде DMEM с добавлением 10% ЭТС и 1% пенициллина-стрептомицина в концентрации 7 тыс. клеток на лунку 96-луночного планшета в 200 мкл питательной среды. После адгезии клеток стандартную питательную среду заменяют на «вытяжку» и культивируют в течение 72 часов, после чего заменяют на среду с добавлением 200 мкл на лунку реагента МТТ в концентрации 0,5 мг/мл. После инкубации в течение 4 часов в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> среду с МТТ удаляют, в каждую лунку добавляют по 100 мкл диметилсульфоксида. Образующийся в течение 20 мин при постоянном шейкировании формазан экстрагируют. Оптическую плотность раствора формазана в диметилсульфоксиде измеряют с помощью анализатора при длине волны 570 нм и длине волны 630 нм. Оптическую плотность сравнивают с контролем.

## **А 10 ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МАТРИКСА ИЗ ДЕКЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВАРТОНОВА СТУДНЯ**

Для определения функциональной активности матрикса из ДВС *in vitro* исследуют влияние образцов матрикса на пролиферацию и жизнеспособность фибробластов кожи мыши. Культуру клеток ведут с пересевами каждые 7 суток с разведением 1:5 в культуральных флаконах 25 см<sup>2</sup>. Бесклеточный матрикс из ДВС (1мг/мл) помещают в экспериментальные флаконы на протяжении всего исследования.

На 21 сутки от начала культивирования клетки открепляют от пластика раствором трипсин-Версена 0,02% в соотношении 1:3 при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 5-7 минут. После инактивации трипсина питательной средой с ЭТС клеточный материал осаждают центрифугированием при 3500 об/мин в течение 5 минут. Дважды отмывают питательной средой. Производят подсчет клеток в камере Горяева по общепринятой методике. Определение жизнеспособности клеток производят методом суправитальной окраски 0,4% раствором красителя трипанового синего.

## **А. 11 ХРАНЕНИЕ МАТРИКСА ИЗ ДЕКЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВАРТОНОВА СТУДНЯ**

Стерильные образцы матрикса из ДВС могут храниться герметично упакованными при температуре -20<sup>0</sup>С до одного года. Матрикс из ДВС с низкой иммуногенностью и отсутствием цитотоксичности используют в качестве дополнительного терапевтического средства при лечении глубоких обширных повреждений кожи и мягких тканей. Непосредственно перед использованием рекомендуется дополнительно измельчать матрикс из ДВС с помощью пестика и ступки в жидком азоте.