

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

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Доктор биологических наук

Басок Юлия Борисовна

Доктор медицинских наук

Калюжная – Земляная Лидия Ивановна

Официальные оппоненты:

Кирпатовский Владимир Игоревич - доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кудан Елизавета Валерьевна – доктор биологических наук, ведущий эксперт научно-образовательного центра биомедицинской инженерии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России.

Защита диссертации состоится «21» ноября 2023 года в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.transpl.ru>.

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета ДСТИО 001.21

Кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Совершенствование методов лечения глубоких повреждений кожи по-прежнему остается актуальной задачей современной биомедицины [Е.М. Фоминых и соавт., 2020].

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 [С.В. Готье и соавт., 2018; В.И. Севастьянов и соавт., 2018].

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 [S.F. Badylak, 2014]. Такой матрикс может быть изготовлен заранее и применен без предварительной подготовки, что имеет особое значение для военной медицины [N. Vakhtyar et al., 2018]. При этом отсутствие стадии культивирования клеток потенциально ускоряет внедрение бесклеточных матриксов в клиническую практику [P. Gupta et al., 2021].

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 [M. Dubus et al., 2022; A. Fayon et al., 2022]. 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 [А.С. Плешков, 2016; С.С. Целуйко и соавт., 2016]. Ксеногенный биоматериал животных любого возраста доступен, но развитие технологий генетических модификаций для удаления ксеноантигенов не достигли еще широкого применения [M. Sykes, 2022].

Материалом гомологичного происхождения, лишенным возрастных изменений внеклеточного матрикса, являются внеэмбриональные ткани. Их получение неинвазивно, не связано с этическими ограничениями [A. Roy et al., 2022]. Кроме того, провизорные органы обладают уникальным составом и свойствами [T.J. Sabol et al., 2022]. Пуповина человека перспективна для создания на её основе бесклеточных матриксов, благодаря присутствию в ней коллагенов разных типов, несulfатированных и sulfатированных гликозаминогликанов, фибронектина, многочисленных факторов роста, таких как: трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α) и различные изоформы трансформирующего фактора роста бета (TGF- β 1, 2, 3), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и др. [A. Gupta et al., 2020; I.A. Deus et al., 2020].

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 [D.O. Sohutskey et al., 2020].

Способ децеллюляризации биоматериала обуславливает компонентный состав, структуру и биологические свойства изготовленного матрикса [N.S. Sulaiman et al., 2021; A. Fayon et al., 2022]. 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- β 3, биodeградацией в растворе коллагеназы и набуханием в $16,1 \pm 2,0$ раза при контакте с физиологическим раствором при 37°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 биодegradации 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 антиконтрационных 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.); использованы материалы, полученные в рамках научно-исследовательских работ Федерального Государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-Медицинская академия имени С.М. Кирова»: «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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление матриксов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

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).

Для изготовления матрикса из образцов пуповины в стерильных условиях были осторожно удалены сосуды. После замораживания/оттаивания (-20°C/+37°C), обработки 3% перекисью водорода с последующим промыванием деионизированной водой, образцы Вартонова студня (ВС) измельчали блендером и гомогенизировали (gentle MACS™ Dissociator Milteniy Biotech, Германия), программа «h-cord-01-01». Удаление клеток осуществляли с помощью 0,05% раствора додецилсульфата натрия (SDS) в течение 24 часов со скоростью 140 об/мин. Остатки SDS удаляли промывкой фосфатным буфером pH 7,35. Матрикс из децеллюляризованного ВС (ДВС) лиофилизировали (ZirbusVaCo5II, Германия), облучали ультрафиолетом мощностью потока UV-C излучения 12 Вт в течение 15 минут (рисунок 1).



Рисунок 1 – Схема изготовления матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

Для изготовления второго матрикса 10 мг сухого матрикса (приготовленного по описанной выше технологии) солюбилизировали раствором пепсина 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. Далее матрикс лиофилизировали (рисунок 2).

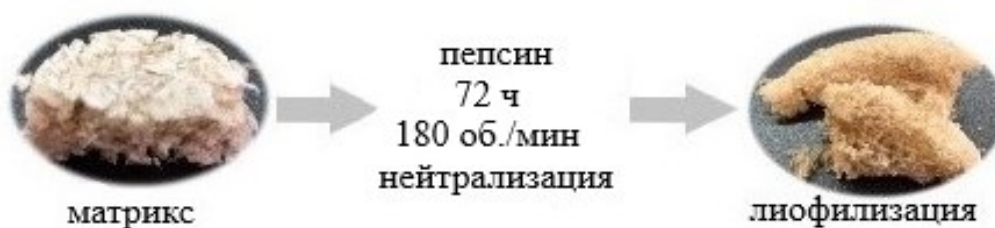


Рисунок 2 - Схема изготовления матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, обработанного солянокислым пепсином

Гистологические исследования

Образцы лиофилизированных матриксов и нативной пуповины заливали в парафин. Срезы толщиной 0,5-1,5 мкм после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим (рН 2,5). Для подтверждения окрашивания гликозаминогликанов (ГАГ) использовали раствор гиалуронидазы 1280 МЕ/мл (препарат «Лидаза», Микроген, Россия). Срезы матрикса инкубировали с раствором гиалуронидазы во влажной камере в течение 72 часов. После промывания в дистиллированной воде все препараты окрашивали альциановым синим.

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. После блокирования сайтов неспецифического связывания срезы инкубировали в течение 2 часов с первичными мышиными антителами, направленными против человеческого ламинина (1/50; LAM-89, Leica, Германия), коллагена IV типа (1/25; CIV22, ДАКО, Дания). Для визуализации связывания антител использовали систему EnVision (Dako, Дания) с контрастированием гематоксилином Майера.

Для идентификации в матриксе TGF- β 3 использовали моноклональные мышиные антитела к TGF- β 3 (1/30; MAB949Hu22; Cloud-clone Corp., Китай), 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). Демаскировку антигена проводили в микроволновой печи с 10 мМ трис-ЭДТА буфером (рН 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).

Флюориметрическое окрашивание двуцепочечной ДНК для оценки полноты децеллюляризации

Образцы бесклеточного матрикса и нативной пуповины окрашивали 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), с приготовлением препаратов по стандартной методике. Результаты регистрировали на микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

Определение количества ДНК

Для количественного определения содержания остаточного ДНК из предварительно взвешенных образцов лиофилизированных матрикса и нативной пуповины (n=10) 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/мг сухого вещества).

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 с 5 мкл глицерина. 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).

Методы электронной микроскопии

Образцы сухих бесклеточных матриксов и нативной пуповины 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 мА. Для обеспечения стока заряда методом магнетронного распыления на установке Emitech K950 (Quorum Technologies, Великобритания) наносили слой золота толщиной 30 нм.

Для исследования микроструктуры образцов использовали метод трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) Merlin CarlZeiss (Германия). Образцы 15 мм диаметром, толщиной 2 мм фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде в течение 12 часов. Далее препараты были изготовлены по стандартной методике. Обработку изображений проводили в программе ImageJ (1,53e, National Institutes of Health, США, n=40).

Анализ содержания гликозаминогликанов

Количество ГАГ определяли, используя краситель 1,9-диметил-метиленовый синий, по 200 мкл раствора красителя (125 мкг/мл фосфатного буфера). Лиофилизованные образцы матриксов и нативной пуповины (n=9) после взвешивания растворяли в папаине при 65°C в течение 12 часов. Для анализа использовали 20 мкл надосадочной жидкости. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре Tecan (Trading AG, Швейцария) при длине волны 525 нм. Концентрацию ГАГ определяли по калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям хондроитин сульфата в диапазоне 0-50 мкг/мл. Результаты измерений выражали в мкг ГАГ на мг сухого веса.

