

УДК 611.013.8-089.843:59.089

Биологические эффекты бесклеточного тканеинженерного продукта из пуповины человека

Кондратенко А.А., Товпеко Д.В., Калюжная Л.И.

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6

Применение тканеинженерных продуктов (ТИП), состоящих из внеклеточного матрикса (ВКМ) различного происхождения, при глубоких повреждениях кожи с разрушением стромального каркаса является перспективным методом тканевой инженерии (ТИ). Широкое распространение получили препараты на основе сочетания коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ), изготовленные методами децеллюляризации биоматериалов различного происхождения. В лаборатории ТИ Военно-медицинской академии был разработан и запатентован высокорегенеративный ТИП на основе пуповины человека.

Материалы и методы. Биологические эффекты данного ТИП были изучены в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Рост и жизнеспособность клеточных популяций, выделенных из эксплантов кожи мышей, в присутствии ТИП изучали в течение 40 суток культивирования. Заживление полнослойных кожных ран в присутствии ТИП исследовали на белых мышах-самцах. Для предотвращения контракции использовали силиконовые кольца. Образцы тканей областей ран забирали на 1, 3, 7 и 14 сутки для гистологического исследования.

Результаты. Пролиферация клеток, культивированных в присутствии ТИП, была статистически значимо активнее по сравнению с клетками, культивированными в стандартных условиях: 2,63 [2,55; 2,68] и 2,03 [1,95; 2,10] $\times 10^6$ в мл соответственно. Было выявлено статистически значимое увеличение жизнеспособности клеток, культивированных в присутствии ТИП по сравнению с контролем: 91,00 [87,75; 95,25]% и 70,00 [65,00; 71,50]% соответственно. Интенсивных воспалительных реакций в областях ран, а также клеточных реакций на присутствие инородного тела у опытных и контрольных животных не было обнаружено на протяжении всего периода наблюдений. Отмечали более активные процессы ангиогенеза в тканях, окружающих рану, и образование грануляционной ткани, с содержанием зрелых сосудов, в гистологических образцах от животных опытной группы, по сравнению с контролем.

Заключение. Показанные в наших экспериментах *in vitro* и *in vivo* свойства ТИП потенциально обладают большим терапевтическим потенциалом для лечения ран.

Ключевые слова: тканеинженерный продукт; Вартонов студень пуповины человека; полнослойная кожная рана; экспланты кожи.

Для цитирования: Кондратенко А.А., Товпеко Д.В., Калюжная Л.И. Биологические эффекты бесклеточного тканеинженерного продукта из пуповины человека. Патогенез. 2022; 20(4): 53-62

DOI: 10.25557/2310-0435.2022.04.53-62

Для корреспонденции: Кондратенко Альбина Александровна, e-mail: kondraa24@gmail.com

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: Соколовой М.О., Решеткиной Д.А., Ивановой А.К., Чернову В.Е.

Поступила: 25.07.2022

Biological effects of a cell-free tissue engineering product from the human umbilical cord

KondratenkoA.A., TovpekoD.V., KalyuzhnayaL.I.

Kirov Military Medical Academy,
Akademika Lebedeva St. 6, St. Petersburg 194044, Russian Federation

The use of tissue engineering products (TIP) consisting of extracellular matrix (ECM) of various origins in deep skin lesions with destruction of the stromal framework is a promising method of tissue engineering (TI). Medicinal products based on a combination of collagen and glycosaminoglycans (GAGs) produced by the methods of decellularization of biomaterials of various origins are widely used. A highly regenerative TIP based on the human umbilical cord was developed and patented in the TI laboratory of the Military Medical Academy.

Methods. Biological effects of this TIP have been studied in *in vitro* and *in vivo* experiments. The growth and viability of cell populations isolated from mouse skin explants in the presence of TIP were studied during 40 days of cultivation. The healing of full-thickness skin wounds in the presence of TIP was studied in 64 white male mice. Silicone rings were used to prevent contraction. Tissue samples from wound areas were collected on days 1, 3, 7, and 14 for histological examination.

Results. The proliferation of cells cultured in the presence of TIP was significantly more active compared to cells cultured under standard conditions: 2.63 [2.55; 2.68], and 2.03 [1.95; 2.10] $\times 10^6$ in ml, respectively. The viability of cells cultured in the presence of TIP was significantly higher compared to the control: 91.00 [87.75; 95.25]% and 70.00 [65.00; 71.50]%, respectively. No intensive inflammatory reactions in the areas of wounds or cellular reactions to the presence of a foreign body were found in experimental and control animals throughout the entire observation period. Processes of vasculogenesis in the tissues surrounding the wound and formation of granulation tissue containing mature blood vessels were more active compared to the control.

Conclusion. The properties of TIP shown in our *in vitro* and *in vivo* experiments have a great therapeutic potential for the treatment of wounds.

Keywords: tissue engineering product; Wharton's jelly of the human umbilical cord; full-thickness skin wound; skin explants.

For citation: Kondratenko A.A., Tovpeko D.V., Kalyuzhnaya L.I. [Biological effects of a cell-free tissue engineering product from the human umbilical cord]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2022; 20(4): 53-62 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2022.04.53-62

For correspondence: Kondratenko Albina Aleksandrovna, e-mail: kondraa24@gmail.com

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The authors thank Sokolova M.O., Reshetkina D.A., Ivanova A.K., and Chernov V.E.

Received: 25.07.2022

Введение

Внеклеточный матрикс (ВКМ) является активным участником заживления ран. Известно, что ВКМ представляет собой активный и сложный тканевой компонент, который способен влиять на выживание, пролиферацию и функции клеток [1]. Разрушение стромального каркаса ткани с повреждением целостности базальной мембраны приводит к образованию рубца вместо регенерации [2]. Применение биологических матриксов из децеллюляризованных тканей является новым перспективным методом регенеративной медицины, способствующим регенеративному типу заживления. Тканеинженерные продукты (ТИП) из ВКМ воспроизводят иерархическую сложность поврежденных тканей, имитируют структурные, биохимические и механические сигналы, необходимые для привлечения клеток, а также являются источником биологически активных молекул при его деградации. Регенеративный потенциал таких ТИП сильно зависит от их пористости, компонентного состава и качества удаления генетического материала донорской ткани [3].

Биоматериалы человека для создания на их основе бесклеточных ТИП предпочтительнее доступных ксеногенных материалов. ТИП из ВКМ ксеногенного происхождения потенциально могут вызвать нежелательные иммунные реакции при имплантации реципиенту [4]. Материал аллогенного происхождения часто ограниченно доступен, особенно прижизненный, и создает риск отторжения при трансплантации [5]. Ограничения использования аутогенных трансплантатов побуждают исследователей искать альтернативные биоматериалы.

Экстраэмбриональный биоматериал доступен и не имеет этических ограничений при его использовании. Твердая слизистая соединительная ткань во-

круг сосудов пуповины человека обладает многими уникальными биохимическими характеристиками, необходимыми для создания высокорегенеративного ТИП. Вартонов студень пуповины человека является резервуаром пептидных факторов роста, его основное вещество состоит из коллагена и богато гиалуроновой кислотой и сульфатированными гликозаминогликанами (ГАГ). Его уникальной особенностью является содержание большого количества ретикулинового коллагена III типа, нефиброгенной изоформы трансформирующего фактора роста (TGF- β 3) и гиалуронана высокой молекулярной массы [6].

В лаборатории ТИ Военно-медицинской академии был разработан и запатентован высокорегенеративный ТИП на основе пуповины человека. Изготовленный бесклеточный ТИП из Вартонова студня пуповины человека, имеет уникальные свойства и состав. Продукт может быть изготовлен в различных лекарственных формах [7].

Цель. Оценить влияние разработанного ТИП из высокорегенеративного биоматериала пуповины человека на рост и жизнеспособность клеточных популяций кожи мышей *in vitro* и на процессы заживления полнослойных кожных ран мышей *in vivo*.

Материалы и методы исследования

Дизайн двухэтапного исследования на белых беспородных мышцах-самцах 3–4-месячного возраста, полученных из питомника «Рапполово» Ленинградской области, представлен в табл. 1. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с этическими принципами, утвержденными Этическим Комитетом при Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, протокол №263 (Санкт-Петербург, Россия) и установленными Европейской конвенцией по защите позво-

Таблица 1.

Дизайн двухэтапного эксперимента

Эксперимент	Опыт (исследование влияния ТИП на объект)	Контроль (без присутствия ТИП)
In vitro		
Культивирование клеток, выделенных из эксплантов кожи	4 (20) эксплантов	4 (20) эксплантов
In vivo		
Группы мышей	4 (8) мышей	4 (8) мышей

Примечание: указано количество серий экспериментов, в скобках – количество объектов в одной серии экспериментов.

ночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей [8].

Изготовление бесклеточного ТИП из пуповины человека. Материал пуповин человека был получен после самопроизвольных родов здоровых доношенных новорожденных и с информированного согласия матерей. В работе руководствовались принципами, утвержденными Этическим Комитетом при Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, протокол №203 (Санкт-Петербург, Россия). После удаления сосудов в стерильных условиях ткань пуповины измельчали и гомогенизировали (Gentle MACS™ Dissociator Milteniy Biotech, Германия). Децеллюляризацию ткани пуповины проводили 0,05% раствором додецилсульфата натрия (Биолот, Россия) в течение 24 часов при комнатной температуре в шейкере со скоростью 180 об/мин (Biosan, Латвия). Продукт промывали деионизированной водой (Аквафор, Россия) и раствором фосфатного буфера, pH 7,4 (Биолот, Россия), для удаления остатков детергента и лиофилизировали в течение 21 часа (Zirbus VaCo5II, Германия). Для измельчения ТИП растирали в керамической ступке с использованием жидкого азота. Стерилизацию ТИП проводили ультрафиолетом в боксе микробиологической безопасности LAMSYSTEMS мощностью потока UV-C излучения 12 Вт в течение 15 мин. Полученный ТИП хранили герметично упакованным при температуре – 20°C.

Оценка влияния ТИП на пролиферацию и жизнеспособность клеточных популяций, выделенных из эксплантов кожи мышей. Фрагменты кожи размером около 1 мм³ от четырех мышей (масса тела 21,95±0,65 г), извлеченные в стерильных условиях и трижды промытые физиологическим раствором с антибиотиками (пенициллин, стрептомицин для культур клеток, Биолот, Россия), центрифугировали (LMC-4200R BioSan; 3500 об/мин, 10 мин). На дне чашек Петри для культур клеток (Jet Biofil, Китай) на расстоянии 3 мм друг от друга располагали по 10 полнослойных эксплантов кожи, чашки помещали в термостат (Binder BD 115, Германия) при температуре 37±0,1°C на 30 мин для прикрепления. Далее добавляли по 3 мл питательной среды в каждую чашку. Культуральная среда (pH 7,2) содержала 35 мл раствора Хенкса (Биолот, Россия), 35% среды Игла МЕМ с L-глутамином (Биолот, Россия), 25% фетальной сыворотки теленка (NuClone, США), глюкозу 0,6% (Гротекс, Россия), инсулин 0,5 ЕД/мл (Фармстандарт, Россия), гентамицина для культур клеток 100 ЕД/мл (Биолот, Россия). После получения первичной смешанной популяции клеток фибробластоподобной морфологии культуру вели с пересевами каждые 7 сут с разведением 1:5 в культуральных флаконах 25 см² (Thermo scientific, США). ТИП из пуповины человека (1 мг/мл) был помещен и в экспериментальные чашки Петри при выделении клеток из эксплантов кожи мышей, и в экспериментальные флаконы при культивировании на протяжении всего исследования.

Клеточный материал 4-го пассажа (40-е сутки от начала культивирования) открепляли от пластика раство-

ром трипсин-Версена 0,02% (Биолот, Россия) в соотношении 1:3 при температуре 37°C в течение 5–7 мин. После инактивации трипсина питательной средой с фетальной бычьей сывороткой клеточный материал осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 5 мин. 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 с. Далее подсчитывали число живых (не окрашенных) и погибших (окрашенных синих) клеток на 100 кариоцитов. Рассчитывали долю (%) гибели клеток. Все расчеты производили в 4 опытных и 4 контрольных флаконах.

Исследование влияния ТИП из пуповины человека на организм лабораторных мышей in vivo. Анестезированным (Ксила, Эстония, в дозировке 100 мг/кг) животным массой тела 24,25±0,48 г в асептических условиях на предварительно освобожденную от шерсти область холки скальпелем наносили полнослойную кожную рану диаметром 1,2 см.