Исследование метаболической активности фибробластов дермы человека, подвергнутых действию «вытяжек» матриксов из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

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). Влияние образцов лиофилизованных бесклеточных матриксов на клетки 3-5 пассажей оценивали с

использованием «вытяжек» питательных сред (1 мг/мл). Срок инкубации образцов в питательной среде составил 1 сутки.

Клетки (7 тыс./лунку) в «вытяжках» и параллельно в стандартных средах культивировали в течение 72 часов, после чего проводили МТТ-анализ по стандартной методике. Оптическую плотность в лунках контроля принимали за 100% клеточной метаболической активности.

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Спектры поглощения лиофилизированных образцов матрикса и нативной пуповины регистрировали в диапазоне волновых чисел 4000 – 500 см⁻¹ на спектрометре Bruker Alpha (Германия) со спектральным разрешением 2 см⁻¹ по 45 сканов, расположенных на разных участках лиофилизированных образцов. Измерения проводились при 21±1°C в кондиционируемом помещении.

Исследование биodeградации матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека in vitro

Изучение влияния растворов 0,1% коллагеназы 159 ЕД/мл (Биолот, Россия) и гиалуронидазы 1280 МЕ/мл («Лидаза», Микроген, Россия) на матрикс проводили с регистрацией результатов по потере массы образцов.

Образцы матрикса (n=9) взвешивали в микропробирках. К образцам добавляли растворы коллагеназы или гиалуронидазы, к контрольным образцам – стерильный фосфатный буфер, рН 7,4 в соотношении 1:20. Лиофилизаты ферментов растворяли стерильным фосфатным буфером. Инкубировали при 37°C при закрытых крышках. Спустя 24 и 72 часа от начала инкубации образцы охлаждали и отбирали супернатант. Осадок лиофилизировали в течение 48 часов и взвешивали в микропробирках.

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 и инкубировали при 37°C. Спустя 60 минут гидратированные образцы взвешивали. После удаления избытка физиологического раствора, коэффициент равновесного набухания (Q) рассчитывали по следующей формуле:

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

где: m – масса сухого образца

m_i – масса влажного образца

Исследования влияния матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины на рост клеток животных in vitro

Исследование было проведено с использованием руководящих принципов, утвержденных Этическим Комитетом при Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, протокол № 263 от 31.05.2022 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). Клетки фибробластоподобной морфологии были выделены из фрагментов коры головного мозга, печени, селезенки, кожи и сердца свиньи, морских свинок, крыс и мышей. Культуры выделенных клеток (1×10^6 кл/мл) вели в питательной среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США) и 1% пенициллина-стрептомицина с пересевами каждые 7 суток с разведением 1:5 в культуральных флаконах 25 см² в присутствии матрикса из ДВС пуповины (1 мг/мл). Количество клеток и их жизнеспособность (окрашивание трипановым синим) оценивали на 21 сутки.

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 животных моделях: беспородные белые мыши и свинья.

Анестезированным (Ксила, Эстония, в дозировке 100 мг/кг) мышам (n=64) в асептических условиях на предварительно освобожденную от шерсти область холки скальпелем наносили полнослойную кожную рану диаметром 1,2 см. Силиконовые кольца диаметром 1,4 см были пришиты к краям дефектов кожи. Выбранным случайным образом животным опытной группы в рану помещали лиофилизаты бесклеточного матрикса (0,01 г), увлажненные 0,2 мл раствора стерильного фосфатно-солевого буфера. Для предотвращения высыхания и загрязнения и дефект бесконтактно закрывали парафиновой пленкой. Животным контрольной группы (n=32) производили аналогичные манипуляции, но без помещения матрикса в рану.

На 1, 3, 7, 14-е сутки по 8 животных выводили из эксперимента передозировкой паров эфира. Ткани в области раны после извлечения фиксировали в 10% формалине и изготавливали гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином и по Гейденгайну. Определяли удельную площадь сосудов (и их средний диаметр) в тканях окружающих раневой дефект (n=10 для каждого срока наблюдения).

Для наркоза свинье использовали внутримышечно Золетил 100 (Virbac, Франция, 10 мг/кг) и Ксилазин (Ксила, Эстония, 0,1 мл/кг). После очищения кожи дермопанчем DMP08 диаметром 8 мм наносили две кожные раны глубиной 1 см. В опытную рану помещали 0,01 г лиофилизованного бесклеточного матрикса. Спустя 7 суток забирали биопсию, готовили гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, по Массону.

Методы статистического анализа

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 среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор технологии изготовления матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека

Учитывая влияние способа обработки ВС на доступность факторов роста, были изготовлены два варианта бесклеточного матрикса. Для изготовления второго варианта матрикса обработке пепсином подвергались образцы ДВС (рисунок 2). Поэтому исследованию на содержание остаточного ДНК подвергались только образцы матрикса, изготовленного без применения этапа ферментативного гидролиза солянокислым пепсином. В исходном материале ВС присутствуют многочисленные клетки, в то время как в ДВС наличия ядер клеток не визуализируется (рисунок 3).

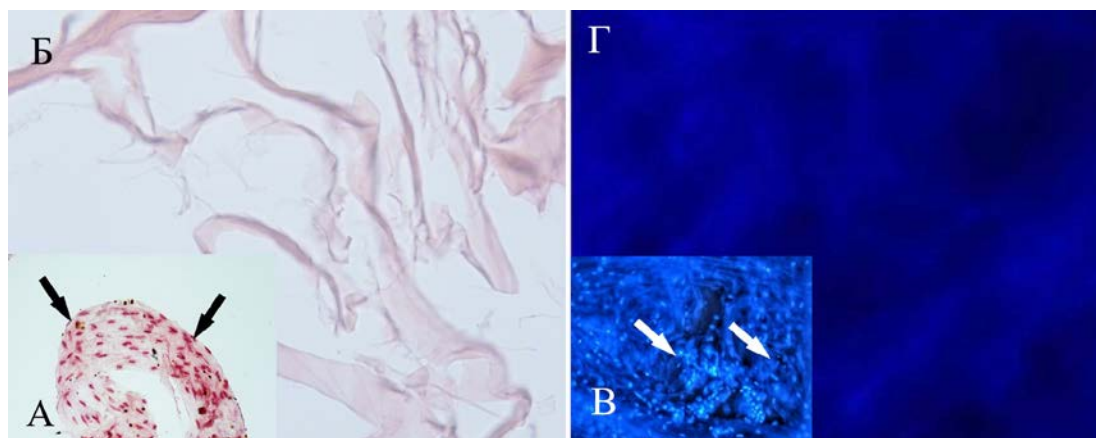


Рисунок 3 – Вартонов студень с клетками (указано стрелками) (А, В); матрикс из децеллюляризованного Вартонова студня (Б, Г), окраска гематоксилином и эозином (А, Б), DAPI (В, Г). Ув. $\times 400$

Электрофорез выделенной из матрикса ДНК в геле агарозы подтвердил ее элиминацию. Содержание остаточного ДНК в ДВС составило $21,8 \pm 5,0$ нг/мг. Что было статистически значимо ниже ($p=0,000001$) по сравнению с содержанием ДНК в нативной пуповине $506,8 \pm 39,1$ нг/мг (рисунок 4).