У грызунов имеются анатомические особенности кожи, их раны в большей степени закрываются путем контракции мышечного слоя (*panniculus carnosus*). Для предотвращения спонтанного стягивания кожи антиконтракционные силиконовые кольца диаметром 1,4 см были пришиты к краям дефектов кожи хирургической нитью 6-0 Surgipro II (Medtronic, США). Выбранным случайным образом животным опытной группы в рану помещали измельченный стерильный ТИП массой около 0,01 г. Всем животным в область раны капали 0,2 мл раствора стерильного раствора Рингера pH 7,4. Для предотвращения высыхания и загрязнения дефекты кожи всех мышей бесконтактно закрывали парафиновой пленкой (рис. 1).

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-е, 3-е, 7-е, 14-е сутки от начала эксперимента по 2 животных в каждой группе серии выводили из эксперимента передозировкой паров эфира. Ткани в области раны после извлечения фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 час. После гистологической обработки в спиртах различной концентрации образцы заливали в парафин. Изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином и по Гайденгайну. Препараты анализировали с помощью микроскопа Axio Image 2M (Carl Zeiss, Германия). Подсчет количественных данных проводили в программе ImageJ. Определяли удельную площадь сосудов (и их средний диаметр) в тканях окружающих раневой дефект и удельную площадь сосудов грануляционной ткани.

Статистическую обработку количественных данных проводили с помощью непараметрического кри-

терия Манна–Уитни. Различия считали значимыми на уровне $p < 0,05$ (Statistics 7.0). Количественные данные представлены в виде медианы, 25% и 75% квартилей (Me [Q1; Q3]), масса тела животных представлена в виде среднего арифметического и ошибки среднего ($M \pm m$).

Результаты исследования

Изготовленный ТИП из Вартонова студня пуповины человека бесклеточный, имеет гетеропористую структуру и может быть измельчен (рис. 2). ТИП содержит коллагены и ГАГ. Специальными методами иммуногистохимического окрашивания выявлено присутствие в готовом лиофилизированном продукте важ-

нейших компонентов базальных мембран (ламинин, коллаген IV типа). Подробное описание свойств и состава полученного продукта представлено в наших опубликованных работах [7].

Неоднородность и динамичность фенотипа субпопуляций фибробластов даже в пределах одного типа ткани определил наш выбор модели *in vitro*. Преимуществом эксплантов является сохранение целостности базальной мембраны и возможность исследовать местное воздействие биологически активных веществ, при исключении действия нервной и эндокринной систем. В течение первых 7 сут происходило «выселение» клеток различных популяций, включая фибробласты и макрофаги, из края экспланта (рис. 3).

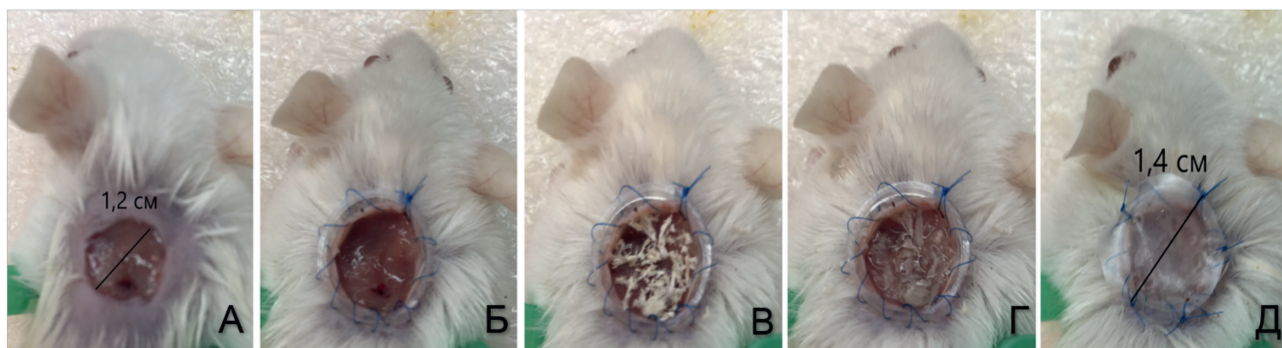


Рис. 1. Вид моделированного глубокого дефекта кожи мышей: А – полнослойная кожная рана, диаметром 1,2 см; Б – силиконовое антиконтракционное кольцо диаметром 1,4 см; В – лиофилизированный тканеинженерный продукт в области раны; Г – тканеинженерный продукт увлажнен раствором Рингера; Д – дефект бесконтактно закрыт парафиновой пленкой.



Рис. 2. Внешний вид ТИП, слева лиофилизированная форма и измельченная форма справа.

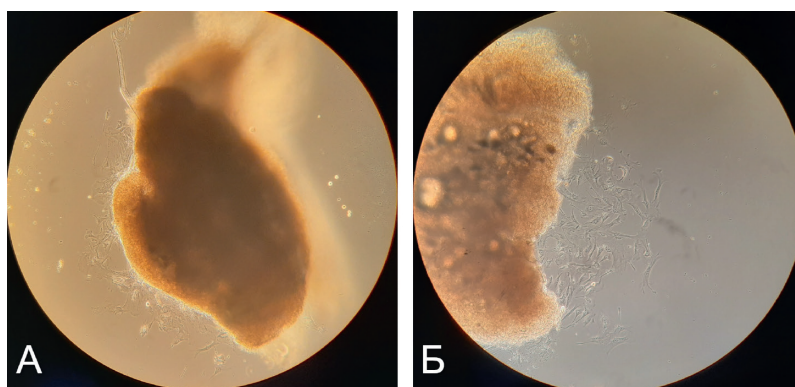


Рис. 3. Внешний вид эксплантов кожи мышей на 3-и сутки. Эксплант, культивированный в стандартных условиях (А) и в присутствии ТИП (Б); $\times 100$.

Анализ количества и жизнеспособности, выделенных и культивированных популяции клеток под влиянием ТИП, при подсчете на 40-е сутки показал следующие результаты (рис. 4). Количество клеток составило 2,63 [2,55; 2,68] и 2,03 [1,95; 2,10] $\times 10^6$ в 1 мл в опыте и контроле соответственно ($p < 0,05$). Жизнеспособность клеток составила 91,00% [87,75%; 95,25%] и 70,00% [65,00%; 71,50%] в опыте и контроле соответственно ($p < 0,05$).

В нашем эксперименте *in vitro* выявлено статистически значимое увеличение количества клеток и их жизнеспособности в присутствии ТИП по сравнению с контролем.

В связи с тем, что заживление дефектов кожи грызунов происходит за счет контракции подкожного мышечного слоя, а применение дополнительных приспособлений, ограничивающих стягивание кожи возможно на срок до 14 дней, анализ процессов заживления *in vivo* проводили на основании динамики образования и созревания грануляционной ткани, исследования активности капиллярогенеза в тканях окружающих рану.

В течение первых суток после первичной альтаерации возникшая сосудистая реакция в тканях, окружающих зону дефекта, имела незначительные отличия в опыте и контроле (рис. 5). Наблюдали расши-

рение просвета артериол и капилляров с явлениями стаза и периваскулярного отека. Удельная площадь сосудов в тканях по периферии раны 8,12 [7,70; 8,59]% и 7,32 [6,16; 8,72]% от поля зрения в опыте и контроле соответственно ($p > 0,05$). Средний диаметр сосудов в тканях, окружающих рану 23,12 [21,96; 24,87] и 25,14 [22,66; 27,80] мкм в опыте и контроле соответственно ($p > 0,05$). В образцах тканей мышечной опытной группы в ране визуализируется ТИП (рис. 5, Б). Эмиграция гранулоцитов в области дефекта у животных контрольной группы визуально была активнее, по сравнению с опытом (рис. 5, А).

На третьи сутки от операции наблюдали образование грануляционной ткани с большим количеством молодых тонкостенных сосудов, как в опыте, так и в контроле (рис. 6). ТИП был также вмонтирован с состав струпа, закрывающего рану (рис. 6, Б). В тканях, окружающих дефект, наблюдали явления венозного застоя и периваскулярного отека. Удельная площадь сосудов 6,78 [6,34; 7,36]% и 7,25 [6,95; 7,58]% от поля зрения в опыте и контроле соответственно ($p > 0,05$). Средний диаметр сосудов в тканях, окружающих рану, составил 18,05 (16,78; 19,22) и 21,59 (19,38; 23,45) мкм ($p > 0,05$); а удельная площадь сосудов грануляционной ткани – 34,90 [31,44; 38,79]% и 30,47 [26,41; 33,27]% в опыте и контроле соответственно ($p > 0,05$). На этом

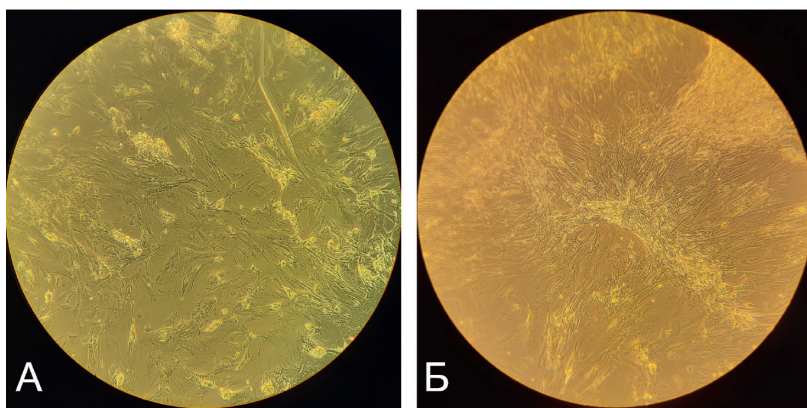


Рис. 4. Внешний вид культуры клеток фибробластоподобной морфологии, выделенных из эксплантов кожи мышечной и культивированных в течение 40-а суток. Клетки, выделенные и культивированные в стандартных условиях (А) и в присутствии ТИП (Б); $\times 100$.

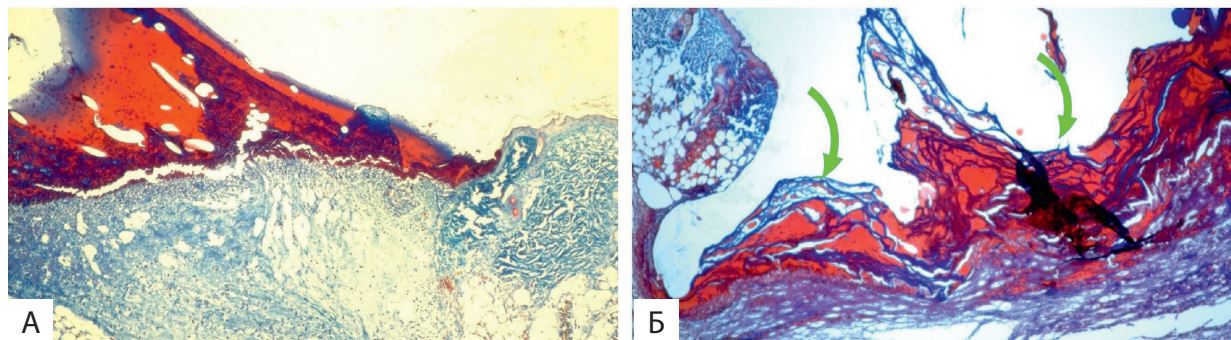


Рис. 5. Области полнослойных раневых дефектов спустя одни сутки. А – без ТИП; Б – присутствие ТИП в ране, указано стрелкой. Окраска по Гейденгайну, $\times 200$.

сроке исследования наблюдали умеренную инфильтрацию мононуклерных фагоцитов в тканях двух групп.

К седьмым суткам после имплантации ТИП у животных опытной группы отмечали более интенсивное заполнение пространства раневого дефекта грануляционной тканью по сравнению с контролем (с антиконтрационным кольцом, но без ТИП в ране, **рис. 7**). Фрагменты ТИП визуализируются в толще грануляционной ткани и не окружены при этом клетками-фагоцитами (**рис. 7, Б**). Плотность капиллярного русла в тканях, окружающих рану, у мышей опытной группы была большей по сравнению с контролем, что в фазу угасания сосудистых реакций может свидетельствовать об образовании новых капилляров. Удельная площадь сосудов в тканях вокруг ран составила 7,85 [7,26; 8,35]% и 5,64 [5,02; 6,11]% в опыте и контроле соответственно ($p < 0,05$). Средний диаметр сосудов в тканях, окружающих рану, составлял 10,42 [9,15; 11,97] и 17,48 [16,41; 18,95] мкм в опыте и контроле соответственно ($p < 0,05$). В составе грануляционной ткани наблюдали созревающие сосуды и активную пролиферацию фибробластов в препаратах двух групп. Удельная площадь сосудов грануляционной ткани 48,90 [42,19; 51,12]% и 33,67 [29,37; 39,58]% в поле зрения в опыте и контроле ($p > 0,05$).