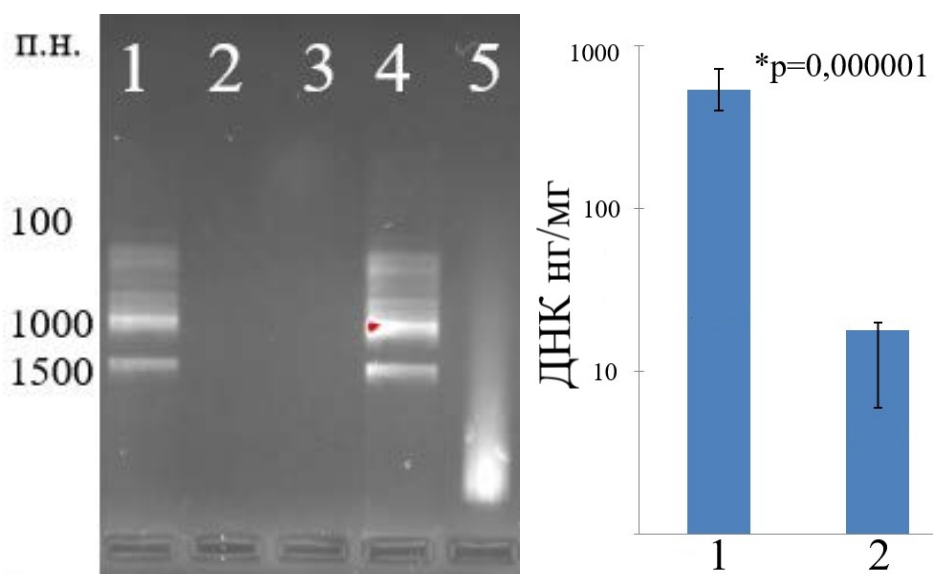


Рисунок 4 – Электрофорез в геле агарозы (1, 4 – маркер, 2, 3 – матрикс, 5 – пуповина). На графике представлено содержание ДНК в пуповине (1) и матриксе (2), нг/мг сухого веса ткани

Таким образом, разработанная технология децеллюляризации ВС пуповины человека обеспечивает удаление около 96% ДНК, что свидетельствует о ее эффективности и, соответственно, низкой способности матрикса вызывать нежелательные иммунные реакции [Р.М. Старо et al., 2011].

Применение разных протоколов изготовления бесклеточных матриксов не только вносит вклад в сохранение профиля белков внеклеточного матрикса (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 5А).

Микрофотографии СЭМ демонстрируют гетерогенный диаметр пор матриксов (рисунок 5Б, В). Причем рельеф поверхности децеллюляризованного матрикса и нативной пуповины неоднородный (рисунок 5Г, Д). В то время как матрикс, изготовленный с применением ферментативного гидролиза пепсином, показал более гомогенную структуру (рисунок 5Е). Наличие пор и шероховатость поверхности являются важными параметрами для миграции, адгезии клеток и их пролиферации на поверхности матрикса. Отметим, что наличие пор способствует циркуляции жидкостей и питательных веществ, что необходимо для пролиферации клеток.

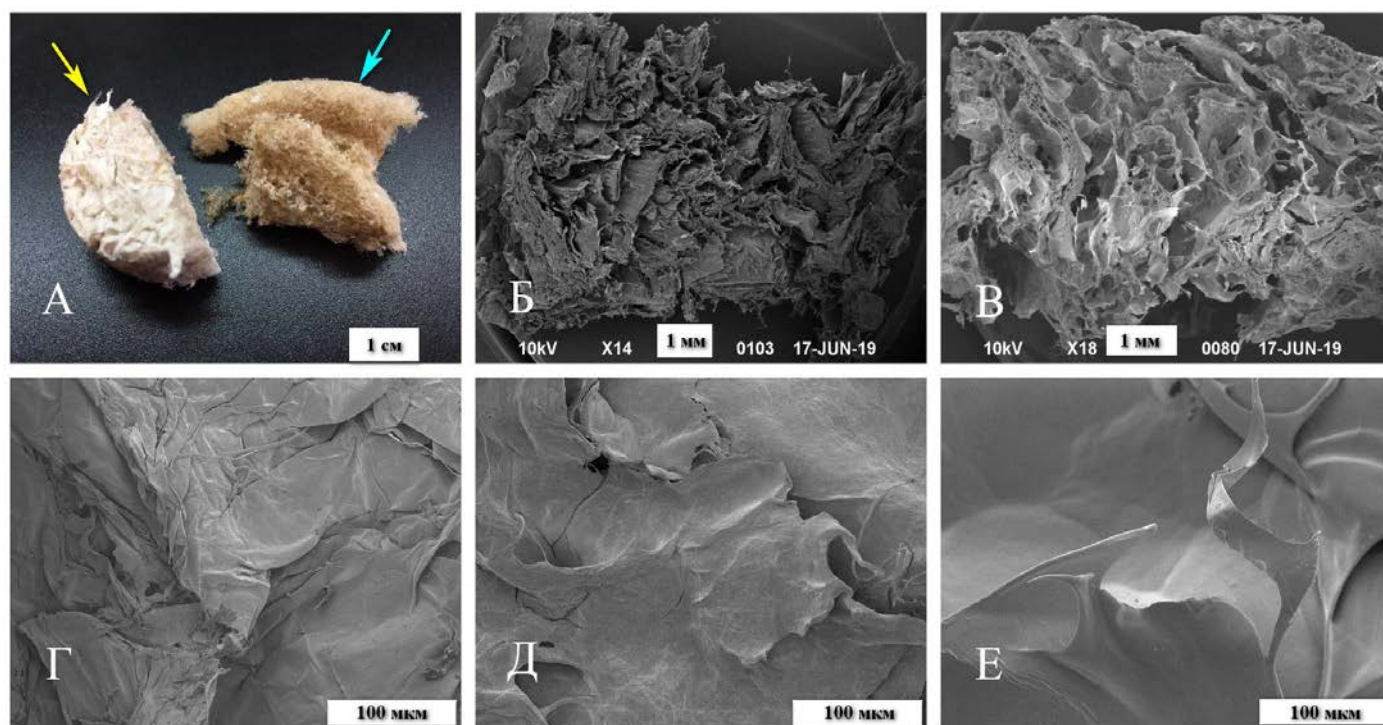


Рисунок 5 – Образцы высушенного матрикса (А желтая стрелка) и матрикса, обработанного пепсином (А голубая стрелка); сканирующая электронная микроскопия образцов нативной пуповины (Г), матрикса (Б, Д) и матрикса, обработанного пепсином (В, Е)

Основную массу ткани пуповины составляют коллагеновые волокна, что продемонстрировано на микрофотографиях ТЭМ нативной пуповины (рисунок 6А, Г). Удаление клеток из ВС существенно не повлияло на конфигурацию волокон коллагена в матриксе (рисунок 6Б, Д). Последующая обработка матрикса пепсином приводила к частичной утрате микроструктуры ВКМ (рисунок 6В, Е).

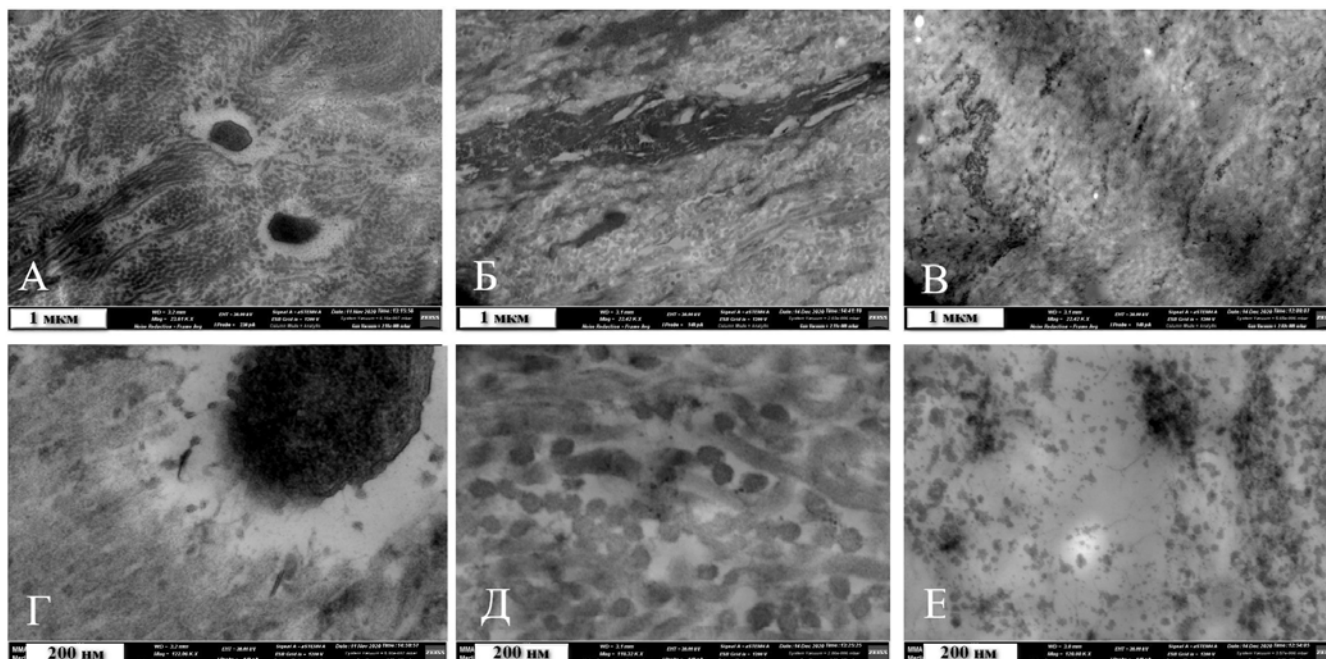


Рисунок 6 – Трансмиссионная электронная микроскопия образцов пуповины (А, Г), матрикса (Б, Д) и матрикса, обработанного пепсином (В, Е)

Одной из функций ВС является обеспечение кровотока по сосудам пуповины, даже в условиях скручивания и сжимания, это возможно за счет большого содержания ГАГ, встроенных в коллагеновую сеть [A. Roy et al., 2022]. Сохранность ГАГ после децеллюляризации подтверждена гистохимическим окрашиванием альциановым синим (рисунок 7).

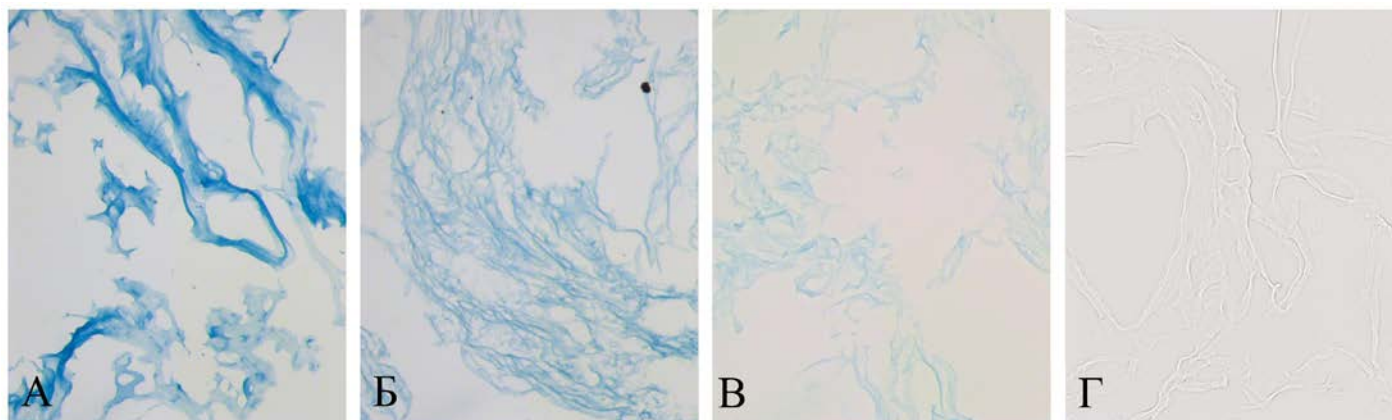


Рисунок 7 – Гликозаминогликаны в нативной пуповине (А), матриксе (Б) и матриксе, изготовленном с использованием ферментативного гидролиза пепсином (В), матрикс, обработанный гиалуронидазой (Г). Окрашивание альциановым синим, рН 2,5. Ув. ×100

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, которая имеет особенное значение для активации клеток и стимуляции заживления [S. Thones et al., 2019].

Было обнаружено, что матрикс из ДВС содержит сульфатированные ГАГ в больших количествах, чем в нативной пуповине (рисунок 8). Данное явление объясняется увеличением

доли ГАГ в единице массы высушенной ткани, вследствие удаления клеток пуповины. Данный факт согласуется с опубликованными в научной литературе данными [M. Dubus et al., 2022; F. Ramzan et al., 2022]. При обработке матрикса из ДВС раствором солянокислого пепсина обнаружено статистически значимое снижение содержания сульфатированных ГАГ по сравнению с их содержанием в матриксе из ДВС (рисунок 8).

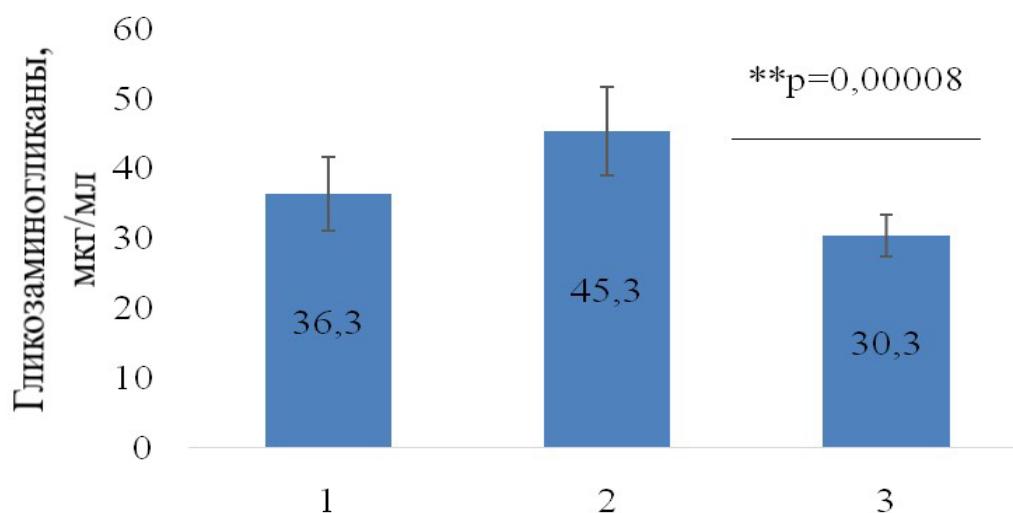


Рисунок 8 – Содержание гликозаминогликанов в пуповине (1), матриксе (2) и матриксе, изготовленном с применением ферментативного гидролиза пепсином (3)

Нетоксичность бесклеточного матрикса в значительной степени зависит от качественного удаления агентов децеллюляризации. Было показано, что концентрация остаточного детергента <50 мг/л является приемлемой для обеспечения нетоксичности [S. Sebotari et al., 2010]. Проведенные исследования метаболической активности *in vitro* на клетках человека продемонстрировали отсутствие цитотоксических свойств матрикса из ДВС. Метаболическая активность клеток, подвергшихся действию «вытяжки» из матрикса, приготовленного с применением ферментативного гидролиза солянокислым пепсином, была статистически значимо ниже по сравнению с контролем (рисунок 9).