Спустя две недели фрагменты ТИП все еще визуализируются в ране (**рис. 8, Б**). Клетки фибробластоподобной морфологии активно прикрепляются к продукту (**рис. 9**). Интенсивных воспалительных реакций в областях ран, а также клеточных реакций на присутствие «инородного тела» у опытных и контрольных животных не было обнаружено. На 14-е сутки от операции область тканевого дефекта, в который помещали ТИП, полностью заполнена грануляционной тканью, содержащей в поле зрения большое количество зрелых сосудов – 45,18 [43,55; 46,15]%. В контрольной группе область раны также выполнена грануляционной тканью, но ее высота неоднородна, а плотность сосудов меньшая – 36,27 [34,01; 38,21]% и степень их зрелости менее выражена (**рис. 8, А**) ($p < 0,05$). Постепенная деградация помещенного в раны ТИП сопровождалась активным заполнением ложа раневого дефекта грануляционной тканью и ее созреванием. Удельная площадь сосудов тканей, окружающих рану с ТИП, составила 7,43 [6,70; 8,19]% и 5,61 [5,25; 5,89]% в опыте и контроле соответственно ($p < 0,05$). Средний диаметр сосудов был 10,59 [8,18; 12,63] и 11,98 [9,96; 13,77] мкм в опыте и контроле соответственно ($p > 0,05$).

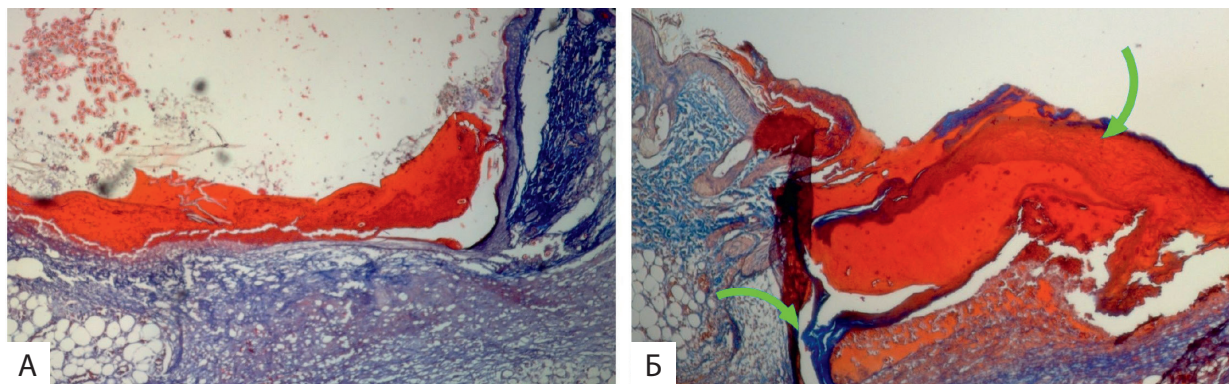


Рис. 6. Области полнослойных раневых дефектов спустя 3 суток. А – без ТИП; Б – присутствие ТИП в ране, указано стрелкой. Окраска по Гейденгайну, $\times 200$.

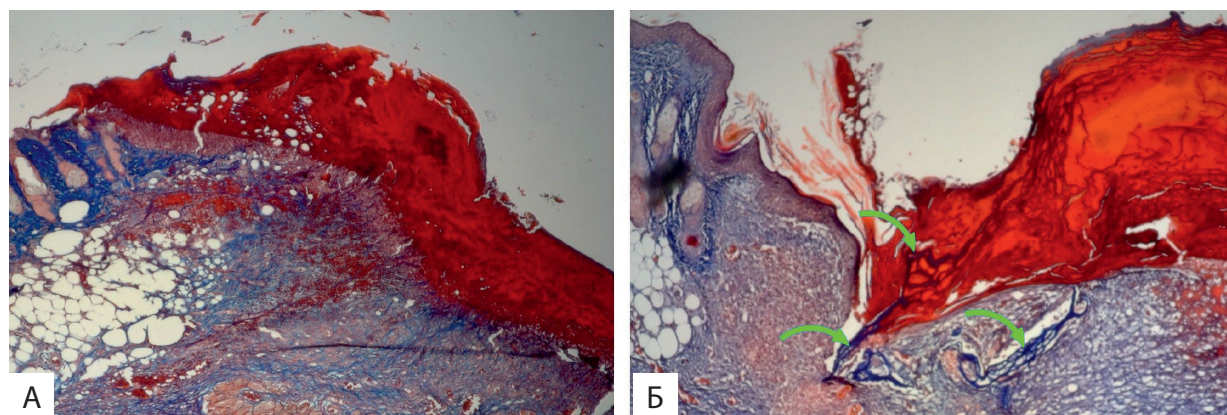


Рис. 7. Области полнослойных раневых дефектов на 7-е сутки. А – без ТИП; Б – присутствие ТИП в ране, указано стрелкой. Окраска по Гейденгайну, $\times 200$.

Таким образом, в нашем эксперименте *in vivo* показано, что заживление полнослойной кожной раны у мышей в присутствии ТИП отличалось умеренно выраженными процессами альтерации, сосудистых реакций и селективной фокусировки лейкоцитов, близких к контролю. Это может свидетельствовать как о неспособности продукта вызывать иммунный ответ *in situ*, так и о его иммуномодулирующих свойствах. Присутствие ТИП в ране сопровождалось увеличением числа капилляров в тканях, окружающих рану. Пroliferативная фаза заживления в присутствии ТИП протекала

более заметно, чем в контроле. Уже на 7-е сутки отмечали активное созревание стенки сосудов грануляционной ткани. На 14-е сутки выявлено заполнение раны грануляционной тканью, в которой фибробласты прикреплены к фрагментам ТИП.