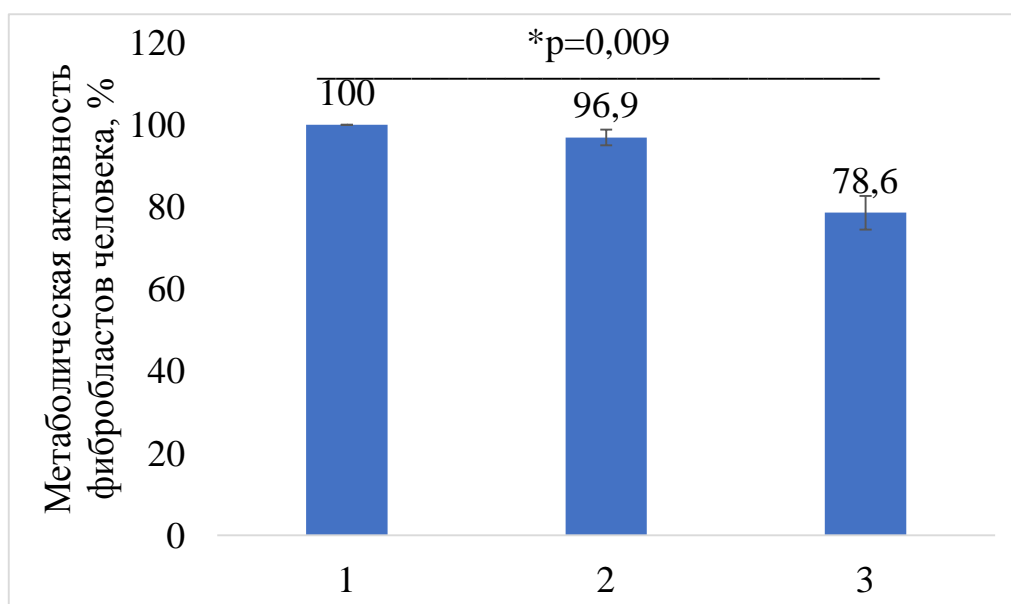


Рисунок 9 – Метаболическая активность фибробластов дермы человека при культивировании в стандартных условиях (1), в «вытяжках» из матрикса (2) и матрикса, изготовленного с применением ферментативного гидролиза пепсином (3)

Полученные результаты показали, что бесклеточные матриксы из ДВС пуповины человека обладают пористой структурой, сохраняют в своем составе ГАГ (несульфатированные и сульфатированные). При этом обработка пепсином обуславливает снижение уровня сульфатированных ГАГ. Отметим, что метаболическая активность клеток, культивируемых с использованием «вытяжки» из матрикса, изготовленного с применением ферментативного гидролиза пепсином, была статистически значимо ниже по сравнению с контролем. Таким образом, для дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo* был выбран лиофилизированный матрикс на основе ДВС, изготовленный без применения этапа обработки пепсином. Заметим, что исключение из технологии изготовления пепсина свиного происхождения позволяет создать максимально гомологичный продукт, то есть избежать присутствия ксеногенного белка в конечном продукте.

Оценка состава матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины

Был изучен качественный состав матрикса из ДВС. Общий вид спектров инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием (ИКСФП) матрикса и пуповины (рисунок 10) был близок к описанным в литературе для коллагена [А.М. Cortizas et al., 2020]. Показаны пики характерные для высокомолекулярных органических соединений [N.S. Sulaiman et al., 2021; V. Kumar et al., 2020; Y. Nashchekina et al., 2021]. Основные пики показаны в областях Амидов I и II. Пики в областях поглощения между 1170 и 800 см^{-1} отражающие наличие углеводных фрагментов коллагена и ГАГ. [M. Dubus et al., 2022].

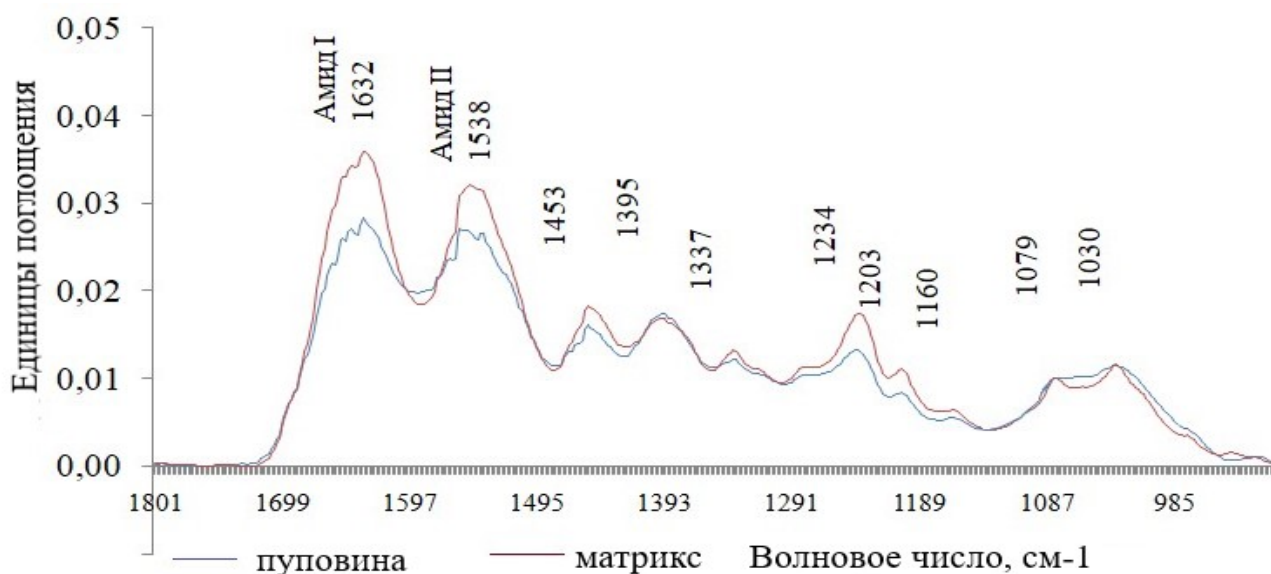


Рисунок 10 – Инфракрасные спектры с Фурье преобразованием пуповины и матрикса

В составе матрикса было показано присутствие коллагена IV типа и ламинина (рисунок 11А, Б). Являясь сложным адгезионным белком, ламинин совместно с нефибриллярным коллагеном IV типа образует сети базальной мембраны эпителия [К.И. Мелконян и соавт., 2019].

Чрезвычайное значение для заживления ран кожи имеет обнаруженный в бесклеточном матриксе фибронектин (рисунок 11В). Этот гликопротеин экспонирует матрикриптические сайты, такие как «клетки-связывающий домен» - RGD (Arg-Gly-Asp). Фибронектин посредством данной последовательности аминокислот связывается с $\alpha_v\beta_3$ -

интегрином фибробластов, стимулируя тем самым их миграцию в рану. Также было показано, что фибронектин регулирует протеолитическую активность лизилоксидазы (фермента ответственного за поперечную сшивку коллагеновых фибрилл в зрелые волокна) [L.E. Tracy et al., 2014].

Уникальной особенностью тканей фетального фенотипа является высокое содержание в них противofiбротической изоформы TGF- β 3, относительно изоформ TGF- β 1 и TGF- β 2, присущих постнатальным тканям [D.D. Lo et al., 2012]. Наличие TGF- β 3 в бесклеточном матриксе также было подтверждено (рисунок 11Г).

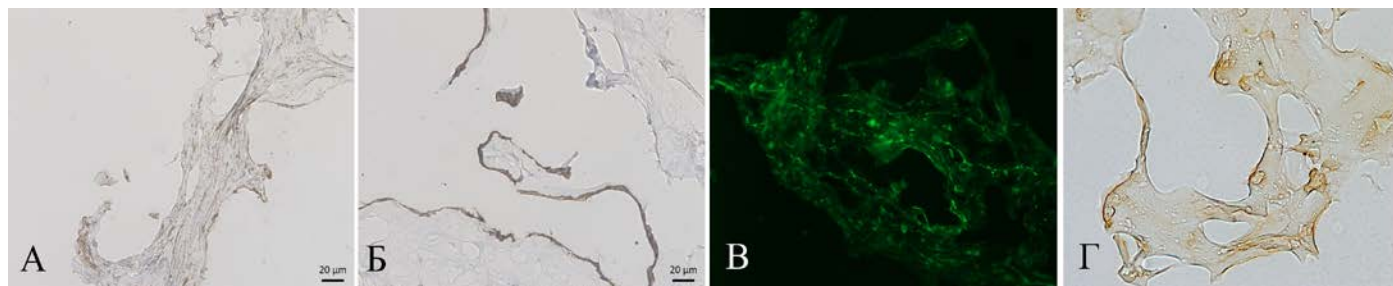


Рисунок 11 – Иммуногистохимическое окрашивание матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека антителами к коллагену IV типа (А), ламинину (Б), фибронектину (В), TGF- β 3 (Г). Ув. $\times 400$

Была исследована его способность к полной биодеградации *in vitro* (рисунок 12). Естественная биодеградация имплантированного матрикса исключает необходимость формирования организмом ответа на «инородное тело» [L.M. Delgado et al., 2015].