Обсуждение

Являясь типовым патологическим процессом, воспалительная реакция развивается в тканях, имеющих развитую сосудистую сеть, в ответ на действие флого-

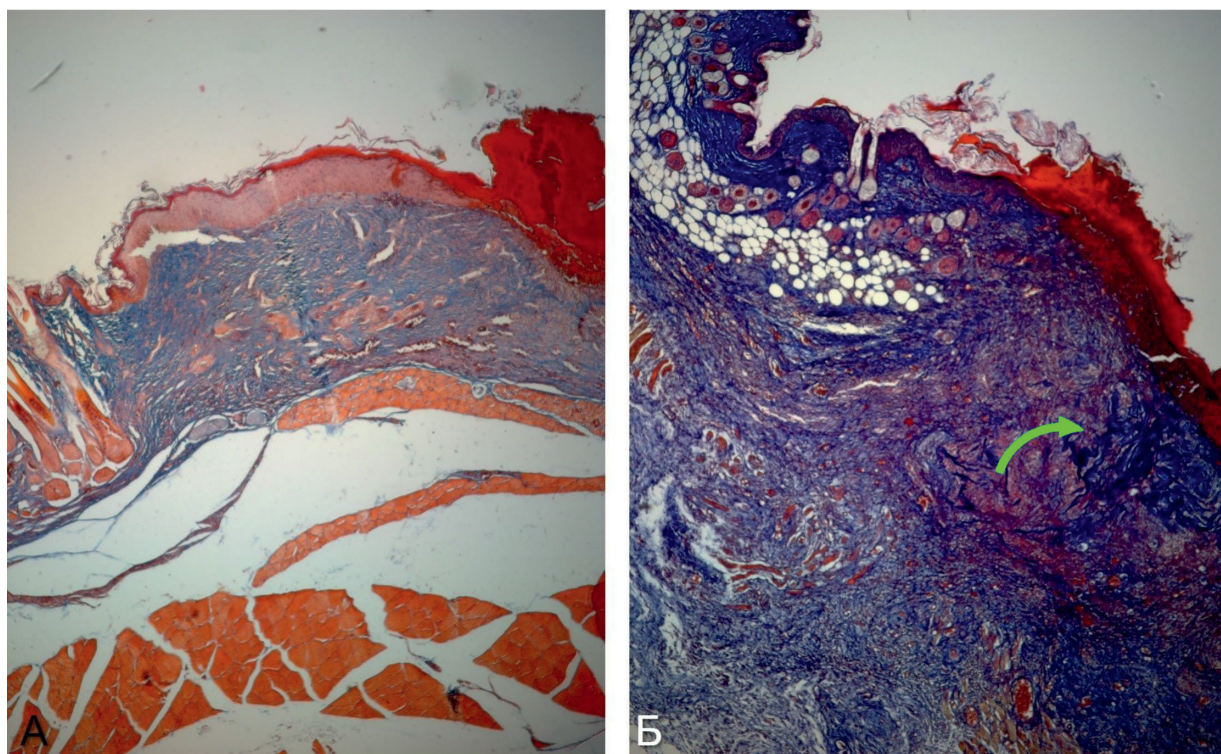


Рис. 8. Области полнослойных раневых дефектов спустя 14 суток. А – без использования ТИП; Б – с использованием ТИП (стрелка) при заживлении. Окраска по Гейденгайну, $\times 100$.

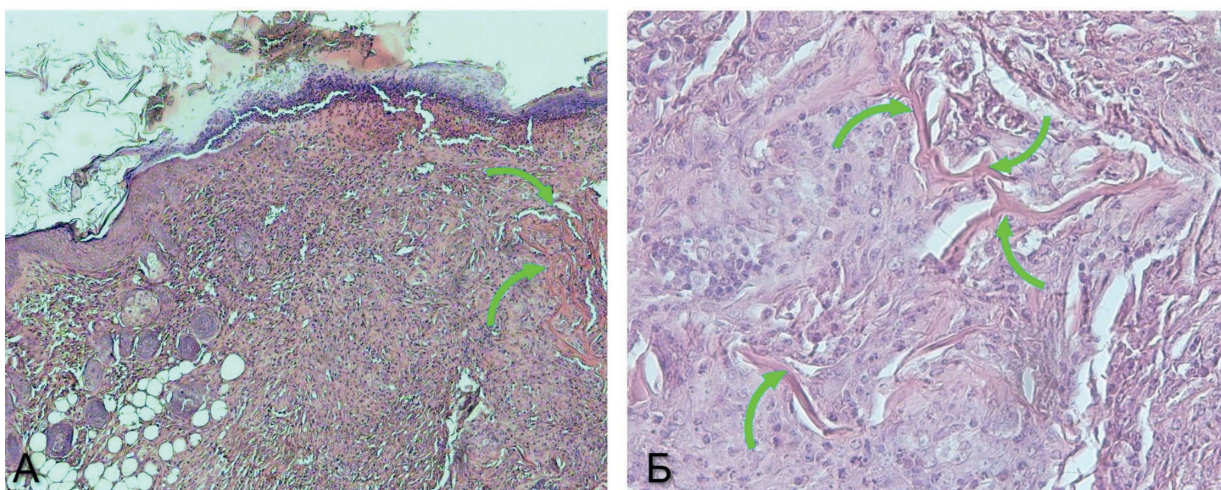


Рис. 9. Область полнослойного раневого дефекта спустя 14 суток с использованием ТИП (стрелки). Окраска гематоксилин и эозин, $\times 100$ (А) и $\times 400$ (Б).

генного 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 [9]. При закрытии дефекта эпителиоциты перемещаются горизонтально от краев раны путем активных амёбовидных движений. Клетки эпителия способны мигрировать только по ровной плоской поверхности и не спускаются в область дна раны. Следовательно, эпителизация поверхности возможна только после замещения полости дефекта достаточным количеством грануляционной ткани [10].

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 металломатриксными протеиназами 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 автономия 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 [9]. Помещенный в рану ТИП впитывал выделяющийся экссудат и частично заполнял дефект ткани, постепенно интегрируясь и замещая отсутствующий в ране ВКМ. При этом ТИП не влиял существенно на течение естественных процессов экссудации и фагоцитоза, что выразилось в отсутствии избыточного (относительно контроля) скопления нейтрофилов вблизи ТИП.

К концу первых суток в рану мигрируют активированные моноциты крови, дифференцирующиеся в макрофаги, изменяющийся спектр специализации которых определяет течение процессов заживления и сигналы преиммунного ответа [9]. Было показано, что реакция макрофагов является определяющим событием, способствующим конструктивному ремоделированию, опосредованному действием ТИП ВКМ. Многочисленные исследования подтвердили предположение о регенераторных свойствах ТИП ВКМ, полученных путем децеллюляризации тканей, в отличие от синтетических, и в значительной степени объясняются их способностью модулировать иммунные реакции реципиента [3, 11, 12].

Каппилярогенез по периферии раневого дефекта, активное образование грануляционной ткани, рост и созревание ее сосудов в присутствии ТИП в нашем

эксперименте происходили активнее. Обнаруженное в экспериментах *in vitro* положительное влияние продукта на пролиферацию и жизнеспособность клеток эксплантов кожи мышей и выявленная активная адгезия фибробластоподобных клеток к ТИП *in vivo* могут быть следствием высвобождения биологически активных молекул в процессе биодеградации продукта, описанные в научных источниках [6, 12, 13]. Их авторы выявили большое содержание в ТИП ВКМ структурных и биологически активных белков, участвующих в процессе заживления ран, таких как: коллаген, фибронектин, тенасцин, люмикан, периостин, кератин типа I и II, фибулин, бета-цепь фибриногена и др [6]. Методами масс-спектрометрии и иммуноферментного анализа было установлено, что децеллюляризованный Вартонов студень пуповины человека не только сохраняет, но содержит в большем количестве факторы роста (такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и трансформирующий фактор роста (TGF- β) и др), чем материал нативной пуповины [12]. Данный феномен может быть связан с изменением структурной организации ВКМ в процессе децеллюляризации биоматериала и биодеградации продукта. Известно, что факторы роста фиксированы в структурах ВКМ. При действии ферментов начинаются процессы гидролиза каркасных белков матрикса с высвобождением и активацией факторов роста [12, 13].

Deshpande и соавторы пришли к выводу в своих исследованиях *in vitro*, что образование хорошо организованного эпителия на бесклеточном дермальном матриксе зависит главным образом от сохранения базальной мембраны. Они заметили, что включение фибробластов в отсутствие компонентов базальной мембраны не оказывало существенного влияния на поведение кератиноцитов [3]. Подтвержденное иммуногистохимически присутствие в нашем ТИП коллагена IV типа и ламинина особенно важно для процессов адгезии клеток и эпителизации раны [7]. Коллаген IV типа, в отличие от структурных коллагенов I типа, имеет длинные, но прерывающиеся трехспиральные домены и способен образовывать слои базальной мембраны. Ламинин, гепарансульфат и другие протеогликаны, являясь компонентами базальных мембран, обеспечивают прикрепление эпителиальных клеток. Молекулы клеточной адгезии (кадгерины, интегрины, селектины) функционируют как трансмембранные рецепторы и обеспечивают взаимодействие между клетками и матриксом [14]. Основная функция протеогликанов – организация ВКМ, а также регулирование структуры и проницаемости соединительной ткани. Протеогликаны, выступая в качестве интегральных мембранных белков и активируясь при связывании с факторами роста, хемокинами или другими белками, могут выступать регуляторами воспаления, иммунного ответа, роста клеток и их дифференцировки [15]. Полученные нами результаты настоящего и предыдущих исследований позволяют считать ТИП из Вартонового студня пуповины человека источ-

ником веществ, стимулирующих рост и жизнеспособность популяций пациент-специфических клеток, их направленной миграции и адгезии к продукту.

Заключение

Пуповина человека как биоматериал обладает несомненными преимуществами для ТИП благодаря своему составу и структуре ВКМ. ТИП из пуповины человека способствует механической защите раневого дефекта, активации процессов образования новых капилляров в окружающих тканях, пролиферации фибробластов и созревания сосудов грануляционной ткани. Продукт не вызывал избыточной лейкоцитарной инфильтрации, отека и регресса образования новых капилляров. Показанные свойства ТИП, обеспечивающие условия для адгезии потенциально обладают большим терапевтическим потенциалом для лечения ран. Следующим этапом нашего исследования является изучение влияния ТИП на заживление полнослойных кожных ран у животных с анатомическим строением кожи, подобным коже человека (свиньи).

Авторский вклад

Кондратенко А.А. — экспериментальная работа с мышами и эксплантами кожи, обработка результатов, дизайн исследования, написание статьи.

Товпеко Д.В. — изготовление ТИП, написание статьи.

Калюжная Л.И. — руководство, написание статьи.

Список литературы

1. Tracy L.E., Minasian R.A., Caterson E.J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2016; 5(3): 119–136. DOI: 10.1089/wound.2014.0561
2. Yannas I.V. Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early fetal regeneration. *J. R. Soc. Interface*. 2005; 2: 403–417. DOI: org/10.1098/rsif.2005.0062
3. Eweida A.M., Marey M.C. Natural Extracellular Matrix Scaffolds for Skin Regeneration: Do They Really Need Cells? *BioMed Res. Int*. 2015; 839694: 9. DOI: org/10.1155/2015/839694
4. Bohuslavskiy K., Bozhok G., Legach E., Furda I., Bondarenko T. Gal- α -1,3-Gal Epitope: Role in Cell Biology and Transplantation. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016; 26(1): 3–12. DOI: 10.15407/cryo26.01.003
5. Dan P., Velot E., Francius G., Menu P., Decot V. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: an untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. *Acta Biomater*. 2016; 48: 227–237. DOI: org/10.1016/j.actbio.2016.10.018
6. Jadalannagari S., Converse G., McFall C., Buse E., Filla M., Villar M.T., Artigues A., Mellot A.J., Wang J., Detamore M.S., Hopkins R.A., Aljaitawi O.S. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. *PLOS One*. 2017; 12(2): e0172098. DOI: 10.1371/journal.pone.0172098
7. Кондратенко А.А., Калюжная Л.И., Соколова М.О., Чернов В.Е. Сохранность важнейших структурных компонентов пуповины человека после децеллюляризации как этапа изготовления высокорегенеративного раневого покрытия. *Биотехнология*. 2021; 37(5): 61–65. DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-5-61-65
8. 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: 22.02.2022 г.)

9. Чурилов Л.П. О системном подходе в общей патологии: необходимость и принципы патоинформатики. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*. 2009; 11(3): 5–23.
10. Силина Е.В., Мантурова Н.Е., Артюшкова Е.Б., Литвицкий П.Ф., Васин В.И., Синельникова Т.Г., Гладченко М.П., Крюков А.А., Ананьев А.В., Каплин А.Н., Наимзада М.Д.З., Ступин В.А. Динамика заживления кожной раны при применении инъекционных стимуляторов регенерации у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(3): 54–63. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.54-63
11. Dziki J.L., Wang D.S., Pineda C., Sicari B.M., Rausch T., Badylak S.F. Solubilized extracellular matrix bioscaffolds derived from diverse source tissues differentially influence macrophage phenotype. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2017; 105A: 138–147. DOI: 10.1002/jbm.a.35894
12. Dubus M., Scomazzon L., Chevrier J., Montanede A., Baldit A., Terryn C., Quilès F., Thomachot-Schneider C., Gangloff S.C., Bouland N., Gindraux F., Rammal H., Mauprivez C., Kerdjoudj H. Decellularization of Wharton's Jelly Increases Its Bioactivity and Antibacterial Properties. *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2022; 10: 828424. DOI: org/10.3389/fbioe.2022.828424
13. Ramzan F., Ekram S., Frazier T., Salim A., Mohiuddin O.A., Khan I. Decellularized Human Umbilical Tissue Derived Hydrogels Promote Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering (Basel)*. 2022; 9: 239. DOI: org/10.3390/bioengineering 9060239
14. Arimori T., Miyazaki N., Mihara E., Takizawa M., Taniguchi Y., Cabañas C., Sekiguchi K., Takagi J. Structural mechanism of laminin recognition by integrin. *Nat. Commun*. 2021; 12: 4012. DOI: org/10.1038/s41467-021-24184-8
15. Beiki B., Zeynali B., Seyedjafari, E. Fabrication of a Three Dimensional Spongy Scaffold Using Human Wharton's Jelly Derived Extra Cellular Matrix for Wound Healing. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl*. 2017; 78: 627–638. DOI:10.1016/j.msec.2017.04.074

References

1. Tracy L.E., Minasian R.A., Caterson E.J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2016; 5(3): 119–136. DOI: 10.1089/wound.2014.0561
2. Yannas I.V. Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early fetal regeneration. *J. R. Soc. Interface*. 2005; 2: 403–417. DOI: org/10.1098/rsif.2005.0062
3. Eweida A.M., Marey M.C. Natural Extracellular Matrix Scaffolds for Skin Regeneration: Do They Really Need Cells? *BioMed Res. Int*. 2015; 839694: 9. DOI: org/10.1155/2015/839694
4. Bohuslavskiy K., Bozhok G., Legach E., Furda I., Bondarenko T. Gal- α -1,3-Gal Epitope: Role in Cell Biology and Transplantation. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2016; 26(1): 3–12. DOI: 10.15407/cryo26.01.003
5. Dan P., Velot E., Francius G., Menu P., Decot V. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: an untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. *Acta Biomater*. 2016; 48: 227–237. DOI: org/10.1016/j.actbio.2016.10.018
6. Jadalannagari S., Converse G., McFall C., Buse E., Filla M., Villar M.T., Artigues A., Mellot A.J., Wang J., Detamore M.S., Hopkins R.A., Aljaitawi O.S. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. *PLOS One*. 2017; 12(2): e0172098. DOI: 10.1371/journal.pone.0172098
7. Kondratenko A.A., Kalyuzhnaya L.I., Socolova M.O., Chernov V.E. [Preservation of the most important structural components of the human umbilical cord after decellularization as a stage in the manufacture of a highly regenerative wound dressing]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2021; 37(5): 61–65. DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-5-61-65. (in Russian)
8. Directive of the European Parliament and of the Council of the European Union 2010/63/EU of 22 Sept. 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [Electronic resource]. *Guarantor: information and legal support*. Available at: <http://base.garant.ru/70350564/ce210ed70e5daea1ed719396b4dabe87/> (Retrieved: 22.02.2022). (in Russian)

9. Churilov L.P. [On a systematic approach in general pathology: the need and principles of pathoinformatics]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Meditsina [Bulletin of St. Petersburg University. The medicine]*. 2009; 11(3): 5–23. (in Russian)
10. Silina E.V., Manturova N.E., Artyushkova E.B., Litvitsky P.F., Vasin V.I., Sinelnikova T.G., Gladchenko M.P., Kryukov A.A., Anikanov A. V., Kaplin A.N., Naimzada M.D.Z., Stupin V.A. [Dynamics of skin wound healing with the use of injection regeneration stimulants in rats]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2020; 64(3): 54–63. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.03.54-63. (in Russian)
11. Dziki J.L., Wang D.S., Pineda C., Sicari B.M., Rausch T., Badylak S.F. Solubilized extracellular matrix bioscaffolds derived from diverse source tissues differentially influence macrophage phenotype. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2017; 105A: 138–147. DOI: 10.1002/jbm.a.35894
12. Dubus M., Scomazzon L., Chevrier J., Montanede A., Baldit A., Terryn C., Quilès F., Thomachot-Schneider C., Gangloff S.C., Bouland N., Gindraux F., Rammal H., Mauprivez C., Kerdjoudj H. Decellularization of Wharton's Jelly Increases Its Bioactivity and Antibacterial Properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022; 10: 828424. DOI: org/10.3389/fbioe.2022.828424
13. Ramzan F., Ekram S., Frazier T., Salim A., Mohiuddin O.A., Khan I. Decellularized Human Umbilical Tissue Derived Hydrogels Promote Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering (Basel)*. 2022; 9: 239. DOI: org/10.3390/bioengineering 9060239
14. Arimori T., Miyazaki N., Mihara E., Takizawa M., Taniguchi Y., Cabañas C., Sekiguchi K., Takagi J. Structural mechanism of laminin recognition by integrin. *Nat. Commun.* 2021; 12: 4012. DOI: org/10.1038/s41467-021-24184-8
15. Beiki B., Zeynali B., Seyedjafari, E. Fabrication of a Three Dimensional Spongy Scaffold Using Human Wharton's Jelly Derived Extra Cellular Matrix for Wound Healing. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017; 78: 627–638. DOI:10.1016/j.msec.2017.04.074

Сведения об авторах:

Кондратенко Альбина Александровна — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории тканевой инженерии научно-исследовательского отдела медико-биологических исследований Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-0161-5977>

Товпеко Дмитрий Викторович — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории военной терапии научно-исследовательского отдела экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0003-0286-3056>

Калюжная Лидия Ивановна — старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории тканевой инженерии научно-исследовательского отдела медико-биологических исследований Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0001-6698-4872>