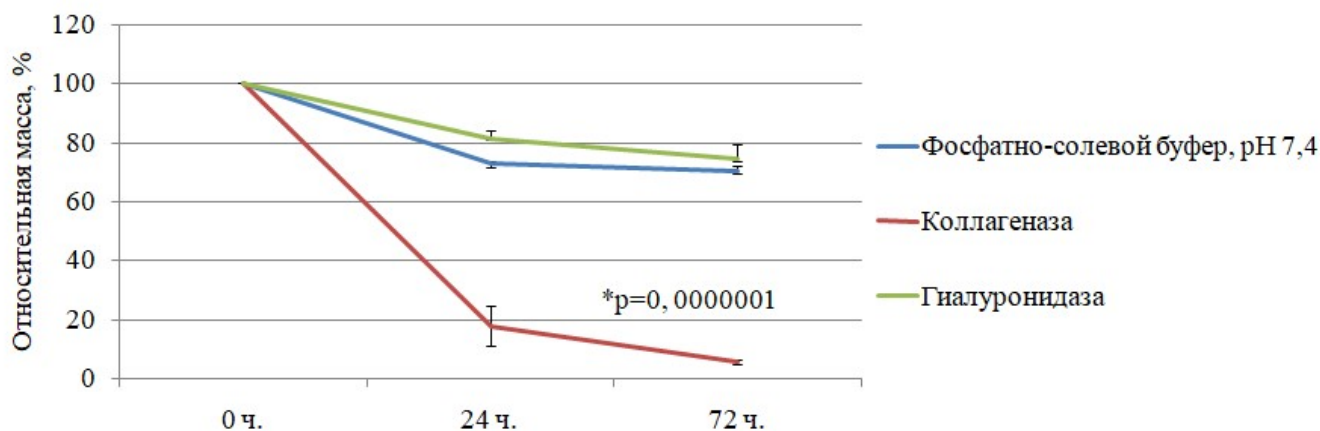


Рисунок 12– Остаточная масса образцов матрикса после инкубации в растворах ферментов и в контроле

При контакте с физиологическим раствором при 37°C в течение 1 часа матрикс из ДВС увеличивает свою массу в $16,1 \pm 2,0$ раза. 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.

Таким образом, матрикс из ДВС пуповины человека состоит из коллагенов, ГАГ и является биодеградируемым, 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.

Биосовместимость матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека *in vitro*

Матрикс из ДВС не угнетал рост всех выделенных клеток (рисунок 13).

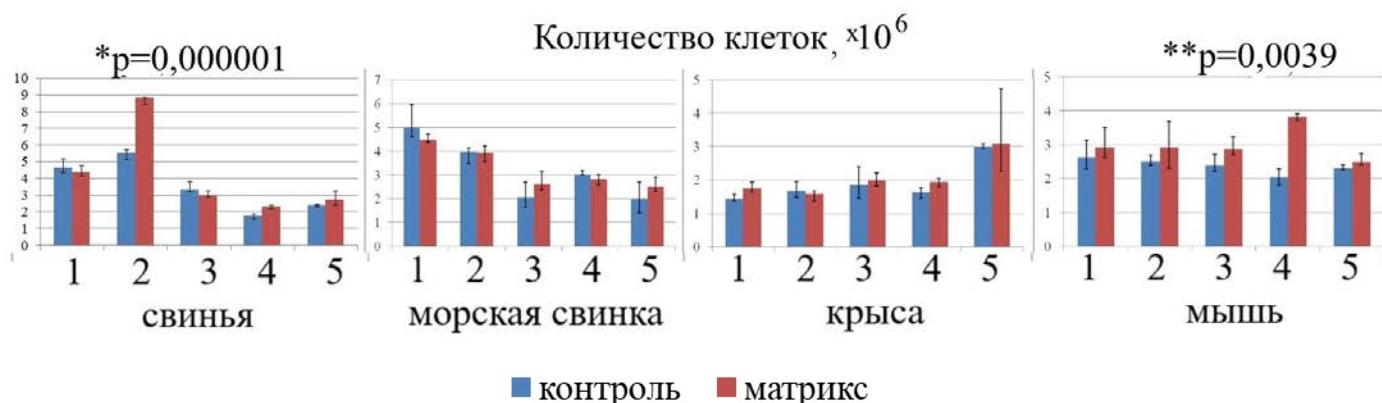


Рисунок 13 – Количество клеток (1- селезенка, 2 – кора головного мозга, 3 – печень, 4 – кожа, 5 – сердце) на 21-е сутки культивирования в присутствии матрикса и в контроле

Количество клеток коры головного мозга свиньи и клеток кожи мыши на 21 сутки культивирования статистически значимо превышало показатели в контроле.

Жизнеспособность выделенных популяций клеток также была сопоставима с контролем (рисунок 14). Процент жизнеспособных клеток коры головного мозга морских свинок и кожи мышей был статистически значимо выше по сравнению с контролем.

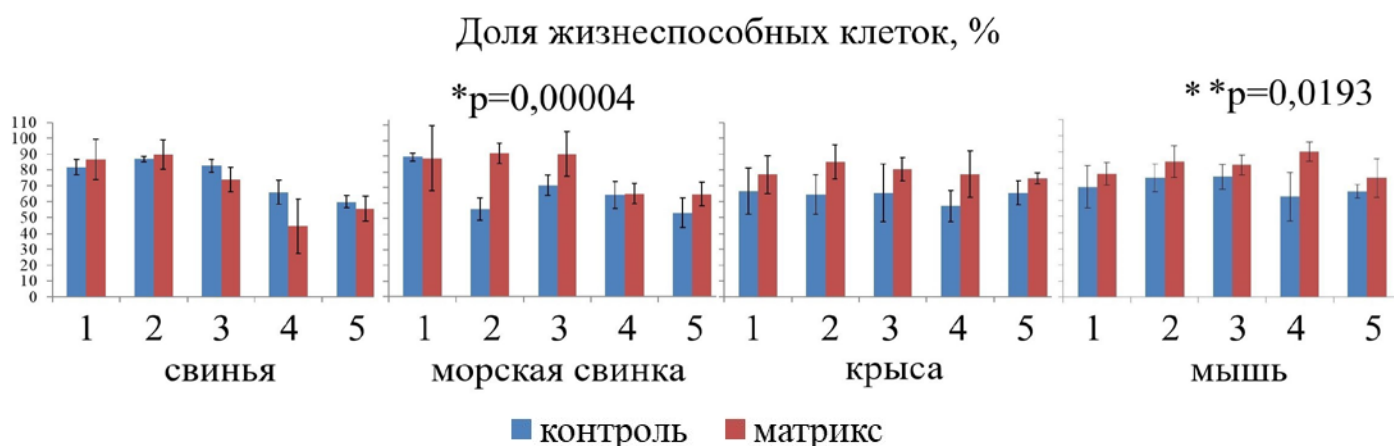


Рисунок 14 – Доля жизнеспособных клеток (1- селезенка, 2 – кора головного мозга, 3 – печень, 4 – кожа, 5 – сердце) на 21-е сутки культивирования в присутствии матрикса и в контроле.

Таким образом, матрикс из ДВС пуповины человека не проявляет цитотоксических свойств и целесообразно исследовать его биологическую активность на моделях *in vivo*.

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

На ранних сроках исследования матрикс обнаруживается в составе кровяного сгустка (рисунок 15В, Г, Ж, З; зеленые стрелки). После первичной альтерации возникшая сосудистая реакция в тканях, окружающих зону дефекта, имела незначительные отличия в опыте и контроле. Наблюдали расширение просвета артериол и капилляров с явлениями стаза и периваскулярного отека с эмиграцией гранулоцитов в область дефекта. Спустя трое

суток наблюдали умеренную инфильтрацию мононуклерных фагоцитов в тканях областей дефектов двух групп. К седьмым суткам после имплантации матрикса отмечали более интенсивное заполнение пространства раневого дефекта грануляционной тканью по сравнению с контролем. Фрагменты матрикса визуализируются не только в составе струпа, но и в толще грануляционной ткани (рисунок 15Л, М; зеленые стрелки). В составе грануляционной ткани наблюдали созревающие сосуды и пролиферацию фибробластов, прикрепляющихся к матриксу.

Спустя две недели области дефектов, содержащих матрикс, полностью заполнены грануляционной тканью (рисунок 15П, Р). Интенсивных воспалительных реакций в областях ран, а также клеточных реакций на присутствие «инородного тела» не обнаружено. Эпителизация дефекта под струпом завершена полностью (рисунок 15П, Р; желтая стрелка). В контрольной группе эпителизация дефекта не завершена (рисунок 15Н, О голубая стрелка).

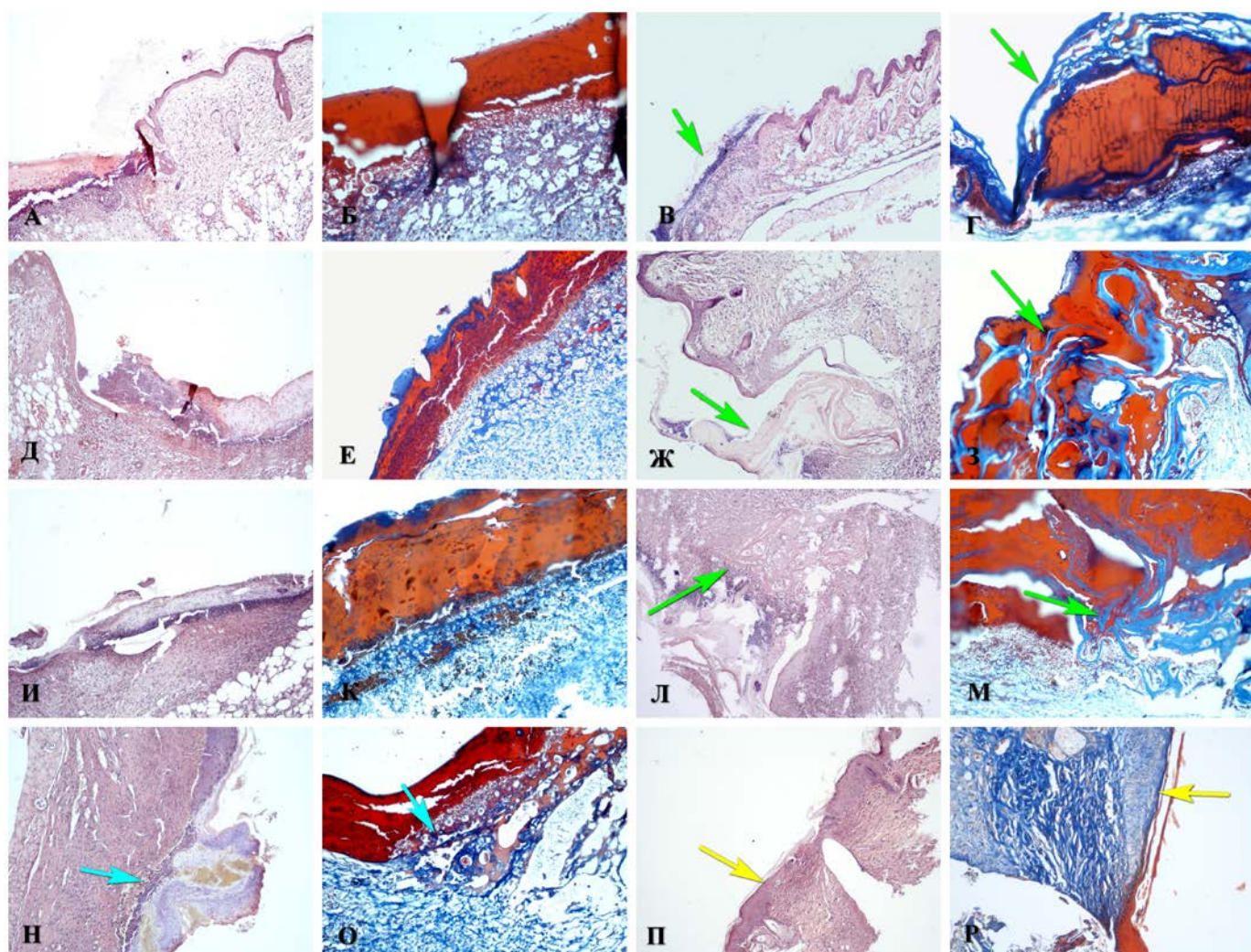


Рисунок 15 – Области полнослойных ран кожи мышей, 1-е сутки в контроле (А, Б) и опыте (В, Г); 3-и сутки в контроле (Д, Е) и опыте (Ж, З); 7-е сутки в контроле (И, К) и опыте (Л, М); 14-е сутки в контроле (Н, О) и опыте (П, Р). Стрелки: зеленые – матрикс, желтая – эпителий; голубая – отсутствие полной эпителизации. А, В, Д, Ж, И, Л, Н, П – окраска гематоксилином и эозином, ув. ×100; Б, Г, Е, З, К, М, О, Р – окраска по Гейденгайну, ув. ×200

Таким образом, в эксперименте *in vivo* показано, что заживление полнослойных кожных ран у мышей в присутствии матрикса из децеллюляризованной пуповины отличалось умеренно выраженными процессами альтерации, сосудистых реакций и селективной фокусировки лейкоцитов, близких к контролю. Эпителизация в присутствии матрикса, в отличие от контроля, произошла полностью. Постепенная деградация помещенного в раны матрикса сопровождалась активным заполнением ложа раневого дефекта грануляционной тканью и ее созреванием.

Влияние матрикса из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека на заживление полнослойных кожных ран у свиньи

Имплантация матрикса из ДВС пуповины человека в область полнослойных дефектов кожи свиньи сопровождалась активным его пропитыванием жидкой частью крови и набуханием. Показанная пористость и присутствие в матриксе ГАГ способствуют увеличению его массы при контакте с кровью. В зоне имплантации не наблюдали внешних признаков воспалительной реакции, таких как отек, гиперемия и повышение температуры в месте имплантации. Интенсивное заполнение пространства дефектов грануляционной тканью наблюдали уже спустя неделю. В ране, содержащей матрикс из ДВС пуповины человека под струпом наблюдали формирующийся слой эпителия (рисунок 16)

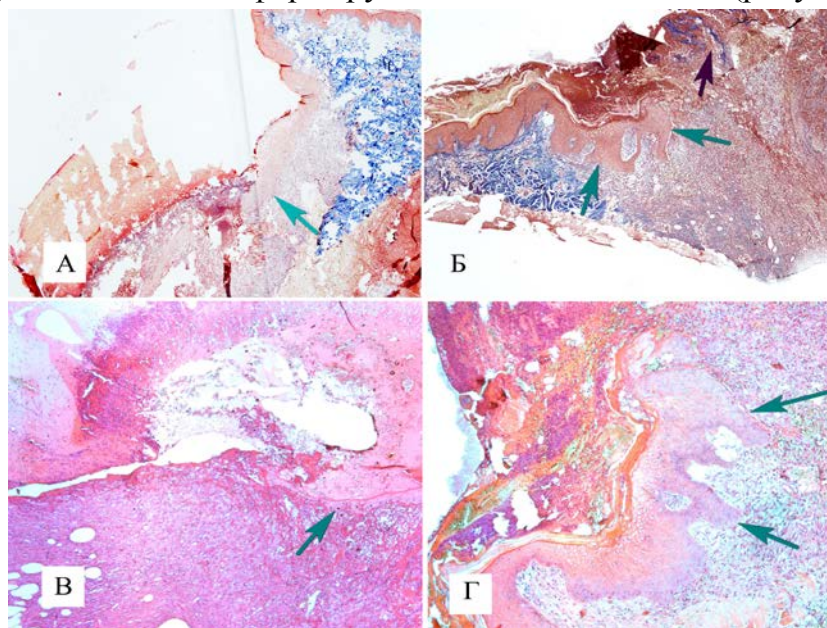


Рисунок 16 – Области полнослойных ран кожи свиньи, содержащих матрикс (Б, Г) и контроле (А, В), 7-е сутки. Стрелками отмечен формирующийся эпителий. А, Б – окраска по Массону, ув. ×40; В, Г – окраска гематоксилином и эозином, ув. ×50

Таким образом, в эксперименте *in vivo* показано, что имплантация матрикса из ДВС пуповины человека в полнослойные кожные раны свиньи 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 ремоделированию. Эпителий в ранах, содержащих матрикс из ДВС пуповины человека, формировался активнее, чем в контроле.

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- β 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- β 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.

Выражаю глубокую и искреннюю благодарность начальнику отдела медико-биологических исследований НИЦ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации – д.м.н. Р.И. Глушакову, и сотрудникам этого отдела – к.б.н. В.Е. Чернову и М.О. Соколовой; сотрудникам отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России – д.б.н., профессору В.И. Севастьянову и к.б.н. Л.А. Кирсановой, сотруднику ФГБУН «Институт цитологии» РАН Министерства науки и образования Российской Федерации О.И. Александр-Синклер за их неоценимую помощь и участие в проведении экспериментальных исследований.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) **Калюжная, Л.И.** 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, Д. А. Земляной, С. В. Чеботарев, Н. И. Чалисова, **А. А. Кондратенко**, Ю. С. Гречанная, Н. В. Едоменко, Э. И. Александер-Синклер // *Гены и клетки*. - 2021. – Т.16. - №3. – С. 72 – 79.
- 2) **Кондратенко, А.А.** Сохранность важнейших структурных компонентов пуповины человека после децеллюляризации как этапа изготовления высокорегенеративного раневого покрытия. / **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, М.О. Соколова, В.Е. Чернов // *Биотехнология*. - 2021. – Т.37. - №5. – С. 61-65.
- 3) **Кондратенко, А.А.** Микроскопический анализ структуры и компонентного состава тканеинженерного каркаса из пуповины человека как основы раневого покрытия / **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, М.О. Соколова, В.Е. Чернов // В книге: Биотехнология: состояние и перспективы развития, материалы международного конгресса. - 2021. – С. 33-34.
- 4) **Кондратенко, А.А.** Тканеинженерный бесклеточный каркас из пуповины человека модифицирует пролиферативную активность и жизнеспособность клеток кожи разных лабораторных животных. / **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, М.О. Соколова, Н.И. Чалисова // *Иппология и ветеринария*. – 2021. – Т. 41. - №3. – С. 90-99.
- 5) **Кондратенко, А.А.** Тканеинженерный матрикс из пуповины человека стимулирует пролиферацию клеток коры головного мозга, кожи, селезенки крыс. / **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, Н.И. Чалисова // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. – 2021. - №3. – С. 89-90.
- 6) **Кондратенко, А.А.** Микроскопическая оценка состава тканеинженерного матрикса пуповины для регенеративной медицины. / **А.А. Кондратенко**, М.О. Соколова, В.Е. Чернов, Л.И. Калюжная, Р.И. Глушаков // В сборнике: Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии». Сборник статей III Всероссийской научно-технической конференции. – 2021. – С. 93-100.
- 7) **Кондратенко, А.А.** Тканеинженерный продукт из пуповины человека для заживления ран. / **А.А. Кондратенко**, Д.В. Товпеко, Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов // *Гены и клетки*. – 2022. – Т.17. - №3. – С. 117.
- 8) Товпеко, Д.В. Изготовление бесклеточного продукта из высокорегенеративного материала пуповины человека для лечения глубоких ран. / Д.В. Товпеко, **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов // *Гены и клетки*. – 2022. – Т.17. - №3. – С. 230.
- 9) Руснак, М.В. Анализ состава гидрогеля из внеклеточного матрикса пуповины человека. / М.В. Руснак, Л.И. Калюжная, **А.А. Кондратенко**, Д.В. Товпеко // *Гены и клетки*. – 2022. – Т.17. - №3. – С. 199.
- 10) **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.

11) **Кондратенко, А.А.** Влияние биотехнологического продукта из пуповины человека на органотипическую культуру *invitro* и *invivo* / **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, Д.А. Решеткина, А.К. Иванова // Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии». IV научно-техническая конференции. – 2022. – С. 32-39.

12) Товпеко, Д.В. Изготовление неиммуногенного нетоксичного высокорегенеративного бесклеточного продукта из пуповины человека детергентным способом. / Д.В. Товпеко, **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, В.Е. Чернов, А.В. Нащекин, А.И. Полосков // В сборнике тезисов IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. – 2022. – С.268.

13) **Кондратенко А.А.** Исследование биологических эффектов применения тканеинженерных матрикса и гидрогеля из пуповины человека *in vivo* и *in vitro*. / **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, Д.В. Товпеко, В.С. Шевелева, Р.И. Глушаков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. XXV, №1 – С. 113-122.

14) Басок, Ю.Б. Децеллюляризованная строма пуповины в тканевой инженерии и регенеративной медицине: систематический обзор. / Ю.Б. Басок, **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, Е.А. Волкова, К.А. Воробьев, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. XXV, №2 – С. 82-98.

15) **Кондратенко, А.А.** Бесклеточный продукт из пуповины человека для заживления глубоких повреждений кожи. / **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, Д.В. Товпеко, Ю.Б. Басок // Материалы VII Национального конгресса с международным участием «Здоровые дети – будущее страны». - 2023. – Т.6, спецвыпуск 1. С. 314-316.

16) **Кондратенко, А.А.** Тканеинженерный продукт из пуповины человека как основа для создания высокорегенеративного раневого покрытия. / **А.А. Кондратенко**, Л.И. Калюжная, Д.В. Товпеко // Сборник тезисов VIII Всероссийского конгресса с международным участием «Медицинская помощь при травмах. Новое в организации и технологиях. Фактор травмы в современном мире. Травматические эпидемии и борьба с ними». - 2023. – С. 73-74.

17) Калюжная-Земляная, Л.И. Патент № 2795904 «Способ изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека для создания высокорегенеративного раневого покрытия». / Л.И. Калюжная-Земляная, Д.В. Товпеко, **А.А. Кондратенко**, Д.А. Земляной, В.Е. Чернов, С.В. Чеботарев, Д.А. Волов. // 15 мая 2023 г.

ПАТЕНТ

Калюжная-Земляная Л.И., Товпеко Д.В., **Кондратенко А.А.**, Земляной Д.А., Чернов В.Е., Чеботарев С.В., Волов Д.А. Способ изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека для создания высокорегенеративного раневого покрытия. Патент на изобретение RU 2795904 С1, 15.05.2023 (заявка № 2022118355 от 05.07.2022). Дата регистрации: 05.07.2022, опубликовано: 15.05.2023.

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВС – Вартонов студень

ГАГ – гликозаминогликаны

ДВС – децеллюляризованный Вартонов студень

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКСПФ – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

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

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

DAPI – 4,6-диамино-2-фенилиндол

EGF – фактор роста эпителиоцитов

FGF – фактор роста фибробластов

PDGF – фактор роста тромбоцитов

RGD – аргинил-глицил-аспарагиновая кислота

SDS – додецил сульфат натрия

TGF – трансформирующий фактор роста

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов