

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ВОЕННОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЕННО-МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С.М.КИРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ОБОРОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Товпеко Дмитрий Викторович

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА
ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ
ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Калюжная-Земляная Лидия Ивановна

Санкт-Петербург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС КАК ОСНОВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1 Внеклеточный матрикс: основные компоненты, функции и роль при заживлении ран	17
1.1.1 Коллаген	18
1.1.2 Фибронектин.....	21
1.1.3 Ламинины.....	23
1.1.4 Эластин.....	23
1.1.5 Гликозаминогликаны и протеогликаны.....	24
1.2 Децеллюляризация тканей и органов как перспективный метод получения тканеинженерных продуктов	27
1.2.1 Физические методы обработки	27
1.2.2 Химические методы обработки	29
1.2.3 Ферментативные методы обработки	32
1.2.4 Оценка качества децеллюляризации	34
1.3 Клиническое применение децеллюляризованного внеклеточного матрикса	35
1.4 Потенциал использования биологического материала пуповины человека в тканевой инженерии и регенеративной медицине	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	56
2.1 Забор материала	56
2.2 Изготовление тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека.....	56
2.2.1 Получение матрикса	57
2.2.2 Получение гидролизата	58
2.3 Оценка эффективности децеллюляризации	59
2.3.1 Гистологический анализ образцов	59
2.3.2 Флуоресцентная микроскопия для выявления клеточных ядер.....	60
2.3.3 Количественное определение двухцепочечной ДНК.....	60

2.3.4 Электрофоретическое разделение молекул ДНК в агарозном геле в присутствии бромистого этидия	60
2.3.5 Количественное определение остаточного содержания додецилсульфата натрия.....	61
2.4 Оценка компонентного состава	62
2.4.1 Количественное определение гидроксипролина и общего коллагена	62
2.4.2 Количественное определение гликозаминогликанов	64
2.4.3 Метод масс-спектрометрического секвенирования пептидов и определение их аминокислотных последовательностей	65
2.5 Оценка структурных и морфологических характеристик	66
2.5.1 Метод сканирующей электронной микроскопии	66
2.5.2 Метод определения пористости	67
2.5.3 Метод инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье	67
2.6 Оценка биологического действия	68
2.6.1 Оценка на цитотоксичность методами <i>in vitro</i>	68
2.6.2 Оценка гемосовместимости <i>in vitro</i>	69
2.6.3 Оценка биологической реакции подкожной ткани	71
2.7 Статистические методы анализа результатов	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	73
3.1 Качество децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека	73
3.2 Компонентный состав Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации	79
3.3 Структура и морфология тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека	97
3.4 Влияние тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека на фибробласты дермы и фетальные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека	102
3.5 Гемолитическая активность тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека	107
3.6 Тканевая реакция на подкожную имплантацию тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	112

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Лабораторный регламент на производство тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека	141
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Технологическая схема производства тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека (проект).....	142
ПРИЛОЖЕНИЕ В. Акт внедрения результатов диссертационного исследования в работу научных и клинических подразделений.....	150
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Акт внедрения результатов диссертационного исследования в учебный процесс.....	152
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Патент на изобретение № 2795904 «Способ изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека для создания высокорегенеративного раневого покрытия»	153
ПРИЛОЖЕНИЕ Е. Патент на изобретение № 2816034 «Способ применения бесклеточного лиофилизированного продукта из пуповины человека для заживления ран»	154
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж. Статистическая оценка качества децеллюляризации, а также структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Повреждения мягких тканей и кожных покровов, вызванные механическими, термическими или иного генеза травмами, являются распространенной патологией как в условиях мирного, так и военного времени [1–3]. Результаты хирургического лечения таких повреждений зависят от характера и механизма нанесения ран, степени их инфицированности, течения воспалительно-репаративного процесса, а также от качества и сроков оказания медицинской помощи. Обширные или длительно незаживающие раны способны привести к значительным функциональным, физиологическим и серьезным косметическим дефектам, которые существенно снижают качество жизни пациентов, увеличивают время и стоимость лечения, а также могут стать причиной тяжелых осложнений, вплоть до летального исхода [4]. Существующие стандарты в современной медицине предполагают использование собственных тканей пациента для замещения обширных дефектов – аутопластики [5]. Однако дополнительный объем хирургического вмешательства и травматичность донорского участка ограничивают применение традиционных стратегий лечения и не всегда приводят к желаемым результатам [6]. Дальнейшее совершенствование сугубо хирургических методов, инструментов, оборудования, квалификации врачей уже не позволяет существенно улучшить результаты лечения пациентов данного профиля, так как предел влияния указанных факторов ограничен биологическим потенциалом тканей к восстановлению. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины представляются как перспективные терапевтические решения проблемы восстановления структуры и функций поврежденных тканей и органов. Ключевая задача заключается в разработке тканеинженерных конструкций, предназначенных для имплантации, с применением биосовместимых материалов как самостоятельно, так и в сочетании с клетками и другими биологическими препаратами [7; 8]. Особое внимание уделяется поиску высокорегенеративных биоматериалов и созданию на их основе тканеинженерных конструкций, способствующих

улучшению условий естественного течения раневого процесса, повышению качества лечения и сокращению сроков восстановления тканей. Биоматериал должен быть структурно и функционально близким к нативной структуре заменяемой ткани и/или органа, выполняя не только роль трехмерного механического каркаса, но и создавая оптимальные условия для адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток, что обеспечивает эффективное восстановление поврежденных участков [5; 7; 8].

В настоящее время при изготовлении тканеинженерных конструкций в качестве каркаса применяют различные материалы природного и/или синтетического происхождения [5–8]. Однако наибольший интерес вызывает биологический материал, получаемый из тканей и органов человека и животных путем их децеллюляризации с сохранением структуры и архитектоники естественного внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ представляет собой высокотканеспецифичную трехмерную сеть, состоящую в основном из коллагенов, фибронектина, ламининов, эластина, протеогликанов и гликозаминогликанов (GAG) [9; 10]. Компоненты ВКМ играют ключевую роль в формировании клеточной ниши, регулируя процессы адгезии, миграции, дифференцировки, пролиферации и роста клеток, обеспечивая им структурную и биохимическую поддержку, необходимые для морфогенеза и гомеостаза тканей [5; 10]. Важно подчеркнуть, что ВКМ характеризуется уникальным биохимическим составом и структурной организацией, специфичными для каждой ткани, что открывает широкие перспективы для развития тканевой инженерии и регенеративной медицины. Ткани провизорных органов, обеспечивающие внутриутробное развитие плода и прекращающие функционирование после рождения ребенка, к которым относятся пуповина и плацента, все чаще рассматриваются как перспективный источник не только клеток, но и биоматериалов благодаря своей высокой биосовместимости, биоразлагаемости, низкой иммуногенности и содержанию разнообразных биологически активных молекул, способствующих регенерации и ремоделированию тканей [11–25]. Особое внимание уделяется Вартонову

студню пуповины человека, представляющему собой твердую слизистую соединительную ткань внеэмбрионального происхождения [11–17; 20; 25], которая сохраняет особенности эмбрионального фенотипа, что проявляется в способности к быстрой регенерации повреждений и безрубцовому заживлению ран плода [11; 20; 23–25]. Эти уникальные свойства делают пуповину человека наиболее подходящим высокорегенеративным, доступным и возобновляемым биологическим материалом гомологичного происхождения. При этом ее использование не сопровождается этическими или юридическими ограничениями, что делает данный подход особенно привлекательным для исследований в области тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Степень разработанности темы исследования

Децеллюляризованный матрикс, полученный из биологического материала пуповины человека, демонстрирует высокую эффективность в экспериментах по восстановлению и регенерации различных типов тканей и органов. Исследования показывают его успешное применение для восстановления хрящевой [11–15], костной [16–18], сердечной [19] и нервной [20; 21] тканей, а также при лечении повреждений кожи и барабанной перепонки [22; 23]. Однако в значительной части этих исследований не приводится всесторонний анализ структурных, морфологических и биологических характеристик полученных материалов, что может привести к серьезным проблемам на этапе разработки и регистрации лекарственных препаратов и/или медицинских изделий на их основе, замедляя процесс внедрения инновационных решений в медицину и снижая доверие к новым технологиям со стороны научного сообщества, регуляторов и потенциальных потребителей.

Цель исследования

Разработка технологии изготовления тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека и исследование их структурных, морфологических и биологических характеристик.

Задачи исследования

1. Оценить эффективность условий децеллюляризации биологического материала пуповины человека в отношении полноты удаления клеточного и генетического материала, а также остаточного содержания агента децеллюляризации.
2. Исследовать компонентный состав матрикса Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации.
3. Провести анализ структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека.
4. Изучить биологическое действие тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна

Разработана технология изготовления тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, позволяющая сохранить несulfатированные и sulfатированные гликозаминогликаны и общий коллаген в наибольшей степени, при этом остаточное содержание клеточного и генетического материала соответствует общепринятым рекомендациям для минимизации нежелательных иммунных реакций, а содержание агента децеллюляризации находится ниже пороговых значений индуцированной детергентом цитотоксичности. Установлено, что в разработанных тканеинженерных продуктах из Вартонова студня пуповины человека присутствуют как структурные белки основного матрикса (коллагены различного типа, протеогликаны, гликопротеины), так и регуляторные, аффилированные и секретируемые вещества, относящиеся к матрикс-ассоциированным белкам. Оценены структурные и морфологические характеристики тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, включая пористость и сохранность тройной спирали коллагена. Экспериментально подтверждены гемо- и цитосовместимость тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека в исследованиях *in vitro*,

а также оценена биологическая реакция подкожной ткани на тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека методом подкожной имплантации *in vivo* мышам.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основании комплексного анализа проведенных исследований разработаны лабораторный регламент (Приложение А) и проект технологической схемы производства тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека (Приложение Б). Технология получения тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека с использованием детергентного метода децеллюляризации внедрена в работу научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (Акт внедрения от 22.05.2025, Приложение В). Использование тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека внедрено в клиническую практику кафедр (клиник) военной травматологии и ортопедии имени Г.И. Турнера и терапии усовершенствования врачей № 1 имени академика Н.С. Молчанова федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (Акт внедрения от 22.05.2025, Приложение В). Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс медицинского факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Министерства науки и высшего образования (Акт внедрения от 19.05.2025, Приложение Г).

Методология и методы исследования

Объектами исследования являлись биологический материал пуповины человека, а также образцы тканеинженерных продуктов из Вартонова студня

пуповины человека. Для оценки качества децеллюляризации биологического материала пуповины человека применяли методы гистологического окрашивания, флуоресцентной микроскопии, электрофорез в агарозном геле, спектрофотометрии и масс-спектрометрии. Компонентный состав Вартонова студня пуповины до и после децеллюляризации анализировали с помощью физико-химических методов, включая определение содержания гидроксипролина, растворимого и нерастворимого коллагена, несulfатированных (гиалуроновой кислоты) и сульфатированных гликозаминогликанов, а также изучение протеомного профиля с применением методов спектрофотометрии и масс-спектропии соответственно. Для анализа структурных и морфологических характеристик применяли методы электронной и световой микроскопии, инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, а также определение пористости с использованием этанола. Оценку цитотоксического действия тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека проводили *in vitro* двумя методами: исследованием экстрактов и методом прямого контакта на культурах фибробластов дермы и фетальных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека соответственно. Гемосовместимость оценивали по степени гемолиза эритроцитов человека *in vitro*. Модель подкожной имплантации *in vivo* у мышей использовали для оценки биологической реакции подкожной ткани на тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека.

Положения, выносимые на защиту

1. Применение детергентного метода децеллюляризации обеспечивает эффективное удаление клеточного и генетического материала с минимальным остаточным содержанием самого агента децеллюляризации, а также позволяет сохранить основные структурные и функциональные компоненты матрикса Вартонова студня пуповины человека.

2. Разработанная технология изготовления тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека позволяет получить материалы,

характеризующиеся сохранением нативной структуры коллагенов и высокой гетепористостью.

3. Тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека демонстрируют высокую гемо- и цитосовместимость в исследованиях *in vitro*, а также отсутствие выраженной тканевой реакции при подкожной имплантации *in vivo*.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов исследования обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных данных, а также применением комплекса современных стандартизированных методов анализа и статистической обработки результатов. Научная обоснованность выводов подкреплена репрезентативностью выборок, адекватностью методологического подхода поставленным задачам и объективностью используемых методик. В работе применены общепринятые и валидированные методы исследования, включая гистологические, спектрофотометрические и масс-спектрометрические, а также статистические методы анализа данных, что позволило получить релевантные, надежные и достоверные результаты и выводы.

Основные положения и результаты диссертации доложены и обсуждены на III Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Новые материалы и энергетика в ВС РФ» (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.); на Международном военно-техническом форуме «Армия-2022» (г. Кубинка Московской области, 18–22 августа 2022 г.); VIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Медицинская помощь при травмах. Новое в организации и технологиях. Фактор травмы в современном мире. Травматические эпидемии и борьба с ними» (Санкт-Петербург, 7–8 апреля 2023 г.); XXIX Всероссийской конференции молодых ученых с международным

участием «Актуальные проблемы биомедицины-2023» (Санкт-Петербург, 30–31 марта 2023 г.); V Международной конференции «Физика – наукам о жизни» (Санкт-Петербург, 16–19 октября 2023 г.); XIX Международной (XXVIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 21 марта 2024 г.); I Международном молодежном научном форуме «Медицинская весна-2024» (Москва, 16–17 мая 2024 г.); XII Всероссийском Съезде трансплантологов (Москва, 30 сентября – 2 октября 2024 г.); VI Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Санкт-Петербург, 13–15 ноября 2024 г.); V Международной Школе молодых ученых «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (Москва, 21–25 апреля 2025 г.); XI Всероссийской молодежной школе-конференции «Химия, физика, биология – пути интеграции» (Москва, 23–25 апреля 2025 г.).

Личный вклад автора

Автор лично осуществлял процедуры всех этапов изготовления тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, а также планирование и выполнение экспериментальной части работы, включая оценку качества децеллюляризации, исследование их структурных, морфологических и биологических характеристик, работу с клеточными культурами и манипуляции с лабораторными животными. Автор принимал непосредственное участие в статистической обработке, обобщении, интерпретации и представлении результатов исследования.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 20 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертаций, 14 публикаций – в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, результатам собственных исследований и их обсуждению, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 232 источника, в том числе 19 отечественных и 213 зарубежных, и приложений. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, иллюстрирована 21 рисунками, содержит 4 таблицы, 2 формулы и 7 приложений.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Представленная диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (отрасль наук – биологические): п.15. «Биоматериалы, включая системы доставки и материалы для клеточной инженерии и медицины. Разработка, получение, оценка эффективности и безопасности ... биологических макромолекул, для использования в медицине...».

Благодарности

Автор выражает благодарность ведущему научному сотруднику, руководителю группы протеомики и масс-спектрометрии Центра клеточных технологий ФГБУН «Институт цитологии» РАН Министерства науки и образования Российской Федерации к.б.н. Миттенбергу Алексею Георгиевичу за предоставленные сведения и материалы, используемые при идентификации белков методом тандемной времяпролетной масс-спектрометрии. Автор также благодарит научного сотрудника научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации к.б.н. Кондратенко Альбину Александровну за ценные консультации и помощь в планировании и проведении экспериментальных исследований.

ГЛАВА 1. ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС КАК ОСНОВА ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Заживление ран – сложный динамический и строго регулируемый биологический процесс, в котором ключевая роль принадлежит компонентам ВКМ, различным типам клеток и регуляторным молекулам [6; 26–30]. Независимо от характера раны и степени повреждения тканей раневой процесс включает несколько перекрывающихся фаз, протекающих в определенной временной последовательности: фаза воспаления, фаза регенерации (или пролиферации) и фаза созревания (или ремоделирования) [26; 28; 31; 32].

Нарушение выраженности, последовательности и длительности фаз раневого процесса часто становится причиной формирования обширных или длительно незаживающих ран, при которых заживление путем первичного или вторичного натяжения затруднено без адекватной тактики лечения [14; 26; 28; 33; 34]. Подобные раны могут вызывать не только косметические дефекты, но и приводить к серьезным функциональным и физиологическим нарушениям, существенно снижая качество жизни пациентов, увеличивая время и стоимость лечения, а также в некоторых случаях способствовать развитию осложнений, вплоть до летального исхода [4; 6].

Традиционным методом лечения обширных раневых дефектов является выполнение пересадки собственных тканей пациента – аутоотрансплантация [35]. Как правило, используют лоскуты на широком основании или на сосудистой ножке и свободные трансплантаты [36]. Однако даже при использовании современных методик сохраняется риск развития общих осложнений, таких как недостаточная перфузия крови, нарушение микроциркуляции в тканях, формирование ишемической реперфузионной травмы и ишемического некроза, что может привести к снижению приживаемости пересаженных трансплантатов [35; 37].

Так, при использовании латерального супрамаллеолярного лоскута для покрытия повреждений мягких тканей стопы и лодыжек успешное

приживление трансплантата было зафиксировано у 42 (89,4%) из 47 пациентов [38]. В то же время в другом исследовании полное приживление латерального супрамаллеолярного лоскута без осложнений наблюдалось лишь в 35 (71,6%) из 49 случаев [39]. Оценивая эффективность операций с применением свободных реvascularизированных лоскутов у пациентов с обширными посттравматическими дефектами стопы, А. П. Власов и соавт. (2020) отметили полное приживление лишь в 28 (87,5%) из 32 случаев. При этом кожно-мышечный лоскут широчайшей мышцы спины прижился в 15 (76,4%) из 17 случаев, кожно-фасциальный лоскут лопаточной области – в 3 (75%) из 4, а передней зубчатой мышцы – в 4 (80%) из 5 [37]. Среди всех пациентов полное заживление ран через первичное натяжение отмечено у 16 из 24 пациентов (66,6%), краевые некрозы до 0,5 см с последующим заживлением ран через вторичное натяжение – у 5 (20,8%), а частичный некроз до 25% поверхности – у 3 (12,5%) [37]. В исследовании S. Makhmudov и соавт. (2022) при аутодермопластике травматических повреждений кожи и мягких тканей из 124 операций полное приживление трансплантатов наблюдалось в 105 случаях (84,7%), хорошее и удовлетворительное – в 12 случаях (9,7%), а полный лизис трансплантатов зафиксирован в 7 случаях (5,6%) [40].

На сегодняшний день предпринимаются многочисленные попытки повышения выживаемости лоскутов, включая пре- и посткондиционирование с использованием как хирургических, так и фармакологических методов [41]. Так, по данным М. В. Варганова и соавт. (2020), приживление кожных лоскутов значительно улучшается за счет предоперационной подготовки и применения реамберина: показатели выживаемости лоскута увеличиваются с 68 в контрольной группе до 80–90% в экспериментальной [42]. В исследовании Н. Ю. Орлинской и соавт. (2018) применение гипоксического прекондиционирования донорской области способствовало значительному увеличению площади приживления аутоотрансплантата кожи до 91%, в то время как при традиционной свободной кожной пластике этот показатель составил лишь 56% [43].

Таким образом, традиционные подходы лечения повреждений кожи и мягких тканей, даже с применением известных методов пре- и посткондиционирования, не всегда обеспечивают полное заживление, особенно при обширных травмах, хронических язвах или ожогах. Ограниченная способность организма к регенерации, высокий риск инфекционных осложнений и образование рубцовой ткани часто затрудняют восстановление структуры и функции тканей, подчеркивая необходимость внедрения инновационных подходов и технологий [41].

Методы тканевой инженерии и регенеративной медицины нацелены на поиск и исследование перспективных материалов и разработку на их основе тканеинженерных конструкций, предназначенных для восстановления и/или замены поврежденных тканей и органов, а также способных активизировать и стимулировать процессы заживления ран [9; 10; 44]. Как правило, они подразделяются на два принципиально разных вида медицинских продуктов: 1) медицинские изделия, которые представляют собой имплантаты из биологических тканей и 2) клеточные продукты – системы на основе биостабильного и/или биodeградируемого носителя, содержащие стволовые и/или прогениторные клетки, а также другие биологические препараты (например, цитокины, факторы роста и прочие сигнальные молекулы) [45]. Независимо от вида медицинского продукта его основой является носитель, часто называемый каркасом, скаффолдом, матрицей или матриксом, представляющий собой трехмерную структуру, обеспечивающую оптимальное взаимодействие тканевого микроокружения и клеток [5; 6; 10; 44; 46]. Материал, из которого изготавливают матрикс, должен обладать биосовместимостью и неиммуногенностью, быть структурно и функционально близким к нативной структуре заменяемой ткани и/или органа, а также способствовать адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток, заселенных как искусственно на этапе изготовления, так и естественным путем после имплантации в организм [5; 44; 47–49]. В зависимости от типа и области применения к матриксам предъявляются специфические требования, которые проявляются в определенных физико-

химических характеристиках (биodeградация, механические свойства и т. д.) и морфологических особенностях (топология поверхности, размер, распределение и взаимосвязь пор и т. д.) [22; 26; 50]. Среди них важным свойством является способность матрикса к биodeградации, продукты которой должны представлять собой нетоксичные вещества, принимающие участие в естественных биохимических циклах метаболизма клеток без системного и локального накопления для ремоделирования ВКМ [46; 51].

Современные материалы, применяемые для создания ранозаживляющих средств, повторяют группы веществ, составляющих естественный ВКМ. Имитирование естественного состава и строения необходимо для создания оптимальных условий процессов жизнедеятельности клеток на конструкции, а также физико-механических характеристик матрикса [6; 23; 44; 46; 47].

1.1 Внеклеточный матрикс: основные компоненты, функции и роль при заживлении ран

ВКМ представляет собой сложную динамическую трехмерную сеть, основу которой составляют макромолекулярные компоненты: коллагены, фибронектин, ламинины, эластин, GAG и протеогликаны [10; 52; 53]. ВКМ включает интерстициальный матрикс и базальную мембрану [54]. Первый состоит из полисахаридов и волокнистых белков, заполненных межклеточными пространствами, тогда как последний представляет собой тонкий бесклеточный слой, содержащий преимущественно коллаген IV типа и ламинины, который отделяет наружную (эпителиальную, мезотелиальную или эндотелиальную) ткань от подлежащей соединительной ткани [9; 55]. Состав, организация и структура ВКМ уникальны для каждой ткани и определяют ее физические, биохимические и биомеханические характеристики [10; 53; 56; 57]. Компоненты ВКМ выполняют ключевую роль в регуляции важных процессов жизнедеятельности клеток, включая их адгезию, миграцию, дифференцировку, пролиферацию и рост, обеспечивая им необходимую структурную и биохимическую поддержку и способствуя формированию тканей (морфогенезу) и поддержанию их функционального равновесия (гомеостаза) [10; 55; 58]. Идентифицировано

более 300 различных компонентов ВКМ со специфическими функциями, среди которых некоторые могут быть присущи только определенному типу ткани [54; 56], однако многие структурные и функциональные молекулы являются общими [59].

1.1.1 Коллаген

Коллагены составляют около 30% от общей массы белков у млекопитающих, что делает их наиболее распространенным и структурно важным классом белков в организме [60; 61]. Биосинтез проколлагена – молекулы-предшественника коллагена – начинается в рибосомах фибробластов и гладкомышечных клеток, а также, в зависимости от типа коллагена, может происходить в хондроцитах, эндотелиальных клетках и даже эпидермоцитах. После синтеза проколлаген подвергается многочисленным посттрансляционным модификациям во внеклеточном пространстве, что приводит к формированию сложного семейства, включающего не менее 28 типов коллагена, различающихся по надмолекулярной организации и функциям [61; 62]. Изначально считалось, что коллагены выполняют исключительно структурную роль в ВКМ, однако поздние исследования показали, что они также играют ключевую роль в регуляции клеточных процессов, таких как адгезия, пролиферация и миграция [61]. Таким образом, коллагены функционируют не только как основные структурные компоненты ВКМ, но и как активные сигнальные молекулы, участвующие в регуляции клеточного поведения и организации тканей [63].

Тройная спираль является отличительной структурной особенностью всех типов коллагена и состоит из трех полипептидных цепей, стабилизированных водородными связями. Каждая из этих цепей характеризуется повторяющимся аминокислотным (aa) мотивом: Gly-Xaa-Yaa, где X и Y могут быть любыми аминокислотами, но чаще всего представлены пролином и гидроксипролином (HyPro) [60; 62; 64]. Наличие HyPro, который встречается редко в других белках, является уникальным маркером коллагена и широко применяется в биохимических анализах для его количественного

определения [63]. Также все типы коллагена объединяет очень низкое содержание цистеина и полное отсутствие триптофана [64].

Молекулы коллагена способны формировать фибриллы, якорные фибриллы, филаменты-бусы и сетеподобные структуры [53; 60]. Наиболее изученными среди них являются фибриллярные и сетеобразующие коллагены, которые играют ключевую роль в организации ВКМ и обеспечивают выполнение специфических функций в различных тканях организма.

Фибриллярный коллаген, к которому относятся коллагены I, II, III, V и XI типов, является ключевым структурным элементом всех соединительных тканей организма. В коже он составляет около 55% сухой массы, обеспечивая ее прочность и эластичность, в суставном хряще – от 25 до 40% сухой массы, что обуславливает амортизационные свойства хряща и его способность выдерживать нагрузки, в скелетных мышцах – около 70% сухой массы, выполняя роль поддерживающего каркаса для мышечных волокон, а в костной ткани – от 80 до 90% сухой массы, играя ключевую роль в формировании механической прочности костей и их минерализации [60; 63]. Он также в большом количестве содержится в роговице, кровеносных сосудах, кишечнике и межпозвоночных дисках [63]. Процесс формирования коллагеновых фибрилл – коллагеновый фибриллогенез – представляет собой спонтанный процесс самосборки, инициированный зарождением трех одноцепочечных С-концевых пропептидов проколлагена и последующим расщеплением N- и С-концевых пропептидов и опосредованный фибронектином, коллагеном V типа и интегринами клеточной поверхности [65].

Сетеобразующие коллагены, в отличие от фибриллярных, формируют трехмерные сетеподобные структуры, которые играют важную роль в организации базальных мембран и поддержании клеточной адгезии, миграции и дифференцировки. Основным представителем этой группы – коллаген IV типа – является ключевым компонентом всех базальных мембран, выполняя важную роль в поддержании их структурной целостности и механической устойчивости. Помимо своей структурной функции, коллаген IV типа служит лигандом

для интегринов и других клеточных рецепторов. Взаимодействие с этими рецепторами способствует адгезии клеток, их миграции, пролиферации и дифференцировке [60; 66].

Установлено, что различные типы коллагена оказывают прямое или косвенное влияние на течение раневого процесса [32]. При повреждении различные типы коллагена инициируют активацию и агрегацию тромбоцитов, способствуя формированию фибринового сгустка в зоне травмы. На воспалительной стадии заживления ран активация иммунных клеток стимулирует секрецию провоспалительных цитокинов, которые регулируют миграцию фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток, ускоряя процессы восстановления тканей [32]. По мере того, как фибробласты начинают мигрировать в место раны, производство фибриллярного коллагена постепенно увеличивается, и полученный коллагеновый матрикс в конечном итоге заменяет временный фибриновый [67]. Коллаген III типа синтезируется первым на ранних стадиях заживления ран. Начальное случайное отложение коллагена во время формирования грануляционной ткани дополнительно усиливается ковалентным сшиванием, индуцированным ферментом лизилоксидазой (LOX) [32]. Затем коллаген III типа постепенно (в течение нескольких месяцев после закрытия раны) замещается коллагеном I типа посредством регуляции матриксными металлопротеиназами (ММП) [68], и прочность восстановленной ткани на растяжение увеличивается примерно до 80–85% нормальной ткани, если все процессы протекают без каких-либо нарушений [32]. Коллаген I типа играет ключевую роль в процессах заживления ран, стимулируя миграцию кератиноцитов и запуская реэпителизацию, а также усиливая экспрессию ММП в кератиноцитах, что способствует ремоделированию ВКМ [6]. Коллаген V типа преимущественно участвует в регуляции пролиферации и миграции фибробластов, оказывая влияние на восстановление тканей и поддержание их функциональной активности [6]. Также стоит отметить, что в процессе деградации молекул коллагенов происходит высвобождение их фрагментов,

которые влияют на пролиферацию фибробластов и стимулируют синтез факторов роста, тем самым запуская механизмы ангиогенеза и реэпителизации [32].

Наличие коллагенов, формирующих филаменты-бусины, а именно коллагена VI типа, также было обнаружено в грануляционной ткани. Он откладывается на ранних стадиях заживления ран, и его синтез увеличивается параллельно с коллагеном I типа, достигая пика примерно через 8 дней после образования раны [67]. Коллаген VI типа является ключевым регулятором сборки и состава дермального матрикса и влияет на поведение фибробластов [57].

Важную роль в заживлении ран играет коллаген IV типа. Так, Р. Betz и соавт. (1992) при иммуногистохимическом анализе ран человека (включая операционные, колото-резанные и рваные раны после хирургического вмешательства) выявили экспрессию коллагена IV типа в области раны уже через 4 дня после ранения. Также его обнаруживают в период от 8 до 21 дня во вновь образованной базальной мембране [69; 70], что подтверждает роль коллагена в ее сборке и стабилизации. Фрагменты коллагенов I и IV типов могут также быть медиаторами воспаления, действуя как мощные хемоаттрактанты для нейтрофилов, усиливая фагоцитоз и иммунный ответ и модулируя экспрессию некоторых генов [71; 72].

1.1.2 Фибронектин

Фибронектин является одним из ключевых белков ВКМ и занимает второе место по распространенности среди его компонентов [34; 73]. Структурно он представляет собой димерный высокомолекулярный гликопротеин, состоящий из двух практически идентичных полипептидных субъединиц, ковалентно связанных дисульфидными мостиками на С-концевой части молекулы. Выделяют два основных типа фибронектина: 1) растворимый (или плазменный) фибронектин, который является основным компонентом плазмы крови и синтезируется гепатоцитами, и 2) нерастворимый (или клеточный) фибронектин, который синтезируется фибробластами, глиальными и эпителиальными клетками, образующий фибриллярные структуры в составе ВКМ [74–76]. Мономеры фибронектина включают три типа гомологичных

повторяющихся модулей (I, II и III), которые кодируются одним геном [74]. Благодаря своей уникальной структуре молекулы фибронектина способны взаимодействовать с множеством компонентов ВКМ, включая факторы роста и GAG, обеспечивая интеграцию клеток в матрикс и регуляцию ключевых биологических процессов. Особую роль фибронектин играет в процессах клеточной адгезии благодаря наличию RGD-последовательности (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота), которая связывается с интегринами $\alpha_5\beta_1$ клеточной мембраны и интегринами с αV [6; 59]. Эти взаимодействия обеспечивают передачу механических и химических сигналов, необходимых для регуляции специфического поведения клеток, включая дифференцировку и эпителиально-мезенхимальный переход. Нарушение этих процессов может стать причиной развития патологий, таких как рубцевание, фиброз, онкогенез и аномалии эмбрионального развития [67; 76].

В процессе заживления ран фибронектин выполняет ключевую роль в организации и стабилизации ВКМ. Он способствует отложению коллагена I типа и других белков ВКМ, а также регулирует активность LOX, которые участвуют в укреплении коллагеновых волокон за счет их ковалентного сшивания. Важное значение имеет плазменная форма фибронектина, которая особенно важна на ранних этапах процесса заживления. Она связывается с тромбоцитами и фибрином, интегрируясь в фибриновый сгусток, что способствует уплотнению раны и формирует каркас для миграции лейкоцитов и эндотелиальных клеток [30]. Позднее при заживлении раны эндотелиальные клетки и фибробласты попадают в раневое ложе и откладывают клеточный фибронектин, который принимает участие в образовании грануляционной ткани [77]. На стадии пролиферации фибронектин собирается в сложную трехмерную структуру, которая регулирует клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию и апоптоз при заживлении ран и обеспечивает тканевую архитектуру. Считается, что формирование дальнейшей коллагеновой сети зависит от исходной структуры фибронектина посредством механизмов, включающих интегрины [78].

1.1.3 Ламинины

Ламинины представляют собой обширное семейство адгезивных гликопротеинов ВКМ и являются ключевым компонентом базальной мембраны, выполняя существенную роль в формировании и поддержании ее структуры [52; 79; 80]. Молекулы ламининов существуют в виде гетеротримеров, состоящих из трех различных полипептидных цепей – α , β и γ , каждая из которых кодируется отдельными генами [79]. После трансляции эти три мономера самособираются, формируя характерную крестообразную структуру с тремя короткими плечами и одним длинным спиральным доменом, которые содержат множественные сайты связывания, взаимодействующие как с интегриновыми, так и с неинтегриновыми рецепторами клеток [78; 80]. Несмотря на то, что механизмы передачи сигналов через внутриклеточные пути до конца еще не изучены, известно, что ламинины способны модулировать клеточные фенотипы в процессе эмбрионального морфо- и органогенеза, а также влиять на процессы миграции и адгезии клеток в постнатальном развитии [81]. Ламинины потенциально могут выполнять одну из центральных ролей в заживлении ран, способствуя реэпителизации, неоваскуляризации и ускорению восстановления поврежденных тканей [82].

1.1.4 Эластин

Эластин – фибриллярный белок, обладающий уникальными эластичными свойствами, которые обусловлены обширным ковалентным сшиванием его молекулярной структуры [9; 83]. Предшественником эластина является белок тропоэластин – растворимый мономер, секретируемый такими клетками, как фибробласты, гладкомышечные клетки, эндотелиальные клетки, клетки респираторного эпителия, хондроциты и кератиноциты [52]. После секреции в межклеточное пространство тропоэластин подвергается спонтанной агрегации в более крупные структуры благодаря взаимодействию гидрофобных доменов, процессу, известному как коацервация [83]. Затем они подвергаются окислительному дезаминированию остатков лизина в тропоэластине, катализируемого LOX. Происходит формирование поперечных сшивок

между остатками лизина и аллизина или двух остатков аллизина, которое приводит к повышению структурной целостности ткани и образованию нерастворимой зрелой структуры эластина [9]. Зрелый эластин играет ключевую роль в обеспечении функциональности таких тканей и органов, как стенки кровеносных сосудов, кожа, легкие, сердце, сухожилия, связки, мочевого пузыря, а также эластичной хрящевой ткани (например, в ушной раковине, гортани и надгортаннике) [52]. Тем не менее, с возрастом способность организма к продукции эластина значительно снижается [83], что приводит к утрате возможности полноценно восстанавливать поврежденные и/или деградировавшие эластичные волокна. Это становится причиной постепенной потери эластичности тканей, их избыточного уплотнения и жесткости, что может способствовать развитию заболеваний сердечно-сосудистой системы, легких и кожи [52; 83; 84]. В то же время синтез эластина может быть активирован в ответ на травму или патологические состояния, хотя этот процесс часто оказывается недостаточно эффективным для полного восстановления функций тканей [27].

Пептиды эластина, содержащие специфические последовательности, способны стимулировать распространение, адгезию и передачу сигналов клеток, что играет важную роль в заживлении ран кожи и поддержании гомеостаза [27]. Таким образом, эластин может участвовать в процессах заживления ран не только за счет обеспечения механической эластичности тканей, но и путем воздействия на клеточные механизмы, постепенно уменьшая раневую контрактуру [27; 83].

1.1.5 Гликозаминогликаны и протеогликаны

GAG представляют собой семейство неразветвленных полисахаридов, состоящих из основных повторяющихся дисахаридных единиц, включающих остатки аминасахара (N-ацетил-D-галактозамин или N-ацетил-D-глюкозамин) и гексуроновой кислоты (D-глюкуроновая или L-идуроновая) [52; 56; 63]. GAG играют важнейшую роль в поддержании физической целостности ВКМ, взаимодействуя с его белковыми компонентами, такими как коллагены, фибронектин и ламинины [57].

На основании химической структуры GAG можно разделить на несколько основных групп, каждая из которых характеризуется структурной гетерогенностью, обусловленной вариациями длины цепей, а также степенью ацетилирования и сульфатирования сахарных остатков [52; 56]. Эти модификации определяют уникальные физико-химические и биологические свойства GAG, включая способность связывать воду, регулировать механическую прочность и эластичность тканей и взаимодействовать с различными биологическими молекулами, такими как факторы роста и цитокины [52; 53; 56; 63; 85].

Гепарин, гепаран-, кератан-, хондроитин- и дерматансульфат являются примерами сульфатированных GAG и составляют часть протеогликанов, среди которых выделяют агрекан и версикан, а также декорин, люмикан и перлекан. Протеогликаны выполняют ряд важных функций, таких как обеспечение адгезии клеток к ВКМ и связывание секретируемых белков и факторов роста. Например, версикан агрегирует с эластическими волокнами, влияя на миграцию клеток, тогда как декорин взаимодействует с коллагеном и регулирует организацию коллагеновых фибрилл [78; 86; 87].

Гиалуроновая кислота (ГК), или гиалуронан, является несulfатированным GAG и может встречаться в свободном виде [52; 63; 88]. Функции ГК зависят от ее молекулярного веса [89]. Высокомолекулярная ГК (молекулярная масса более 1000 кДа) обладает иммуносупрессивными, противовоспалительными и антиангиогенными свойствами и способствует выживанию клеток. В свою очередь, низкомолекулярная ГК (150–350 кДа) обладает иммуностимулирующими, провоспалительными и проангиогенными свойствами и способствует миграции клеток в очаг воспаления [88; 90]. Фактически, около половины всей ГК в организме человека находится в коже [91].

В процессе заживления ран одним из ключевых компонентов, присутствующих на всех этапах, является ГК [88; 89]. В фазу воспаления ГК аккумулируется в области раны и выполняет роль регулятора раннего воспалительного ответа. Главные функции ГК на этой стадии заключаются в регулировании миграции воспалительных клеток и фибробластов, синтезе

провоспалительных цитокинов и фагоцитозе [29; 88]. В очагах воспаления и повреждения тканей низкомолекулярные фрагменты ГК, образующиеся в результате последовательных каталитических стадий расщепления высокомолекулярной ГК под действием ферментов гиалуронидазы и активных форм кислорода, способны инициировать активацию толл-подобных рецепторов-2 и -4 и вызвать продукцию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли-альфа и IL-1 β [29; 88].

Кроме того, по результатам исследования, проведенным М. Т. Longaker и соавт. (1991), установлено, что внутриутробное восстановление тканей плода, которое происходит без образования рубцов, сопровождается продолжительным повышенным общим уровнем ГК. В течение трех недель после повреждения уровни ГК в тканях плода остаются повышенными, в то время как раны взрослого организма характеризуются лишь временным увеличением уровней ГК на протяжении короткого периода (7 дней), причем преобладает ГК с низкой молекулярной массой [92]. Это дает основание полагать, что повышенные уровни ГК могут частично снижать отложение коллагенового матрикса и способствовать безрубцовому восстановлению тканей [91; 92].

Таким образом, компоненты ВКМ, создают не только временную матрицу, обеспечивая структурную целостность ВКМ при формировании ткани *de novo*, но и регулируют большинство клеточных функций, опосредуют межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия, а также служат резервуаром и модулятором действия цитокинов и факторов роста. В связи с этим в настоящее время активно ведутся исследования по оценке возможности использования этих компонентов при разработке тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины. Технология децеллюляризации рассматривается как один из наиболее перспективных подходов к получению биоматериалов с минимальной иммуногенностью и высокой биосовместимостью для использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине [51].

1.2 Децеллюляризация тканей и органов как перспективный метод получения тканеинженерных продуктов

Согласно международному стандарту американского общества по испытанию материалов (American Society for Testing and Materials, ASTM) F3354-19 «Децеллюляризация представляет собой процесс, используемый для разрушения и/или удаления клеток и клеточных компонентов из биологического материала при сохранении ключевых структурных и/или композиционных свойств материала ВКМ» [93]. Децеллюляризация может быть осуществлена физическими, химическими и ферментативными (биологическими) методами [10; 58].

1.2.1 Физические методы обработки

К физическим методам децеллюляризации относятся циклы замораживания-оттаивания [94; 95], прямое механическое воздействие [96], включая ультразвуковую обработку [97; 98] и воздействие градиентом давления [99], а также использование сверхкритических флюидов [100; 101] и электропорации [102].

Метод попеременного замораживания и оттаивания считается одним из наиболее распространенных подходов, основанном на образовании внутриклеточных кристаллов льда, которые оказывают механическое воздействие на клеточные мембраны, вызывая их разрушение [103; 104]. Как правило, данный метод применяется в качестве дополнительного этапа перед другими способами децеллюляризации. Для достижения максимальной эффективности процесс может включать несколько циклов замораживания и оттаивания. Важно отметить, что даже при многократном повторении циклов не наблюдается значительной потери ключевых белковых компонентов ВКМ [95], а его механические свойства остаются практически неизменными [104].

Электропорация, также называемая нетермической необратимой электропорацией, представляет собой метод, основанный на воздействии микросекундных электрических импульсов, которые дестабилизируют

электрический потенциал клеточных мембран, способствуя образованию микропор, нарушающих клеточный гомеостаз и вызывающих гибель клетки [9; 102]. Одним из главных преимуществ данного подхода является его способность сохранять целостность, морфологию и трехмерную архитектуру ВКМ в тканях и органах. Тем не менее, метод имеет ограничения, связанные с относительно небольшими размерами электродов [102; 103]. Важно также отметить, что децеллюляризация с использованием электропорации должна проводиться *in vivo*, поскольку предполагается, что удаление поврежденных клеток происходит за счет активации иммунной системы организма, которая устраняет клеточный дебрис [105].

Ультразвук, представляющий собой звуковые волны с частотой выше 20 кГц, широко применяют в процессах децеллюляризации тканей и органов. Его механизм действия основан на явлении кавитации, которое возникает при образовании и последующем схлопывании микроскопических пузырьков в жидкости. Эти процессы создают локальные механические воздействия, увеличивающие проницаемость клеточных мембран и улучшающие проникновение других агентов децеллюляризации [106]. Метод ультразвуковой обработки демонстрирует высокую эффективность, особенно при комбинированном использовании с другими методами децеллюляризации. Например, для достижения максимальной эффективности удаления клеточного и генетического материала обработка ультразвуком часто проводится в растворе додецилсульфата натрия (SDS) [97; 98; 106; 107]. Использование ультразвука не приводит к значительной потере ключевых компонентов ВКМ [97; 106; 108], но тем не менее, при повышении мощности ультразвука, времени обработки или неконтролируемой кавитации могут возникать структурные повреждения ткани, что негативно сказывается на ее механических свойствах [98; 103; 108]. Это подчеркивает необходимость точной оптимизации параметров ультразвуковой обработки для минимизации рисков повреждения ткани и сохранения ее целостности и функциональности.

Ткани и органы, подвергнутые исключительно методам физической децеллюляризации, например, циклам замораживания-оттаивания, считаются девитализированными. В них происходит разрушение клеточных мембран и лизис клеток, однако клеточный дебрис остается в структуре ткани [103; 105]. Наличие остатков разрушенных клеток создает потенциальный риск возникновения нежелательных иммунных реакций при применении полученных материалов [109]. Для минимизации этих рисков рекомендуется сочетать физические методы с другими подходами, такими как химическая или ферментативная обработка. Такая комбинированная стратегия позволяет достичь более полной децеллюляризации, удаляя остатки клеточного и генетического материала, и тем самым снижая вероятность иммунологических осложнений при использовании полученных тканеинженерных продуктов [109; 110].

1.2.2 Химические методы обработки

Химическая децеллюляризация включает использование широкого спектра реагентов, таких как кислоты [111; 112] и основания [113–115], которые способствуют разрушению клеточных структур за счет изменения pH среды, детергенты (или поверхностно-активные вещества) [94; 111; 114–116], обеспечивающие растворение клеточных мембран, гипо- и гипертонические растворы [117–119], приводящие к осмотическому шоку, хелатирующие вещества [120], которые способны связывать и секвестировать ионы металлов, стабилизирующие клеточную архитектуру, и различные растворители (например, спирты, ацетон и трибутиловый эфир фосфорной кислоты) [58; 96; 121; 122]. Выбор реагентов зависит от типа ткани и требуемой степени очистки.

В качестве кислот для децеллюляризации обычно применяют уксусную, надуксусную, соляную и серную кислоты, а в качестве оснований – гидроксиды аммония, кальция и натрия [110; 113]. Кислоты способствуют растворению цитоплазматических компонентов и разрушению нуклеиновых кислот и их фрагментов [110; 114], тогда как щелочные растворы вызывают или катализируют деградацию нуклеиновых кислот и других биомолекул за счет гидролиза [123]. Использование кислот имеет существенные недостатки:

они могут снижать прочность и механические свойства ВКМ из-за воздействия на его ключевые компоненты [9; 112]. Например, обработка уксусной кислотой может привести к нарушению структурной целостности коллагенов и/или их удалению из ВКМ, что снижает его механическую прочность [112]. Щелочные растворы, в свою очередь, могут вызывать значительные изменения структуры матрикса, включая частичную денатурацию белков [114; 123; 124], а также способствовать удалению факторов роста [115]. Эффективность децеллюляризации будет зависеть от множества факторов, таких как тип и концентрация используемой кислоты или основания, продолжительность обработки и характеристики исходного материала.

Химическая децеллюляризация может быть успешно осуществлена с применением детергентов, которые могут быть классифицированы в зависимости от заряда диссоциирующей группы на неионо- и ионогенные [9; 105; 110]. Каждый тип детергентов характеризуется уникальными физико-химическими свойствами, что дает возможность выбора наиболее подходящего реагента в зависимости от специфики обрабатываемой ткани и поставленных задач исследования.

Неионогенные (или неионные) детергенты, такие как Triton X-100 и полисорбаты, воздействуют на клеточную мембрану и нарушают липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, при этом в значительной степени сохраняя белок-белковые связи [94; 125; 126]. Благодаря этому происходит солюбилизация белков, как правило, без потери их нативной структуры [124]. Тем не менее, одним из ключевых недостатков неионных детергентов является их способность при длительном воздействии вызывать существенное снижение содержания молекул ламинина и фибронектина, что может негативно сказаться на ультраструктуре ВКМ [127; 128].

Ионногенные (или ионные) детергенты эффективно лизируют клетки и дезорганизуют липидный бислой их мембраны [125], способствуя деградации клеточного содержимого и последующему удалению клеточной популяции, а также клеточного дебриса из ткани [110; 124]. Воздействие ионных детергентов

часто приводит к денатурации и расщеплению белков с изменением их нативной структуры за счет нарушения белок-белковых взаимодействий [129]. Кроме того, они способны удалять факторы роста из тканей [115], вызывать значительную потерю сульфатированных GAG [95; 111; 130] и оказывать негативное влияние на процесс рецеллюляризации из-за своей цитотоксичности [131]. Несмотря на свою высокую эффективность, которая часто превосходит результаты использования других агентов децеллюляризации [122], ионные детергенты требуют тщательной оптимизации параметров применения. Наиболее часто применяют анионные детергенты, такие как SDS и дезоксихолат натрия, которые характеризуются высокой эффективностью в разрушении клеточных мембран благодаря своему отрицательному заряду. Их воздействие на целостность и состав ВКМ зависит от типа ткани или органа, концентрации детергента и продолжительности обработки [58; 111; 122; 128; 129]. Амфотерные (или цвиттер-ионные) детергенты, такие как 3-[[[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат, сульфобетаины-10 и -16, сочетают в себе свойства катионных и анионных детергентов, что делает их особенно эффективными для удаления клеточного и генетического материала из тканей, которые характеризуются небольшой толщиной, плотностью и относительно простой структурой [124; 125]. В отличие от анионных детергентов, цвиттер-ионные оказывают меньшее денатурирующее воздействие на белки, что позволяет сохранять их нативную структуру и функциональность. Тем не менее, их мягкое воздействие может оказаться недостаточным для достижения качественной децеллюляризации, поскольку они удаляют клеточный и генетический материал менее эффективно по сравнению с другими типами детергентов [124; 132].

Применение гипо- и гипертонических растворов приводит к изменениям в клетках в результате градиента осмотического давления [110]. При этом такие растворы оказывают лишь незначительное воздействие на структуру и молекулярный состав ВКМ [110; 119]. Для усиления осмотического эффекта и повышения эффективности децеллюляризации ткани и органы обычно подвергают циклической обработке, поочередно погружая их в гипо-

и гипертонические растворы [118]. Гипотонические растворы вызывают гипергидратацию клеток, что приводит к разрыву мембран и способствует их лизису. Гипертонические растворы, напротив, вызывают дегидратацию клеток, нарушая взаимодействие между ДНК и белками [117]. Однако ни один из этих растворов не обеспечивает полного удаления клеточного и генетического материала из тканей [110; 118], что требует их комбинирования с другими методами для достижения эффективной децеллюляризации.

Хелатирующие вещества (или хелатообразующие агенты), такие как этилендиаминтетрауксусная и этиленгликольтетрауксусная кислоты, нарушают взаимодействие клеток с белками ВКМ, секвестрируя ионы металлов (например, Ca^{2+} и Mg^{2+}), которые играют ключевую роль в процессах клеточной адгезии [110; 120]. Однако эти агенты не способны обеспечить даже поверхностное удаление клеток, поэтому их обычно используют в сочетании с детергентами или ферментами, чтобы усилить эффективность процесса децеллюляризации [120].

1.2.3 Ферментативные методы обработки

Ферментативная децеллюляризация чаще всего применяется либо в сочетании с другими методами, либо на последующих или завершающих этапах децеллюляризации для усиления дегградации клеток и более эффективного удаления остаточного клеточного и генетического материала, а также других иммуногенных компонентов из ткани [96; 133; 134]. Среди наиболее часто применяемых ферментов можно выделить трипсин [115; 135], нуклеазы [118; 136], липазу [96], диспазу [116], термолизин [120] и α -галактозидазу [133; 134]. Каждый из этих ферментов характеризуется уникальным механизмом действия, что позволяет адаптировать и оптимизировать процесс очистки тканей под конкретные задачи.

Трипсин – сериновая протеаза, которая катализирует протеолиз белков и пептидов посредством гидролиза пептидных связей, образованных карбоксильными группами основных аминокислот лизина и аргинина [110]. Эффективность применения трипсина при децеллюляризации, а также степень

сохранности компонентов ВКМ, напрямую зависят от концентрации фермента и продолжительности его воздействия [135]. Тем не менее, достижение полной децеллюляризации исключительно с помощью трипсина возможно только при длительной обработке, которая неизбежно приводит к снижению уровня некоторых белков и GAG [94; 137], а также отрицательным изменениям механических свойств ВКМ, ухудшая его структурную целостность [135; 137].

Нуклеазы, такие как рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза, катализируют гидролиз фосфодиэфирных связей между нуклеотидными субъединицами нуклеиновых кислот [105]. Эти ферменты обычно применяют совместно с химическими методами обработки, что позволяет достичь более полного и эффективного удаления остаточных нуклеиновых кислот из тканей [131; 136; 138]. Однако одной из ключевых проблем при работе с нуклеазами является сложность их полного удаления после завершения процедуры, что приводит к загрязнению ими полученного материала.

Диспаза – нейтральная протеаза, которая способствует гидролизу N-концевых пептидных связей, образованных неполярными аминокислотными остатками. Она преимущественно воздействует на такие компоненты ВКМ, как фибронектин и коллаген IV типа [139]. Однако длительное использование диспазы имеет свои ограничения. При продолжительной обработке фермент может оказывать разрушительное воздействие на общую ультраструктуру ВКМ, нарушая его целостность и снижая механические свойства [140].

Для минимизации нежелательных эффектов при ферментативной обработке критически важно оптимизировать ключевые параметры, такие как концентрация фермента, температура и длительность воздействия. Неправильный выбор этих условий может привести к чрезмерной деградации и потере компонентов ВКМ, а также снижению его механической прочности. Наиболее эффективным подходом также является использование ферментов совместно с другими агентами децеллюляризации. Комбинированный подход позволяет сократить время воздействия и снизить концентрацию каждого из реагентов, что минимизирует риск повреждения структуры тканей и органов.

1.2.4 Оценка качества децеллюляризации

Выбор оптимального метода децеллюляризации представляет собой сложную задачу, обусловленную влиянием множества факторов. К ним относятся видовая специфичность ткани, ее структурные особенности, клеточный состав и плотность, а также тип органа. Важно также учитывать, что сами агенты децеллюляризации могут оказывать воздействие на состав и структуру ВКМ. Все это делает необходимым проведение контрольных испытаний для оценки качества (эффективности) децеллюляризации.

Современным «золотым стандартом» для оценки качества децеллюляризации является измерение содержания двухцепочечной ДНК в децеллюляризованном матриксе. Минимальными критериями качественной децеллюляризации принято считать: (1) количественное содержание двухцепочечной ДНК менее 50 нг/мг сухого веса ВКМ, (2) фрагменты ДНК должны быть длиной менее 200 пар нуклеотидов и (3) отсутствие ядерного материала в тканевых срезах при гистологическом окрашивании гематоксилином и эозином (haematoxylin and eosin, H&E) и флуоресцентном окрашивании 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) [93; 105]. Немаловажным аспектом является качественное удаление используемых агентов децеллюляризации из тканей. Остаточное присутствие таких реагентов может вызывать нежелательные биологические эффекты, включая цитотоксичность, воспалительные реакции или нарушение процессов рецеллюляризации и регенерации тканей [141; 142].

Также для всестороннего анализа как структурных изменений ВКМ, так и его биохимического состава может быть использован комплекс методов, включающих иммуногистохимические, гистологические и микроскопические исследования [143]. Иммуногистохимические и гистологические методы позволяют выявить наличие или отсутствие ключевых компонентов ВКМ, а методы визуализации, такие как сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия, а также микрокомпьютерная томография, – оценить сохранность структуры и морфологии ВКМ [143], предоставляя возможность анализировать

микро- и наноуровневую организацию тканей. В зависимости от предполагаемого клинического применения могут быть дополнительно изучены механические свойства полученного материала, включая модуль упругости и прочность при растяжении [143]. Для количественного анализа ключевых компонентов ВКМ широко применяют хроматографические, колориметрические и спектрофотометрические методы [48; 95; 144; 145]. В последние годы значительное распространение получил масс-спектрометрический анализ протеомного профиля, который позволяет качественно изучить состав ВКМ до и после децеллюляризации [146–148].

Эффективная децеллюляризация служит основой для создания перспективных биоматериалов, способных удовлетворить растущие потребности в высокотехнологичной медицинской помощи, открывая новые горизонты в области регенеративной медицины, тканевой инженерии и разработки терапевтических решений, обеспечивая восстановление поврежденных тканей и органов с минимальным риском осложнений.

1.3 Клиническое применение децеллюляризованного внеклеточного матрикса

За последние десятилетия интерес к применению децеллюляризованного ВКМ в клинической практике значительно возрос и охватывает различные области медицины. В пластической и реконструктивной хирургии такие материалы используют для восстановления дефектов кожи, лечения ожогов, а также острых и хронических ран [149]. Среди наиболее широко используемых продуктов можно выделить AlloDerm, GraftJacket и SureDerm [149; 150]. AlloDerm™ (LifeCell Corp., США) представляет собой один из первых продуктов на основе децеллюляризованной дермы человека, получивших одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA), и остается одним из наиболее тщательно изученных. Этот продукт широко применяется в различных реконструктивных процедурах, особенно при восстановлении кожных покровов и лечении дефектов мягких тканей [149; 151; 152].

В исследовании 2010 г. было проведено лечение 14 пациентов отделения ожогового профиля с глубокими поражениями кожи, средняя площадь раневой поверхности у которых составляла 185 см². Для восстановления использовалась сэндвич-техника с применением расщепленного кожного трансплантата и AlloDermTM. Результаты показали, что приживаемость трансплантатов достигала 99%, что является значительным показателем успешности процедуры. Более того, имплантация привела к образованию мягкой эластичной кожи с хорошими косметическими характеристиками. Долгосрочные наблюдения за пациентами показали значительное улучшение качества рубцов, а также улучшение функциональности кожи в зоне имплантации, особенно по параметрам высоты рубцовых деформаций [153]. GraftJacket (Wright Medical Technology, Inc., США), еще один продукт на основе децеллюляризованной дермы человека, продемонстрировал высокую эффективность в лечении нейропатических язв при диабетической стопе [154]. В рандомизированном, проспективном контролируемом клиническом исследовании 2009 г. полное заживление язв было достигнуто у 32 (69,6%) из 46 пациентов в исследуемой группе, которым проводили однократную аппликацию GraftJacket, и у 18 (46,2%) из 39 пациентов в контрольной группе, которые получали стандартное лечение. Вероятность заживления в группе с GraftJacket была в 2,7 раза выше, а язвы заживали в среднем на неделю раньше, чем у пациентов, получавших стандартную терапию, что, хотя и не достигло статистической значимости, указывает на тенденцию к ускоренному заживлению [154].

Также продукты на основе децеллюляризованного ВКМ находят применение в кардиохирургии для восстановления сердечной ткани и создания тканеинженерных протезов сердечных клапанов и сосудов [155–157]. В 2019 г. американская компания Ventrix, Inc. сообщила об успешном завершении первого в истории одобренного FDA клинического исследования первой фазы инъекционного гидрогеля VentriGel из децеллюляризованного миокарда свиньи, предназначенного для устранения повреждений и восстановления функции сердца у пациентов с сердечной недостаточностью, ранее перенесших инфаркт

миокарда [158]. Результаты исследования подтвердили безопасность препарата и возможность его трансэндокардиальной инъекции. Хотя исследование не было предназначено для оценки эффективности, наблюдались положительные изменения, включая значительное увеличение дистанции после инъекции по сравнению с исходным результатом при проведении теста 6-минутной ходьбы [158].

Другое исследование, в котором 61 пациент (в возрасте от 9 дней до 50 лет) с врожденным пороком сердца подверглись реконструкции выносящего отдела правого желудочка с использованием тканеинженерных конструкций Matrix P (n = 9) или Matrix P Plus (n = 52), показало благоприятные среднесрочные результаты [155]. Matrix P представляет собой децеллюляризованный легочный клапан свиньи, который разработан немецкой компанией AutoTissue в соответствии с запатентованными протоколами децеллюляризации и стерилизации, в то время как Matrix P Plus – клапан Matrix P, покрытый децеллюляризованной перикардиальной заплатой лошади, используемый в случаях, когда требуется удлинение дистальной или проксимальной заплаты. В исследовании сообщается об общей свободе от повторной операции или повторного вмешательства в $96 \pm 2,5$ и $90 \pm 4,1\%$ случаях через 3 и 4 года соответственно, что сопоставимо или превосходит результаты использования стандартных клапаносодержащих кондуитов [155; 157; 159].

Децеллюляризованные матриксы также находят применение в ортопедии, травматологии и стоматологии [160–163]. Например, для восстановления костей и сухожилий в клинической практике применяются одобренные FDA децеллюляризованные продукты, полученные, как правило, из костной ткани, такие как Grafton®, Puros® DBM, BioSet™, DBX®, Progenix™ Plus, Accell Connexus®, TBM®, InterGro® и Viagraft® [160]. Исследование С. Hierholzer и соавт. (2006) демонстрирует высокую эффективность таких материалов: в ретроспективном анализе 78 пациентов с несросшимися переломами диафиза плечевой кости 45 пациентов лечили с помощью аутогенного трансплантата из гребня подвздошной кости, а 33 пациента – с использованием костного

матрикса Grafton®. Показатели заживления в этих группах составили 100 и 97% соответственно, что подтверждает эффективность как аутологичного материала, так и Grafton®. Однако применение Grafton® позволило избежать забора аутотрансплантата, а вместе с этим – и потенциальных осложнений на донорском участке, что снижает травматичность лечения [161]. Такие результаты подчеркивают перспективы использования децеллюляризованных материалов для ускорения и улучшения процесса заживления костной ткани, сокращая потребность в инвазивных процедурах и снижая заболеваемость пациентов.

Имеются также клинические исследования, оценивающие возможность применения продуктов на основе децеллюляризованного ВКМ в стоматологии [162; 163]. В частности, М. Schlee и соавт. (2012) изучили эффективность использования мембраны CopiOs® (Zimmer, Германия), изготовленной из бычьего перикарда методом децеллюляризации, для лечения 62 рецессий десны I и II классов по Миллеру с целью восстановления мягкотканного покрытия корня зуба. Через 6 месяцев после операции средний процент покрытия корня составил 86,7%. Использование CopiOs® обеспечило значительное уменьшение средней глубины рецессии с $2,2 \pm 1,1$ до $0,3 \pm 0,5$ мм, а ширина кератинизированной десны увеличилась с $1,5 \pm 0,9$ до $2,4 \pm 0,8$ мм. Кроме того, спустя полгода после лечения все 62 рецессии были классифицированы как имеющие толстый биотип, в то время как на исходном уровне только 22 случая обладали такими характеристиками. Полученные результаты лечения сопоставимы с результатами, достигаемыми традиционными методами, подтверждая перспективность применения децеллюляризованных материалов в стоматологической практике [162].

Положительные результаты и успешные клинические примеры стимулируют научное сообщество продолжать активно исследовать различные источники биологического материала для разработки тканеинженерных продуктов, предназначенных для регенеративной медицины. Особое внимание уделяется оценке их эффективности и безопасности в рамках как кратко-, так и долгосрочных исследований (Таблица 1).

Таблица 1 – Клинические исследования с использованием децеллюляризованного внеклеточного матрикса, зарегистрированные на сайте ClinicalTrials.gov (по состоянию на 12 августа 2024 г.)

Номер и название клинического исследования	Терапевтическая область	Дата начала и окончания	Тип исследования	Статус	Фаза	Исследуемый продукт и его описание
NCT00958711. Механизм действия Unite Biomatrix при лечении язвы при диабетической стопе	Язва при диабетической стопе	01.2009 – 05.2012	Интервенционное	Завершено	–	Unite Biomatrix (Synovis Orthopedic and Woundcare, Inc, США) – повязка из децеллюляризованного перикарда лошади
NCT01292876. Восстановление и укрепление мышечно-сухожильных тканей (MTURR)	Значительная потеря мышечной ткани	12.2010 – 05.2012	Интервенционное	Завершено	–	Децеллюляризованный мочевой пузырь свиньи
NCT02035540. Европейское клиническое исследование применения регенеративных сердечных клапанов (ESPOIR)	Болезнь клапанов сердца	08.2014 – 01.2017	Наблюдательное	Завершено	–	Децеллюляризованные клапаны сердца человека
NCT02073331. Получение дополнительной информации об использовании CorMatrix ECM (внеклеточного матрикса) (RECON)	Ишемическая болезнь сердца (реконструкция перикарда)	03.2014 – 12.2017	Наблюдательное	Завершено	–	CorMatrix ECM® (CorMatrix Cardiovascular, Inc., США) – децеллюляризованная подслизистая оболочка тонкого кишечника свиньи
NCT02527629. Замена аорты с использованием индивидуальных регенеративных аллотрансплантатов (ARISE)	Болезнь клапанов сердца	09.2015 – 03.2019	Наблюдательное	Завершено	–	Децеллюляризованные аортальные клапаны сердца человека

Продолжение Таблицы 1

Номер и название клинического исследования	Терапевтическая область	Дата начала и окончания	Тип исследования	Статус	Фаза	Исследуемый продукт и его описание
NCT02184455. Техничко-экономическое обоснование применения DermGEN для лечения язв при диабетической стопе	Язва при диабетической стопе	01.07.2016 – 01.05.2017	Интервенционное	Завершено	1	DermGEN™ (DeCell Technologies Inc., Канада) – децеллюляризованный дермальный матрикс из донорской кожи человека
NCT05251480. Исследование эффективности DermGEN™ в лечении язв при диабетической стопе у коренных народов		30.12.2024 – 01.12.2026	Интервенционное	Планируется	–	
NCT06227520. Бесклеточный дермальный аллотрансплантат для лечения хронических ран при синдроме диабетической стопы		01.04.2024 – 30.12.2026	Интервенционное	Активно	–	
NCT02530970. Постмаркетинговое исследование использования в качестве конверта Cormatrix® Cangaroo ECM® (внеклеточный матрикс) (SECURE)	Сердечно-сосудистые заболевания	10.2015 – 04.2018	Наблюдательное	Завершено	–	CorMatrix® CanGaroo ECM® (CorMatrix Cardiovascular, Inc., США) – децеллюляризованная подслизистая оболочка тонкого кишечника свиньи, используемая в качестве конверта для установки имплантируемого электронного устройства
NCT03044132. DermACELL AWM® при лечении хронических язв при диабетической стопе по Вагнеру 3/4 степени тяжести	Язва при диабетической стопе	15.01.2017 – 31.12.2018	Интервенционное	Завершено	–	DermACELL AWM® (LifeNet Health, США) – децеллюляризованный аллотрансплантат матрикса человеческой ткани (дермы), обработанный с использованием запатентованной технологии Matracell®

Продолжение Таблицы 1

Номер и название клинического исследования	Терапевтическая область	Дата начала и окончания	Тип исследования	Статус	Фаза	Исследуемый продукт и его описание
NCT02750280. Продольное исследование по оценке внеклеточного матрикса (MatriStem®) для лечения язв при диабетической стопе (MS-DFU-RCT)	Язва при диабетической стопе	06.2015 – 12.2015	Интервенционное	Завершено	–	MatriStem® (ACell, США) – децеллюляризованный мочевого пузыря свиной
NCT02817984. Исследование безопасности бесклеточной жировой ткани для реконструкции мягких тканей	Дефекты мягких тканей	04.2016 – 06.04.2017	Интервенционное	Завершено	1	Децеллюляризованная жировая ткань человека
NCT03544632. Бесклеточная жировая ткань (AAT) для реконструкции мягких тканей		21.06.2018 – 31.12.2025		Набор пациентов	2	
NCT03226600. OrACELL™ в сравнении с соединительной тканью при дефектах класса 3 по Миллеру	Рецессия десны	26.03.2015 – 16.12.2016	Интервенционное	Завершено	–	OrACELL™ (LifeNet Health, США) – децеллюляризованная дерма человека, обработанная с использованием запатентованной технологии Matracell®
NCT03283787. Сравнение одновременного применения ACell MicroMatrix® и ACell Cytal™ со стандартами лечения пролежней 3 или 4 стадии	Пролежни различной степени	01.04.2017 – 23.12.2019	Интервенционное	Завершено	–	MicroMatrix® и Cytal™ Wound Matrix 2-Layer (Acell, Inc., США) – децеллюляризованный свиной мочевого пузыря в виде мелкодисперсного порошка и двухслойной повязки соответственно

Продолжение Таблицы 1

Номер и название клинического исследования	Терапевтическая область	Дата начала и окончания	Тип исследования	Статус	Фаза	Исследуемый продукт и его описание
NCT03632031. Лечение ран с использованием Oasis® ECM	Хронические раны	26.09.2018 – 14.01.2020	Наблюдательное	Завершено	–	Oasis® (Smith & Nephew, США) – децеллюляризованная подслизистая основа тонкой кишки свиньи
NCT03669042. Постмаркетинговая проспективная оценка фотоокисленного бычьего перикарда в сосудистой хирургии (PHOTO-V)	Сердечно-сосудистые заболевания	20.11.2018 – 10.07.2020	Интервенционное	Завершено	–	PhotoFix® (Artivion, Inc) – фотоокисленный децеллюляризованный перикард крупного рогатого скота, используемый в качестве пластыря
NCT03798353. Перикардальный матрикс с мезенхимальными стволовыми клетками для лечения пациентов с инфарктом миокарда (PERISCOPE)	Инфаркт миокарда	13.05.2019 – 06.10.2022	Интервенционное	Завершено	1	PeriCord – децеллюляризованный перикард человека от умершего донора, заселенный МСК из Вартонова студня пупочного канатика человека
NCT04021316. Децеллюляризованный аллотрансплантат дермы для лечения венозных трофических язв ног (DAVE)	Венозные трофические язвы нижних конечностей	01.10.2019 – 10.04.2023	Интервенционное	Завершено	–	dCELL® Human Dermis – децеллюляризованный дермальный кожный аллотрансплантат от умерших доноров тканей
NCT04294446. Постмаркетинговое исследование трансплантата грыжи Biodesign	Вентральная грыжа	10.10.2020 – 30.06.2027	Наблюдательное	Набор пациентов	–	Biodesign® Hernia Graft (Cook Biotech, Inc., США) – децеллюляризованная подслизистая основа тонкой кишки свиньи из 8 слоев

Продолжение Таблицы 1

Номер и название клинического исследования	Терапевтическая область	Дата начала и окончания	Тип исследования	Статус	Фаза	Исследуемый продукт и его описание
NCT04534010. Децеллюляризированные цельные донорские трансплантаты для реконструкции сосково-ареолярного комплекса	Реконструкция молочных желез после хирургического лечения рака	28.04.2021 – 30.12.2024	Интервенционное	Активно	–	NACgraft (BioAesthetics Corp., США) – децеллюляризированный сосково-ареолярный комплекс человека от умершего донора
NCT05484934. Исследование заживления ран, эстетики и удовлетворенности пациентов после реконструкции сосково-ареолярного комплекса с использованием децеллюляризованного донорского NACGraft		21.09.2022 – 07.10.2024	Интервенционное	Набор пациентов	–	
NCT05087758. Децеллюляризованная плацентарная мембрана Matrion™ у пациентов с диабетическими язвами стопы	Язва при диабетической стопе	01.03.2022 – 30.03.2024	Интервенционное	Набор пациентов	–	Matrion™ (LifeNet Health, Inc., США) – децеллюляризованная плацентарная мембрана человека
NCT05199155. Использование канала регенерации нервов (NerVFIX®) при лечении участка нерва запястья	Повреждения нервов	08.12.2020 – 12.2023	Интервенционное	Набор пациентов	2	NerVFIX® (TBF Genie Tissulaire, Франция) – децеллюляризованный, лиофилизированный аллогенный трансплантат артерии или вены из пуповины

Продолжение Таблицы 1

Номер и название клинического исследования	Терапевтическая область	Дата начала и окончания	Тип исследования	Статус	Фаза	Исследуемый продукт и его описание
NCT05243966. Реестр расширенной реконструкции мягких тканей Myriad™ (MASTRR)	Дефекты мягких тканей	10.01.2022 – 01.2029	Наблюдательное	Набор пациентов	–	Myriad Matrix™ и Myriad Morcells™ (Aroa Biosurgery Limited, Новая Зеландия) – децеллюляризованный матрикс овечьего преджелудка в виде многослойной повязки и порошка соответственно
NCT05652816. Биологический трансплантат кожи с совместной культурой кератиноцитов и стволовых клеток для пациентов с ожогами	Ожоги второй и третьей степеней	06.09.2022 – 31.12.2024	Интервенционное	Набор пациентов	1	Децеллюляризованная амниотическая мембрана, сформированная в трехмерную матрицу, засеянная аутологичными кератиноцитами, совместно культивированными с эпителиальными стволовыми клетками амниона
NCT05440370. Клиническое исследование по оценке эффективности и безопасности MegaCarti® при дефектах хряща коленного сустава	Повреждение хряща коленного сустава	16.04.2020 – 31.01.2027	Интервенционное	Активно	–	MegaCarti® (L&C BIO, Южная Корея) – децеллюляризованный гиалиновый хрящ человека от умершего донора в возрасте до 45 лет
NCT06278480. Клиническое исследование по оценке регенерации суставного хряща с помощью артроскопии после применения MegaCarti®		23.06.2023 – 29.02.2024	Наблюдательное	Активно	–	

Продолжение Таблицы 1

Номер и название клинического исследования	Терапевтическая область	Дата начала и окончания	Тип исследования	Статус	Фаза	Исследуемый продукт и его описание
NCT05250726. Использование обработанного, девитализированного и стерильного сегмента мениска (MENISC-T) в лечении скафотрапезиотрапезиевидного артрита	Остеоартрит суставов кисти	01.01.2021 – 08.02.2024	Интервенционное	Завершено	2	MENISC-T (TBF Genie Tissulaire, Франция) – децеллюляризованный, виروинактивированный, лиофилизированный и стерильный трансплантат мениска человека
NCT06038331. Использование обработанной, девитализированной и стерильной амниотической мембраны пуповины при лечении скафотрапезиотрапезиевидного артрита		28.05.2024 – 01.2026	Интервенционное	Набор пациентов	2	SclerFIX (TBF Genie Tissulaire, Франция) – децеллюляризованный, вируинактивированный, лиофилизированный и стерильный трансплантат амниотической оболочки пуповины человека
NCT05455138. Аллотрансплантаты в хирургии магистральных артерий	Хроническая ишемия, угрожающая потерей конечности	01.12.2021 – 01.12.2025	Интервенционное	Набор пациентов	–	Децеллюляризованный трансплантат артерии крупного рогатого скота
NCT06171542. Эффективность однократной инъекции СТМ под контролем визуализации при артрите плечевого сустава (HC22-1)	Остеоартроз плечевого сустава	22.12.2022 – 30.04.2025	Интервенционное	Активно	1	СТМ Boost и СТМ Flow (CTM Biomedical, LLC, США) – децеллюляризованные частицы ткани плаценты человека в виде инъекционного раствора
NCT06171555. Эффективность СТМ для теннисного локтя	Эпикондилит локтевого сустава (теннисный локоть)	26.01.2023 – 31.12.2025	Интервенционное	Активно	2	

Продолжение Таблицы 1

Номер и название клинического исследования	Терапевтическая область	Дата начала и окончания	Тип исследования	Статус	Фаза	Исследуемый продукт и его описание
NCT06160427. Матрикс соединительной ткани при тендинопатии вращательной манжеты плеча	Тендинит вращательной (ротаторной) манжеты плеча	04.12.2023 – 15.01.2028	Интервенционное	Набор пациентов	4	CTM Boost (CTM Biomedical, LLC, США) – децеллюляризованный аллотрансплантат на основе клеток и тканей человека, полученный из соединительной ткани плаценты
NCT06433284. Сравнительное исследование гидрогеля из децеллюляризованной амниотической мембраны человека и инвертированного внутреннего ограничивающего мембранного лоскута при идиопатических больших макулярных разрывах (MACROHOLE)	Макулярный разрыв	01.01.2025 – 30.01.2027	Интервенционное	Планируется	–	Децеллюляризованная амниотическая оболочка человека в виде гидрогеля
NCT05880537. Проспективный регистр децеллюляризованного аллотрансплантата бедренной артерии (Nexeon AVX)	Терминальная стадия хронической почечной недостаточности	06.06.2023 – 15.12.2027	Наблюдательное	Набор пациентов	–	Nexeon AVX (LifeNet Health, США) – децеллюляризованный трансплантат бедренной артерии человека
NCT04700566. Аллотрансплантат жировой ткани для инъекций при параличе голосовых связок	Парезы и параличи голосовых складок	16.05.2022 – 07.01.2025	Интервенционное	Набор пациентов	3	Renuva® (MTF Biologics, США) – инъекционный децеллюляризованный аллотрансплантат жировой матрицы
NCT05880888. Исследование клинического воздействия нового аллотрансплантата жировой матрицы при лечении Болезни Гоффа	Болезнь Гоффа	22.04.2023 – 30.12.2024	Интервенционное	Активно	1	

Представленные клинические исследования свидетельствуют о широком потенциале применения децеллюляризованного ВКМ в различных областях медицины. Однако выбор источника биологического материала остается ключевым вопросом, существенно влияющим на безопасность, регенеративный потенциал и клиническую эффективность разработанных на его основе продуктов. Биологический материал человека, полученный от живого или умершего донора, обладает важными преимуществами, такими как сниженный риск иммунного отторжения и передачи межвидовых инфекций. Однако ограниченная доступность донорских тканей и органов нередко затрудняет их широкое применение [164], что привело к распространению использования ксеногенных источников биологического материала [113]. Тем не менее, применение материалов ксеногенного происхождения сопряжено с риском развития нежелательных иммунных реакций, потенциальной контаминацией патогенами и возможностью передачи зоонозных инфекций [51; 138; 165; 166]. Так, в 2001 г. четырем педиатрическим пациентам были трансплантированы бесклеточные сердечные клапаны свиного происхождения (SynerGraft™). Вскоре после операции у них возникли выраженные реакции на инородное тело и серьезные послеоперационные осложнения [167]. Эти случаи подчеркивают, что применение ксеногенных материалов в крупных клинических исследованиях по-прежнему является спорным вопросом [156]. Кроме того, исследование В. Liu и соавт. (2020) показало различия в составе ВКМ кожи человека, свиней и крыс. Протеомный и биоинформатический анализы выявили, что по сравнению с ВКМ кожи человека, ВКМ кожи свиней и крыс имеют дефицит белков, участвующих в модуляции воспалительных процессов и врожденного иммунного ответа, а также содержат значительно меньше протеаз и их ингибиторов. Эти результаты позволяют предположить, что ВКМ человеческого происхождения создает более благоприятную среду для заживления ран, благодаря лучшему соответствию требованиям иммунной системы пациента [168]. Существуют также дополнительные ограничения

в применении ксеногенных материалов, обусловленные религиозными убеждениями [169; 170].

В связи с вышеизложенным возрастает интерес к использованию внеэмбриональных тканей и органов человека – плаценты и пуповины. Эти провизорные органы поддерживают и защищают развитие плода в период беременности, являясь временными структурами, необходимыми только до момента рождения. Внеэмбриональные ткани и органы представляют значительный интерес в современной медицине, особенно как биологический материал, предназначенный для изготовления медицинских изделий, благодаря уникальным свойствам фетальных тканей и высокой доступности их в качестве сырья [56; 171]. В отличие от тканей и органов трупного происхождения, внеэмбриональные ткани и органы имеют постоянный возраст, получены от проверенной популяции здоровых доноров и не требуют сложных многоступенчатых процедур при взятии биологического материала [171].

Хотя клиническое применение зародышевых оболочек уже хорошо изучено и широко описано в научной литературе, использование биологического материала пуповины человека остается относительно новым направлением исследований, которое открывает значительные перспективы для разработки безопасных и высокоэффективных тканеинженерных продуктов.

1.4 Потенциал использования биологического материала пуповины человека в тканевой инженерии и регенеративной медицине

Пуповина, или пупочный канатик, – специальный орган, обеспечивающий связь между плодом и плацентой [172]. Нормальная пуповина содержит две артерии и одну вену, окруженные Вартоновым студнем и эктодермальным амниотическим слоем эпителия [173]. Вена пуповины транспортирует богатую кислородом и разнообразными питательными веществами кровь от плаценты к плоду, а две артерии возвращают кровь, насыщенную двуокисью углерода и шлаками, к плаценте [172; 173].

Вартонов студень составляет большую часть пуповины, представляя собой слизистую соединительную ткань, покрытую слоем амниотического эпителия

и окружающую кровеносные сосуды [28]. Его состав включает коллагены различных типов, которые составляют более 50% ткани, а также протеогликаны и GAG, такие как ГК и гепарансульфат, которые интегрированы в структуру коллагеновых волокон [23; 174]. К. Sobolewski и соавт. (1997) исследовали соотношение различных типов коллагена в Вартоновом студне и установили, что коллаген I типа составляет 47%, коллаген III типа – 40%, а коллаген V типа – 12% от общего содержания коллагена [174]. Около 1% коллагена осталось неидентифицированным. Предполагается, что это может быть коллаген VII типа, который преимущественно экспрессируется эпителиальными клетками, что подтверждается более ранними исследованиями, демонстрирующими наличие экспрессии коллагена VII типа в культивируемых стромальных клетках Вартонова студня [175]. Структурную поддержку Вартонова студня обеспечивают GAG, играющие ключевую роль в регуляции клеточных взаимодействий и модуляции процессов ремоделирования ВКМ во время беременности [176–178]. При низких нагрузках GAG способствуют эластичности ткани и сохранению ее формы при больших нагрузках, поскольку Вартонов студень не содержит эластиновых волокон [176; 179]. ГК составляет до 70% GAG в составе пуповины, что придает ткани гидрофильные свойства и способствует удержанию воды, создавая оптимальные условия для жизнедеятельности клеток и миграции факторов роста [174]. Уникальный состав и свойства пуповины делают ее перспективным биологическим материалом, предназначенным для изготовления медицинских изделий для применения в области регенеративной медицины [179; 180].

Особый интерес вызывает использование биологического материала пуповины человека для восстановления хрящевой ткани [12–14], что обусловлено высоким сходством состава Вартонова студня пуповины человека с хрящевой тканью [48]. Так, S. Kang и соавт. (2024) использовали гидрогель из децеллюляризованного Вартонова студня с экзосомами, полученными из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пуповины человека, для заживления разрыва мениска. Результаты экспериментов *in vitro* и *in vivo*

продемонстрировали, что такой композитный гидрогель способствовал заживлению разрыва мениска, стимулируя хондрогенез и защищая суставной хрящ, подавляя вторичную дегенерацию хряща [13]. В другом исследовании, Т. Хіао и соавт. (2017) разработали каркас из Вартонова студня пуповины человека и сравнили его с каркасом из суставного хряща свиней, исследовав экспрессию и секрецию генов компонентов ВКМ хряща. Результаты показали, что каркасы обладали подходящими размерами пор и пористостью, высокими показателями коэффициента водопоглощения и модуля сжатия, необходимыми для поддержки культивируемых на них хондроцитов кролика. При этом по результатам метода полимеразной цепной реакции в реальном времени было показано, что каркас из Вартонова студня более благоприятен для усиления клеточного хондрогенеза, чем каркас из суставного хряща, демонстрируя большую экспрессию мРНК коллагена II и аггрекана [12]. В исследовании А. Е. Neto и соавт. (2024) был получен продукт из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, и проанализирована способность регенерации ткани трахеи после 60 дней имплантации полученной конструкции кроликам, подвергнутым традиционной трахеостомии. Конструкция продемонстрировала потенциал восстановления механических характеристик ВКМ трахеи, обеспечив необходимую поддержку и среду для регулирования процесса заживления дефекта и предотвратив стеноз с поддержанием желаемого диаметра трахеи. Однако, хотя она создавала благоприятную микросреду, она не показала значительных гистопатологических преимуществ по сравнению с естественным заживлением раны после дефекта трахеи вторичным натяжением [14]. В то же время в исследовании Y. Хи и соавт. (2020), где были получены нановолокнистые мембраны на основе децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека и поли(ϵ -капролактона) методом электропрядения, показано, что с увеличением содержания децеллюляризованного Вартонова студня наблюдалось улучшение абсорбционной способности, деградационных свойств, а также повышение адгезии клеток к продукту. Кроме того, удовлетворительная гомогенная структура

хряща через 12 недель в эксперименте *in vivo* была достигнута только в группе с самым высоким содержанием децеллюляризованного Вартонова студня. Также при реконструкции сегментарного дефекта трахеи на модели кроликов эта конструкция обеспечила долгосрочное (6 месяцев) восстановление периферических повреждений трахеи с биологической структурой и функцией, аналогичной нативной трахеи, что показывает перспективность использования децеллюляризованного Вартонова студня для тканевой инженерии трахеи [15].

Z. Yuan и соавт. (2022) исследовали репаративные свойства композитного материала, состоящего из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека и картогенина, с целью регенерации фиброзно-хрящевой ткани на границе сухожилия и кости ротаторной манжеты. В ходе экспериментов было продемонстрировано, что разработанный материал значительно усиливает адгезию, миграцию и пролиферацию МСК костного мозга в условиях *in vitro*. Более того, композит способствовал хондрогенной дифференцировке МСК костного мозга, что позволило достичь эффективной регенерации ткани в исследованиях *in situ in vivo* на модели разрыва сухожилия к кости ротаторной манжеты кролика [181].

Не менее значимым направлением применения пуповины человека является восстановление дефектов кожи и мягких тканей [23]. Например, В. Beiki и соавт. (2017) разработали пористый матрикс на основе децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека и оценили его эффективность в заживлении ран на модели экспериментальной полной толщины раны у лабораторных мышей. Применение децеллюляризованного Вартонова студня привело к полному закрытию раны, исчезновению струпа и полной реэпителизации, а также к формированию новых эпидермальных слоев и придатков уже через 12 дней после имплантации. Более того, использование материала не вызывало выраженных воспалительных реакций, что дополнительно подтверждает его безопасность [23]. В другом исследовании J.-H. Lu и соавт. (2023) разработали влажные повязки из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека с МСК жировой ткани крысы для заживления ран. Результаты

экспериментов на модели лимфедемы хвоста крысы показали, что разработанные тканеинженерные конструкции могут ускорить заживление ран и уменьшить лимфедему, способствуя образованию лимфатических сосудов и капилляров [182]. Также L. Chen и соавт. (2024) показали, что патч, состоящий из гидрогеля на основе децеллюляризованной пуповины человека в сочетании с МСК пуповины человека, может быть успешно применен для лечения пролежней. В ходе *in vitro* экспериментов было установлено, что гидрогель на основе децеллюляризованной пуповины человека эффективно поддерживает жизнеспособность клеток, усиливает экспрессию генов, ассоциированных со «стволовостью», а также способствует миграции эндотелиальных клеток пупочной вены человека и ангиогенезу. В экспериментах *in vivo* патч, сочетающий гидрогель на основе децеллюляризованной пуповины человека и МСК пуповины человека, значительно ускорил заживление пролежней у мышей линии C57BL/6, оказавшись более эффективным по сравнению с другими методами лечения, включая использование патча только с гидрогелем, инъекции МСК или марлевой повязки [183].

Исследования показывают, что пуповина может быть использована и при восстановлении костной ткани [16–18]. Так, Y. S. Fu и соавт. (2024) в экспериментах *in vivo* на модели критического дефекта свода черепа у крыс показали, что децеллюляризованный Вартонов студень пуповины человека способен усилить ангиогенез, образование коллагена, созревание остеобластов и рост костной ткани в области дефекта [16]. В другом исследовании, проведенном L. Scomazzon и соавт. (2024), показано, что сшивание дубильной кислотой мембран из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека с последующим их окислением периодатом натрия улучшает их биологические свойства. Полученные таким образом окисленные мембраны проявили антибактериальную и антиоксидантную активности, а также улучшенные характеристики *in vitro*, такие как повышенная адгезия и пролиферация первичных остеобластов и стромальных клеток пульпы зуба. Исследования *in vivo* на модели дефекта теменной кости у крыс показали

увеличение образования новой кости. Эти результаты подтвердили остеобиосовместимость и значительный потенциал сшитых дубильной кислотой и окисленных периодатом натрия мембран из децеллюляризованного Вартонова студня при восстановлении костной ткани [18].

Пуповина также обладает значительным потенциалом для восстановления нервной ткани [20; 21]. Z. Kočí и соавт. (2017) разработали инъекционный гидрогель из децеллюляризованной ткани пуповины человека, который в экспериментах *in vitro* способствовал миграции МСК человека, дифференцировке нейтральных стволовых клеток, а также росту аксонов. При введении гидрогеля в очаговое ишемическое поражение в моторной коре головного мозга крысы наблюдались его гелеобразование *in situ* и инфильтрация макрофагами хозяина [20]. Позже той же научной группой было продемонстрировано, что сшивка генипином улучшает биостабильность инъекционного гидрогеля из децеллюляризованной ткани пуповины человека. В эксперименте *in vivo* ими показано гелеобразование *in situ* сшитых генипином гидрогелей и улучшение удержания продукта на срок до 2 недель без каких-либо неблагоприятных тканевых реакций или усиления воспалительного ответа в случае кортикального ишемического поражения, что превосходит результаты несшитого гидрогеля из децеллюляризованной ткани пуповины человека [21].

Вартонов студень пуповины человека находит применение и в других областях медицины, включая тимпаноластику и кардиохирургию, где его используют для лечения повреждений перфораций барабанной перепонки, миокарда и улучшения регенерации сердечной ткани соответственно. Так, в исследовании P. Najafi и соавт. (2023) разработан тканеинженерный композитный каркас на основе поливинилового спирта, альгинатсульфата и децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека в качестве перспективной альтернативы традиционным хирургическим методам лечения перфораций барабанной перепонки [22]. Добавление децеллюляризованного Вартонова студня к каркасам, полученным методом электропрядения, на основе поливинилового спирта и альгинатсульфата позволило значительно улучшить

механические, физико-химические и биологические свойства материала, включая механическую прочность, способность к набуханию и стимулирование клеточной активности. Эксперименты *in vivo* показали высокую эффективность разработанного композита в регенерации барабанной перепонки, при этом восстановление слуховой функции достигло уровня, близкого к нормальному [22]. В исследовании L. K. Gamba и соавт. (2025) было изучено влияние введения моноклеарных клеток аутологичного костного мозга и имплантации децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, как по отдельности, так и в комбинации, на функциональные и гистопатологические параметры левого желудочка у крыс линии Вистар после инфаркта миокарда [19]. Результаты показали, что совместное использование клеток и Вартонова студня способствовало значительному улучшению сердечной функции и снижению размера поврежденной области миокарда через 30 дней после инфаркта [19].

Ткань пуповины человека также находит применение в качестве субстрата для 3D-культивирования различных типов клеток, что открывает новые возможности в клеточных технологиях и трансплантологии [184–186]. Так, D. Li и соавт. (2019) разработали систему 3D-культуры на основе децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека, которая поддерживает пролиферацию гемопоэтических стволовых клеток, полученных из CD34⁺ клеток пуповинной крови. При этом удалось повысить их потенциал к трансмиграции и сохранить способность к дифференцировке, что делает эту систему перспективной для исследования стволовых клеток и их применения в терапии [184]. В свою очередь, M. Talebi и соавт. (2020) продемонстрировали, что децеллюляризованный Вартонов студень пуповины человека может служить доступной альтернативой дорогостоящим бессывороточным средам для культивирования лимфоцитов и использоваться как вспомогательный компонент для активации и пролиферации клеток [185]. Также есть исследование оценки развития преантральных фолликулов мыши как в 3D-культуре *in vitro*, так и при трансплантации с использованием децеллюляризованного Вартонова

студня пуповины человека. Так, E. Zand и соавт. (2023) показали, что смесь альгината и гидрогеля из децеллюляризованного Вартонова студня пуповины человека может поддерживать развитие *in vitro* и *in vivo* инкапсулированных мышинных преантральных фолликулов вплоть до антральной стадии, усиливая экспрессию фактора роста эндотелия сосудов и CD34 как факторов, способствующих ангиогенезу в трансплантированных инкапсулированных фолликулах [186]. В другом исследовании, M. Kehtari и соавт. (2019) предложили применять децеллюляризованный Вартонов студень пуповины человека в качестве биоматериала для стимулирования дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в гепатоциты [24]. Экспрессия генов, специфичных для печени человека, таких как *ALB*, *CK19*, *TAT* и *CYP7A1*, значительно возросла на поздней стадии дифференцировки при культивировании клеток на каркасах из децеллюляризованного Вартонова студня по сравнению с традиционными 2D-условиями. Кроме того, функциональная активность полученных гепатоцитов была подтверждена путем оценки секреции альбумина и синтеза мочевины, что подчеркивает эффективность разработанной системы для гепатоцитарной дифференцировки [24].

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует о значительном терапевтическом потенциале тканеинженерных конструкций на основе биологического материала пуповины человека для регенерации поврежденных тканей и органов в различных областях медицины. Благодаря уникальному сочетанию функциональных, структурных и биологических свойств пуповина может использоваться как самостоятельно, так и в составе композиционных материалов. Ее высокая доступность и отсутствие этических и юридических ограничений делают ее особенно привлекательной для разработки лекарственных препаратов и/или медицинских изделий для применения в области регенеративной медицины.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Забор материала

Объектами исследования являлись биологический материал пуповины человека, который был получен от здоровых доношенных новорожденных после естественных родов, а также тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека. Забор биологического материала проводили только при наличии информированного добровольного согласия матерей. Все пациентки прошли комплексное лабораторное обследование для исключения инфекционных заболеваний, включая гепатиты А и В, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирусную инфекцию и сифилис. Изъятие и транспортировку пуповин проводили в двойном стерильном (одноразовом) контейнере, содержащем физиологический раствор. Хранение биологического материала осуществляли при температуре -20°C для обеспечения его стабильности до начала исследования.

Все исследования, связанные с использованием биологического материала пуповины человека, а также эксперименты на животных, были выполнены в строгом соответствии с основными этическими принципами и правилами биологической безопасности и получили одобрение независимого Этического комитета при Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (Санкт-Петербург, Россия, протокол № 203 от 20 марта 2018 г., протокол № 230 от 17 декабря 2019 г. и протокол № 263 от 31 мая 2022 г.).

2.2 Изготовление тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека

В рамках настоящего исследования были разработаны и получены два варианта тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека – матрикс и гидролизат. Способы изготовления и медицинского применения тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека защищены патентами РФ № 2795904 (Приложение Д) и № 2816034 (Приложение Е).

2.2.1 Получение матрикса

Для получения матрикса применяли детергентный метод децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека с использованием стерильных растворов SDS (ЛенРеактив, Россия) в различной концентрации согласно схеме, представленной на Рисунке 1.

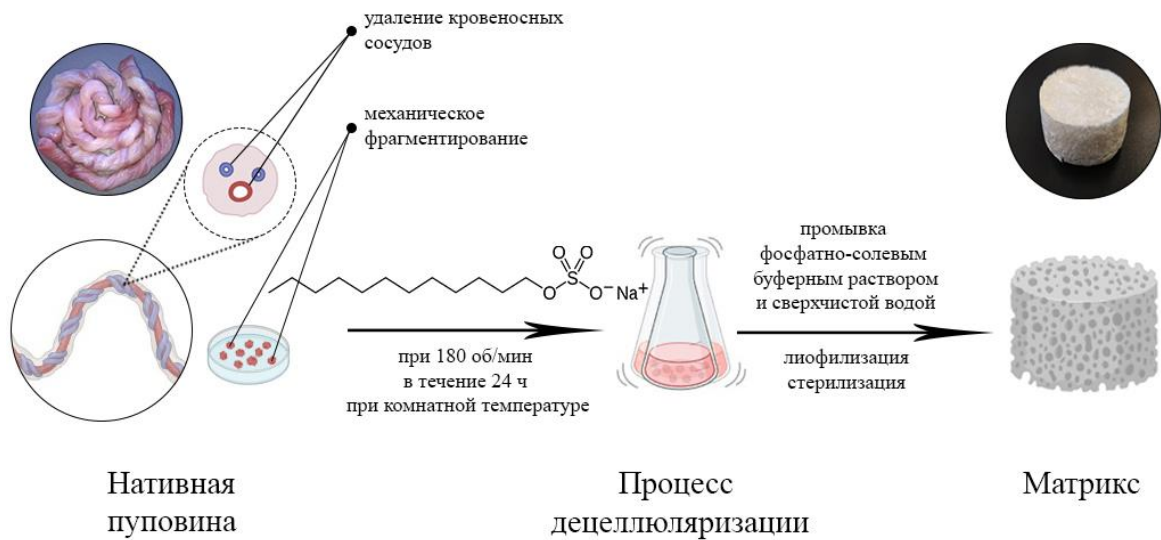


Рисунок 1 – Схема получения матрикса Вартонова студня пуповины человека детергентным методом децеллюляризации с использованием стерильного раствора додецилсульфата натрия

На предварительном этапе образцы пуповины подвергали циклам попеременного замораживания и оттаивания в диапазоне температур от -20 до $+30$ °C. Далее проводили промывку очищенной и деионизированной в системе Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, США) сверхчистой водой (СЧВ) для удаления остатков компонентов крови. После этого образцы обрабатывали 6%-ным раствором перекиси водорода и препарировали в боксе микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 NEOTERIC (Ламинарные системы, Россия) с соблюдением правил асептики, извлекая вену и артерии. Вартонов студень пуповины человека вместе с покрывающей его амниотической оболочкой подвергали механическому фрагментированию для дальнейшей обработки [187].

Перед процессом децеллюляризации образцы пуповин человека сортировали случайным образом на подгруппы. Для определения наиболее эффективного способа децеллюляризации были опробованы различные концентрации SDS: 0,01; 0,03 и 0,05%. Образцы пуповин в каждом из трех растворов обрабатывались в течение 24 ч при комнатной температуре (КТ) с постоянным перемешиванием на шейкере ES-20/60 (Biosan, Латвия) со скоростью вращения 180 об/мин. По окончании децеллюляризации образцы подвергали отмывке фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, pH 7,4) и СЧВ с целью удаления детергента, открепившихся клеток и клеточного дебриса.

Полученный материал лиофилизировали на лабораторной лиофильной сушке VaCo 5-II (ZIRBUS Technology, Германия), а затем подвергали радиационной стерилизации при 25 кГр на радиационно-технологической установке с ускорителем электронов УЭЛР-10-20С модели MB 10-30 SC900 (Mevex, США), принадлежащей ООО «АКЦЕНТР СЕВЕРО-ЗАПАД», и хранили герметично упакованным при температуре -20°C .

2.2.2 Получение гидролизата

Для получения гидролизата Вартонова студня пуповина человека лиофилизированный матрикс (изготовленный по описанной выше технологии) подвергали ферментативному гидролизу (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Схема получения гидролизата Вартонова студня пуповины человека методом ферментативного гидролиза с использованием солянокислого пепсина

Процесс проводили с использованием солянокислого раствора пепсина (1:3000, Servicebio, Китай, CAS 9001-75-6) в концентрации 1 мг фермента на 1 мл 0,01 N HCl (pH $1,8 \pm 0,2$). Соотношение матрикса к раствору составляло 10:1. Ферментативный гидролиз осуществляли в течение 72 ч при КТ и постоянном перемешивании со скоростью вращения 180 об/мин. Затем полученный гидролизат нейтрализовали добавлением 0,1 N раствора NaOH ($\sim 1/9$ от исходного объема) и 10-кратного PBS ($\sim 1/10$ конечного нейтрализованного объема) до достижения pH $7,4 \pm 0,2$. Перед нейтрализацией раствор NaOH и PBS охлаждали на льду в течение 15 мин. Контроль водородного показателя осуществляли с помощью pH-метра pH-150МИ (Измерительная техника, Россия).

Полученный материал лиофилизировали, стерилизовали и хранили как указано в п. 2.2.1.

2.3 Оценка эффективности децеллюляризации

2.3.1 Гистологический анализ образцов

Образцы Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации подвергали заливке в парафин с использованием станции для заливки биологических тканей парафином HistoStar (Thermo Fisher Scientific, США). Далее готовили срезы толщиной ($1 \pm 0,5$) мкм на автоматическом ротационном микротоме, оснащенной системой переноса срезов STS HM 355S (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные срезы депарафинировали и окрашивали Н&Е и трихромом Массона в соответствии с инструкциями производителя наборов (БиоВитрум, Россия). После окрашивания препараты подвергали обезвоживанию и заключали под покровные стекла (Thermo Fisher Scientific, США) для дальнейшего анализа. Оценку результатов окрашивания выполняли с использованием светового микроскопа Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Германия) при различных увеличениях.

2.3.2 Флуоресцентная микроскопия для выявления клеточных ядер

Эффективность протоколов децеллюляризации оценивали с использованием флуоресцентного красителя DAPI (Servicebio, Китай). Депарафинированные срезы образцов Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации, приготовленные в соответствии с методикой, описанной в п. 2.3.1, инкубировали в течение 5 мин в 300 нМ растворе DAPI в PBS в темноте для визуализации клеточных ядер. После инкубации срезы промывали PBS для удаления избытка красителя и анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM-880 (Carl Zeiss, Германия).

2.3.3 Количественное определение двухцепочечной ДНК

Количественную оценку содержания двухцепочечной ДНК в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации проводили с использованием коммерческого набора для выделения ДНК DU-250 (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Образцы предварительно подвергали воздействию протеиназы К (44 ЕД/мг, CAS 39450-01-6, МЕРЕР Bio Science, Китай) с протеолитической активностью 40 ЕД/мл в течение 1 ч при температуре $(56 \pm 2) ^\circ\text{C}$ для высвобождения нуклеиновых кислот.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США) при длинах волн 260 и 280 нм. Для анализа было исследовано по 10 образцов из каждой группы.

2.3.4 Электрофоретическое разделение молекул ДНК в агарозном геле в присутствии бромистого этидия

Для определения размеров фрагментов ДНК в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации использовали метод электрофореза в агарозном геле. Исследуемые образцы ДНК и маркер молекулярного веса (13 фрагментов ДНК от 50 до 1500 пар нуклеотидов; diaGene, Россия) вносили в лунки 1,8%-ного агарозного геля, содержащего бромистый этидий (Биолабмикс, Россия). Электрофорез выполняли при напряжении

70 В в течение 90 мин в мини-камере для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США) с использованием однократного трис-ацетатного буферного раствора. Визуализацию и анализ результатов осуществляли с помощью системы гель-документирования ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

2.3.5 Количественное определение остаточного содержания додецилсульфата натрия

Количественно SDS определяли масс-спектрометрически методом внешнего стандарта. Вкратце, к навескам образцов Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации (до 50 мг) добавляли 500 мкл смеси протеиназы К с протеолитической активностью 40 ЕД/мл и буферного раствора (pH 7,6), содержащего 50 мМ трис-HCl, перемешивали и оставляли на ночь при $(56 \pm 1) ^\circ\text{C}$. После инкубации несколько образцов из одной группы объединяли и концентрировали на роторном вакуумном испарителе Hei-Var Advantage ML/G3B (Heidolph, Германия).

Для построения калибровочной кривой готовили стандартные растворы с заданными концентрациями (от 0 до 350 мкМ). Аликвоты стандартов и анализируемых образцов вводили в масс-спектрометр последовательно при помощи стеклянного шприца Гамильтон со скоростью 180 мкл/ч. Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре maXis impact (Bruker, Германия), оснащенном масс-анализатором на основе времяпролетной трубы и источником ионов Apollo (ESI) с системой ионизации электроспреем при атмосферном давлении. Масс-спектры записывали в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов в диапазоне m/z от 50 до 1300. Для достижения максимальной интенсивности масс-спектров анализируемых образцов на наличие ионов SDS были оптимизированы параметры ионного источника на основе предварительных экспериментов: напряжение на капилляре составило 4500 В, давление газ-распылителя – 2,0 бар, температура газа-осушителя – $220 ^\circ\text{C}$, скорость потока газа-осушителя – 8 л/мин.

Управление масс-спектрометром, сбор и обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения tofControl (Bruker, Германия).

2.4 Оценка компонентного состава

Для оценки компонентного состава образцы Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации подвергали криогенному измельчению на планетарной шаровой криомельнице CPBM-2L (ERSTVAK Ltd., Россия).

Значения оптической плотности стандартов, холостых реактивов и анализируемых образцов измеряли с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Содержание ключевых компонентов ВКМ определяли методом градуировочного графика и нормировали по массе сухого образца (мкг/мг сухого веса). Для анализа было исследовано по 10 образцов из каждой группы.

2.4.1 Количественное определение гидроксипролина и общего коллагена

Определение гидроксипролина

Определение НuPro осуществляли спектрофотометрически по методике, описанной в работе [188]. К навескам анализируемых образцов (до 10 мг) добавляли 1 мл 6 М HCl и проводили гидролиз при (120 ± 2) °C в течение 6 ч. После этого растворы упаривали досуха. Сухие остатки растворяли в СЧВ, после чего полученный раствор подвергали анализу на содержание НuPro с использованием метода, основанного на реакции взаимодействия с реактивом Эрлиха.

Реагенты и стандартную кривую готовили непосредственно перед началом анализа. Для приготовления буферного раствора (рН 6,0) 7,24 г ацетата натрия предварительно растворяли в 60 мл СЧВ. Затем последовательно добавляли 5 г лимонной кислоты, 1,2 мл ледяной уксусной кислоты и 3,4 г NaOH (все реактивы от ЛенРеактив, Россия). Общий объем раствора доводили до 100 мл СЧВ. Для получения раствора хлорамина 1,068 г хлорамина Т (ЛенРеактив, Россия) растворяли в 20 мл СЧВ, затем добавляли 30 мл этилцеллозольва (Экос-1, Россия) и 50 мл буферного раствора.

Для построения стандартной кривой 10 мг сверхчистого порошка L-гидроксипролина (CAS 51-35-4, Sisco Research Laboratories, Индия) растворяли

в 100 мл СЧВ для получения раствора с концентрацией 100 мкг/мл. Затем отбирали от 20 до 100 мкл полученного раствора и доводили общий объем до 200 мкл добавлением СЧВ.

Окисление НуPro проводили при добавлении 100 мкл раствора хлорамина в каждую пробирку, смесь взбалтывали и выдерживали 20 мин при КТ. Избыток хлорамина разрушали добавлением 100 мкл 3,15 М HClO_4 (ЛенРеактив, Россия), взбалтывали и по истечении 5 мин добавляли по 100 мкл 20%-ного раствора *пара*-диметиламинобензальдегида (реагент Эрлиха, Диаэм, Россия) в этилцеллозольве и вновь взбалтывали. Пробирки помещали в воду, нагретую до $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ на 20 мин, затем охлаждали в течение 5 мин. Далее добавляли по 500 мкл этилцеллозольва в каждую пробирку до суммарного объема 1 мл.

Анализируемые образцы готовили таким же образом (исходный объем составлял 200 мкл перед добавлением раствора хлорамина и 1 мл после добавления всех реагентов) на базе аликвоты, полученной из исходного раствора после кислотного гидролиза последовательным отбором и разбавлением с таким расчетом, чтобы предполагаемая конечная концентрация НуPro находилась в диапазоне от 2 до 10 мкг/мл, что соответствует линейности спектрофотометрического определения. Оптическую плотность измеряли при длине волны 558 нм.

Определение растворимого и нерастворимого коллагена

Количественный анализ растворимого и нерастворимого коллагена проводили спектрофотометрически с использованием коммерческих наборов для анализа коллагена Sircol 2.0 Soluble Collagen и Sircol™ – Insoluble Collagen (Bioscolor, Великобритания) соответственно. Экстракцию растворимого коллагена проводили путем добавления к навескам анализируемых образцов (до 100 мг) 0,5 М уксусной кислоты с последующим механическим перемешиванием в течение 24 ч при температуре $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$. Затем образцы центрифугировали в течение 10 мин при $12\,000 \times g$ (микроцентрифуга Mini, Gyrozen, Южная Корея) и от 10 до 100 мкл надосадочной жидкости анализировали на наличие растворимого коллагена согласно инструкции производителя. Нерастворившийся

осадок после холодной кислотной экстракции подвергали лиофилизации и последующей обработке реагентом для фрагментации в течение 3 ч при температуре (65 ± 2) °С. Затем образцы центрифугировали в течение 10 мин при $12\,000 \times g$ и от 10 до 100 мкл надосадочной жидкости анализировали на наличие нерастворимого коллагена в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность измеряли при длине волны 556 нм. Общий коллаген рассчитывали как сумму растворимого и нерастворимого коллагена.

2.4.2 Количественное определение гликозаминогликанов

Определение гиалуроновой кислоты

Количественный анализ ГК проводили спектрофотометрически с использованием коммерческого набора для анализа гиалуронана Purple-Jelley Hyaluronic Acid (Biocolor, Великобритания). К навескам анализируемых образцов (до 10 мг) добавляли 400 мкл смеси протеиназы К с протеолитической активностью 40 ЕД/мл и буферного раствора (рН 7,6), содержащего 50 мМ трис-НCl, перемешивали и оставляли на ночь при (56 ± 2) °С. Затем образцы анализировали на наличие ГК согласно инструкции производителя. Оптическую плотность измеряли при длине волны 655 нм.

Определение сульфатированных гликозаминогликанов

Сульфатированные GAG количественно определяли в анализируемых образцах спектрофотометрически с использованием колориметрического метода окрашиванием альциановым синим [145] с некоторыми изменениями и модификациями. К навескам анализируемых образцов (до 10 мг) добавляли смесь протеиназы К с протеолитической активностью 40 ЕД/мл и буферного раствора (рН 7,6), содержащего 50 мМ трис-НCl, в соотношении 1:50, перемешивали и оставляли на ночь при (56 ± 2) °С. После гидролиза образцы центрифугировали при $12\,000 \times g$ в течение 10 мин. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли 2 объема 4%-ного ацетата натрия в 96%-ном этаноле, перемешивали и оставляли на 15 мин при КТ. Осадок, собранный после центрифугирования ($12\,000 \times g$ в течение 10 мин), осаждали этанолом

и снова центрифугировали при $12\ 000 \times g$ в течение 5 мин. После удаления супернатанта к осадку добавляли 1 мл СЧВ и экстрагировали сульфатированные GAG в течение 30 мин при КТ, периодически перемешивая. Отбирали аликвоту надосадочной жидкости с таким расчетом, чтобы предполагаемая конечная концентрация сульфатированных GAG была от 1 до 10 мкг на лунку, что соответствует линейности спектрофотометрического определения. Затем к стандартам, холостому реактиву и анализируемым образцам добавляли 250 мкл 0,01%-ного альцианового синего 8GX (PanReas AppliChem, Испания) в 0,1 М HCl (pH $\sim 1,5$) и инкубировали в течение ночи на орбитальном шейкере (220 об/мин) при КТ. После центрифугирования ($12\ 000 \times g$ в течение 10 мин) удаляли супернатант, к осадку добавляли 250 мкл 6 М HCl и инкубировали в течение 30 мин на орбитальном шейкере при КТ. Оптическую плотность измеряли при длине волны 615 нм. Реагенты и стандартную кривую готовили непосредственно перед началом анализа. Для построения стандартной кривой 10 мг хондроитина сульфата натрия (CAS 9082-07-9, Sigma-Aldrich, Германия) растворяли в 100 мл СЧВ с получением раствора с концентрацией 100 мкг/мл.

2.4.3 Метод масс-спектрометрического секвенирования пептидов и определение их аминокислотных последовательностей

Для определения аминокислотных последовательностей методом масс-спектрометрического секвенирования пептидов образцы Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации денатурировали в 8 М мочеvine (Merck, Германия) с последующим разрывом дисульфидных связей дитиотреитолом (Sigma-Aldrich, США) и алкилированием йодацетамидом (Sigma-Aldrich, США). Далее реакционную смесь разбавляли 50 мМ трис-HCl (pH 8,0) и добавляли в нее 1 мкг модифицированного трипсина Trypsin Gold (Promega, США) с последующей инкубацией в течение ночи при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Пептиды экстрагировали с использованием картриджей с обращенной фазой (30 мг, Strata-X, #8B-S100-TAK, Phenomenex, США) и последующим высушиванием в ротационном вакуумном концентраторе RVC 2-33 IR (Martin Christ, Германия). Пептидные смеси (по 600 нг) разделяли в нанопотоковой

хроматографической системе ВЭЖХ (Eksigent NanoLC Ultra 2D+, Sciex, Германия) на обращенно-фазовой колонке Chromolith CapRod RP-18e HR (0,1 × 150 мм, Merck, Германия) с использованием водно-ацетонитрильного градиента от 0 до 50% элюента Б при скорости потока 400 нл/мин. В качестве элюента А применяли 5%-ный водный раствор ацетонитрила (ACN, Кριοхром, Россия), содержащий 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ, neoFroxx, Германия), а элюента Б – 60%-ный водный раствор ACN, содержащий 0,1% ТФУ. Элюат, смываемый с колонки, смешивали с раствором матрицы, содержащим 5 мг/мл α-циано-4-гидроксикоричной кислоты (Sigma-Aldrich, США) и 0,2% ТФУ в 95%-ном метаноле, а также два пептида для внутренней калибровки – фрагмент брадикинина 2–9 (30 пМ/мл) и фрагмент адренокортикотропного гормона 18–39 (60 пМ/мл) – при скорости потока 1,4 мкл/мин. Полученные элюаты фракционировали и наносили на МАЛДИ-мишени посредством коллектора микрофракций (704 фракции на одну хроматограмму).

Масс-спектрометрический анализ проводили на системе 5800 TOF/TOF (Sciex, США) в режиме рефлектрона (MS) и tandemной масс-спектрометрии (MS/MS). MS/MS-спектры анализировали с помощью поискового программного обеспечения ProteinPilot 5.0 (Sciex, Германия) с использованием международных белковых баз данных UniProtKB (<https://www.uniprot.org>) и MatrixDB (<http://matrixdb.ibcp.fr>). В качестве критериев отбора пептидных фрагментов для дальнейшего анализа применяли детекцию с достоверностью не менее 95%, а также их присутствие во всех повторностях анализируемых образцов.

2.5 Оценка структурных и морфологических характеристик

2.5.1 Метод сканирующей электронной микроскопии

Морфологию поверхности образцов тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека – матрикса и гидролизата – исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (SEM). Анализ проводили на сканирующем электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 5 кВ с использованием детектора вторичных

электронов. Анализируемые образцы приклеивали специальным проводящим клеем на держатели для SEM. Во избежание накопления статического электрического заряда на поверхности все образцы покрывали тонким слоем ($\approx 5 \text{ \AA}$) платины методом катодного распыления с использованием установки Q150T ES (Quorum Instruments, Великобритания). Размеры пор измеряли с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1,54g; National Institutes of Health, США).

2.5.2 Метод определения пористости

Определение пористости проводили с использованием этанола по методике, описанной в работе [23]. Образцы тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека погружали в градуированный цилиндр, содержащий определенный объем абсолютного этанола (V_1). Цилиндр помещали в вакуум на 10 мин, чтобы этанол проник в поры образца. Общий объем этанола и заполненного этанолом образца затем обозначался как V_2 . Остаточный объем этанола после удаления образца из цилиндра обозначался как V_3 . Пористость каркаса (p) рассчитывали по формуле (1):

$$p = \frac{(V_1 - V_3)}{(V_2 - V_3)}. \quad (1)$$

2.5.3 Метод инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье

Инфракрасные (ИК) спектры образцов нативной пуповины человека и тканеинженерных продуктов из нее регистрировали на ИК-Фурье спектрометре i-Red 7800u-L (SILab, Китай), оснащенном приставкой Quest с кристаллом из монокристаллического алмаза (Specac, Великобритания), методом нарушенного полного внутреннего отражения. Для повышения точности данных выполняли усреднение результатов 20 сканирований в диапазоне волновых чисел от 4000 до 600 см^{-1} , при спектральном разрешении 2 см^{-1} . Обработку и анализ спектроскопических данных проводили с использованием программного обеспечения SILab WSI.

2.6 Оценка биологического действия

2.6.1 Оценка на цитотоксичность методами *in vitro*

Анализ цитотоксичности тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека проводили в соответствии с ГОСТ ISO 10993–5–2023 [189]. В качестве тест-системы в исследовании использовали две неиммортиализованные линии клеток человека, обладающие мультипотентными свойствами – фибробласты дермы (ФД) и фетальные МСК костного мозга, которые были получены в Институте цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе в питательной среде DMEM/F12 (Биолот, Россия), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) и 1% пенициллин-стрептомицина (Gibco, США), при (37 ± 1) °C в атмосфере 5% CO₂.

Исследование экстрактов

Для оценки влияния тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека на ФД использовали метод экстрактов с применением тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ) в соответствии со стандартным протоколом. Метод основан на приготовлении экстрактов из анализируемых образцов в условиях, приближенных к условиям клинического применения, и с учетом свойств самого материала. Экстракцию проводили в стерильных, химически инертных, закрытых емкостях с соблюдением правил асептики в соответствии с ГОСТ ISO 10993-12-2023 [190] при (37 ± 1) °C в течение 72 ч. В качестве экстрагента использовали полную питательную среду DMEM/F12 (Биолот, Россия). Концентрация анализируемых образцов в пробе составляла 1, 5 и 10 мг/мл.

Клетки высевали в 96-луночные планшеты в 100 мкл полной питательной среды в количестве 1×10^4 клеток на лунку. После прикрепления клеток или спустя 24 ч после нее стандартную питательную среду заменяли на модельные среды на основе экстрактов из тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека. Затем клетки культивировали в CO₂-

инкубаторе MCO-19AIC (Sanyo, Япония) в течение 24 ч при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере 5% CO_2 . В процессе культивирования морфологическое состояние клеток оценивали методом фазового контраста с использованием инвертированного микроскопа ECLIPSE TS100 (Nikon, Япония). В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в стандартной питательной среде. Спустя сутки культивирования производили смену питательной среды на 100 мкл питательной среды, содержащей МТТ (Sigma-Aldrich, США) в PBS (0,5 мг/мл) в количестве 10% от общего объема. Планшет с клетками помещали в CO_2 -инкубатор при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 4 ч, после чего среду, содержащую МТТ, удаляли, добавляли по 100 мкл раствора диметилсульфоксида (ДМСО) в каждую лунку и в течение 15–20 мин экстрагировали внутриклеточные кристаллы формазана при КТ. Оптическую плотность полученного раствора формазана в ДМСО измеряли с использованием мультимодального ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 570 нм (референсная длина волны 620 нм).

Полученные данные использовали для оценки метаболической активности клеток как показателя их жизнеспособности. Снижение жизнеспособности клеток более чем на 30% считали цитотоксическим эффектом [189].

Исследование методом прямого контакта

Цитотоксичность образцов тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека в виде фрагментов оценивали *in vitro* методом прямого контакта на культуре фетальных МСК костного мозга человека. Наблюдение за ростом и состоянием клеток продолжали в течение 72 ч для выявления возможного пролонгированного цитотоксического эффекта. Мониторинг культуры осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Primo Vert (Zeiss, Германия) методом фазового контраста.

2.6.2 Оценка гемосовместимости *in vitro*

Оценку гемолитической активности образцов тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека проводили в соответствии с методикой,

описанной в [183], непрямым методом, а именно, по гемолизу, индуцированному веществами, экстрагируемыми из анализируемых образцов [191]. Приготовление экстрактов проводили согласно ГОСТ ISO 10993-12-2023 [190] при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 72 ч. В качестве экстрагента использовали физиологический раствор хлорида натрия в воде (0,9%-ный раствор NaCl).

Цельную кровь, полученную от здоровых доноров и стабилизированную гепарином, центрифугировали при $2000 \times g$ при КТ в течение 15 мин (центрифуга лабораторная СМ-6МТ, ELMi, Латвия). Осадок эритроцитов промывали не менее трех раз до получения бесцветной промывной жидкости, а затем разбавляли до 5%-ной суспензии эритроцитов 0,9%-ным раствором NaCl.

К экстрактам из тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека добавляли суспензию эритроцитов (200 мкл суспензии на 800 мкл анализируемого образца), конечная концентрация анализируемых образцов в пробе составляла 1, 5 и 10 мг/мл. Для получения положительного (100%-ный лизис эритроцитов) и отрицательного (отсутствие лизиса эритроцитов) контролей в пробы вместо анализируемых образцов вносили 10%-ный раствор Triton X-100 (BioFroxx, Германия) и физиологический раствор соответственно. Пробы инкубировали в течение 3 ч при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. По окончании инкубации пробы центрифугировали при $5000 \times g$ в течение 5 мин и отбирали супернатант для анализа. Значения поглощения анализируемых образцов, а также положительного и отрицательного контролей измеряли при длине волны 540 нм с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Степень гемолиза в процентах рассчитывали по формуле (2):

$$\text{Степень гемолиза(\%)} = \frac{A_i - A_0}{A_{100} - A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

где A_i – оптическая плотность анализируемого образца;

A_0 – оптическая плотность отрицательного контроля;

A_{100} – оптическая плотность положительного контроля.

2.6.3 Оценка биологической реакции подкожной ткани

Исследование биологической реакции подкожной ткани на тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека проводили согласно ГОСТ ISO 10993–6–2021 [192].

Были проведены две серии исследований на белых беспородных мышах 3–4 месячного возраста обоего пола ($n = 60$), с равным количеством самцов и самок, со средней массой тела ($24,25 \pm 0,48$) г. Анестезию проводили с использованием ксилазина (препарат «Ксила», Interchemie, Эстония, 100 мг/кг массы тела). В асептических условиях в области холки выполняли разрез длиной около 5 мм и под кожу имплантировали стерильные образцы тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека массой ($10 \pm 0,5$) мг. Разрез ушивали хирургическим шовным материалом 6-0 Surgipro II (Medtronic, США). Оценку тканевой реакции проводили на 7, 14, 21, 28 и 42-е сут после начала эксперимента. На каждом этапе путем эвтаназии передозировкой паров эфира выводили по 6 животных из эксперимента.

После гуманной эвтаназии животного забирали место имплантации с достаточным количеством окружающей его незатронутой ткани для оценки местной гистопатологической реакции. Образцы извлеченных тканей в области имплантации подвергали химической фиксации в 10%-ном нейтральном забуференном формалине (Синтакон, Россия) в течение 24 ч. Далее проводили постепенное обезвоживание образцов в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Готовили серийные срезы и окрашивали Н&Е и по Массону в соответствии с п. 2.3.1.

2.7 Статистические методы анализа результатов

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета программного обеспечения SPSS Statistics v. 26.0 (IBM, США).

Описательная статистика представлена следующими показателями: средняя арифметическая (M), медиана (Me), стандартное отклонение (SD), межквартильный размах (IQR), нижний квартиль (Lower), верхний квартиль

(Upper), минимум (Min), максимум (Max). Поскольку распределение данных отличалось от нормального, для сравнения двух зависимых выборок при оценке качества децеллюляризации, а также структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека применяли непараметрический критерий Вилкоксона, для двух независимых выборок – критерий Манна–Уитни. При сравнении трех и более зависимых выборок использовали двухфакторный ранговый дисперсионный анализ Фридмана для связанных выборок с post-hoc анализом и применением поправки Бонферрони на множественность сравнений. При сравнении трех и более независимых выборок использовали критерий Краскела–Уоллиса с последующим апостериорными парными сравнениями с помощью критерия Данна. Данные представляли в виде Me (Lower–Upper). Результаты исследования биологического действия тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека проверяли на нормальность с помощью критерия Колмогорова и анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного критерия Тьюки и представляли в виде $M \pm SD$. За уровень статистической значимости для данных критериев принимали $p < 0,05$.

Статистическая оценка качества децеллюляризации, а также структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека представлена в Таблице Ж.1 (Приложение Ж).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Качество децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека

После процесса децеллюляризации биологический материал пуповины человека приобретал белесый оттенок, утратив характерный первоначальный цвет (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Внешний вид Вартонова студня пуповины человека до (А) и после (Б) децеллюляризации

Гистологические исследования с окрашиванием Н&Е не выявили наличия ядерного или цитоплазматического окрашивания в децеллюляризованных образцах (Рисунок 4А–Г). Анализ окрашенных DAPI образцов Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием растворов SDS различной концентрации также показал отсутствие клеточных ядер во всех случаях по сравнению с образцами Вартонова студня пуповины человека до децеллюляризации (Рисунок 4Д–З).

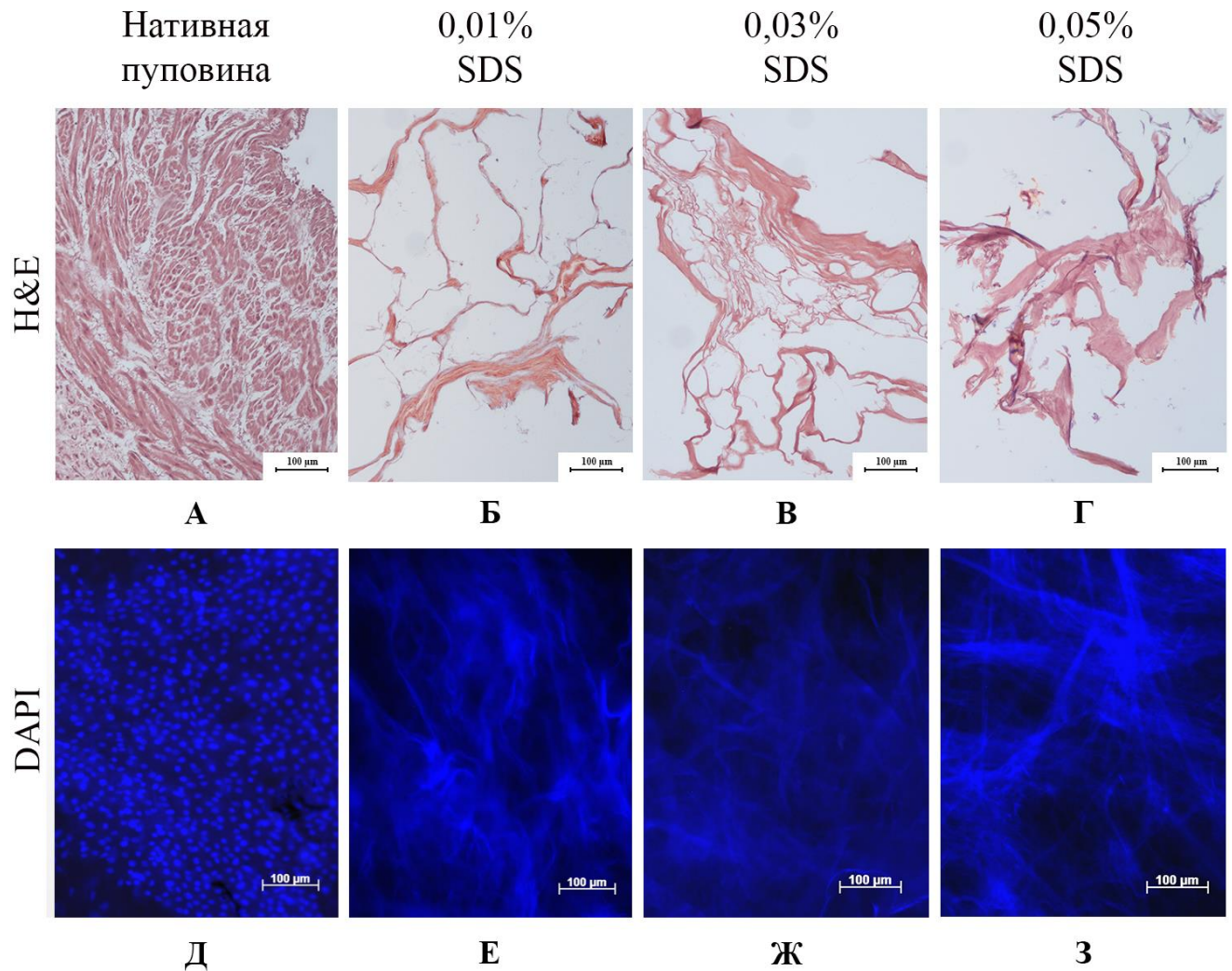


Рисунок 4 – Результаты гистологического окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) образцов Вартонова студня пуповины человека до (А) и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия (SDS) в концентрации 0,01 (Б), 0,03 (В) и 0,05% (Г) соответственно. Масштабный отрезок 100 мкм.

Результаты окрашивания DAPI образцов Вартонова студня пуповины человека до (Д) и после децеллюляризации с использованием растворов SDS в концентрации 0,01 (Е), 0,03 (Ж) и 0,05% (З) соответственно. Масштабный отрезок 100 мкм

Количественное содержание двухцепочечной ДНК и оценка размеров фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации с использованием растворов SDS различной концентрации представлены на Рисунке 5.

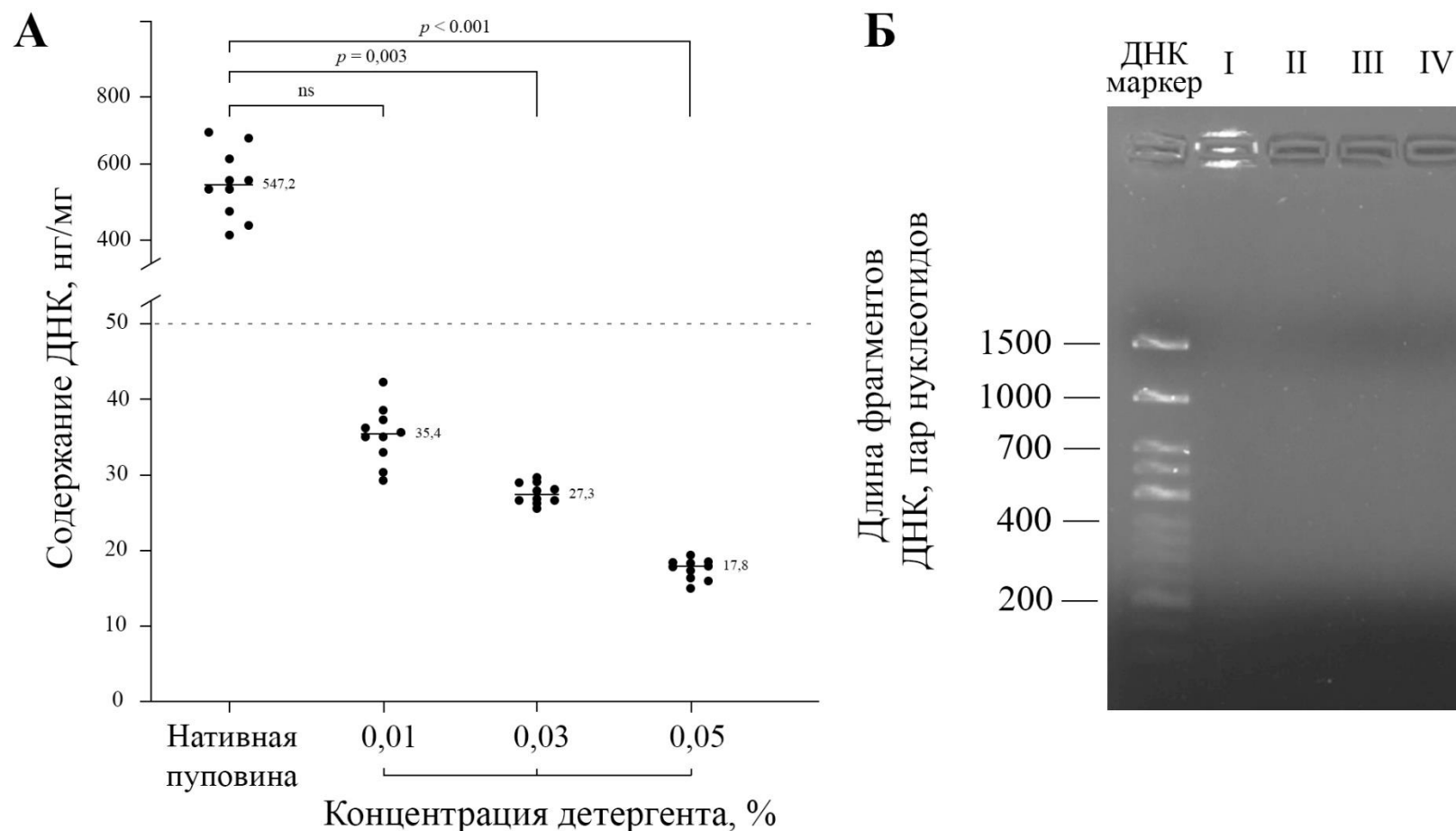


Рисунок 5 – Результаты оценки качества децеллюляризации. (А) Количественное содержание двухцепочечной ДНК (пунктирная линия на графике указывает на порог успешной децеллюляризации – содержание ДНК 50 нг/мг сухого веса), представленное в виде точек и медианы, $n = 10$ для каждой группы и (Б) электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле в образцах Вартонова студня пуповины человека до (I) и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия в концентрации 0,01 (II) 0,03 (III) и 0,05% (IV) соответственно. ns – не является статистически значимым

Результаты оценки качества децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека с использованием растворов SDS различной концентрации соответствовали критериям качественной децеллюляризации, направленной на минимизацию нежелательных иммунных реакций. Эти критерии включают: отсутствие видимого ядерного материала в тканевых срезах анализируемых образцов при окрашивании H&E и/или DAPI, количественное содержание двухцепочечной ДНК менее 50 нг/мг сухого веса ВКМ и отсутствие фрагментов ДНК длиной более 200 пар нуклеотидов [105].

Отсутствие цитотоксического действия децеллюляризованного ВКМ для клеток в сайте имплантации в значительной степени зависит также от качественного удаления агентов децеллюляризации [141; 142]. Додecilсульфат натрия, или лаурилсульфат натрия, являясь натриевой солью лаурилсерной кислоты и сильным анионным поверхностно-активным веществом [193; 194], широко используется в протоколах децеллюляризации благодаря своей способности эффективно удалять клеточный и генетический материал [105; 195]. Однако полное удаление SDS после процесса децеллюляризации из конечного продукта затруднено, что может стать причиной проявления токсических эффектов в отношении различных типов клеток при рецеллюляризации или имплантации, когда происходит заселение конструкции клетками реципиента [142; 196].

Сообщалось, что разные типы клеток могут иметь разные пороги концентрации индуцированной детергентом цитотоксичности [194; 196; 197]. Например, для клеток бронхиального эпителия, фибробластов легких и МСК костного мозга человека значение SDS составляет 0,002%, тогда как для эндотелиальных клеток легочных сосудов человека оно снижается до 0,00012% [197]. Концентрации SDS выше 0,003% оказались токсичными для МСК жировой ткани кролика, при этом их жизнеспособность снизилась до 49,4%. В то же время линия клеток эмбриональной почки человека HEK 293 продемонстрировала относительно высокую устойчивость: при концентрациях SDS 0,003 и 0,001% их жизнеспособность составила 87,4

и 85,4% соответственно [194]. Учитывая предполагаемое применение тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, мы уделили особое внимание определению остаточного содержания SDS. Количественный анализ остаточного содержания SDS проводили методом масс-спектрометрии. Репрезентативный масс-спектр, демонстрирующий наличие SDS в тканеинженерных продуктах, представлен на Рисунке 6.

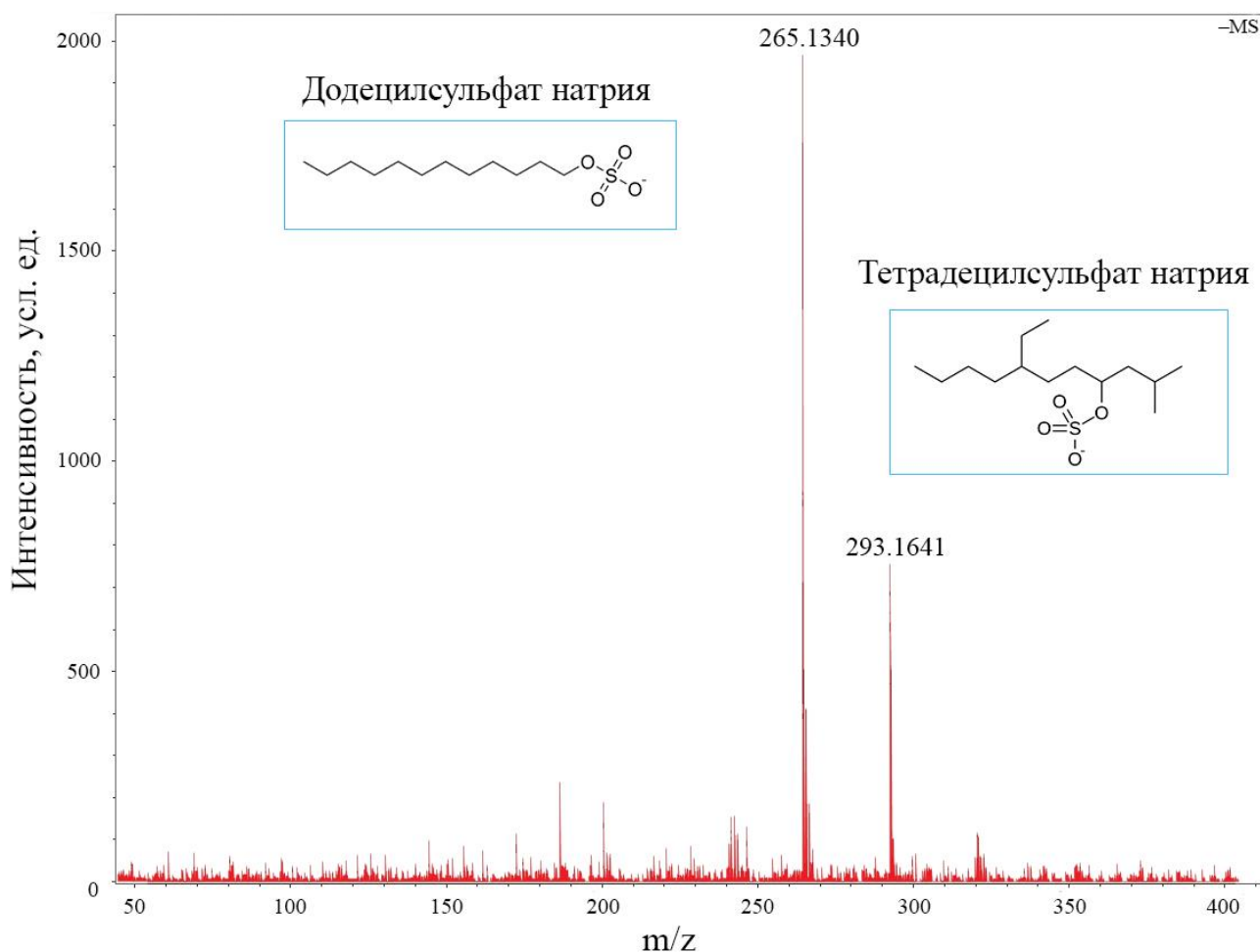


Рисунок 6 – Репрезентативный спектр отрицательных ионов в образце Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием додецилсульфата натрия

Пик при m/z 265 может быть отнесен к молекулярному иону SDS ($C_{12}H_{25}SO_4^-$), тогда как пик при m/z 293, вероятно, соответствует молекулярному иону тетрадецилсульфата натрия ($C_{14}H_{29}SO_4^-$), который часто присутствует в составе SDS в качестве примеси [142].

В ходе исследования были определены значения остаточного содержания SDS в образцах Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием растворов SDS в концентрациях 0,01, 0,03 и 0,05%. Полученные значения составили 7,5 (7,0–8,3), 13,7 (12,4–14,5) и 29,8 (28,8–31,3) пг/мг соответственно (Рисунок 7).

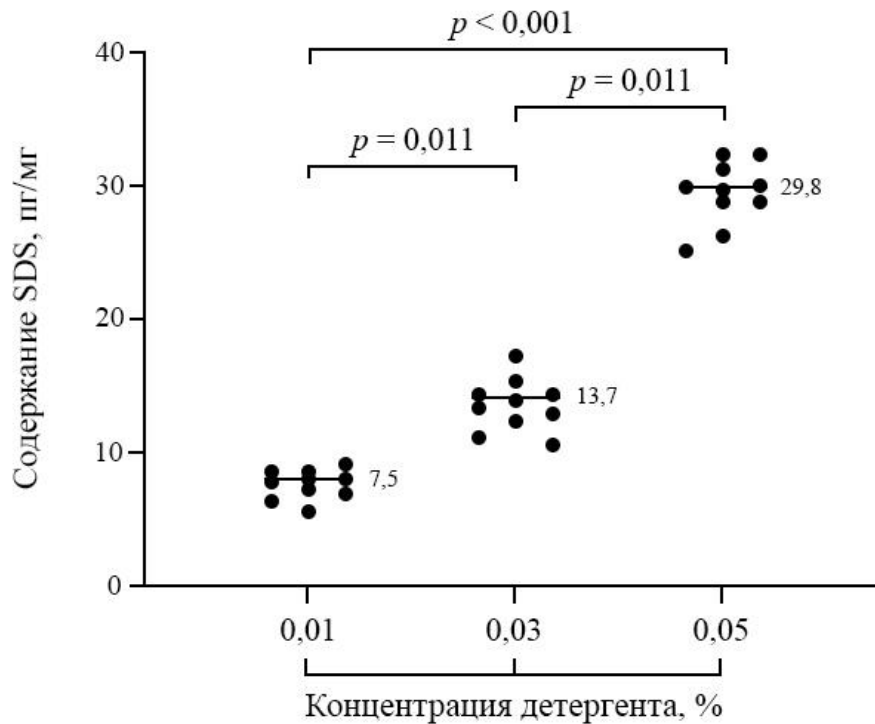


Рисунок 7 – Содержание додецилсульфата натрия (SDS) в образцах Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием растворов SDS различной концентрации, представленное в виде точек и медианы, $n = 10$ для каждой группы

В процентном выражении это соответствует уровням $7,5 (7,0–8,3) \times 10^{-7}$, $13,7 (12,4–14,5) \times 10^{-7}$ и $29,8 (28,8–31,3) \times 10^{-7} \%$, что значительно ниже пороговых значений, описанных для различных клеточных линий, что позволяет ожидать отсутствие индуцированной детергентом цитотоксичности тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека.

Предложенные условия децеллюляризации с использованием различных концентраций детергента соответствуют общепринятым критериям, направленным на минимизацию риска возникновения нежелательных иммунных

реакций. Это достигается за счет эффективного удаления клеточного и генетического материала, а также за счет контроля остаточного содержания детергента на уровне, значительно ниже пороговых значений цитотоксичности.

Далее была проведена оценка компонентного состава Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации для анализа влияния различных концентраций SDS на сохранность ключевых компонентов ВКМ.

3.2 Компонентный состав Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации

Согласно результатам проведенных исследований, общий выход после децеллюляризации биологического материала пуповины демонстрировал тенденцию к снижению с увеличением концентрации детергента. Значения выхода составили $(52,2 \pm 1,8)$, $(50,9 \pm 2,2)$ и $(49,2 \pm 1,3)$ % для образцов Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием растворов SDS в концентрации 0,01, 0,03 и 0,05% соответственно. Этот эффект может быть обусловлен более интенсивным разрушением структур ВКМ и удалением некоторых его компонентов при использовании более высоких концентраций детергента. Для подтверждения изменений, связанных с воздействием детергента, и выбора протокола децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека был проведен количественный анализ содержания ключевых компонентов ВКМ в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации.

Гидроксипролин представляет собой непротеиногенную аминокислоту, образующуюся в результате посттрансляционного гидроксирования пролина [198]. Эта аминокислота встречается почти исключительно в коллагене, где выполняет ключевую роль в стабилизации его тройной спирали, составляя от 10 до 18% всех его аминокислотных остатков [188; 199–203]. HyPro легко определяется колориметрическим методом в гидролизате коллагена на основе реакции с реактивом Эрлиха, которая сопровождается образованием интенсивного малинового окрашивания [188; 200]. Измеренное содержание HyPro может быть пересчитано в содержание общего коллагена с использованием коэффициента преобразования. Однако следует учитывать, что универсального

коэффициента не существует, поскольку содержание HyPro в коллагене варьируется в зависимости от его типа и источника ткани, из которой он был выделен. Например, Н. Capella-Monsonis и соавт. (2018) рекомендуют использовать коэффициент преобразования 0,135, основываясь на данных о том, что в коллагене I типа тканей млекопитающих содержится 13,5% HyPro [200]. С. А. Edwards и W. D. O'Brien (1980) предлагают ориентироваться на диапазон содержания HyPro в коллагене, извлеченном из кожи, который составляет 10–14% [199]. В свою очередь, D. J. Etherington и T. J. Sims (1981) представили более детализированные данные для различных типов коллагена: 13,1% для I типа, 15% для II типа, 17,4% для III типа и 16,6% для IV типа [203]. Таким образом, выбор коэффициента преобразования должен основываться на типе коллагена и специфике анализируемой ткани, чтобы обеспечить точность расчетов при оценке содержания общего коллагена.

Поскольку количественное содержание отдельных типов коллагена в разработанных продуктах не изучалось, для оценки содержания общего коллагена на основе данных по HyPro были использованы крайние значения диапазона 10–18%, а также среднее значение 13,5%, рекомендованное в литературных источниках [200; 201]. Такой подход позволяет учитывать возможную вариативность содержания HyPro в различных типах коллагена, обеспечивая более полное представление о его количественном составе. Результаты расчетов содержания HyPro и общего коллагена на его основе, полученные с использованием коэффициента преобразования 0,135, представлены на Рисунке 8.

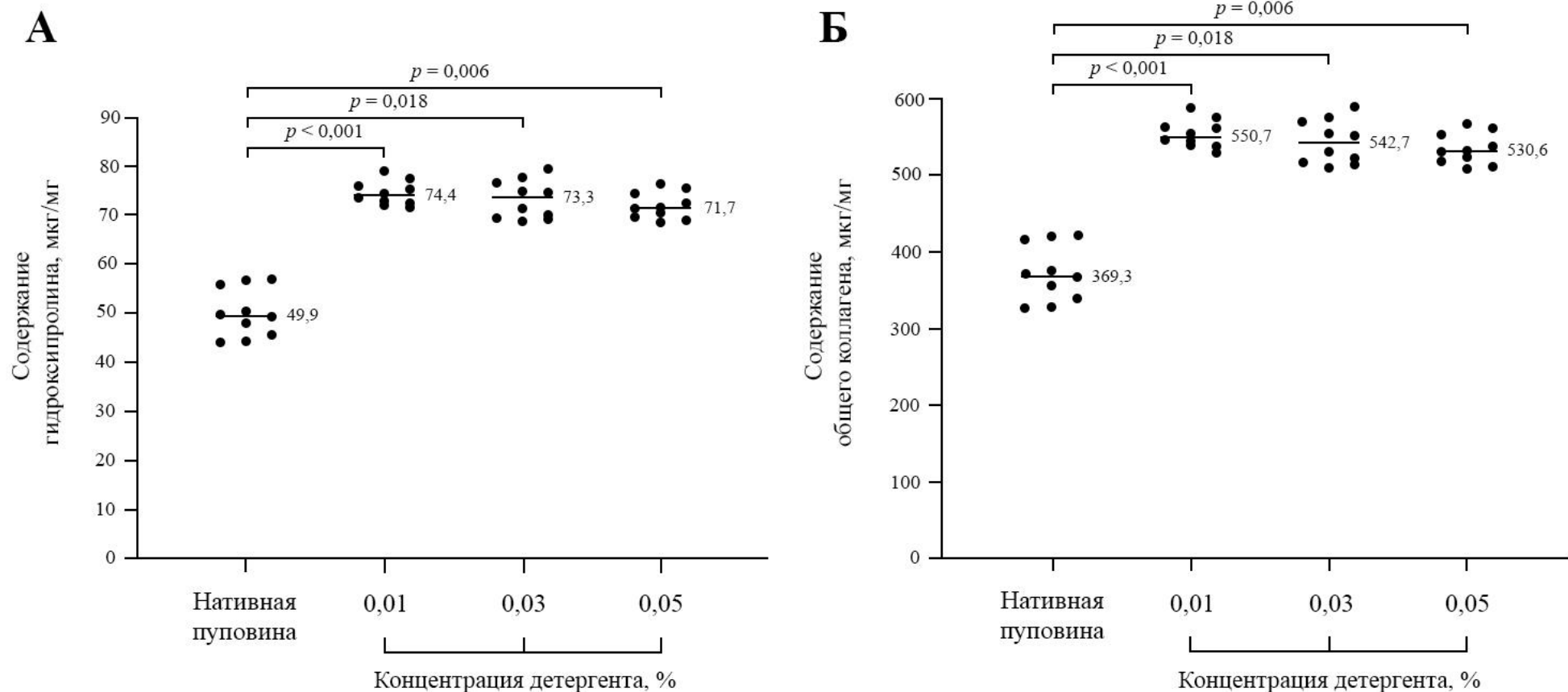


Рисунок 8 – Содержание гидроксипролина (А) и рассчитанное содержание общего коллагена с использованием коэффициента 0,135 (Б) в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия различной концентрации, представленное в виде точек и медианы, $n = 10$ для каждой группы

После пересчета содержания HyPro в эквивалентное содержание общего коллагена были определены диапазоны его значений в анализируемых образцах. Содержание общего коллагена по HyPro в образцах Вартонова студня пуповины человека до децеллюляризации составило от 277,0 (254,5–313,4) до 498,6 (458,1–564,1) мкг/мг. После децеллюляризации с использованием раствора SDS в концентрации 0,01% этот показатель был на уровне от 413,1 (404,9–423,1) до 743,5 (728,9–761,5) мкг/мг, в концентрации 0,03% – от 407,1 (387,3–427,1) до 732,7 (697,1–768,8) мкг/мг, а при применении раствора SDS в концентрации 0,05% – от 398,0 (388,5–415,6) до 716,3 (699,3–748,1) мкг/мг. Увеличение количества коллагена в децеллюляризованных тканях по сравнению с нативной обусловлено удалением клеток, а также вымыванием водорастворимых молекул и молекул, наиболее чувствительных к воздействию агента децеллюляризации, что приводит к относительному увеличению доли некоторых ключевых компонентов в оставшемся ВКМ.

Также был проведен анализ содержания растворимого и нерастворимого коллагена с использованием коммерческих наборов Sircol. Эти наборы позволяют количественно определить коллаген благодаря способности анионного азокрасителя Сириуса красного, содержащего боковые сульфокислотные группы, специфически связываться в условиях анализа с боковыми группами определенных аминокислотных остатков молекул коллагена [204]. Результаты оценки содержания растворимого и нерастворимого коллагена представлены на Рисунке 9.

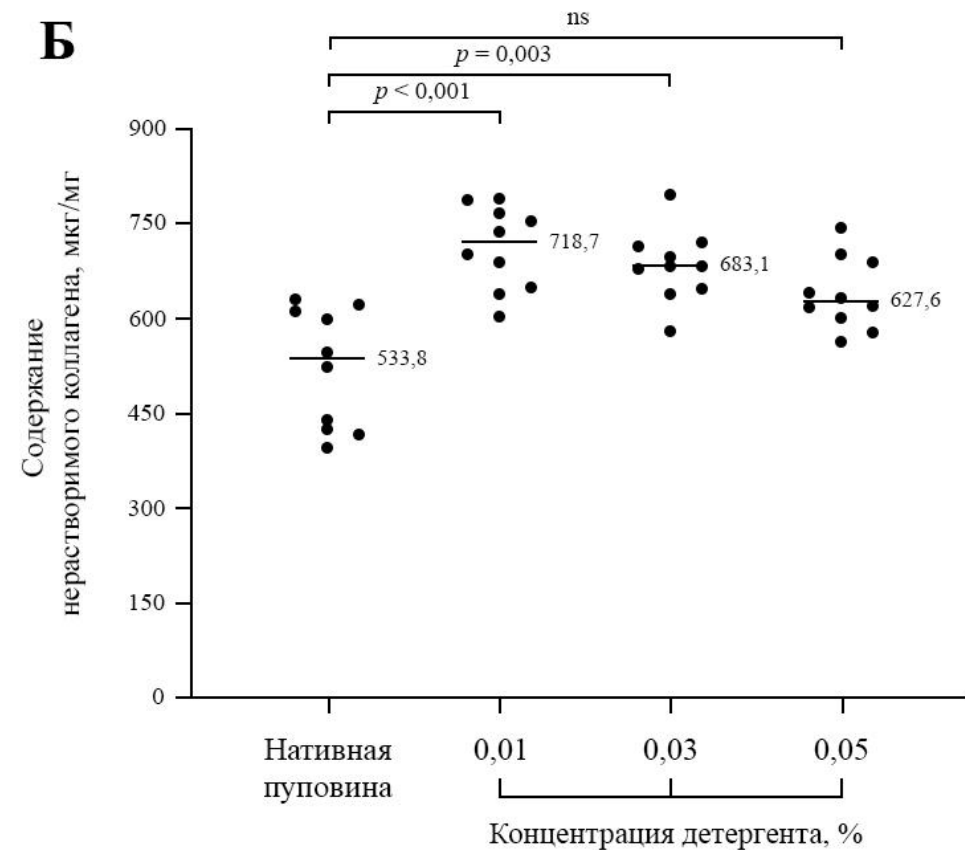
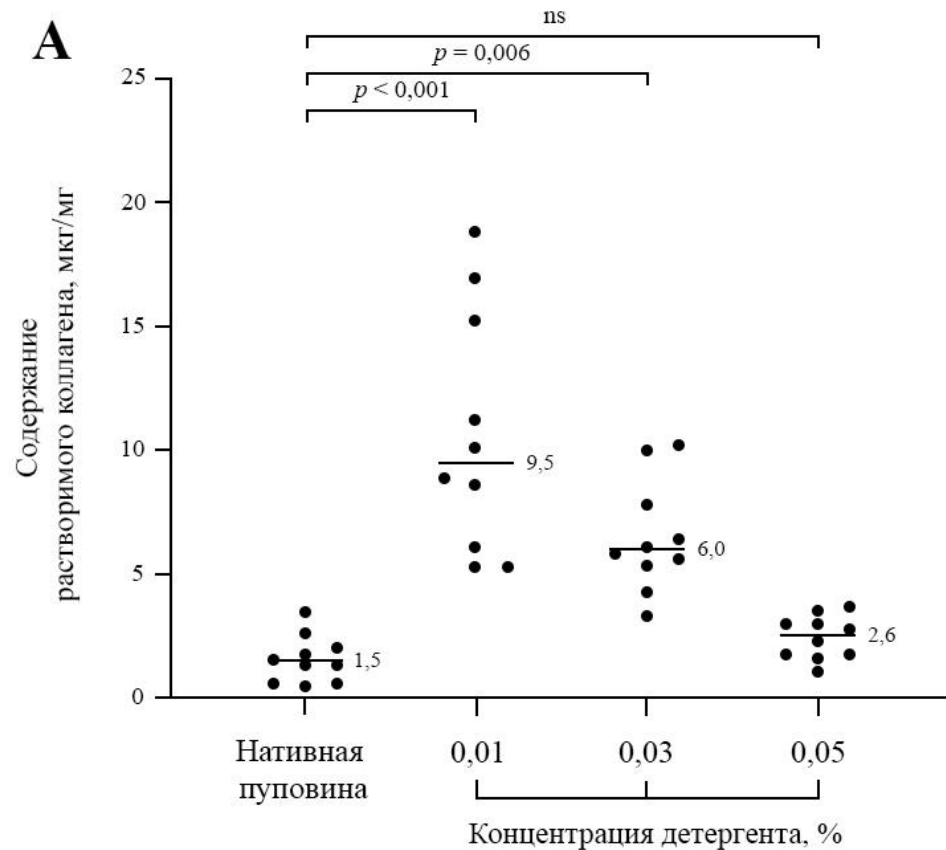


Рисунок 9 – Содержание растворимого (А) и нерастворимого (Б) коллагена в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия различной концентрации, представленное в виде точек и медианы, $n = 10$ для каждой группы. ns – не является статистически значимым

Стоит обратить внимание на то, что показатели содержания суммы растворимого и нерастворимого коллагена в образцах Вартонова студня пуповины человека до децеллюляризации находятся вблизи верхней границы или превышают диапазон значений, рассчитанных на основе содержания HyPro, демонстрируя более высокие значения (Рисунок 10).

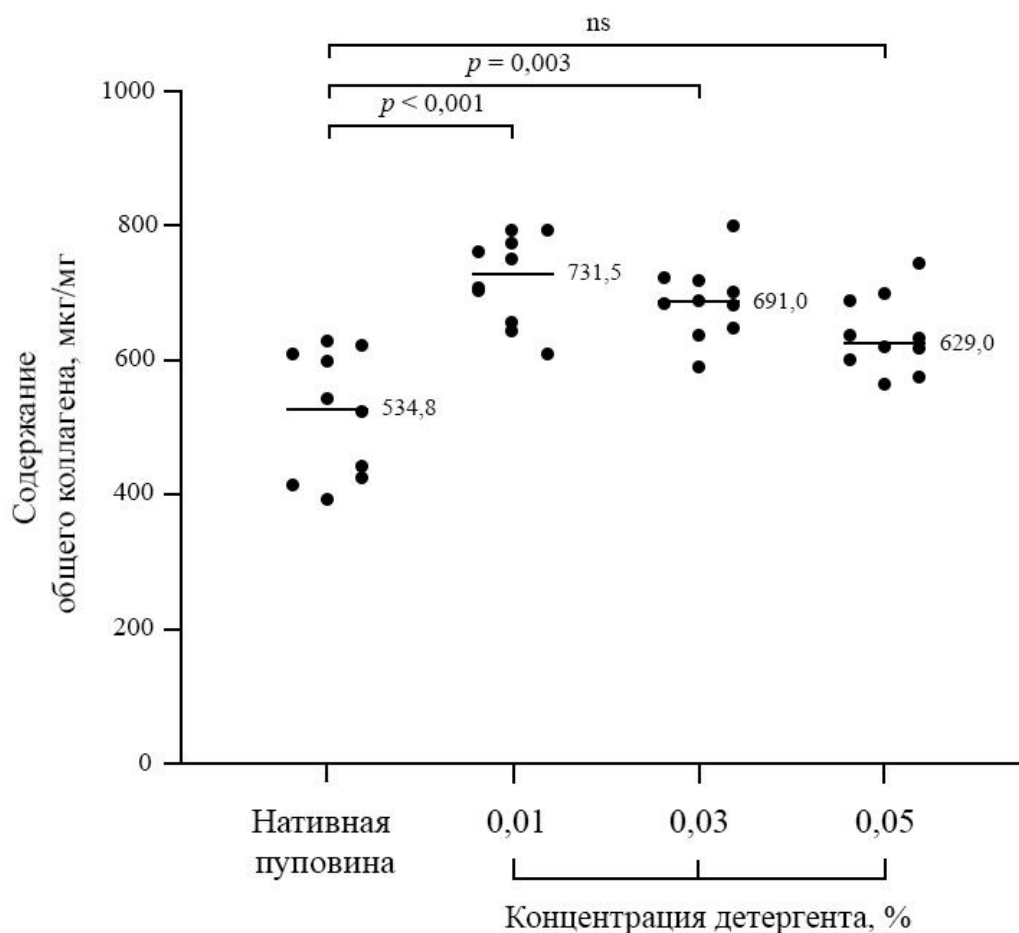


Рисунок 10 – Содержание суммы растворимого и нерастворимого коллагена в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия различной концентрации, представленное в виде точек и медианы, $n = 10$ для каждой группы.

ns – не является статистически значимым

Аналогичная ситуация наблюдается и при оценке содержания коллагена в образцах Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием растворов SDS различной концентрации: полученные показатели в основном находятся в диапазоне значений, определенном

по содержанию HyPro, однако отмечается повышенная вариативность данных внутри групп образцов децеллюляризованных тканей. Данное различие может быть обусловлено взаимодействием некоторых компонентов ВКМ с красителем Сириусом красным. Действительно, ряд исследований показывает, что метод анализа Sircol имеет ограничения, связанные с тем, что Сириус красный может связываться не только с аминокислотами коллагена, но и с основными аминокислотами неколлагеновых белков [204; 205].

Дополнительным фактором, влияющим на результаты, могут быть изменения, вызванные обработкой SDS. Известно, что SDS индуцирует диссоциацию белков на субъединицы и их денатурацию, включая нарушение структурной целостности молекул коллагена. Кроме того, SDS способен извлекать неколлагеновые белки, которые потенциально могут неспецифически взаимодействовать с красителем Сириус красный. Таким образом, наблюдаемые различия в результатах определения содержания коллагена могут отражать как структурные изменения в коллагеновой сети, так и снижение вклада неколлагеновых молекул во взаимодействие с красителем вследствие их удаления.

В дополнение к количественному определению общего коллагена для выявления потенциальных различий в структурных характеристиках образцы подвергали гистохимическому трихромному окрашиванию по методу Массона. Анализ показал, что общая структура и характер окраски оказались схожими для всех образцов, независимо от используемых концентраций SDS (Рисунок 11).

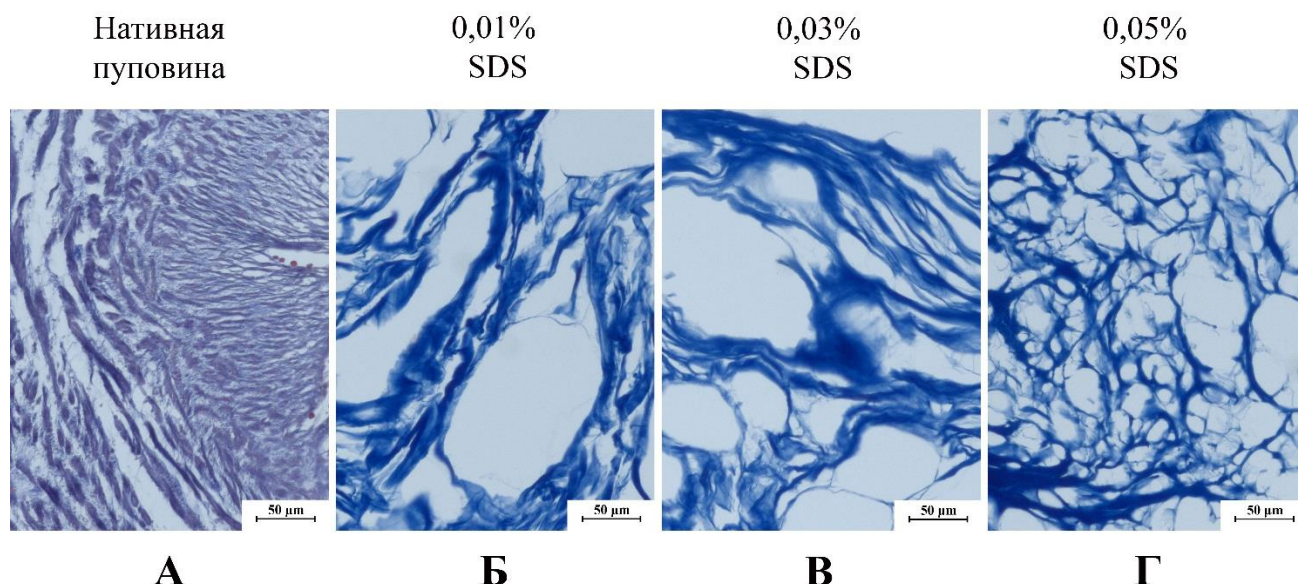


Рисунок 11 – Результаты окрашивания по Массону образцов Вартонова студня пуповины человека до (А) и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия (SDS) в концентрации 0,01 (Б) 0,03 (В) и 0,05% (Г) соответственно. Масштабный отрезок 50 мкм

Также количественно было проанализировано содержание несulfатированных и sulfатированных GAG (Рисунок 12). В образцах Вартонова студня пуповины человека до децеллюляризации содержание ГК и sulfатированных GAG составило 12,3 (11,5–14,4) и 19,3 (16,2–21,5) мкг/мг соответственно. После децеллюляризации с использованием раствора SDS в концентрации 0,01% содержание ГК и sulfатированных GAG составило 15,7 (12,2–18,3) и 26,8 (25,6–27,9) мкг/мг соответственно, в концентрации 0,03% – 14,5 (13,0–16,4) и 25,2 (24,5–25,6) мкг/мг соответственно, а при применении раствора SDS в концентрации 0,05% – 12,7 (11,4–14,7) и 22,2 (20,7–23,2) мкг/мг соответственно.

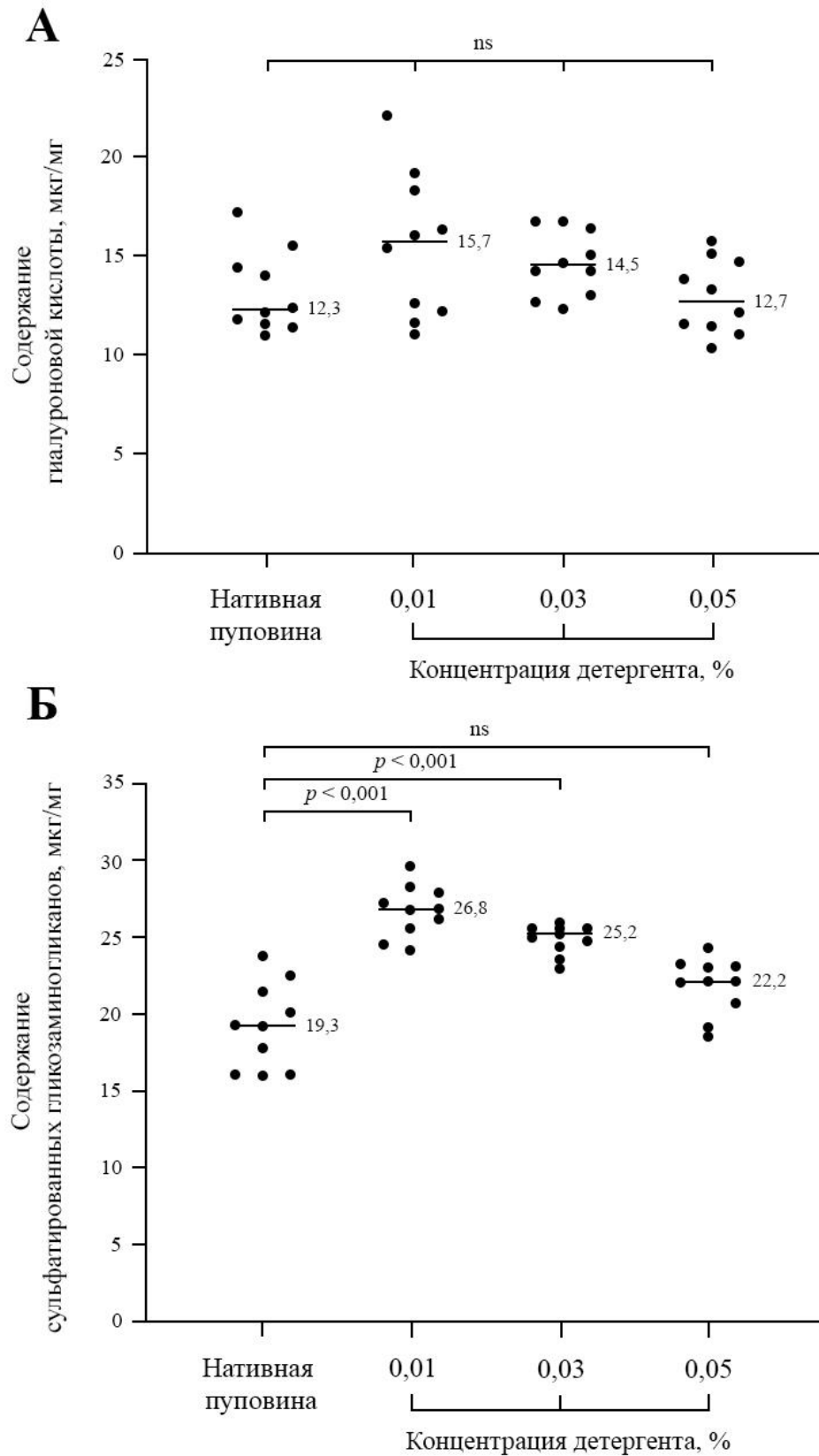


Рисунок 12 – Содержание гиалуроновой кислоты (А) и сульфатированных гликозаминогликанов (Б) в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия различной концентрации, представленное в виде точек и медианы, $n = 10$ для каждой группы. ns – не является статистически значимым

Таким образом, на основании полученных результатов установлено, что применение раствора SDS в концентрации 0,01% обеспечивает оптимальный баланс между эффективностью децеллюляризации и сохранностью ключевых компонентов ВКМ. Этот подход позволяет получить более высокий выход конечного продукта с наибольшим содержанием общего коллагена и GAG по сравнению с другими концентрациями SDS (Рисунок 13). При этом достигается эффективное удаление клеточного и генетического материала, что подтверждается содержанием ДНК менее 50 нг/мг сухого веса ткани, длиной фрагментов остаточной ДНК менее 200 пар оснований и содержанием агента децеллюляризации – ниже пороговых значений индуцированной детергентом цитотоксичности.

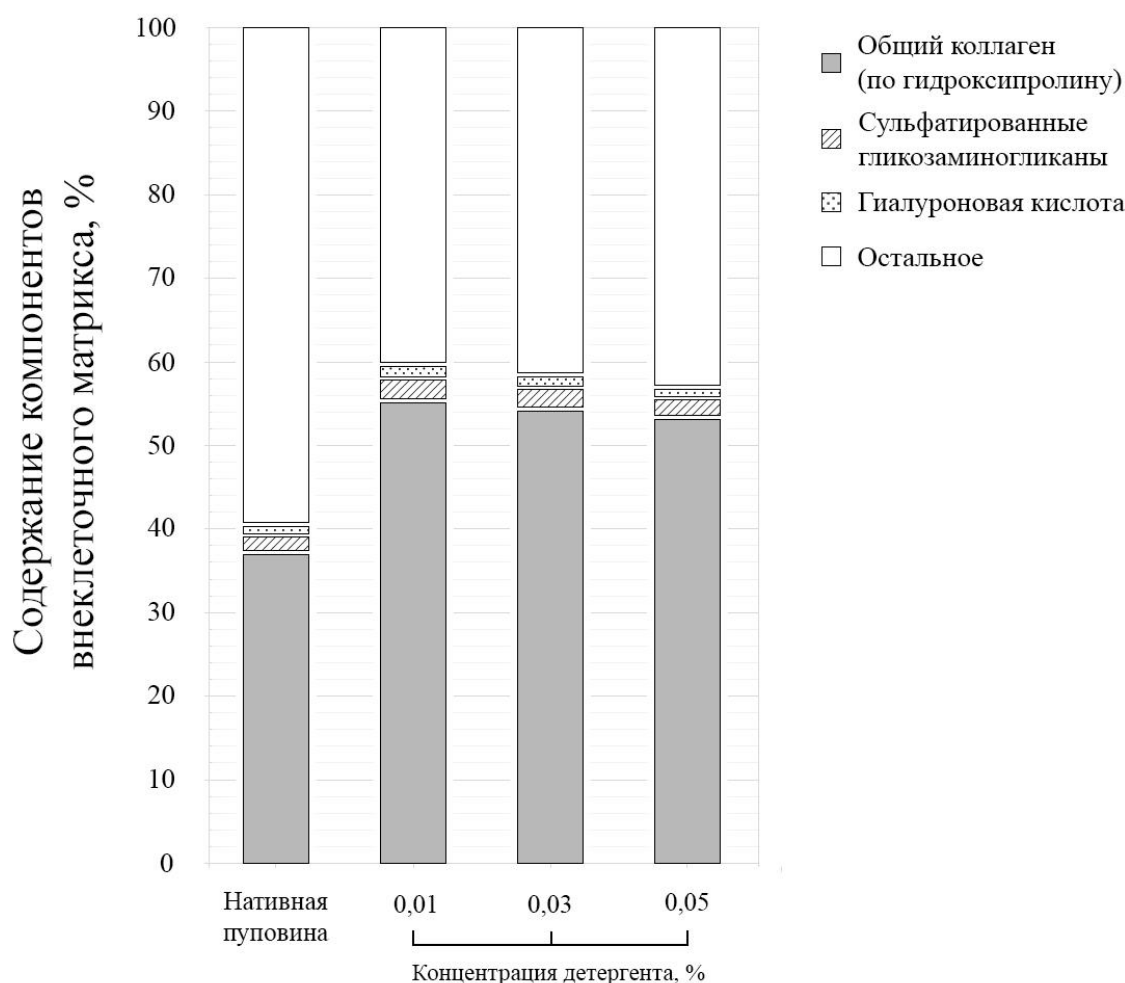


Рисунок 13 – Распределение ключевых компонентов внеклеточного матрикса Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия различной концентрации

Для всесторонней характеристики состава Вартонова студня пуповины человека с точки зрения протеомного содержания до и после децеллюляризации, был проведен масс-спектрометрический анализ. На основании ранее полученных результатов, демонстрирующих оптимальный баланс между сохранностью ВКМ и эффективностью децеллюляризации, анализ был сфокусирован на матриксе, полученном с использованием раствора SDS в концентрации 0,01%. Исследование выполняли до этапа расщепления образцов пепсином, чтобы получить максимально полное представление о белковом профиле ткани.

В ходе протеомного анализа Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации было проведено распределение идентифицированных белков по функциональным классам с использованием международных белковых баз данных (Рисунок 14). Установлены как общие, так и уникальные наборы белков для анализируемых групп.

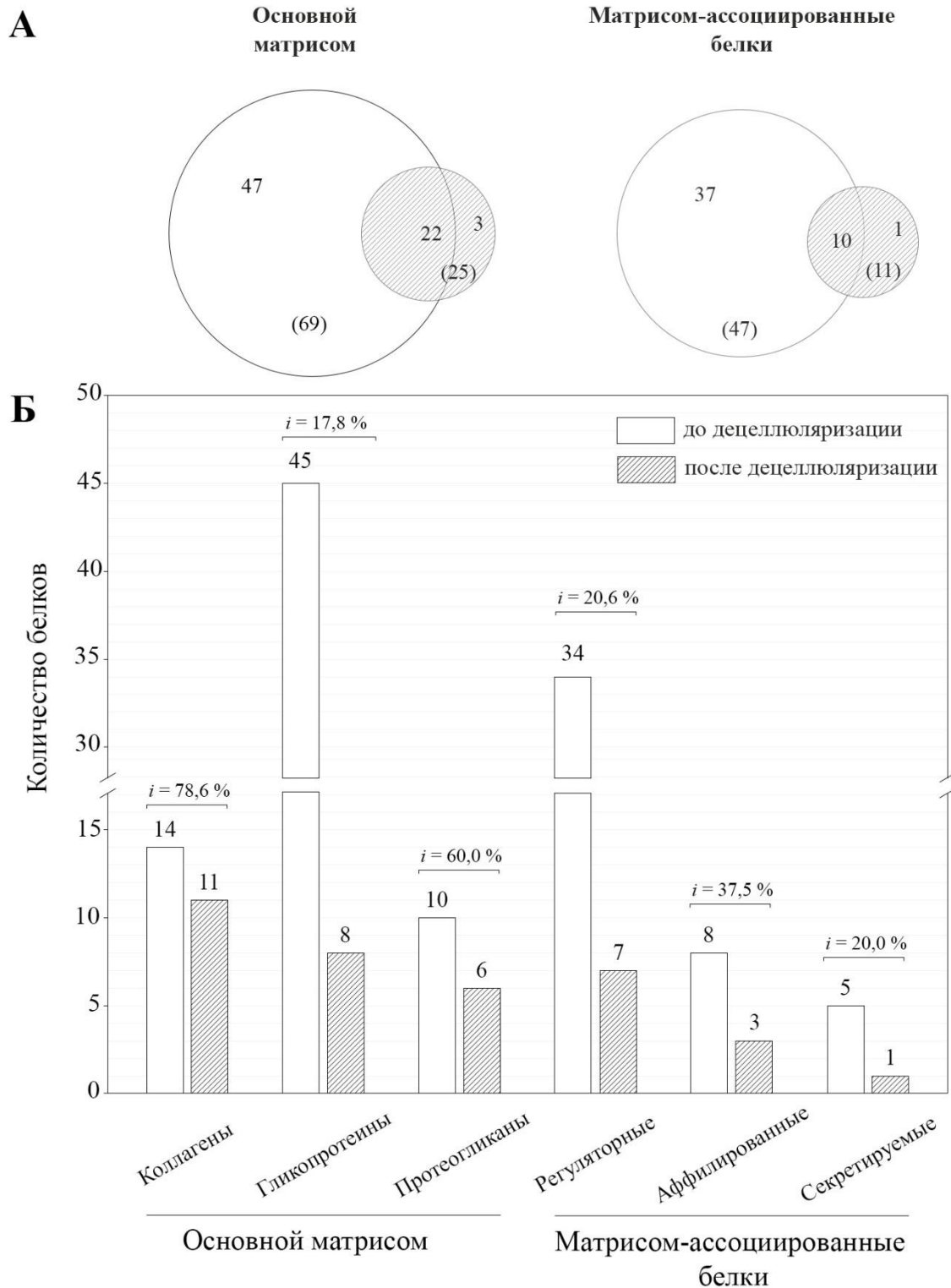


Рисунок 14 – Протеомный профиль Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации. (А) Диаграмма Венна, демонстрирующая количество белков, которые относятся к основному матрисому и матрисом-ассоциированным белкам, выявленных в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации. Цифры в скобках – общее количество белков в группе; цифры без скобок – количество уникальных белков для каждой группы; в области пересечения – количество общих белков. (Б) Количество белков и их процентная сохранность (i) по функциональным классам после децеллюляризации

В Вартоновом студне пуповины человека до децеллюляризации было идентифицировано 566 белков, из которых часть относится к собственно ВКМ, а часть – к белкам, связанным с экзосомами и другими растворимыми факторами, что подтверждает двойную роль ВКМ как поддерживающей структуры и хранилища адсорбированных растворимых сигналов. После децеллюляризации в оставшемся матриксе было выявлено 162 белка. Несмотря на значительное снижение общего числа обнаруженных молекул, что может быть связано с удалением клеточного материала, а также части растворимых компонентов, ряд ключевых белков основного матрисома и матрисом-ассоциированных белков был сохранен. В частности, в Вартоновом студне после децеллюляризации были выявлены такие важные белки, как фибронектин, люмикан, декорин, бигликан и тенасцин, которые играют центральную роль в регуляции процессов заживления ран, ангиогенеза, ремоделирования ВКМ и иммуномодуляции [30; 206–209]. Также были идентифицированы множественные типы коллагена, в основном фибриллярные (типы I, III, V, VI), но также связанные с фибриллами (тип XII) и сетеобразующие (тип IV), что свидетельствует о сохранении структурной организации ВКМ после процесса децеллюляризации (Таблица 2).

Таблица 2 – Белки, идентифицированные масс-спектрометрически, по группам матрисома

Группа матрисома	Компоненты матрисома	Ген	UniProt идентификатор	Описание	Длина последовательности	Молекулярный вес, кДа	Наличие	
							До децеллюляции	После децеллюляции
Основной матрисом	Коллагены	<i>COL1A1</i>	P02452	Коллаген I типа альфа-1	1464	138,911	+	+
		<i>COL1A2</i>	P08123	Коллаген I типа альфа-2	1366	129,314	+	+
		<i>COL3A1</i>	P02461	Коллаген III типа альфа-1	1466	138,564	+	+
		<i>COL4A1</i>	P02462	Коллаген IV типа альфа-1	1669	160,611	+	+
		<i>COL4A2</i>	P08572	Коллаген IV типа альфа-2	1712	167,553	+	+
		<i>COL5A1</i>	P20908	Коллаген V типа альфа-1	1838	183,560	+	+
		<i>COL5A2</i>	P05997	Коллаген V типа альфа-2	1499	144,910	+	+
		<i>COL6A1</i>	P12109	Коллаген VI типа альфа-1	1028	108,529	+	+
		<i>COL6A2</i>	P12110	Коллаген VI типа альфа-2	1019	108,579	+	+
		<i>COL6A3</i>	P12111	Коллаген VI типа альфа-3	3177	343,669	+	+
		<i>COL12A1</i>	Q99715	Коллаген XII типа альфа-1	3063	333,147	+	+
		<i>COL14A1</i>	Q05707	Коллаген XIV типа альфа-1	1796	193,515	+	–

Продолжение Таблицы 2

Группа матрисома	Компоненты матрисома	Ген	UniProt идентификатор	Описание	Длина последовательности	Молекулярный вес, кДа	Наличие	
							До децеллюляции	После децеллюляции
Основной матрисом	Коллагены	COL15A1	P39059	Коллаген XV типа альфа-1	1388	141,720	+	—
		COL18A1	P39060	Коллаген XVIII типа альфа-1	1754	178,188	+	—
	Гликопротеины	TGFBI	Q15582	Белок ig-h3, индуцированный трансформирующим фактором роста-β	683	74,681	+	+
		DPT	Q07507	Дерматопонтин	201	24,005	+	+
		FGG	P02679	Гамма-цепь фибриногена	453	51,512	+	+
		NID1	P14543	Нидоген-1	1247	136,377	+	—
		POSTN	Q15063	Периостин	836	93,314	+	+
		TNC	P24821	Тенасцин	2201	240,853	+	+
		TNXB	P22105	Тенасцин-X	4244	458,388	+	—
		FBN1	P35555	Фибриллин-1	2871	312,298	+	+
		FN1	P02751	Фибронектин	2386	262,625	+	+
		FBLN1	P23142	Фибулин-1	703	77,214	+	+

Продолжение Таблицы 2

Группа матрисома	Компоненты матрисома	Ген	UniProt идентификатор	Описание	Длина последовательности	Молекулярный вес, кДа	Наличие	
							До децеллюляризации	После децеллюляризации
Основной матрисом	Протеогликаны	BGN	P21810	Бигликан	368	41,654	+	+
		VCAN	P13611	Версикан	3396	372,820	+	—
		DCN	P07585	Декорин	359	39,747	+	+
		LUM	P51884	Люмикан	338	38,429	+	+
		OGN	P20774	Мимекан	298	33,922	+	+
		OMD	Q99983	Остеомодулин	421	49,492	+	—
		HSPG2	P98160	Перлекан	4391	468,830	+	+
		PRELP	P51888	Проларгин	382	43,810	+	+
		PRG2	P13727	Протеогликан костного мозга	222	25,206	+	—
		FMOD	Q06828	Фибромодулин	376	43,179	+	—

Продолжение Таблицы 2

Группа матрисома	Компоненты матрисома	Ген	UniProt идентификатор	Описание	Длина последовательности	Молекулярный вес, кДа	Наличие	
							До децеллюляции	После децеллюляции
Матрисом-ассоциированные белки	Регуляторные	<i>SERPINA1</i>	P01009	Альфа-1-антитрипсин	418	46,737	+	+
		<i>A2M</i>	P01023	Альфа-2-макроглобулин	1474	163,291	+	—
		<i>ITIH2</i>	P19823	Ингибитор тяжелой цепи альфа-трипсина H2	946	106,463	+	+
		<i>ITIH3</i>	Q06033	Ингибитор тяжелой цепи альфа-трипсина H3	890	99,849	+	+
		<i>LOX</i>	P28300	Протеин-лизин-6-оксидаза	417	46,944	+	+
		<i>SERPINB5</i>	P36952	Серпин B5	375	42,100	+	+
		<i>SERPINB6</i>	P35237	Серпин B6	376	42,622	+	—
		<i>CSTB</i>	P04080	Цистатин В	98	11,140	+	+
		<i>SERPINF1</i>	P36955	Фактор пигментного эпителия	418	46,312	+	+
	Аффилированные	<i>ANXA1</i>	P04083	Аннексин А1	346	38,714	+	+
		<i>ANXA2</i>	P07355	Аннексин А2	339	38,604	+	+
		<i>ANXA5</i>	P08758	Аннексин А5	320	35,937	+	+

Продолжение Таблицы 2

Группа матрисома	Компоненты матрисома	Ген	UniProt идентификатор	Описание	Длина последовательности	Молекулярный вес, кДа	Наличие	
							До децеллюляции	После децеллюляции
Матрисом-ассоциированные белки	Аффилированные	<i>LGALS1</i>	P09382	Галектин-1	135	14,716	+	—
		<i>C1QB</i>	P02746	Комплемент C1q субкомпонент субъединица В	253	26,722	+	—
		<i>C1QC</i>	P02747	Комплемент C1q субкомпонент субъединица С	245	25,774	+	—
	Секретируемые	<i>S100A6</i>	P06703	Белок S100-A6	90	10,180	+	—
		<i>S100A9</i>	P06702	Белок S100-A9	114	13,242	+	—
		<i>S100A10</i>	P60903	Белок S100-A10	97	11,203	+	—
		<i>S100A11</i>	P31949	Белок S100-A11	105	11,740	+	+
		<i>FSTL1</i>	Q12841	Фоллистатин-подобный белок-1	308	34,986	+	—

После количественной и качественной оценки состава полученного матрикса Вартонова студня пуповины человека проводили ферментативный гидролиз солянокислым пепсином. Пепсин представляет собой аспарагиновую протеазу, которая образуется из своего предшественника пепсиногена при низких значениях pH. Пепсин выполняет важную функцию в процессе пищеварения у млекопитающих, в том числе у человека, осуществляя расщепление поступающих в желудок белков пищи до пептидов. Он расщепляет амидную связь между карбоксильной группой дикарбоновой L-аминокислоты и аминогруппой ароматической L-аминокислоты при условии, что вторая карбоксильная кислотная группа дикарбоновой аминокислоты не связана, разрушая тем самым от 5 до 15% пептидных связей в белках [210; 211]. Эффективность этого процесса во многом зависит от кислотности среды. Наиболее высокая активность наблюдается при pH около 1,5–2, а также при температуре в диапазоне от 25 до 30 °C [210; 211]. Важно отметить, что пепсин теряет активность при pH выше 6,5 и необратимо денатурирует при pH от 7,0 до 8,0 [212]. Таким образом, гидролизат, полученный из матрикса Вартонова студня пуповины человека, представляет собой смесь полипептидных фракций.

Дальнейшие исследования были посвящены сравнительному анализу структурных, морфологических и биологических характеристик матрикса и гидролизата.

3.3 Структура и морфология тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека

Рельеф поверхностей и поперечного сечения, а также структуру тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека исследовали методом SEM (Рисунок 15).

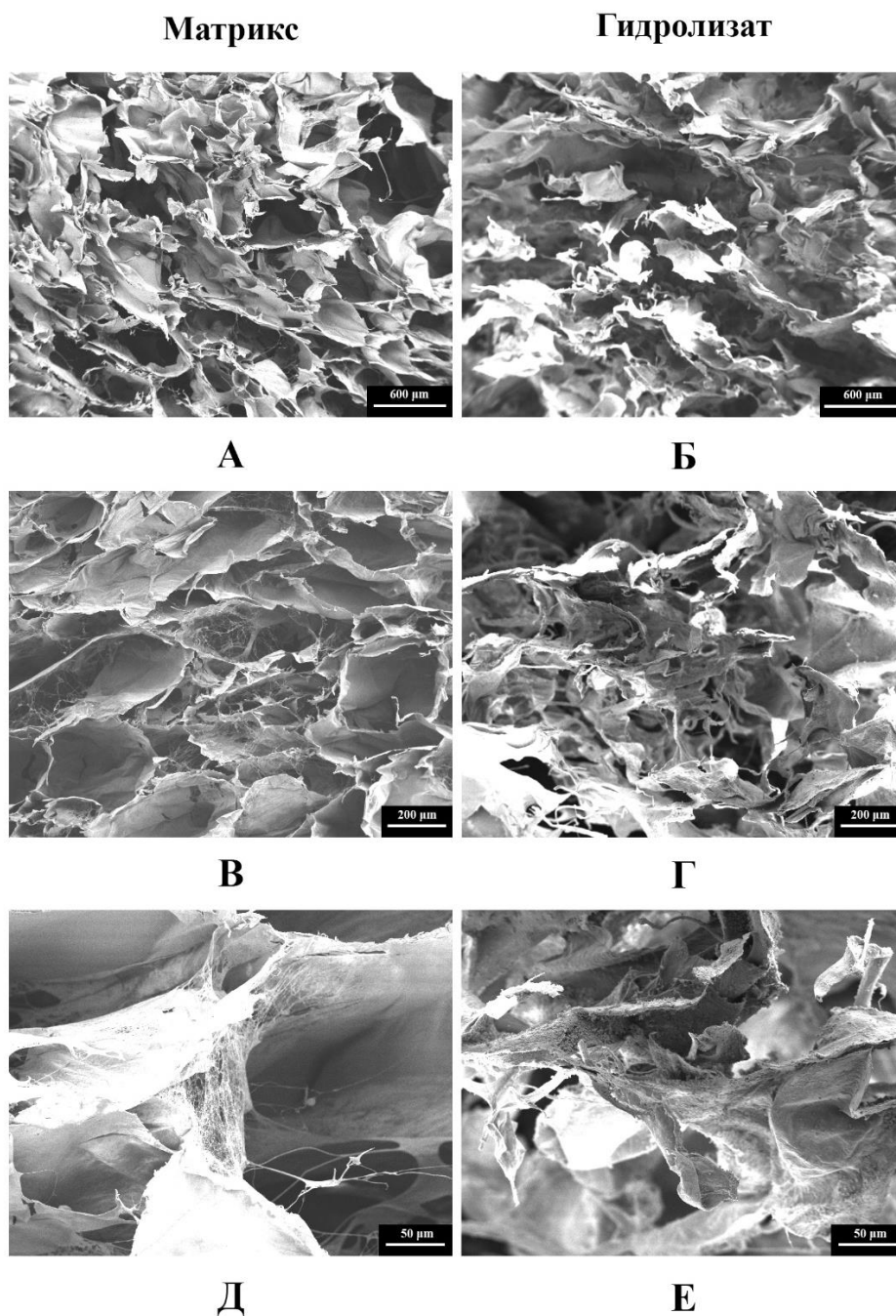


Рисунок 15 – Изображения поверхности (А, Б) и поперечного сечения (В–Е) тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, полученные методом сканирующей электронной микроскопии. А, Б – Масштабный отрезок 600 мкм, В, Г – Масштабный отрезок 200 мкм, Д, Е – Масштабный отрезок 50 мкм

Матрикс и гидролизат Вартонова студня пуповины человека были гетеропористыми на поверхности (Рисунок 15А, Б) и имели слоистые листовые структуры на поперечном сечении (Рисунок 15В–Е). Размеры пор варьировали от 50 до 1200 мкм, что свидетельствует о наличии микро- и макропористости

тканеинженерных продуктов. Эта характеристика имеет ключевое значение, поскольку поры диаметром от 20 до 125 мкм обеспечивают оптимальные условия для миграции клеток, их адгезии и дифференцировки, а поры диаметром более 140 мкм играют важную роль в стимуляции ангиогенеза, формировании структурированных тканей и диффузии внеклеточной жидкости [213; 214].

Также была проведена оценка пористости образцов тканеинженерных продуктов. Пористость матрикса составила 97,8 (97,2–97,9) %, в то время как для гидролизата этот показатель был ниже – 90,3 (90,0–92,1) %. Наблюдаемое снижение пористости гидролизата может быть связано с ферментативным гидролизом солянокислым пепсином, который вызывает частичное разрушение коллагеновой сети, высвобождение более мелких белковых фрагментов и изменение пространственной организации материала. Высокая пористость тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека играет ключевую роль в их функциональности, придавая материалам важное свойство гигроскопичности и способствуя эффективной абсорбции раневого экссудата, поддержанию оптимальной влажности в области раны и созданию благоприятных условий для заживления [215].

Также были изучены структурные характеристики нативной пуповины человека и тканеинженерных продуктов из нее методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. Соответствие характеристических частот поглощения в спектрах определенным связям и химическим группам проводили на основе анализа литературных данных и доступных баз ИК-спектров для продуктов различной природы, включая одно- и многокомпонентные системы. Общий вид полученных спектров хорошо согласуется с литературными данными для коллагена [62; 216] и других белков и пептидов [217–219]. Действительно, в спектрах как нативной пуповины, так и тканеинженерных продуктов присутствуют основные полосы поглощения при $3500\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ (амид А – валентные колебания связей N–H), $2970\text{--}2850\text{ см}^{-1}$ (асимметричные валентные колебания групп CH_3 и CH_2), $1740\text{--}1630\text{ см}^{-1}$ (амид I – валентные колебания связей C=O), $1630\text{--}1510\text{ см}^{-1}$ (амид II – составные частоты

деформационных колебаний связей N–H и валентных колебаний связей C–N) и 1270–1230 см^{-1} (амид III – валентные колебания связей C–N и плоскостные деформационные колебания связей N–H), свойственные колебаниям функциональных групп, характерных для молекул белков (Рисунок 16). Спектры также демонстрируют полосы поглощения в диапазоне 1170–800 см^{-1} , обусловленные валентными колебаниями связей C–O и C–O–C, которые характерны для углеводных фрагментов коллагена и протеогликанов [62; 215; 219–221].

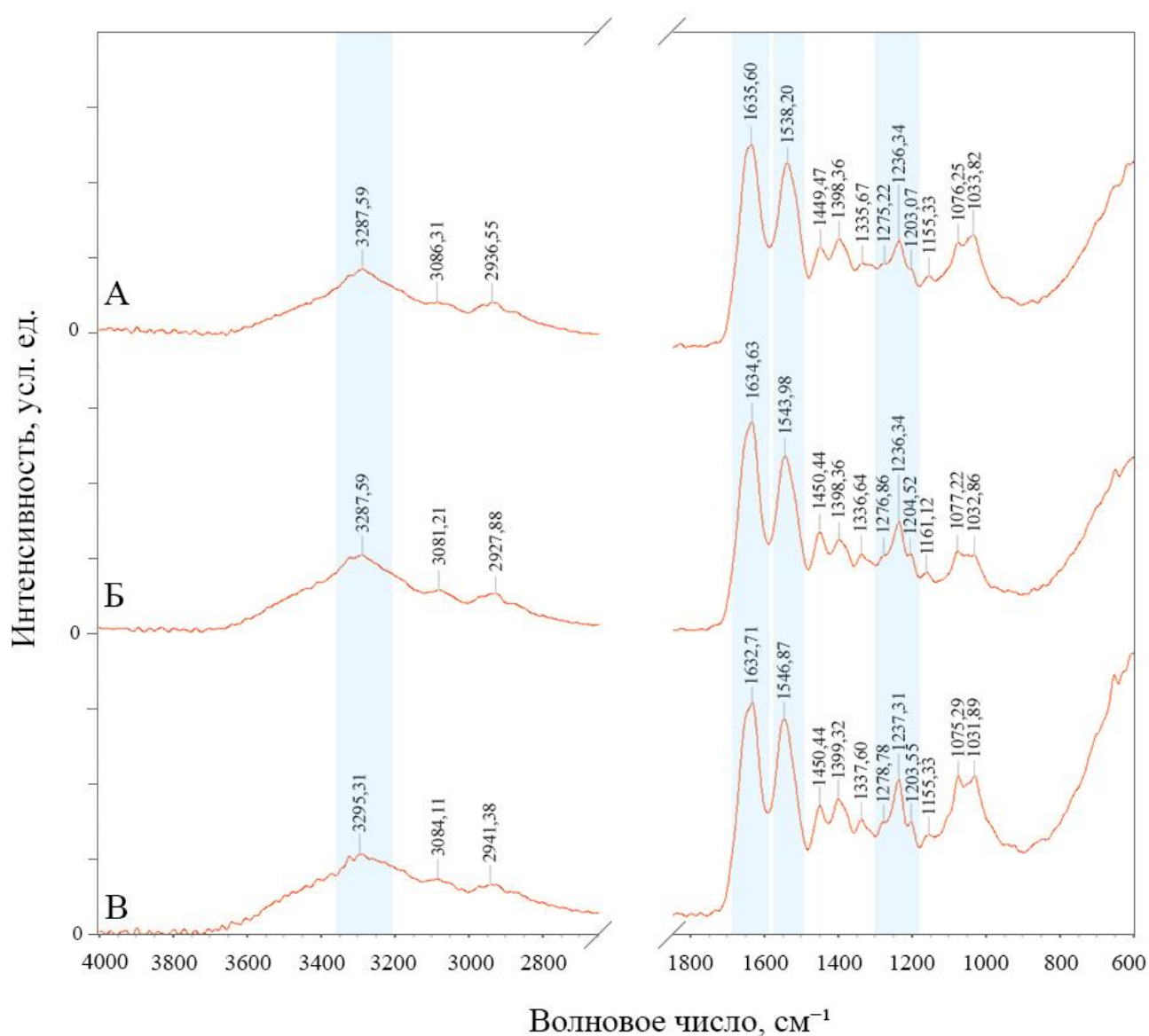


Рисунок 16 – Спектры нативной пуповины человека (А) и тканеинженерных продуктов из нее – матрикса (Б) и гидролизата (В), полученные с использованием инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье

Анализируемые образцы демонстрируют схожий ИК-спектральный паттерн, что свидетельствует о сохранности основных структурных компонентов ВКМ. Однако спектр гидролизата имеет незначительные отличия по сравнению с нативной пуповиной и матриксом. Эти изменения, вероятно, обусловлены действием пепсина, использованного на этапе ферментативного гидролиза, а также его остаточным присутствием в конечном продукте. Пепсин вызывает частичное расщепление белковых молекул и образование пептидов, внутри- и межмолекулярное взаимодействие которых может повлиять на вид спектров, изменяя положение характеристических частот и интенсивность колебаний. При этом важно отметить, что пепсин специфически расщепляет только нетройные спиральные С- и N-телопептиды, оставляя тройную спиральную молекулу коллагена относительно нетронутой [204].

Сохранность нативной конформации коллагена может быть оценена по разнице частот между максимумами поглощения амида I и амида II ($\Delta\nu$). Значение $\Delta\nu$ менее 100 см^{-1} может свидетельствовать о сохранении нативной конформации белка [222]. Также целостность тройной спирали молекул коллагенов можно оценить по соотношению интенсивностей пика поглощения амида III и пика поглощения около 1450 см^{-1} . Для неповрежденной тройной спирали коллагенов это соотношение должно быть равным или выше 1. В случае денатурации коллагена, когда тройная спираль разрушается, данное соотношение снижается до значений около 0,5 [220; 223; 224]. Результаты оценки характеристик ИК-спектров анализируемых образцов представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Характеристики спектров инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье нативной пуповины человека и тканеинженерных продуктов из нее

Образец	Амид III/A ₁₄₅₀	$\Delta\nu$, см^{-1}
Нативная пуповина	1,07 (1,06–1,08)	85,83 (84,87–87,76)
Тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека		
Матрикс	1,08 (1,06–1,11)	85,83 (84,87–92,58)
Гидролизат	1,18 (1,13–1,19)	92,10 (90,65–95,47)

Полученные данные указывают на сохранение относительно неповрежденной тройной спирали молекул коллагенов в анализируемых образцах.

3.4 Влияние тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека на фибробласты дермы и фетальные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека

Жизнеспособность клеток, культивируемых в модельных средах на основе экстрактов из тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, оценивали по их функциональной активности и морфологии с использованием анализа цитотоксичности с применением МТТ-теста и метода фазового контраста соответственно. В качестве тест-системы в исследовании использовали ФД человека – ключевые клетки рыхлой соединительной ткани, выполняющие центральную роль в синтезе и ремоделировании ВКМ, репарации повреждений кожи, стимуляции пролиферации, миграции и роста окружающих клеток, а также в процессе образования новых кровеносных сосудов [225; 226]. Широкое применение фибробластов в лабораторной практике обусловлено их кариотипической стабильностью и сохранением характерной морфологии на протяжении всего срока культивирования, что делает их перспективной биологической моделью для стандартизированных биохимических и токсикологических исследований [225].

Результаты оценки влияния экстрактов тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека на жизнеспособность ФД, полученные с использованием МТТ-теста, представлены на Рисунке 17.

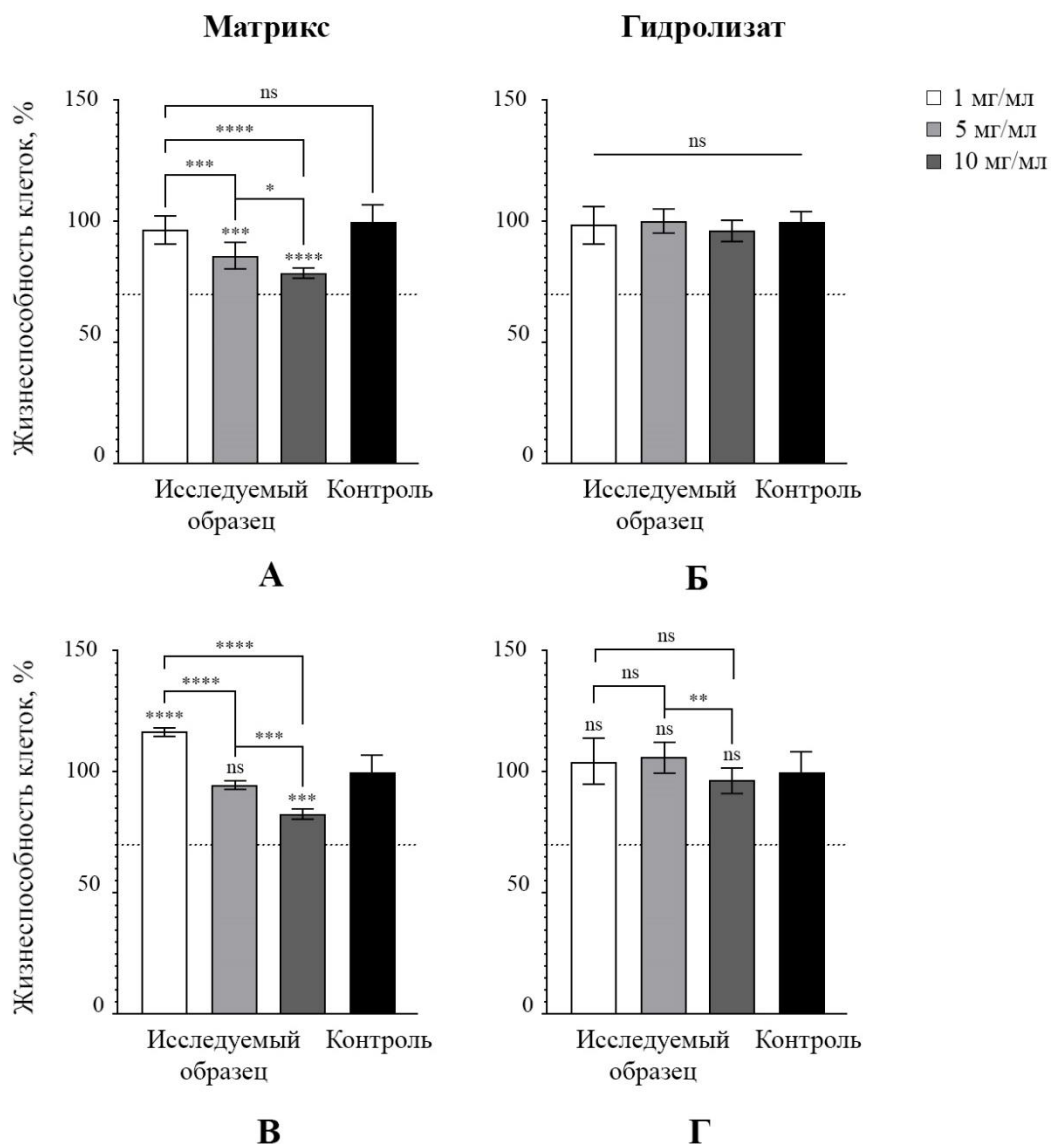


Рисунок 17 – Жизнеспособность фибробластов дермы человека, культивируемых в модельных средах на основе экстрактов из тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека – матрикса и гидролизата, – добавленных сразу (А, Б) и через сутки после адгезии клеток (В, Г). Критерий Тьюки: **** – $p < 0,0001$, *** – $p < 0,001$, ** – $p < 0,01$, * – $p < 0,1$, ns – не является статистически значимым

Установлено, что модельные среды на основе экстрактов из тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека в различных концентрациях не оказывают цитотоксического эффекта на ФД как при добавлении их сразу (Рисунок 17А, Б), так и через сутки после адгезии клеток (Рисунок 17В, Г). При этом влияние модельных сред на основе матрикса Вартонова студня пуповины человека на жизнеспособность клеток демонстрирует дозозависимый характер. В то же время при использовании сред на основе

гидролизата Вартонова студня пуповины человека статистически значимых различий в жизнеспособности клеток относительно контрольной группы выявлено не было.

Результаты прижизненного наблюдения за морфологическим состоянием ФД человека, культивируемых в модельных питательных средах на основе экстрактов из тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, представлены на Рисунке 18.

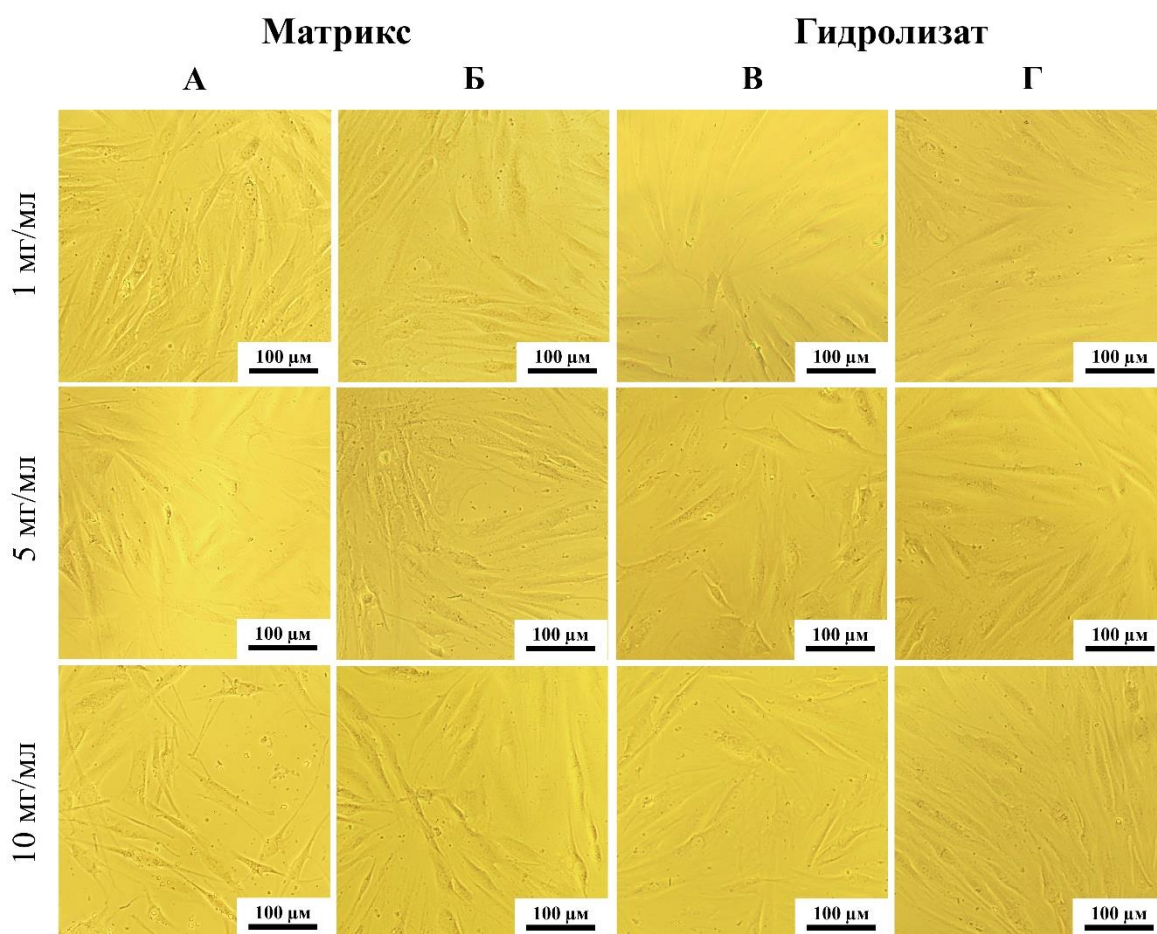


Рисунок 18 – Морфология фибробластов дермы человека, культивируемых в модельных питательных средах на основе экстрактов из тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека – матрикса и гидролизата, – добавленных сразу (А, В) и через сутки после адгезии клеток (Б, Г). Масштабный отрезок 100 мкм

В качестве контроля использовали ФД, культивируемые в стандартных условиях (Рисунок 19). Клетки в контроле имели характерный веретеновидный фенотип и в процессе культивирования сформировали конфлюэнтный монослой.

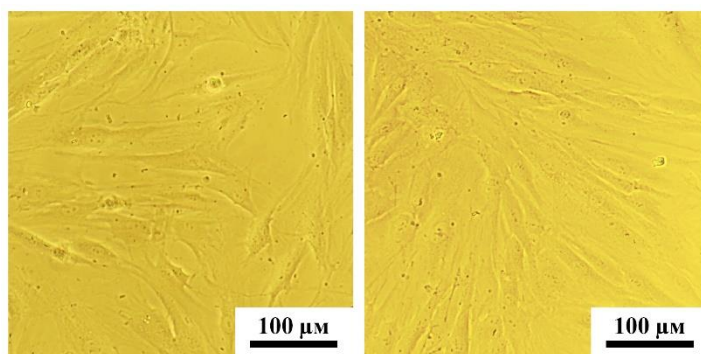
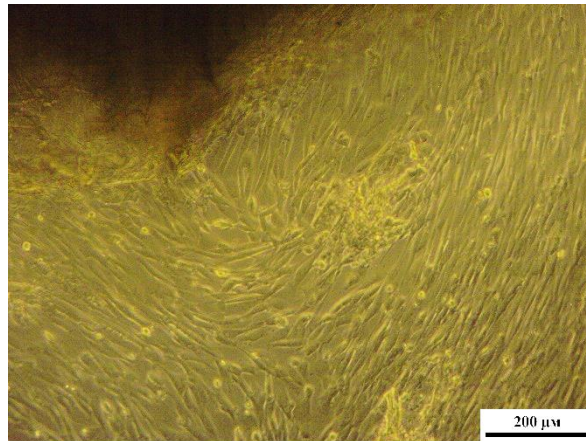


Рисунок 19 – Морфология фибробластов дермы человека, культивируемых в стандартных условиях. Масштабный отрезок 100 мкм

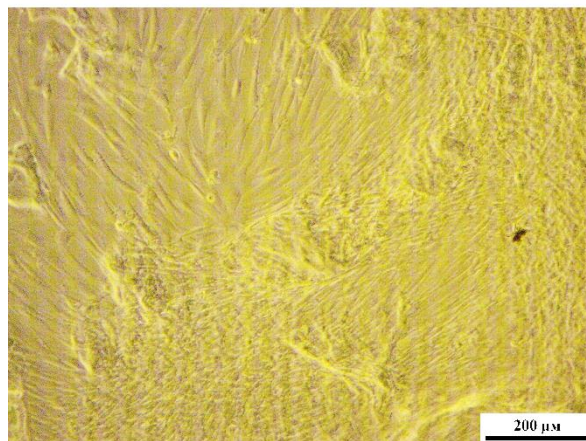
Формирование монослоя и морфологическое состояние клеток, культивируемых в модельных питательных средах на основе экстрактов как матрикса, так и гидролизата Вартонова студня пуповины человека были сопоставимы с контролем и коррелировали с результатами МТТ-теста. Признаков, свидетельствующих о их цитотоксичности, не выявлено. Тем не менее, в модельных средах наблюдались артефакты неправильной формы, количество которых увеличивалось пропорционально повышению концентрации экстрактов. Это может указывать на наличие в экстрактах высокомолекулярных компонентов или агрегатов, которые не оказывают значительного влияния на жизнеспособность клеток, но могут быть связаны с особенностями состава или пробоподготовки экстрактов.

Поскольку материал предназначен для длительного взаимодействия с тканями и кровью организма, для оценки биологического ответа *in vitro* клеток млекопитающих на воздействие образцов тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека был дополнительно выбран метод прямого контакта. В качестве тест-системы в исследовании использовали фетальные МСК костного мозга человека. МСК играют ключевую роль в регенерации тканей, модуляции иммунного ответа и поддержании гомеостаза, являясь одним из основных восстановительных резервов организма, что делает их важной клеточной моделью для оценки биосовместимости, цитотоксичности и регенеративного потенциала материалов, предназначенных для медицинского применения [227, 228].

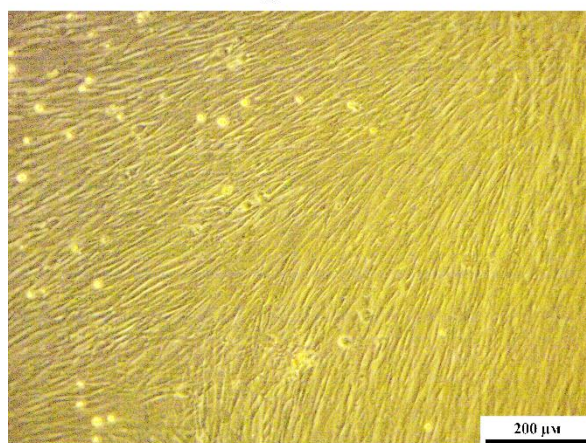
Прямое наблюдение с помощью фазово-контрастной микроскопии показало, что динамика роста клеток в экспериментальных группах практически не отличалась от таковой в контрольной через 72 ч (Рисунок 20).



Матрикс



Гидролизат



Контроль

Рисунок 20 – Рост фетальных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека в присутствии тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека. Масштабный отрезок 200 мкм

Таким образом исследования на клеточных культурах ФД и фетальных МСК человека не выявили проявлений цитотоксического эффекта тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека как методом экстрактов, так и методом прямого контакта.

3.5 Гемолитическая активность тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека

Гемолитическая активность отражает способность того или иного вещества повреждать мембраны эритроцитов и вызывать их лизис (гемолиз), сопровождающийся высвобождением внутриклеточных молекул, в том числе гемоглобина [229]. Дестабилизация мембраны эритроцитов может привести к снижению транспорта кислорода к тканям и органам, а повышенные уровни свободного гемоглобина могут спровоцировать токсические эффекты и/или инициировать различные патологические процессы [230; 231].

Гемосовместимость – ключевая характеристика материалов, которые предназначены для использования в качестве имплантатов или которые находятся в прямом контакте с кровью [183; 230; 231]. Материал считают гемосовместимым, если степень гемолиза составляет менее 2% [232]. Результаты оценки гемолитической активности тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Оценка гемолитической активности тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека

Образец	Концентрация, мг/мл	Степень гемолиза, %
Матрикс	1	$0,37 \pm 0,18$
	5	$0,62 \pm 0,12$
	10	$0,75 \pm 0,24$
Гидролизат	1	$0,06 \pm 0,01$
	5	$0,19 \pm 0,08$
	10	$0,48 \pm 0,17$

Полученные значения были значительно ниже показателя безопасной степени гемолиза, что указывает на то, что тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека удовлетворяют критерию гемосовместимости по тесту на гемолиз.

3.6 Тканевая реакция на подкожную имплантацию тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека

Подкожная имплантация образцов тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека мышам показала постепенную их резорбцию *in vivo* (Рисунок 21). У всех животных не выявлено признаков выраженной воспалительной реакции – лейкоцитарная инфильтрация в зоне имплантации была минимальной или отсутствовала. Вокруг имплантатов не наблюдалось формирования плотной соединительнотканной капсулы. На 42-е сут после имплантации продукты визуализируются в гистологических препаратах.

На основании комплексного анализа эффективности децеллюляризации биологического материала пуповины человека с использованием растворов SDS в различной концентрации, а также оценки структурных, морфологических и биологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, были разработаны лабораторный регламент (Приложение А) и проект технологической схемы производства (Приложение Б).

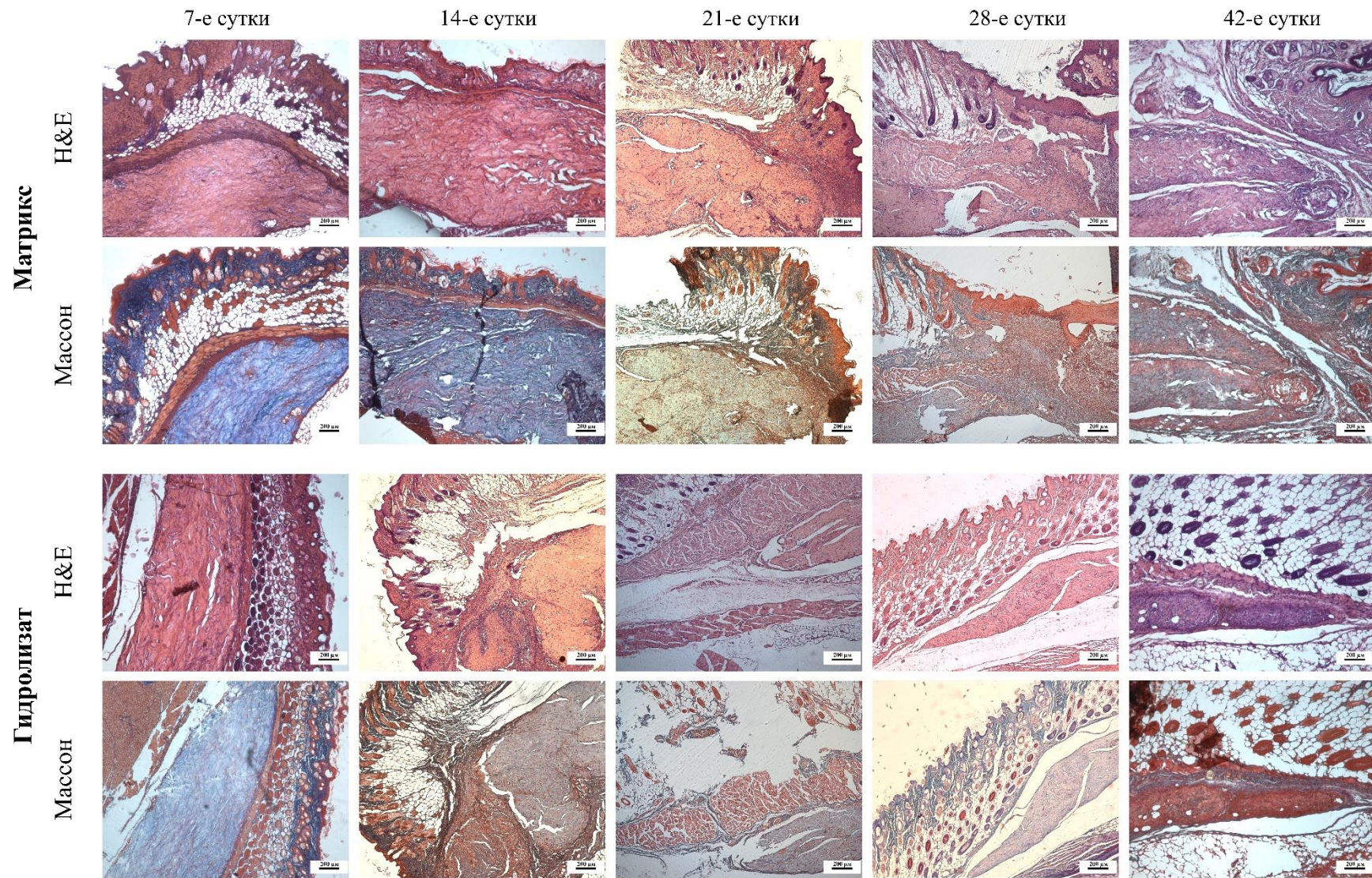


Рисунок 21 – Гистологическая картина места имплантации тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека у лабораторных мышей в динамике. Окраска гематоксилином и эозином (H&E) и по Массону. Масштабный отрезок 200 мкм

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований показана перспективность и практическая реализуемость разработки на основе биологического материала пуповины человека лекарственного препарата и/или медицинского изделия, предназначенного для лечения пациентов с повреждениями кожи и мягких тканей. Условия децеллюляризации, использованные в ходе экспериментальных исследований, обеспечивают эффективное удаление клеточного и генетического материала, а также агента децеллюляризации, сохраняя при этом основные структурные и функциональные компоненты нативной ткани. В составе Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации идентифицировано более 100 различных белков, а также установлено высокое содержание общего коллагена и гликозаминогликанов. Эти компоненты обладают высоким потенциалом для стимуляции процессов регенерации и заживления ран за счет обеспечения структурной поддержки внеклеточного матрикса и создания условий для миграции, пролиферации и дифференцировки клеток в процессе восстановления.

Оценка биологического действия тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека показала отсутствие цитотоксических эффектов на фибробласты дермы и фетальные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека, хорошую гемосовместимость при определении гемолитической активности в исследованиях *in vitro*, а также успешную интеграцию в окружающие ткани без признаков отторжения при подкожной имплантации мышам *in vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Децеллюляризация Вартонова студня пуповины человека с использованием раствора ионного детергента додецилсульфата натрия в концентрации 0,01% обеспечивает достижение рекомендуемого уровня антигенности и неиммуногенности матрикса с остаточным содержанием агента децеллюляризации ниже пороговых значений индуцированной им цитотоксичности.
2. Матрикс Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием раствора додецилсульфата натрия в концентрации 0,01% содержит в своем составе структурные коллагены различных типов – от 413,1 (404,9–423,1) до 743,5 (728,9–761,5) мкг/мг, гиалуроновую кислоту – 15,7 (12,2–18,3) мкг/мг и сульфатированные гликозаминогликаны – 26,8 (25,6–27,9) мкг/мг, а также функциональные молекулы фибронектина, люмикана, бигликана, декорина и другие важные для заживления ран белки и пептиды.
3. Тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека (матрикс и гидролизат) сохраняют потенциально целостность тройной спирали молекул коллагенов и обладают высокой пористостью с размерами пор от 50 до 1200 мкм.
4. Матрикс и гидролизат Вартонова студня пуповины человека не проявляют цитотоксичности по отношению к дермальным фибробластам и фетальным мезенхимальным стволовым клеткам человека, обладают гемосовместимостью в исследованиях *in vitro* и успешно интегрируются в окружающие ткани при подкожной имплантации мышам в экспериментах *in vivo*, не вызывая реакций отторжения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение раствора додецилсульфата натрия в концентрации 0,01% при децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека обеспечивает эффективное удаление клеточного и генетического материала при минимальном остаточном содержании детергента и максимальном сохранении основных структурных и функциональных компонентов ткани.

2. Разработанная технология изготовления матрикса и гидролизата Вартонова студня пуповины человека позволяет получать высокорегенеративные гемо- и цитосовместимые тканеинженерные продукты, характеризующиеся отсутствием признаков усиленной воспалительной реакции и отторжения при подкожной имплантации.

3. Тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека могут быть рассмотрены как самостоятельный лекарственный препарат и/или медицинское изделие для применения в области регенеративной медицины. Они также способны выступать в качестве дополнительного компонента в комплексных подходах к восстановлению глубоких и обширных дефектов кожи и мягких тканей, усиливая эффективность существующих методов лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГК – гиалуроновая кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК – инфракрасный

КТ – комнатная температура

ММП – матриксная металлопротеиназа

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

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

СЧВ – сверхчистая вода

ТФУ – трифторуксусная кислота

ФД – фибробласты дермы

АСN – ацетонитрил

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

GAG – гликозаминогликаны

H&E – гематоксилин и эозин

HyPro – гидроксипролин

IL – интерлейкин

LOX – лизилоксидаза

PBS – фосфатно-солевой буферный раствор

SDS – додецилсульфат натрия

SEM – сканирующая электронная микроскопия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ye, H. Thermal injury of skin and subcutaneous tissues: A review of experimental approaches and numerical models / H. Ye, S. De // *Burns*. – 2017. – Vol. 43, № 5. – P. 909–932. DOI: 10.1016/j.burns.2016.11.014
2. Atiyeh, B. S. Military and civilian burn injuries during armed conflicts / B. S. Atiyeh, S. W. Gunn, S. N. Hayek // *Ann Burns Fire Disasters*. – 2007. – Vol. 20, № 4. – P. 203–215.
3. Management of traumatic wounds in the Emergency Department: position paper from the Academy of Emergency Medicine and Care (AcEMC) and the World Society of Emergency Surgery (WSES) / C. Prevaldi, C. Paolillo, C. Locatelli [et al.] // *World J Emerg Surg*. – 2016. – Vol. 11. – P. 30. DOI: 10.1186/s13017-016-0084-3
4. Decellularized tissues for wound healing: towards closing the gap between scaffold design and effective extracellular matrix remodeling / V. A. Solarte David, V. R. Güiza-Argüello, M. L. Arango-Rodríguez [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2022. – Vol. 10. – P. 821852. DOI: 10.3389/fbioe.2022.821852
5. Suamte, L. Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications / L. Suamte, A. Tirkey, J. Barman, P. J. Babu // *Smart Mater Manuf*. – 2023. – Vol. 1. – P. 100011. DOI: 10.1016/j.smmf.2022.100011
6. Decellularized extracellular matrices for skin wound treatment / R. Liang, R. Pan, L. He [et al.] // *Materials (Basel)*. – 2025. – Vol. 18, № 12. – P. 2752. DOI: 10.3390/ma18122752
7. Polymeric materials, advances and applications in tissue engineering: a review / M. C. Socci, G. Rodríguez, E. Oliva [et al.] // *Bioengineering*. – 2023. – Vol. 10, № 2. – P. 218. DOI: 10.3390/bioengineering10020218
8. Farag, M. M. Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications: review / M. M. Farag // *J Mater Sci*. – 2023. – Vol. 58. – P. 527–558. DOI: 10.1007/s10853-022-08102-x
9. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine / S. Yi, F. Ding, L. Gong, X. Gu // *Curr Stem Cell Res Ther*. – 2017. – Vol. 12, № 3. – P. 233–246. DOI: 10.2174/1574888X11666160905092513

10. Cesur, N. P. Decellularization of tissues and organs / N. P. Cesur, V. Yalman, N. Laçin Türkoğlu // CMJ. – 2020. – Vol. 42, № 2. – P. 192–197. DOI: 10.7197/cmj.vi.609592
11. Extracellular Matrix from decellularized Wharton's Jelly improves the behavior of cells from degenerated intervertebral disc / L. Penolazzi, M. Pozzobon, L. S. Bergamin [et al.] // Front Bioeng Biotechnol. – 2020. – Vol. 8. – P. 262. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00262
12. Fabrication and in vitro study of tissue-engineered cartilage scaffold derived from Wharton's Jelly extracellular matrix / T. Xiao, W. Guo, M. Chen [et al.] // Biomed Res Int. – 2017. – Vol. 2017. – P. 5839071. DOI: 10.1155/2017/5839071
13. Injectable decellularized Wharton's jelly hydrogel containing CD56+ umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes for meniscus tear healing and cartilage protection / S. Kang, X. Shi, Y. Chen [et al.] // Mater Today Bio. – 2024. – Vol. 29. – P. 101258. DOI: 10.1016/j.mtbio.2024.101258
14. Decellularized Wharton's Jelly and amniotic membrane demonstrate potential therapeutic implants in tracheal defects in rabbits / A. E. Neto, K. M. Foltz, T. Fuchs [et al.] // Life. – 2024. – Vol. 14, № 6. – P. 782. DOI: 10.3390/life14060782
15. Nanofibrillar decellularized Wharton's Jelly matrix for segmental tracheal repair / Y. Xu, L. Duan, Y. Li [et al.] // Adv Funct Mater. – 2020. – Vol. 30. – P. 1910067. DOI: 10.1002/adfm.201910067
16. Wharton's jelly of the umbilical cord serves as a natural biomaterial to promote osteogenesis / Y. S. Fu, S. W. Tsai, Z. J. Tong [et al.] // Biomater Sci. – 2024. – Vol. 12, № 24. – P. 6284–6298. DOI: 10.1039/d3bm02137h
17. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on PLLA scaffold coated with Wharton's Jelly / M. Ahmadi, E. Seyedjafari, S. J. Zargar [et al.] // EXCLI J. – 2017. – Vol. 16. – P. 785–794. DOI: 10.17179/excli2016-741
18. Harnessing the Wharton's jelly membrane osteo-biocompatibility by a tannic acid cross-linking / L. Scomazzon, F. Lemaire, M. Dubus [et al.] // Appl Mater Today. – 2024. – Vol. 39. – P. 102241. DOI: 10.1016/j.apmt.2024.102241

19. Wharton's Jelly bioscaffolds improve cardiac repair with bone marrow mononuclear stem cells in rats / L. K. Gamba, L. K. Gamba, C. da Costa [et al.] // *J Funct Biomater.* – 2025. – Vol. 16, № 5. – P. 175. DOI: 10.3390/jfb16050175
20. Extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord as a scaffold for neural tissue repair and its comparison with extracellular matrix from porcine tissues / Z. Kočí, K. Výborný, J. Dubišová [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods.* – 2017. – Vol. 23, № 6. – P. 333–345. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0089
21. Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair / K. Výborný, J. Vallová, Z. Kočí [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 10674. DOI: 10.1038/s41598-019-47059-x
22. Fabrication and optimization of multilayered composite scaffold made of sulfated alginate-based nanofiber/decellularized Wharton's jelly ECM for tympanic membrane tissue engineering / R. Najafi, F. Yazdian, M. Pezeshki-Modaress [et al.] // *Int J Biol Macromol.* – 2023. – Vol. 253 (Pt 6). – P. 127128. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127128
23. Beiki, B. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing / B. Beiki, B. Zeynali, E. Seyedjafari // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2017. – Vol. 78. – P. 627–638. DOI: 10.1016/j.msec.2017.04.074
24. Decellularized Wharton's jelly extracellular matrix as a promising scaffold for promoting hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells / M. Kehtari, B. Beiki, B. Zeynali [et al.] // *J Cell Biochem.* – 2019. – Vol. 120, № 4. – P. 6683–6697. DOI: 10.1002/jcb.27965
25. Characterization of an innovative biomaterial derived from human Wharton's Jelly as a new promising coating for tissue engineering applications / A. Fayon, D. Helle, G. Francius [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 884069. DOI: 10.3389/fbioe.2022.884069
26. Current biomaterials for wound healing / M. Downer, C. E. Berry, J. B. Parker [et al.] // *Bioengineering (Basel).* – 2023. – Vol. 10. – P. 1378. DOI: 10.3390/bioengineering10121378

27. Gardeazabal, L. Elastin and collagen fibres in cutaneous wound healing / L. Gardeazabal, A. Izeta // *Exp Dermatol.* – 2024. – Vol. 33, № 3. – P. e15052. DOI: 10.1111/exd.15052
28. Placental-derived biomaterials and their application to wound healing: a review / N. M. Protzman, Y. Mao, D. Long [et al.] // *Bioengineering (Basel).* – 2023. – Vol. 10, № 7. – P. 829. DOI: 10.3390/bioengineering10070829
29. Roles of proteoglycans and glycosaminoglycans in wound healing and fibrosis / S. Ghatak, E. V. Maytin, J. A. Mack [et al.] // *Int J Cell Biol.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 834893. DOI: 10.1155/2015/834893
30. Lenselink, E. A. Role of fibronectin in normal wound healing / E. A. Lenselink // *Int Wound J.* – 2015. – Vol. 12, № 3. – P. 313–316. DOI: 10.1111/iwj.12109
31. Лечение ран в зависимости от фазы раневого процесса / Е. В. Муромцева, К. И. Сергацкий, В. И. Никольский [и др.] // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* – 2022. – Т. 3, № 63. – С. 93–109. DOI: 10.21685/2072-3032-2022-3-9
32. Mathew-Steiner, S. S. Collagen in wound healing / S. S. Mathew-Steiner, S. Roy, C. K. Sen // *Bioengineering (Basel).* – 2021. – Vol. 8, № 5. – P. 63. DOI: 10.3390/bioengineering8050063
33. Outcome of application of cryopreserved amniotic membrane grafts in the treatment of chronic nonhealing wounds of different origins in polymorbid patients: a prospective multicenter study / A. Svobodova, V. Horvath, L. Balogh [et al.] // *Bioengineering (Basel).* – 2023. – Vol. 10, № 8. – P. 900. DOI: 10.3390/bioengineering10080900
34. Wound healing concepts in clinical practice of OMFS / S. Chhabra, N. Chhabra, A. Kaur, N. Gupta // *J Maxillofac Oral Surg.* – 2017. – Vol. 16, № 4. – P. 403–423. DOI: 10.1007/s12663-016-0880-z
35. Exploiting synergistic effect of CO/NO gases for soft tissue transplantation using a hydrogel patch / X. Tang, J. Ren, X. Wei [et al.] // *Nat Commun.* – 2023. – Vol. 14, № 1. – P. 2417. DOI: 10.1038/s41467-023-37959-y

36. Тактика лечения посттравматических дефектов мягких тканей конечностей / Е. Ю. Шибает, П. А. Иванов, А. В. Неведров [и др.] // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н.В. Склифосовского. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 37–43. DOI: 10.23934/2223-9022-2018-7-1-37-43
37. Сохранение опороспособности стопы при посттравматических дефектах методами микрохирургической аутотрансплантации тканей / А. П. Власов, Е. Ю. Шибает, А. М. Файн [и др.] // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н.В. Склифосовского. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 434–441. DOI: 10.23934/2223-9022-2020-9-3-434-441
38. Long term clinical and functional outcome of lateral supramalleolar flap for soft tissue coverage of foot and ankle defects: largest case series at a tertiary care hospital / P. M. Hashmi, S. Kamran Ahmed, M. Ali [et al.] // Clin Surg. – 2020. – Vol. 5. – P. 2976.
39. Lateral supramalleolar flap: Is it based on perforator of peroneal / anterior tibial artery; A cross-sectional study at tertiary care centre / P. M. Hashmi, K. Ahmed, M. Ali [et al.] // Ann Med Surg (Lond). – 2021. – Vol. 71. – P. 102916. DOI: 10.1016/j.amsu.2021.102916
40. The features of autodermplasty in traumatic wounds of the skin and soft tissues / S. Makhmudov, A. Babajanov, A. Toirov [et al.] // IJHS. – 2022. – Vol. 6, № S1. – P. 7792–7795. DOI: 10.53730/ijhs.v6nS1.6717
41. The current state of knowledge on how to improve skin flap survival: A review / A. Afrooghe, A. R. Damavandi, E. Ahmadi [et al.] // J Plast Reconstr Aesthet Surg. – 2023. – Vol. 82. – P. 48–57. DOI: 10.1016/j.bjps.2023.04.021
42. Варганов, М. В. Опыт использования препарата Реамберин и NPWT-терапии в подготовке ран к аутодермопластике / М. В. Варганов, А. А. Микличев, К. Д. Богданов // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2020. – Т. 6. – С. 76–81. DOI: 10.17116/hirurgia202006176
43. Гипоксическое прекондиционирование донорской области: клинимо-морфологическая оценка состояния аутодермотрансплантата кожи / Н. Ю. Орлинская, Д. В. Давыденко, М. В. Багрянцев [и др.] // Современные

технологии в медицине. – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 110–117. DOI: 10.17691/stm2018.10.3.13

44. Mahajan, N. Regenerative medicine approaches for skin wound healing: from allografts to engineered skin substitutes / N. Mahajan, S. Soker, S. V. Murphy // *Curr Transpl Rep.* – 2024. – Vol. 11. – P. 207–221. DOI: 10.1007/s40472-024-00453-5

45. Севастьянов, В. И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины / В. И. Севастьянов // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 93–108. DOI: 10.15825/1995-1191-2014-3-93-108

46. McInnes, A. D. Preparation and use of decellularized extracellular matrix for tissue engineering / A. D. McInnes, M. A. J. Moser, X. Chen // *J Funct Biomater.* – 2022. – Vol. 13, № 4. – P. 240. DOI: 10.3390/jfb13040240

47. Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications / S. Liu, J. M. Yu, Y. C. Gan [et al.] // *Mil Med Res.* – 2023. – Vol. 10, № 1. – P. 16. DOI: 10.1186/s40779-023-00448-w

48. Human umbilical cord derived scaffolds for cartilage tissue engineering / F. Safari, N. Fani, D. Eglin [et al.] // *J Biomed Mater Res A.* – 2019. – Vol. 107, № 8. – P. 1793–1802. DOI: 10.1002/jbm.a.36698

49. Accelerated wound healing in a diabetic rat model using decellularized dermal matrix and human umbilical cord perivascular cells / P. B. Milan, N. Lotfibakhshaiesh, M. T. Joghataie [et al.] // *Acta Biomater.* – 2016. – Vol. 45. – P. 234–246. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.08.053

50. Scaffolds in the microbial resistant era: Fabrication, materials, properties and tissue engineering applications / Á. Serrano-Aroca, A. Cano-Vicent, R. Sabater i Serra [et al.] // *Mater Today Bio.* – 2022. – Vol. 16. – P. 100412. DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100412

51. Decellularized extracellular matrix: the role of this complex biomaterial in regeneration / de A. G. P. Paula, J. D. de Lima, T. S. B. Bastos [et al.] // *ACS Omega.* – 2023. – Vol. 8, № 25. – P. 22256–22267. DOI: 10.1021/acsomega.2c06216

52. Bandzerewicz, A. Into the tissues: extracellular matrix and its artificial substitutes: cell signalling mechanisms / A. Bandzerewicz, A. Gadomska-Gajadhur // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, № 5. – P. 914. DOI: 10.3390/cells11050914
53. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix / N. K. Karamanos, A. D. Theocharis, Z. Piperigkou [et al.] // *FEBS J*. – 2021. – Vol. 288, № 24. – P. 6850–6912. DOI: 10.1111/febs.15776
54. The charming world of the extracellular matrix: a dynamic and protective network of the intestinal wall / S. Pompili, G. Latella, E. Gaudio [et al.] // *Front Med (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 8. – P. 610189. DOI: 10.3389/fmed.2021.610189
55. Accounting for material changes in decellularized tissue with underutilized methodologies / R. A. Behmer Hansen, X. Wang, G. Kaw [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 6696295. DOI: 10.1155/2021/6696295.
56. Sulfated glycosaminoglycans in decellularized placenta matrix as critical regulators for cutaneous wound healing / C. Wang, G. Li, K. Cui [et al.] // *Acta Biomater*. – 2021. – Vol. 122. – P. 199–210. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.12.055
57. Extracellular matrix structure / A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, N. K. Karamanos // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2016. – Vol. 97. – P. 4–27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001
58. Decellularization of various tissues and organs through chemical methods / T. S. Tabatabai, M. Salehi, L. Rezakhani [et al.] // *Tissue Cell*. – 2024. – Vol. 91. – P. 102573. DOI: 10.1016/j.tice.2024.102573
59. Biologic scaffolds / A. Costa, J. D. Naranjo, R. Londono, S. F. Badylak // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2017. – Vol. 7, № 9. – P. a025676. DOI: 10.1101/cshperspect.a025676
60. Main and minor types of collagens in the articular cartilage: the role of collagens in repair tissue evaluation in chondral defects / L. Alcaide-Ruggiero, V. Molina-Hernández, M. M. Granados, J. M. Domínguez // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22, № 24. – P. 13329. DOI: 10.3390/ijms222413329
61. 3D extracellular matrix mimics: fundamental concepts and role of materials chemistry to influence stem cell fate / J. Nicolas, S. Magli, L. Rabbachin [et al.] //

- Biomacromolecules. – 2020. – Vol. 21, № 6. – P. 1968–1994. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00045
62. Collagen scaffolds treated by hydrogen peroxide for cell cultivation / Y. Nashchekina, P. Nikonov, N. Mikhailova, A. Nashchekin // *Polymers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, № 23. – P. 4134. DOI: 10.3390/polym13234134
63. Walimbe, T. Best of both hydrogel worlds: harnessing bioactivity and tunability by incorporating glycosaminoglycans in collagen hydrogels / T. Walimbe, A. Panitch // *Bioengineering (Basel)*. – 2020. – Vol. 7, № 4. – P. 156. DOI: 10.3390/bioengineering7040156
64. Holwerda, A. M. The impact of collagen protein ingestion on musculoskeletal connective tissue remodeling: a narrative review / A. M. Holwerda, L. J. C. van Loon // *Nutr Rev.* – 2022. – Vol. 80, № 6. – P. 1497–1514. DOI: 10.1093/nutrit/nuab083
65. Genetic and epigenetic aspects of skin collagen fiber turnover and functioning / N. N. Potekaev, O. B. Borzykh, G. V. Medvedev [et al.] // *Cosmetics*. – 2021. – Vol. 8, № 4. – P. 92. DOI: 10.3390/cosmetics8040092
66. Синтез коллагена в коже, его функциональные и структурные особенности / О. Б. Борzych, Н. А. Шнайдер, Е. И. Карпова [и др.] // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2021. – Т. 16, № 4. – С. 443–450. DOI: 10.14300/mnnc.2021.16108
67. Rousselle, P. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization / P. Rousselle, M. Montmasson, C. Garnier // *Matrix Biol.* – 2019. – Vol. 75–76. – P. 12–26. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.01.002
68. Diller, R. B. The role of the extracellular matrix (ECM) in wound healing: a review / R. B. Diller, A. J. Tabor // *Biomimetics (Basel, Switzerland)*. – 2022. – Vol. 7, № 3. – P. 87. DOI: 10.3390/biomimetics7030087
69. The time-dependent rearrangement of the epithelial basement membrane in human skin wounds--immunohistochemical localization of Collagen IV and VII / P. Betz, A. Nerlich, J. Wilske [et al.] // *Int J Legal Med.* – 1992. – Vol. 105, № 2. – P. 93–97. DOI: 10.1007/BF02340831

70. Wick, G. Characterization of antibodies to basement membrane (type IV) collagen in immunohistological studies / G. Wick, R. W. Glanville, R. Timpl // *Immunobiology*. – 1980. – Vol. 156, № 3–4. – P. 372–381. DOI: 10.1016/S0171-2985(80)80071-4.
71. Application of collagen-based hydrogel in skin wound healing / Y. Zhang, Y. Wang, Y. Li [et al.] // *Gels*. – 2023. – Vol. 9, № 3. – P. 185. DOI: 10.3390/gels9030185
72. Ricard-Blum, S. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans / S. Ricard-Blum, L. Ballut // *Front Biosci*. – 2011. – Vol. 16, № 2. – P. 674–697. DOI: 10.2741/3712
73. Londono, R. Biologic scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling / R. Londono, S. Badylak // *Ann Biomed Eng*. – 2015. – Vol. 43, № 3. – P. 577–592. DOI: 10.1007/s10439-014-1103-8
74. A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface / L. Parisi, A. Toffoli, B. Ghezzi [et al.] // *Jpn Dent Sci Rev*. – 2020. – Vol. 56, № 1. – P. 50–55. DOI: 10.1016/j.jdsr.2019.11.002
75. Фибронектин: структура, функции, клиническая значимость (обзор) / С. А. Васильев, Л. А. Горгидзе, Е. Е. Ефремов [и др.] // *Атеротромбоз*. – 2022. – Т. 12, № 1. – С. 138–158. DOI: 10.21518/2307-1109-2022-12-1-138-158
76. Dalton, C. J. Fibronectin: molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling / C. J. Dalton, C. A. Lemmon // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 9. – P. 2443. DOI: 10.3390/cells10092443
77. To, W. S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair / W. S. To, K. S. Midwood // *Fibrogenesis Tissue Repair*. – 2011. – Vol. 4. – P. 21. DOI: 10.1186/1755-1536-4-21
78. The role of extracellular matrix in skin wound healing / N. N. Potekaev, O. B. Borzykh, G. V. Medvedev [et al.] // *J Clin Med*. – 2021. – Vol. 10, № 24. – P. 5947. DOI: 10.3390/jcm10245947
79. Structural mechanism of laminin recognition by integrin / T. Arimori, N. Miyazaki, E. Mihara [et al.] // *Nat Commun*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 4012. DOI: 10.1038/s41467-021-24184-8

80. Hohenester, E. Structural biology of laminins / E. Hohenester // *Essays Biochem.* – 2019. – Vol. 63, № 3. – P. 285–295. DOI: 10.1042/EBC20180075
81. Laminins in cellular differentiation / L. Yap, H. G. Tay, M. T. X. Nguyen [et al.] // *Trends Cell Biol.* – 2019. – Vol. 29, № 12. – P. 987–1000. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.10.001
82. Human placental laminin: role in neuronal differentiation, cell adhesion and proliferation / C. Mukherjee, S. Saleem, S. Das [et al.] // *J Biosci.* – 2020. – Vol. 45. – P. 93.
83. Clinical relevance of elastin in the structure and function of skin / L. Baumann, E. F. Bernstein, A. S. Weiss [et al.] // *Aesthet Surg J Open Forum.* – 2021. – Vol. 3, № 3. – P. ojab019. DOI: 10.1093/asjof/ojab019
84. Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing / J. C. Rodríguez-Cabello, I. González de Torre, A. Ibañez-Fonseca, M. Alonso // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2018. – Vol. 129. – P. 118–133. DOI: 10.1016/j.addr.2018.03.003
85. Extracellular matrix-derived materials for tissue engineering and regenerative medicine: A journey from isolation to characterization and application / J. Noro, H. Vilaça-Faria, R. L. Reis, R. P. Pirraco // *Bioact Mater.* – 2024. – Vol. 34. – P. 494–519. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2024.01.004
86. Versican, a major hyaluronan-binding component in the dermis, loses its hyaluronan-binding ability in solar elastosis / K. Hasegawa, M. Yoneda, H. Kuwabara [et al.] // *J Invest Dermatol.* – 2007. – Vol. 127, № 7. – P. 1657–1663. DOI: 10.1038/sj.jid.5700754
87. Decorin regulates collagen fibrillogenesis during corneal wound healing in mouse in vivo / S. Gupta, F. Buyank, N. R. Sinha [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2022. – Vol. 216. – P. 108933. DOI: 10.1016/j.exer.2022.108933
88. Aya, K. L. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player / K. L. Aya, R. Stern // *Wound Repair Regen.* – 2014. – Vol. 22, № 5. – P. 579–593. DOI: 10.1111/wrr.12214

89. Glycosaminoglycans' ability to promote wound healing: from native living macromolecules to artificial biomaterials / P. Yang, Y. Lu, W. Gou [et al.] // *Adv Sci (Weinh)*. – 2024. – Vol. 11, № 9. – P. e2305918. DOI: 10.1002/advs.202305918
90. The role of hyaluronan in the pathobiology and treatment of respiratory disease / S. Garantziotis, M. Brezina, P. Castelnovo, L. Drago // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2016. – Vol. 310, № 9. – P. L785–L795. DOI: 10.1152/ajplung.00168.2015
91. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease / R. M. Kavasi, A. Berdiaki, I. Spyridaki [et al.] // *Food Chem Toxicol*. – 2017. – Vol. 101. – P. 128–138. DOI: 10.1016/j.fct.2017.01.012
92. Studies in fetal wound healing. V. A prolonged Presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid / M. T. Longaker, E. S. Chiu, N. S. Adzick [et al.] // *Ann Surg*. – 1991. – Vol. 213, № 4. – P. 292–296. DOI: 10.1097/00000658-199104000-00003
93. ASTM F3354-19. Standard guide for evaluating extracellular matrix decellularization processes. – West Conshohocken : ASTM International, 2019. – 11 p. DOI: 10.1520/F3354-19
94. Cheng, J. Combination of freeze-thaw with detergents: A promising approach to the decellularization of porcine carotid arteries / J. Cheng, C. Wang, Y. Gu // *Biomed Mater Eng*. – 2019. – Vol. 30, № 2. – P. 191–205. DOI: 10.3233/BME-191044
95. Fernández-Pérez, J. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels / J. Fernández-Pérez, M. Ahearne // *Sci Rep*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 14933. DOI: 10.1038/s41598-019-49575-2
96. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix / B. N. Brown, J. M. Freund, L. Han [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2011. – Vol. 17, № 4. – P. 411–421. DOI: 10.1089/ten.TEC.2010.0342
97. Hazwani, A. Characterization and in vivo study of decellularized aortic scaffolds using closed sonication system / A. Hazwani, M. Sha'Ban, A. Azhim // *Organogenesis*. – 2019. – Vol. 15, № 4. – P. 120–136. DOI: 10.1080/15476278.2019.1656997

98. The use of sonication treatment to completely decellularize blood arteries: a pilot study / A. Azhim, K. Yamagami, K. Muramatsu [et al.] // Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc. – 2011. – Vol. 2011. – P. 2468–2471. DOI: 10.1109/IEMBS.2011.6090685
99. Functional heart valve scaffolds obtained by complete decellularization of porcine aortic roots in a novel differential pressure gradient perfusion system / L. N. Sierad, E. L. Shaw, A. Bina [et al.] // Tissue Eng Part C Methods. – 2015. – Vol. 21, № 12. – P. 1284–1296. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0170
100. Chung, S. Supercritical extraction of decellularized extracellular matrix from porcine adipose tissue as regeneration therapeutics / S. Chung, H. Kwon, N. P. Kim // J Cosmetic Med. – 2019. – Vol. 3, № 2. – P. 86–93. DOI: 10.25056/JCM.2019.3.2.86
101. Protocols for the preparation and characterization of decellularized tissue and organ scaffolds for tissue engineering / D. J. Hsieh, P. Srinivasan, K. C. Yen [et al.] // BioTechniques. – 2021. – Vol. 70, № 2. – P. 107–115. DOI: 10.2144/btn-2020-0141
102. Phillips, M. Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization / M. Phillips, E. Maor, B. Rubinsky // J Biomech Eng. – 2010. – Vol. 132, № 9. – P. 091003. DOI: 10.1115/1.4001882
103. Rabbani, M. Contribution of physical methods in decellularization of animal tissues / M. Rabbani, N. Zakian, N. Alimoradi // J Med Signals Sens. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 1–11. DOI: 10.4103/jmss.JMSS_2_20
104. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs / P. N. Nonaka, N. Campillo, J. J. Uriarte [et al.] // J Biomed Mater Res A. – 2014. – Vol. 102, № 2. – P. 413–419. DOI: 10.1002/jbm.a.34708
105. Crapo, P. M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P. M. Crapo, T. W. Gilbert, S. F. Badylak // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, № 12. – P. 3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
106. Yusof, F. Development of decellularized meniscus using closed sonication treatment system: potential scaffolds for orthopedics tissue engineering applications / F. Yusof, M. Sha'ban, A. Azhim // Int J Nanomedicine. – 2019. – Vol. 14. – P. 5491–5502. DOI: 10.2147/IJN.S207270

107. The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds / A. Azhim, N. Syazwani, Y. Morimoto [et al.] // *J Biomater Appl.* – 2014. – Vol. 29, № 1. – P. 130–141. DOI: 10.1177/0885328213517579
108. Sonication-assisted method for decellularization of human umbilical artery for small-caliber vascular tissue engineering / C.-H. Lin, K. Hsia, C.-K. Su [et al.] // *Polymers.* – 2021. – Vol. 13, № 11. – P. 1699. DOI: 10.3390/polym13111699
109. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering / Y. S. Kim, M. Majid, A. J. Melchiorri, A. G. Mikos // *Bioeng Transl Med.* – 2018. – Vol. 4, № 1. – P. 83–95. DOI: 10.1002/btm2.10110
110. Decellularization of tissues and organs / T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, S. F. Badylak // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27, № 19. – P. 3675–3683. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014
111. Characterization of porcine urinary bladder matrix hydrogels from sodium dodecyl sulfate decellularization method / C. Y. Kao, H. Q. Nguyen, Y. C. Weng // *Polymers.* – 2020. – Vol. 12, № 12. – P. 3007. DOI: 10.3390/polym12123007
112. RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. *Journal of materials science* / X. Dong, X. Wei, W. Yi [et al.] // *J Mater Sci Mater Med.* – 2009. – Vol. 20, № 11. – P. 2327–2336. DOI: 10.1007/s10856-009-3791-4
113. From cartilage to matrix: protocols for the decellularization of porcine auricular cartilage / A. C. dos Santos, L. M. B. de Andrade, R. A. Q. Candelária [et al.] // *Bioengineering (Basel).* – 2025. – Vol. 12, № 1. – P. 52. DOI: 10.3390/bioengineering12010052
114. Evaluating two ovarian decellularization methods in three species / F. Eivazkhani, N. S. Abtahi, S. Tavana [et al.] // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* – 2019. – Vol. 102. – P. 670–682. DOI: 10.1016/j.msec.2019.04.092
115. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds / J. E. Reing, B. N. Brown, K. A. Daly [et al.] // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31, № 33. – P. 8626–8633. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.083

116. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications / R. N. Chen, H. O. Ho, Y. T. Tsai, M. T. Sheu // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25, № 13. – P. 2679–2686. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.070
117. Generation of femtosecond laser-cut decellularized corneal lenticule using hypotonic trypsin-EDTA solution for corneal tissue engineering / M. I. Huh, K. P. Lee, J. Kim [et al.] // *J Ophthalmol*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 2590536. DOI: 10.1155/2018/2590536
118. Development of an apoptosis-assisted decellularization method for maximal preservation of nerve tissue structure / R. C. Cornelison, S. M. Wellman, J. H. Park [et al.] // *Acta Biomater*. – 2018. – Vol. 77. – P. 116–126. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.07.009
119. Development of a decellularization method to produce nerve allografts using less invasive detergents and hyper/hypotonic solutions / J. K. Kim, Y. D. Koh, J. O. Kim, D. H. Seo // *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. – 2016. – Vol. 69, № 12. – P. 1690–1696. DOI: 10.1016/j.bjps.2016.08.016
120. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering / A. Hopkinson, V. A. Shanmuganathan, T. Gray [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2008. – Vol. 14, № 4. – P. 371–381. DOI: 10.1089/ten.tec.2008.0315
121. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate / C. R. Deeken, A. K. White, S. L. Bachman [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2011. – Vol. 96, № 2. – P. 199–206. DOI: 10.1002/jbm.b.31753
122. Cartmell, J. S. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties / J. S. Cartmell, M. G. Dunn // *J Biomed Mater Res*. – 2000. – Vol. 49, № 1. – P. 134–140. DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(200001)49:1<134::aid-jbm17>3.0.co;2-d
123. Сравнительный анализ эффективности простого и многокомпонентного методов щелочной децеллюляризации на примере очистки волокнистого внеклеточного матрикса дермы / Н. В. Калмыкова, И. А. Демьяненко, Н. В. Шевлягина [и др.] // *Морфологические ведомости*. – 2016. – Т. 24, № 4. – С. 36–45. DOI: 10.20340/mv-mn.2016.24(4):36-45

124. Keane, T. J. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance / T. J. Keane, I. T. Swinehart, S. F. Badylak // *Methods*. – 2015. – Vol. 84. – P. 25–34. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005
125. Tissue-specific decellularization methods: rationale and strategies to achieve regenerative compounds / U. Mendibil, R. Ruiz-Hernandez, S. Retegi-Carrion [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21, № 15. – P. 5447. DOI: 10.3390/ijms21155447
126. Hoshiba, T. Comparison of decellularization protocols for cultured cell-derived extracellular matrix-Effects on decellularization efficacy, extracellular matrix retention, and cell functions / T. Hoshiba, S. Yunoki // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2023. – Vol. 111, № 1. – P. 85–94. DOI: 10.1002/jbm.b.35135
127. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods / R. W. Grauss, M. G. Hazekamp, F. Oppenhuizen [et al.] // *Eur J Cardiothorac Surg*. – 2005. – Vol. 27, № 4. – P. 566–571. DOI: 10.1016/j.ejcts.2004.12.052
128. Rat lung decellularization using chemical detergents for lung tissue engineering / H. Tebyanian, A. Karami, E. Motavallian [et al.] // *Biotech Histochem*. – 2019. – Vol. 94, № 3. – P. 214–222. DOI: 10.1080/10520295.2018.1544376
129. Mesenchymal stem cells can survive on the extracellular matrix-derived decellularized bovine articular cartilage scaffold / A. Tavassoli, M. M. Matin, M. A. Niaki [et al.] // *Iran J Basic Med Sci*. – 2015. – Vol. 18, № 12. – P. 1221–1227.
130. Woods, T. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft / T. Woods, P. F. Gratzner // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26, № 35. – P. 7339–7349. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.066
131. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells / E. Rieder, M. T. Kasimir, G. Silberhumer [et al.] // *J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2004. – Vol. 127, № 2. – P. 399–405. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2003.06.017

132. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds / T. H. Petersen, E. A. Calle, M. B. Colehour, L. E. Niklason // *Cells Tissues Organs*. – 2012. – Vol. 195, № 3. – P. 222–231. DOI: 10.1159/000324896
133. Changes of the structural and biomechanical properties of the bovine pericardium after the removal of α -Gal epitopes by decellularization and α -galactosidase treatment / J. Nam, S. Y. Choi, S. C. Sung [et al.] // *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2012. – Vol. 45, № 6. – P. 380–389. DOI: 10.5090/kjtcs.2012.45.6.380
134. Removal of alpha-Gal epitopes from porcine aortic valve and pericardium using recombinant human alpha galactosidase A / S. Park, W. H. Kim, S. Y. Choi, Y. J. Kim // *J Korean Med Sci*. – 2009. – Vol. 24, № 6. – P. 1126–1131. DOI: 10.3346/jkms.2009.24.6.1126
135. Preparation and evaluation of decellularized porcine carotid arteries cross-linked by genipin: the preliminary results / Y. Gu, F. Wang, R. Wang [et al.] // *Cell Tissue Bank*. – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. 311–321. DOI: 10.1007/s10561-017-9675-9
136. Shin, Y. H. Comparison of systematically combined detergent and nuclease-based decellularization methods for acellular nerve graft: An ex vivo characterization and in vivo evaluation / Y. H. Shin, S. Y. Park, J. K. Kim // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2019. – Vol. 13, № 7. – P. 1241–1252. DOI: 10.1002/term.2874
137. An investigation on the correlation between the mechanical property change and the alterations in composition and microstructure of a porcine vascular tissue underwent trypsin-based decellularization treatment / C. Lin, Y. Kao, H. Ma, R. Y. Tsay // *J Mech Behav Biomed Mater*. – 2018. – Vol. 86. – P. 199–207. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2018.06.029
138. Sequential hydrophile and lipophile solubilization as an efficient method for decellularization of porcine aortic valve leaflets: Structure, mechanical property and biocompatibility study / W. H. Qiao, P. Liu, D. Hu [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2018. – Vol. 12, № 2. – P. e828–e840. DOI: 10.1002/term.2388
139. Preparation of an adipogenic hydrogel from subcutaneous adipose tissue / C. J. Poon, M. V. Pereira E. Cotta, S. Sinha [et al.] // *Acta Biomater*. – 2013. – Vol. 9, № 3. – P. 5609–5620. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.11.003

140. A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine / M. Kawecki, W. Łabuś, A. Klama-Baryla [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2018. – Vol. 106, № 2. – P. 909–923. DOI: 10.1002/jbm.b.33865
141. Decellularization systems and devices: State-of-the-art / D. Choudhury, M. Yee, Z. L. J. Sheng [et al.] // *Acta Biomater.* – 2020. – Vol. 115. – P. 51–59. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.07.060
142. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study / L. J. White, A. J. Taylor, D. M. Faulk [et al.] // *Acta Biomater.* – 2017. – Vol. 50. – P. 207–219. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.12.033
143. К вопросу о морфологических критериях децеллюляризации органов и тканей / А. С. Сотниченко, Е. А. Губарева, Е. В. Куевда [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 65–69. DOI: 10.15825/1995-1191-2017-3-65-69
144. The quantification of glycosaminoglycans: a comparison of HPLC, carbazole, and alcian blue methods / S. B. Frazier, K. A. Roodhouse, D. E. Hourcade, L. Zhang // *Open Glycosci.* – 2008. – Vol. 1. – P. 31–39. DOI: 10.2174/1875398100801010031
145. Analysis of sulfated glycosaminoglycans in ECM scaffolds for tissue engineering applications: modified alcian blue method development and validation / T. Iimaa, Y. Ikegami, R. Bual [et al.] // *J Funct Biomater.* – 2019. – Vol. 10, № 2. – P. 19. DOI: 10.3390/jfb10020019
146. Unraveling the relevance of tissue-specific decellularized extracellular matrix hydrogels for vocal fold regenerative biomaterials: a comprehensive proteomic and in vitro study / M. Brown, S. Zhu, L. Taylor [et al.] // *Adv Nanobiomed Res.* – 2023. – Vol. 3, № 4. – P. 2200095. DOI: 10.1002/anbr.202200095
147. Decellularized extracellular matrix: A promising strategy for skin repair and regeneration / S. Jiang, Y. Zhuang, M. Cai [et al.] // *Engineered Regeneration.* – 2023. – Vol. 4, № 4. – P. 357–374. DOI: 10.1016/j.engreg.2023.05.001

148. Porcine decellularized diaphragm hydrogel: a new option for skeletal muscle malformations / D. Boso, E. Carraro, E. Maghin [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9, № 7. – P. 709. DOI: 10.3390/biomedicines9070709
149. Wainwright, D. J. Acellular dermal matrix in the management of the burn patient / D. J. Wainwright, S. B. Bury // *Aesthet Surg J*. – 2011. – Vol. 31 (7 Suppl). – P. 13S–23S. DOI: 10.1177/1090820X11418202
150. Recent advances in decellularized biomaterials for wound healing / H. Xiao, X. Chen, X. Liu [et al.] // *Mater Today Bio*. – 2023. – Vol. 19. – P. 100589. DOI: 10.1016/j.mtbio.2023.100589
151. Dussoyer, M. Decellularized scaffolds for skin repair and regeneration / M. Dussoyer, A. Michopoulou, P. Rousselle // *Appl Sci*. – 2020. – Vol. 10, № 10. – P. 3435. DOI: 10.3390/app10103435
152. Ayaz, M. Thin split thickness skin grafting on human acellular dermal matrix scaffold for the treatment of deep burn wounds / M. Ayaz, A. Najafi, M. Y. Karami // *Int J Organ Transplant Med*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 44–51.
153. Long-term followup of dermal substitution with acellular dermal implant in burns and postburn scar corrections / I. Juhasz, B. Kiss, L. Lukacs [et al.] // *Dermatol Res Pract*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 210150. DOI: 10.1155/2010/210150
154. Clinical effectiveness of an acellular dermal regenerative tissue matrix compared to standard wound management in healing diabetic foot ulcers: a prospective, randomised, multicentre study / A. Reyzelman, R. T. Crews, J. C. Moore [et al.] // *Int Wound J*. – 2009. – Vol. 6, № 3. – P. 196–208. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2009.00585.x
155. Right ventricular outflow tract reconstruction with decellularized porcine xenografts in patients with congenital heart disease / W. Konertz, E. Angeli, G. Tarusinov [et al.] // *J Heart Valve Dis*. – 2011. – Vol. 20, № 3. – P. 341–347.
156. Decellularized extracellular matrix scaffolds for cardiovascular tissue engineering: current techniques and challenges / G. I. Barbulescu, F. M. Bojin, V. L. Ordodi [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23, № 21. – P. 13040. DOI: 10.3390/ijms232113040

157. Clinical performance of decellularized heart valves versus standard tissue conduits: a systematic review and meta-analysis / S. W. F. R. Waqanivavalagi, S. Bhat, M. B. Ground [et al.] // J Cardiothorac Surg. – 2020. – Vol. 15, № 1. – P. 260. DOI: 10.1186/s13019-020-01292-y
158. First-in-man study of a cardiac extracellular matrix hydrogel in early and late myocardial infarction patients / J. H. Traverse, T. D. Henry, N. Dib [et al.] // JACC. Basic Transl Sci. – 2019. – Vol. 4, № 6. – P. 659–669. DOI: 10.1016/j.jacbts.2019.07.012
159. 20-Year follow-up and comparison of valved conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction: single-centre, propensity score match analysis / F. Sabateen, V. Soják, A. S. Nagi [et al.] // Interdiscip Cardiovasc Thorac Surg. – 2023. – Vol. 37, № 5. – P. ivad182. DOI: 10.1093/icvts/ivad182
160. Amirazad, H. Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering / H. Amirazad, M. Dadashpour, N. Zarghami // J Biol Eng. – 2022. – Vol. 16, № 1. – P. 1. DOI: 10.1186/s13036-021-00282-5
161. Plate fixation of ununited humeral shaft fractures: effect of type of bone graft on healing / C. Hierholzer, D. Sama, J. B. Toro [et al.] // J Bone Joint Surg Am. – 2006. – Vol. 88, № 7. – P. 1442–1447. DOI: 10.2106/JBJS.E.00332
162. Bovine pericardium based non-cross linked collagen matrix for successful root coverage, a clinical study in human / M. Schlee, S. Ghanaati, I. Willershausen [et al.] // Head Face Med. – 2012. – Vol. 8. – P. 6. DOI: 10.1186/1746-160X-8-6
163. Agarwal, C. Comparative evaluation of free gingival graft and AlloDerm® in enhancing the width of attached gingival: A clinical study / C. Agarwal, A. B. Tarun Kumar, D. S. Mehta // Contemp Clin Dent. – 2015. – Vol. 6, № 4. – P. 483–488. DOI: 10.4103/0976-237X.169838
164. Biological evaluations of decellularized extracellular matrix collagen microparticles prepared based on plant enzymes and aqueous two-phase method / Y. Liu, C. C. Huang, Y. Wang [et al.] // Regen Biomater. – 2021. – Vol. 8, № 2. – P. rbab002. DOI: 10.1093/rb/rbab002

165. Novel human placenta-based extract for vascularization strategies in tissue engineering / J. Hackethal, A. M. Weihs, L. Karner [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2021. – Vol. 27, № 11. – P. 616–632. DOI: 10.1089/ten.TEC.2021.0173
166. Keratoacanthoma arising after site injection infection of cosmetic collagen filler / S. Brongo, L. S. Moccia, V. Nunziata, F. D'Andrea // *Int J Surg Case Rep*. – 2013. – Vol. 4, № 4. – P. 429–431. DOI: 10.1016/j.ijscr.2013.01.012
167. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients / P. Simon, M. T. Kasimir, G. Seebacher [et al.] // *Eur J Cardiothorac Surg*. – 2003. – Vol. 23, № 6. – P. 1002–1006. DOI: 10.1016/s1010-7940(03)00094-0
168. Matrisome provides a supportive microenvironment for skin functions of diverse species / B. Liu, S. Zhang, W. Wang [et al.] // *ACS Biomater Sci Eng*. – 2020. – Vol. 6, № 10. – P. 5720–5733. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.0c00479
169. The attitudes of religious group leaders towards xenotransplantation: A focus group study / D. J. Hurst, L. A. Padilla, D. K. Cooper [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2022. – Vol. 29, № 5. – P. e12777. DOI: 10.1111/xen.12777
170. Informed consent: cultural and religious issues associated with the use of allogeneic and xenogeneic mesh products / E. D. Jenkins, M. Yip, L. Melman [et al.] // *J Am Coll Surg*. – 2010. – Vol. 210, № 4. – P. 402–410. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2009.12.001
171. Roy, A. Placental tissues as biomaterials in regenerative medicine / A. Roy, M. Mantay, C. Brannan, S. Griffiths // *Biomed Res Int*. – 2022. – Vol. 2022. – P. 6751456. DOI: 10.1155/2022/6751456
172. Davies, J. E. Concise review: Wharton's Jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells / J. E. Davies, J. T. Walker, A. Keating // *Stem Cells Transl Med*. – 2017. – Vol. 6, № 7. – P. 1620–1630. DOI: 10.1002/sctm.16-0492
173. Ferguson, V. L. Bioengineering aspects of the umbilical cord / V. L. Ferguson, R. B. Dodson // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. – 2009. – Vol. 144 (Suppl 1). – P. S108–S113. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2009.02.024

174. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly / K. Sobolewski, E. Bańkowski, L. Chyczewski, S. Jaworski // *Biol Neonate*. – 1997. – Vol. 71, № 1. – P. 11–21. DOI: 10.1159/000244392
175. Type VII collagen gene expression in human umbilical tissue and cells / J. Ryynanen, E. M. L. Tan, J. Hoffren [et al.] // *Lab Investig*. – 1993. – Vol. 69. – P. 300–304.
176. Collagen and glycosaminoglycans of Wharton's jelly and their alterations in EPH-gestosis / E. Bańkowski, K. Sobolewski, L. Romanowicz [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. – 1996. – Vol. 66, № 2. – P. 109–117. DOI: 10.1016/0301-2115(96)02390-1
177. Gogiel, T. Proteoglycans of Wharton's jelly / T. Gogiel, E. Bańkowski, S. Jaworski // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2003. – Vol. 35, № 10. – P. 1461–1469. DOI: 10.1016/s1357-2725(03)00128-6
178. Characterization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoglycans of extracellular matrices of human umbilical cord blood vessels and Wharton's jelly / M. Valiyaveetil, R. N. Achur, A. Muthusamy, D. C. Gowda // *Glycoconj J*. – 2004. – Vol. 21, № 6. – P. 361–375. DOI: 10.1023/B:GLYC.0000046276.77147.b2
179. Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors / K. Sobolewski, A. Małkowski, E. Bańkowski, S. Jaworski // *Placenta*. – 2005. – Vol. 26, № 10. – P. 747–752. DOI: 10.1016/j.placenta.2004.10.008
180. Assessment of biological properties for decellularized human umbilical cord tissue: Biomaterials in regenerative medicine / M. Muthuchamy, K. Subramanian, C. Padhiar [et al.] // *Res J Biotech*. – 2023. – Vol. 18. – P. 81–90. DOI: 10.25303/1807rjbt081090
181. Decellularized human umbilical cord Wharton Jelly scaffold improves tendon regeneration in a rabbit rotator cuff tendon defect model / Z. Yuan, F. Cao, C. Gao [et al.] // *Am J Sports Med*. – 2022. – Vol. 50, № 2. – P. 371–383. DOI: 10.1177/03635465211055722
182. A novel dressing composed of adipose stem cells and decellularized Wharton's Jelly facilitated wound healing and relieved lymphedema by enhancing angiogenesis

and lymphangiogenesis in a rat model / J.-H. Lu, K. Hsia, C.-K. Su [et al.] // J Funct Biomater. – 2023. – Vol. 14, № 2. – P. 104. DOI: 10.3390/jfb14020104

183. A patch comprising human umbilical cord-derived hydrogel and mesenchymal stem cells promotes pressure ulcer wound healing / L. Chen, Y. Ying Zhang, K. Wang [et al.] // Engineered Regeneration. – 2024. – Vol. 5, № 4. – P. 433–442. DOI: 10.1016/j.engreg.2024.10.002

184. Decellularized Wharton jelly matrix: a biomimetic scaffold for ex vivo hematopoietic stem cell culture / D. Li, G. Chiu, B. Lipe [et al.] // Blood Adv. – 2019. – Vol. 3, № 7. – P. 1011–1026. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018019315

185. Acellular Wharton's Jelly, potentials in T-cell subtypes differentiation, activation and proliferation / M. Talebi, H. Nozad Charoudeh, A. A. Movassaghpour Akbari [et al.] // Adv Pharm Bull. – 2020. – Vol. 10, № 4. – P. 617–622. DOI: 10.34172/apb.2020.074

186. Successful 3D culture and transplantation of mouse isolated preantral follicles in hydrogel of bioengineered Wharton's jelly / E. Zand, E. Rajablou, S. F. Siadat [et al.] // PLoS ONE. – 2023. – Vol. 18, № 9. – P. e0290095. DOI: 10.1371/journal.pone.0290095

187. Патент № 2795904 С1 Российская Федерация, МПК А61К 35/51, А61Р 17/02. Способ изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека для создания высокорегенеративного раневого покрытия: № 2022118355: заявл. 05.07.2022: опубл. 15.05.2023 / Л. И. Калюжная-Земляная, Д. В. Товпеко, А. А. Кондратенко [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

188. Определение гидроксипролина в тканях и оценка содержания в них коллагена / Н. Ю. Игнатьева, Н. А. Данилов, С. В. Аверкиев [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2007. – Т. 62, № 1. – С. 59–65.

189. ГОСТ ISO 10993–5–2023. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*. – М. : Российский институт стандартизации, 2023. – 34 с.
190. ГОСТ ISO 10993–12–2023. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Отбор и подготовка образцов для проведения исследований. – М. : Российский институт стандартизации, 2023. – 24 с.
191. ГОСТ ISO 10993–4–2020. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью. – М. : Стандартиформ, 2020. – 65 с.
192. ГОСТ ISO 10993–6–2021. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. – М. : Российский институт стандартизации, 2021. – 34 с.
193. Effective decellularisation of human saphenous veins for biocompatible arterial tissue engineering applications: Bench optimisation and feasibility in vivo testing / N. S. Sulaiman, A. R. Bond, V. D. Bruno [et al.] // J Tissue Eng. – 2021. – Vol. 12. – P. 2041731420987529. DOI: 10.1177/2041731420987529
194. Detection of the residual concentration of sodium dodecyl sulfate in the decellularized whole rabbit kidney extracellular matrix / F. Ghorbani, M. Ekhtiari, B. M. Chaghervand [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2022. – Vol. 23, № 1. – P. 119–128. DOI: 10.1007/s10561-021-09921-z
195. Chakraborty, J. Regulation of decellularized matrix mediated immune response / J. Chakraborty, S. Roy, S. Ghosh // Biomater Sci. – 2020. – Vol. 8, № 5. – P. 1194–1215. DOI: 10.1039/c9bm01780a
196. Residual sodium dodecyl sulfate in decellularized muscle matrices leads to fibroblast activation in vitro and foreign body response in vivo / E. E. Friedrich, S. T. Lanier, S. Niknam-Bienia [et al.] // J Tissue Eng Regen Med. – 2018. – Vol. 12, № 3. – P. 1–12. DOI: 10.1002/term.2604
197. Residual detergent detection method for nondestructive cytocompatibility evaluation of decellularized whole lung scaffolds / B. Zvarova, F. E. Uhl, J. J. Uriarte

- [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2016. – Vol. 22, № 5. – P. 418–428. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0439
198. Hydroxyproline: a potential biochemical marker and its role in the pathogenesis of different diseases / A. K. Srivastava, P. Khare, H. K. Nagar [et al.] // *Curr Protein Pept Sci*. – 2016. – Vol. 17, № 6. – P. 596–602. DOI: 10.2174/1389203717666151201192247
199. Edwards, C. A. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolysate / C. A. Edwards, W. D. O'Brien Jr. // *Clin Chim Acta*. – 1980. – Vol. 104, № 2. – P. 161–167. DOI: 10.1016/0009-8981(80)90192-8
200. An experimental toolbox for characterization of mammalian collagen type I in biological specimens / H. Capella-Monsonís, J. Q. Coentro, V. Graceffa [et al.] // *Nat Protoc*. – 2018. – Vol. 13, № 3. – P. 507–529. DOI: 10.1038/nprot.2017.117
201. Eclectic characterisation of chemically modified cell-derived matrices obtained by metabolic glycoengineering and re-assessment of commonly used methods / S. Keller, A. Liedek, D. Shendi [et al.] // *RSC Adv*. – 2020. – Vol. 10, № 58. – P. 35273–35286. DOI: 10.1039/d0ra06819e
202. Collagen constitutes about 12% in females and 17% in males of the total protein in mice / K. Tarnutzer, D. Siva Sankar, J. Dengjel, C. Y. Ewald // *Sci Rep*. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 4490. DOI: 10.1038/s41598-023-31566-z
203. Etherington, D. J. Detection and estimation of collagen / D. J. Etherington, T. J. Sims // *J Sci Food Agric*. – 1981. – Vol. 32. – P. 539–546. DOI: 10.1002/jsfa.2740320603
204. Essential modification of the Sircol Collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions / R. R. Lareu, D. I. Zeugolis, M. Abu-Rub [et al.] // *Acta Biomater*. – 2010. – Vol. 6, № 8. – P. 3146–3151. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.004
205. Collagen quantification in tissue specimens / J. Q. Coentro, H. Capella-Monsonís, V. Graceffa [et al.] // *Methods Mol Biol*. – 2017. – Vol. 1627. – P. 341–350. DOI: 10.1007/978-1-4939-7113-8_22

206. A role for decorin in cutaneous wound healing and angiogenesis / H. Järveläinen, P. Puolakkainen, S. Pakkanen [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2006. – Vol. 14, № 4. – P. 443–452. DOI: 10.1111/j.1743-6109.2006.00150.x
207. Lumican as a multivalent effector in wound healing / K. Karamanou, G. Perrot, F. X. Maquart, S. Brézillon // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2018. – Vol. 129. – P. 344–351. DOI: 10.1016/j.addr.2018.02.011
208. Wang, Y. Tenascin-C: a key regulator in angiogenesis during wound healing / Y. Wang, G. Wang, H. Liu // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12, № 11. – P. 1689. DOI: 10.3390/biom12111689
209. Investigating the temporal roles of decorin and biglycan in tendon healing / T. P. Leahy, A. K. Fung, S. N. Weiss [et al.] // *J Orthop Res.* – 2023. – Vol. 41, № 10. – P. 2238–2249. DOI: 10.1002/jor.25590
210. Salelles, L. Pepsin activity as a function of pH and digestion time on caseins and egg white proteins under static in vitro conditions / L. Salelles, J. Floury, S. Le Feunteun // *Food Funct.* – 2021. – Vol. 12, № 24. – P. 12468–12478. DOI: 10.1039/d1fo02453a
211. Kihara, M. Temperature and pH dependency of pepsin activity in the gastric juice of farmed Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* / M. Kihara // *Aquaculture Sci.* – 2015. – Vol. 63, № 4. – P. 459–461.
212. Pepsin properties, structure, and its accurate measurement: a narrative review / K. J. Stanforth, M. D. Wilcox, P. I. Chater [et al.] // *Ann Esophagus.* – 2022. – Vol. 5. – P. 31. DOI: 10.21037/aoe-20-95
213. 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. DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-5-61-65
214. Translational research for orthopedic bone graft development / M. J. C. Vilela, B. J. A. Colaço, J. Ventura [et al.] // *Materials (Basel).* – 2021. – Vol. 14, № 15. – P. 4130. DOI: 10.3390/ma14154130

215. Decellularization of Wharton's Jelly increases its bioactivity and antibacterial properties / M. Dubus, L. Scomazzon, J. Chevrier [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 828424. DOI: 10.3389/fbioe.2022.828424
216. FTIR analysis of natural and synthetic collagen / T. Riaz, R. Zeeshan, F. Zarif [et al.] // *Appl Spectrosc Rev.* – 2018. – Vol. 53, № 9. – P. 703–746. DOI: 10.1080/05704928.2018.1426595
217. Kandori, H. Structure/function study of photoreceptive proteins by FTIR spectroscopy / H. Kandori // *Bull Chem Soc Jpn.* – 2020. – Vol. 93, №. 7. – P. 904–926. DOI: 10.1246/bcsj.20200109
218. Kong, J. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures / J. Kong, S. Yu // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2007. – Vol. 39, № 8. – P. 549–559. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x
219. FTIR method for peptide content estimation and degradation kinetic study of Canarium nut protein / I. Nugrahani, R. Oktaviary, S. Ibrahim [et al.] // *Indonesian J Pharm.* – 2020. – Vol. 31, № 2. – P. 78–83. DOI: 10.14499/indonesianjpharm31iss2pp78
220. Li, Y. Comparative analysis of decellularization methods for the production of decellularized umbilical cord matrix / Y. Li, Y. Zhang, G. Zhang // *Curr Issues Mol Biol.* – 2024. – Vol. 46, № 7. – P. 7686–7701. DOI: 10.3390/cimb46070455
221. A silk fibroin/decellularized extract of Wharton's jelly hydrogel intended for cartilage tissue engineering / A. Basiri, M. Farokhi, M. Azami [et al.] // *Prog Biomater.* – 2019. – Vol. 8. – P. 31–42. DOI: 10.1007/s40204-019-0108-7
222. Preparation and characterization of nanocomposite hydrogels based on self-assembling collagen and cellulose nanocrystals / Y. Li, X. Dong, L. Yao [et al.] // *Polymers.* – 2023. – Vol. 15, № 5. – P. 1308. DOI: 10.3390/polym15051308
223. Plepis, A. M. D. G. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen / A. M. D. G. Plepis, G. Goissis, D. K. Das-Gupta // *Polym Eng Sci.* – 1996. – Vol. 36. – P. 2932–2938.

224. Correlations on the structure and properties of collagen hydrogels produced by E-beam crosslinking / M. Demeter, I. Călina, A. Scărișoreanu [et al.] // *Materials* (Basel). – 2022. – Vol. 15, № 21. – P. 7663. DOI: 10.3390/ma15217663
225. Фибробласты как объект изучения пролиферативной активности *in vitro* / В. И. Кузьмичева, Л. Т. Волова, Ф. Н. Гильмиярова [и др.] // *Наука и инновации в медицине*. – 2020. – Т. 5, № 3. – С. 210–215. DOI: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-210-215
226. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease / M. V. Plikus, X. Wang, S. Sinha [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184, № 15. – P. 3852–3872. DOI: 10.1016/j.cell.2021.06.024
227. Stem cells: past, present, and future / W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, Z. Rybak // *Stem Cell Res Ther*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 68. DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5
228. Multipotent fetal stem cells in reproductive biology research / M. Rosner, S. Horer, M. Feichtinger, M. Hengstschläger // *Stem Cell Res Ther*. – 2023. – Vol. 14, № 1. – P. 157. DOI: 10.1186/s13287-023-03379-4
229. Гемолитическая активность и сорбционная способность наночастиц цеолита Beta / Н. Ю. Ульянова, Л. Н. Куриленко, О. В. Шамова [и др.] // *Физика и химия стекла*. – 2020. – Т. 26, № 2. – С. 174–183. DOI: 10.31857/S0132665120020110
230. Blood-contacting biomaterials: *in vitro* evaluation of the hemocompatibility / M. Weber, H. Steinle, S. Golombek [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2018. – Vol. 6. – P. 99. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00099
231. Biocompatibility testing for implants: A novel tool for selection and characterization / W. Al-Zyoud, D. Haddadin, S. A. Hasan [et al.] // *Materials* (Basel). – 2023. – Vol. 16, № 21. – P. 6881. DOI: 10.3390/ma16216881
232. ASTM F756-17. Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials. – West Conshohocken : ASTM International, 2017. – 6 p. DOI: 10.1520/F0756-17

ПРИЛОЖЕНИЕ А**(справочное)****Лабораторный регламент на производство тканеинженерных продуктов
из Вартонова студня пуповины человека**

Министерство обороны Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ВОЕННОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЕННО-МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С.М. КИРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ОБОРОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ВМедА)

Экз. №

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника академии
по научной работе

доктор медицинских наук профессор

Е.В. Ивченко



2024 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство тканеинженерных продуктов из Вартонова студня

пуповины человека

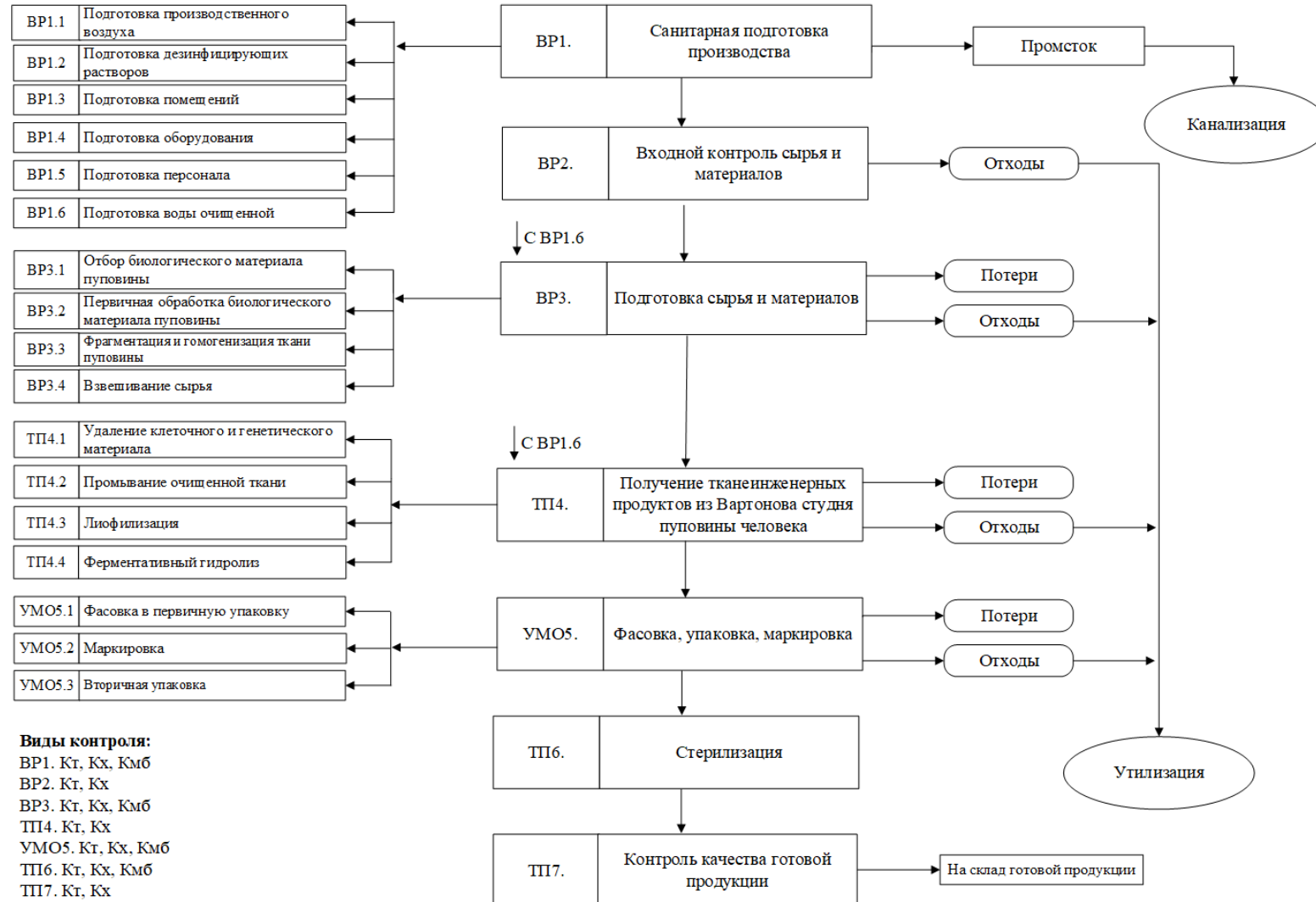
ЛР. 00011.02–2024

Срок действия регламента до «30» января 2026 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(рекомендуемое)

Технологическая схема производства тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека (проект)



ИЗЛОЖЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

BP1. Санитарная подготовка производства

BP1.1 Подготовка производственного воздуха

Для подготовки производственного воздуха используют трехступенчатую очистку:

- фильтр I ступени очистки G4 (эффективность $\leq 90\%$ по весовому методу, падение давления 132 Па);
- фильтр II ступени очистки F7 (эффективность $\geq 90\%$ по оптическому методу, падение давления 183 Па);
- фильтр III ступени очистки H13 (эффективность H13 $\leq 99,99\%$ DOP, падение давления 329 Па).

Допускается максимальное содержание микроорганизмов в 1 м³ воздуха – не более 500 микроорганизмов (Кмб BP 1.1-1).

BP1.2 Подготовка дезинфицирующих растворов

Для обеспечения эффективности и безопасности дезинфекции растворы антисептиков готовят непосредственно перед использованием в специально предназначенном помещении. Во избежание развития устойчивости микроорганизмов к действующим веществам рекомендуется регулярно менять используемые дезинфицирующие средства.

Подготовка растворов осуществляется в чистой посуде, изготовленной из стекла или эмалированных материалов. Каждая емкость с готовым раствором маркируется этикеткой для идентификации содержимого. Чтобы предотвратить размножение микроорганизмов, дезинфицирующий раствор необходимо хранить в герметично закрытой таре. В частично использованную емкость запрещено добавлять свежеприготовленный раствор.

Использование дезинфицирующих растворов должно осуществляться строго в соответствии с их назначением, при этом обязательно применение средств индивидуальной защиты (резиновые перчатки, фартук из прорезиненной

ткани, защитные очки и респиратор). Важно соблюдать установленное время экспозиции для обеспечения эффективности обработки.

При приготовлении дезинфицирующих растворов необходимо тщательно контролировать количество добавляемых ингредиентов, руководствуясь нормативными требованиями (Кх ВР 1.2-1).

ВР1.3 Подготовка помещений

Подготовка производственных помещений к работе включает комплекс мероприятий, направленный на достижение соответствующего класса чистоты помещений, который состоит из:

- сухой и влажной уборки;
- дезинфекции;
- ультрафиолетовой обработки.

Уборку и дезинфекцию проводят в специально предназначенных для этого резиновых перчатках и фартуке, при необходимости – в респираторе. Для протирки стен рекомендуется применять поролоновые губки или салфетки из капроновых или хлопчатобумажных тканей, для обработки полов – салфетки с заделанными краями из суровых или синтетических тканей. Уборочный инвентарь и материал необходимо маркировать, хранить в специальном помещении и использовать строго по назначению. После уборки необходимо произвести визуальный контроль (Кт ВР 1.3-1).

Подготовка помещений должна обеспечивать в помещениях класса чистоты Д в процессе производства:

- наличие не более 10 КОЕ неспорообразующих микроорганизмов на поверхностях помещений (Кмб ВР 1.3-2).

ВР1.4 Подготовка оборудования

Мойку и стерилизацию съемных частей, а также обработку внутренних и наружных частей (поверхностей) оборудования проводят с использованием моющих и дезинфицирующих средств до и после проведения технологического процесса в соответствии с инструкциями.

Все материалы и инвентарь, предназначенные для подготовки оборудования, должны быть маркированы, храниться в специально отведенном помещении и применяться исключительно по назначению.

Основные принципы проведения очистки и обработки оборудования:

- предварительно оборудование очищается от остатков полупродукта (продукта);
- с оборудования снимаются съемные детали и части;
- оборудование и съемные части промываются горячей водой очищенной до отсутствия продукта в смывных водах;
- оборудование промывается приготовленным дезинфицирующим раствором с последующей выдержкой в течение установленного времени экспозиции;
- оборудование и съемные части промываются водой очищенной для удаления следов дезинфицирующего раствора и моющего средства.

После обработки оборудования дезинфицирующими средствами необходимо проводить контроль качества подготовки оборудования к работе в соответствии с инструкциями.

Подготовка оборудования должна обеспечивать в помещениях класса чистоты Д в процессе производства:

- наличие не более 10 КОЕ неспорообразующих микроорганизмов на поверхностях оборудования, тары и инвентаря (Кмб ВР 1.4-1);
- отсутствие следов предыдущего препарата (Кх ВР 1.4-2).

Проведение технологического процесса допускается проводить только на чистом и сухом оборудовании (Кт ВР 1.4-3).

ВР1.5 Подготовка персонала

В подготовку персонала входит:

- допуск по результатам медосмотра персонала к работе;
- обучение персонала правилам личной гигиены и поведения в производственных помещениях;

– выполнение персоналом инструкций, описывающих порядок соблюдения правил личной гигиены и поведения в производственных помещениях, порядок смены спецодежды и обработки рук.

Спецодежда персонала должна быть промаркированная, чистая, без повреждений. Комплект переходной спецодежды используется в санитарно-бытовых помещениях и подлежит замене при появлении загрязнений, но не более чем после пяти рабочих смен. Комплект технологической спецодежды применяется в производственных зонах и подлежит замене при появлении загрязнений, но не более чем после трех рабочих смен.

Подготовка персонала и технологической одежды должна обеспечивать в помещениях класса чистоты Д в процессе производства:

– наличие не более 10 КОЕ неспорообразующих микроорганизмов на технологической одежде и руках персонала (Кмб ВР 1.5-1).

ВР1.6 Подготовка воды очищенной

Вода очищенная должна соответствовать требованиям ФС-42-2619-97 (Кх ВР 1.6-1).

Система получения, хранения и распределения воды очищенной включает в себя:

– полуавтоматический самопромывной фильтр для очистки воды от механических примесей;

– автоматический фильтр для удаления из воды избыточного железа;

– автоматический фильтр дехлорирования воды;

– автоматический фильтр умягчения воды;

– установку ультрафиолетовой обработки воды;

– станцию дозирования щелочи;

– двухступенчатую установку обратного осмоса;

– петлю хранения и распределения воды очищенной, состоящую из накопительной емкости с системой автоматического поддержания уровня жидкости, насосной станции, дезинфицирующей ультрафиолетовой лампы и трубопровода петли распределения воды очищенной.

ВР2. Входной контроль сырья и материалов

Непосредственно перед началом технологических процессов производства сырье и материалы проходят входной контроль по параметрам (требованиям) и методам, установленным в научно-технической документации на контролируемую продукцию.

ВР3. Подготовка сырья и материалов

ВР3.1 Отбор биологического материала пуповины

Исходным сырьем для производства тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека является биологический материал пуповины человека, полученный от здоровых доношенных новорожденных после естественных родов. Забор материала проводится только после информированного добровольного согласия матерей. Все пациентки должны проходить комплексное лабораторное обследование для исключения инфекционных заболеваний, включая гепатиты А и В, вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирусную инфекцию и сифилис. Изъятие и транспортировку биологического материала пуповины человека проводят в двойном стерильном (одноразовом) контейнере, содержащем физиологический раствор. Хранение биологического материала осуществляют при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для обеспечения его стабильности до начала исследования. Последующее оттаивание проходит в течение (4 ± 1) ч при комнатной температуре.

ВР3.2 Первичная обработка биологического материала пуповины

Первичная обработка биологического материала пуповины человека включает механическое удаление кровеносных сосудов (вены и артерий) с использованием хирургических инструментов, обработку 6%-ным раствором перекиси водорода и последующее промывание водой очищенной для удаления остатков компонентов крови.

ВР3.3 Фрагментация и гомогенизация ткани пуповины

После первичной обработки ткань пуповины механически фрагментируют и гомогенизируют.

ВР3.4 Взвешивание сырья

Материал предварительно лиофилизируют, взвешивают на стерильных откалиброванных весах, а полученные данные фиксируют в протоколе с указанием идентификатора образца. Этот этап обеспечивает точный учет и контроль массы сырья, что необходимо для стандартизации процесса и получения качественного продукта.

ТП4. Получение тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека

ТП4.1 Удаления клеточного и генетического материала

Удаление клеточного и генетического материала в образцах ткани пуповины человека осуществляют детергентным способом. Образцы ткани пуповины помещают в предварительно подготовленный стерильный раствор додецилсульфата натрия в концентрации 0,01% и подвергают обработке им в течение 24 ч при комнатной температуре и скорости вращения 180 об/мин в шейкере-инкубаторе. По окончании процесса переходят к следующему этапу.

ТП4.2 Промывание очищенной ткани

После завершения процесса децеллюляризации выполняют многократное промывание ткани пуповины водой очищенной и фосфатным буферным раствором ($\text{pH } 7,4 \pm 0,2$) с целью удаления остатков детергента и клеточного дебриса.

ТП4.3 Лиофилизация

Полученный материал высушивают в течение 24 ч в лиофильной установке.

ТП4.4 Ферментативный гидролиз

Для получения гидролизата Вартонова студня пуповина человека лиофилизированный материал, полученный согласно п. ТП4.3, подвергают ферментативному гидролизу. Процесс проводят с использованием солянокислого раствора пепсина в концентрации 1 мг фермента на 1 мл 0,01 N HCl ($\text{pH } 1,8 \pm 0,2$). Соотношение матрикса к раствору составляет 10:1. Гидролиз осуществляют в течение 72 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании со скоростью вращения 180 об/мин. Затем полученный гидролизат нейтрализуют

добавлением 0,1 N раствором NaOH и 10-кратным фосфатным буферным раствором до достижения pH $7,4 \pm 0,2$. Перед нейтрализацией раствор NaOH и фосфатный буферный раствор охлаждают на льду в течение 15 мин. Контроль водородного показателя осуществляют с помощью pH-метра.

Полученный материал высушивают согласно ТП4.3.

УМО5. Фасовка, упаковка, маркировка

Стадия включает в себя:

- УМО5.1 Фасовка в первичную упаковку;
- УМО5.2 Маркировка;
- УМО5.3 Вторичная упаковка.

Упакованную нестерильную продукцию проверяют на исходное микробное загрязнение перед процессом стерилизации.

ТП6. Стерилизация

Упакованную продукцию подвергают стерилизации на радиационной установке при 25 кГр.

ТП7. Контроль качества готовой продукции

После стерилизации на транспортную тару наносят стикер «Стерильно». Готовую продукцию подвергают приемо-сдаточным испытаниям согласно установленным показателям качества.

После завершения всех этапов готовая продукция направляется на склад для хранения до момента использования или реализации.

ПРИЛОЖЕНИЕ В**(справочное)****Акт внедрения результатов диссертационного исследования в работу научных и клинических подразделений**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника

Военно-медицинской академии

имени С.М.Кирова

по научной работе

Е.Ивченко

2025 г.

А К Т

внедрения результатов диссертационной работы
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Товпеко Д.В. «Разработка и исследование компонентного состава
тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека для
регенеративной медицины»

Проблемная комиссия № 6, созданная приказом начальника Военно-медицинской академии от 25 декабря 2023 года № 691, в составе:

председателя – Цыгана Василия Николаевича, заведующего кафедрой патологической физиологии;

членов комиссии: Чирского Вадима Семеновича, заведующего кафедрой патологической анатомии, Одинцовой Ирины Алексеевны, заведующей кафедрой гистологии с курсом эмбриологии.

составила настоящий акт на предмет проверки в период с 19 по 21 мая 2025 года внедрения результатов диссертационного исследования Товпеко Дмитрия Викторовича «Разработка и исследование компонентного состава тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека для регенеративной медицины» на соискание ученой степени кандидата биологических наук в работу подразделений Военно-медицинской академии имени С.М.Кирова.

Проблемная комиссия установила: технология получения тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека с использованием детергентного метода децеллюляризации внедрена в работу научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии имени С.М.Кирова. Использование тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека внедрено в клиническую практику кафедр (клиник) военной травматологии и ортопедии имени Г.И. Турнера и терапии усовершенствования врачей № 1 имени академика Н.С. Молчанова Военно-медицинской академии имени С.М.Кирова.

Выводы:

1. Внедрение результатов диссертационного исследования обеспечивает получение тканеинженерных продуктов из Вартонова студня

пуповины человека, пригодных для использования в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

2. Применение тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека как самостоятельно, так и в качестве дополнительного компонента к существующим подходам восстановления глубоких и обширных дефектов кожи и мягких тканей способствует ускорению репаративных процессов, снижает риск развития осложнений и способствует улучшению функциональных и эстетических результатов лечения, что положительно влияет на качество жизни пациентов.

3. Опыт апробации результатов диссертационной работы подтвердил их научную и практическую значимость, что обосновывает целесообразность интеграции полученных данных в учебный процесс биологических и медицинских факультетов, в исследовательскую деятельность научных центров, специализирующихся в области тканевой инженерии и регенеративной медицины, и клиническую практику лечебных учреждений.

Председатель
комиссии:

заведующий кафедрой патологической
физиологии, доктор медицинских
наук, профессор, заслуженный деятель
науки РФ

Цыган В.Н.

Члены комиссии:

заведующий кафедрой патологической
анатомии, доктор медицинских наук,
профессор

Чирский В.С.

заведующая кафедрой гистологии с
курсом эмбриологии, доктор
медицинских наук, профессор

Одинцова И.А.

Подпись
Врио начальника отдела кадров
Военно-медицинской академии
капитан

И.Климов

« ____ » 11.10.2025 20 ____ г.



ПРИЛОЖЕНИЕ Г**(справочное)****Акт внедрения результатов диссертационного исследования
в учебный процесс**

УТВЕРЖДАЮ

Директор Медицинского института
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Санкт-Петербургский
государственный университет»



А.М. Сарана

2025 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертации Товпеко Дмитрия Викторовича в учебный процесс кафедры патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Товпеко Дмитрия Викторовича на тему: «Разработка и исследование компонентного состава тканеинженерных продуктов из Вартонова студия пуповины человека для регенеративной медицины» по специальностям: 1.5.6. – Биотехнологии, выполненной на соискание ученой степени кандидата биологических наук внедрены в учебный процесс кафедры физиологии при изучении дисциплины 0022824 «Учение о регенерации».

Опыт использования результатов диссертационной работы показал целесообразность и необходимость их внедрения в учебный процесс и практику медицинских и биологических факультетов высших учебных заведений различных регионов России.

д.п.н., профессор
Медицинского
института ФГБОУ ВО
СПбГУ

Балахонов А.В.



Подпись руки Балахонов
Алексей Викторович

ДОСТОВЕРЯЮ

Подпись руки Крюков
М.И.

« 19 » мая 2025 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

(справочное)

Патент на изобретение № 2795904 «Способ изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека для создания высокорегенеративного раневого покрытия»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2795904

**СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БЕСКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ СОЗДАНИЯ
ВЫСОКОРЕГЕНЕРАТИВНОГО РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования "Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова" Министерства обороны Российской Федерации (ВМедА) (RU)*

Авторы: *Калюжная-Земляная Лидия Ивановна (RU), Товпеко Дмитрий Викторович (RU), Кондратенко Альбина Александровна (RU), Земляной Дмитрий Алексеевич (RU), Чернов Владимир Евгеньевич (RU), Чеботарев Сергей Валерьевич (RU), Волов Даниил Александрович (RU)*

Заявка № 2022118355

Приоритет изобретения **05 июля 2022 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **15 мая 2023 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **05 июля 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



ПРИЛОЖЕНИЕ Е

(справочное)

**Патент на изобретение № 2816034 «Способ применения бесклеточного
лиофилизированного продукта из пуповины человека для заживления ран»**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2816034**СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ БЕСКЛЕТОЧНОГО
ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПРОДУКТА ИЗ ПУПОВИНЫ
ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования "Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова" Министерства обороны Российской Федерации (ВМедА) (RU)*

Авторы: *ХОМИНЕЦ Владимир Васильевич (RU), КАЛЮЖНАЯ-ЗЕМЛЯНАЯ Лидия Ивановна (RU), КОНДРАТЕНКО Альбина Александровна (RU), ТОВПЕКО Дмитрий Викторович (RU), ЗЕМЛЯНОЙ Дмитрий Алексеевич (RU), ВОЛОВ Даниил Александрович (RU), ЧЕБОТАРЕВ Сергей Валерьевич (RU)*

Заявка № 2023115498

Приоритет изобретения **14 июня 2023 г.**Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **25 марта 2024 г.**Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **14 июня 2043 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Ю.С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

(справочное)

Статистическая оценка качества децеллюляризации, а также структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека

Таблица Ж.1 – Статистические данные по оценке качества децеллюляризации, а также структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека

Показатели	Дезоксирибонуклеиновая кислота, нг/мг	Додецилсульфат натрия, пг/мг	Гидроксипролин, мкг/мг	Общий коллаген по гидроксипролину (10%), мкг/мг	Общий коллаген по гидроксипролину (13,5%), мкг/мг	Общий коллаген по гидроксипролину (18%), мкг/мг	Растворимый коллаген, мкг/мг	Нерастворимый коллаген, мкг/мг	Общий коллаген, мкг/мг	Гиалурионовая кислота, мкг/мг	Сульфатированные гликозаминогликаны, мкг/мг	Степень пористости, %	Соотношение Амид III/A1450	Δv , см ⁻¹
Нативная пуповина														
M	548,2	–	50,3	503,2	372,7	279,6	1,6	520,8	522,4	13,1	19,3	–	1,07	87,09
SD	89,7		5,0	50,3	37,3	28,0	1,0	94,2	94,1	2,1	2,7		0,02	3,15
Min	412,8		44,1	440,6	326,3	244,8	0,5	395,0	396,6	10,9	16,1		1,03	83,90
Max	683,2		57,1	570,7	422,7	317,1	3,5	630,5	630,9	17,2	23,7		1,11	92,58
Me	547,2		49,9	498,6	369,3	277,0	1,5	533,8	534,8	12,3	19,3		1,07	85,83
Lower	475,0		45,8	458,1	339,3	254,5	0,6	425,7	426,2	11,5	16,2		1,06	84,87
Upper	612,5		56,4	564,1	417,9	313,4	2,1	611,9	614,1	14,4	21,5		1,08	87,76
Матрикс после децеллюляризации														
0,01% SDS														
M	35,3	7,5	74,8	747,7	553,8	415,4	10,6	711,1	721,7	15,5	26,7	97,6	1,09	87,79
SD	3,8	1,0	2,4	24,5	18,2	13,6	4,9	65,2	66,7	3,7	1,7	0,5	0,03	5,24
Min	29,3	5,6	71,8	718,1	531,9	398,9	5,3	601,7	610,3	11,0	24,2	96,9	1,04	81,37
Max	42,2	8,9	79,3	792,6	587,1	440,3	18,8	789,1	795,8	22,1	29,6	98,3	1,13	96,44
Me	35,4	7,5	74,4	743,5	550,7	413,1	9,5	718,7	731,5	15,7	26,8	97,8	1,08	85,83
Lower	33,0	7,0	72,9	728,9	539,9	404,9	6,1	651,9	657,2	12,2	25,6	97,2	1,06	84,87
Upper	37,2	8,3	76,1	761,5	564,1	423,1	15,2	765,8	777,0	18,3	27,9	97,9	1,11	92,58

Продолжение таблицы Ж.1

Показатели	Дезоксирибонуклеиновая кислота, нг/мг	Додецилсульфат натрия, пг/мг	Гидроксипролин, мкг/мг	Общий коллаген по гидроксипролину (10%), мкг/мг	Общий коллаген по гидроксипролину (13,5%), мкг/мг	Общий коллаген по гидроксипролину (18%), мкг/мг	Растворимый коллаген, мкг/мг	Нерастворимый коллаген, мкг/мг	Общий коллаген, мкг/мг	Гиалуроновая кислота, мкг/мг	Сульфатированные гликозаминогликаны, мкг/мг	Степень пористости, %	Соотношение Амид III/A1450	Δν, см ⁻¹
0,03% SDS														
M	27,5	13,6	73,5	734,4	544,0	408,0	6,5	684,4	690,9	14,6	24,9	—	—	
SD	1,3	2,0	3,9	38,6	28,6	21,4	2,2	57,2	56,6	1,6	1,0			
Min	25,6	10,6	68,9	688,8	510,2	382,7	3,3	581,2	591,4	12,3	23,0			
Max	29,4	17,3	79,7	796,7	590,1	442,6	10,2	797,2	803,6	16,7	25,9			
Me	27,3	13,7	73,3	732,7	542,7	407,1	6,0	683,1	691,0	14,5	25,2			
Lower	26,7	12,4	69,7	697,1	516,4	387,3	5,4	648,8	652,1	13,0	24,5			
Upper	28,8	14,5	76,9	768,8	569,5	427,1	7,8	713,9	721,7	16,4	25,6			
0,05% SDS														
M	17,5	29,5	72,2	721,6	534,5	400,9	2,5	639,1	641,5	12,9	21,9	—	—	
SD	1,3	2,4	2,8	27,6	20,4	15,3	0,9	56,6	56,8	1,9	1,8			
Min	15,0	25,1	68,8	687,9	509,6	382,2	1,1	564,8	567,1	10,3	18,6			
Max	19,4	32,4	76,6	765,6	567,1	425,3	3,7	744,1	746,9	15,7	24,3			
Me	17,8	29,8	71,7	716,3	530,6	398,0	2,6	627,6	629,0	12,7	22,2			
Lower	16,3	28,8	69,9	699,3	518,0	388,5	1,8	600,2	603,2	11,4	20,7			
Upper	18,3	31,3	74,8	748,1	554,1	415,6	3,0	688,8	692,5	14,7	23,2			
Гидролизат														
M	—											90,8	1,17	92,20
SD												1,3	0,03	3,31
Min												88,8	1,13	84,87
Max												93,0	1,20	96,44
Me												90,3	1,18	92,10
Lower												90,0	1,13	90,65
Upper												92,1	1,19	95,47

Примечание: М – среднее, SD – стандартное отклонение, Min – минимальное значение, Max – максимальное значение, Me – медиана, Lower – нижний квартиль, Upper – верхний квартиль, SDS – додецилсульфат натрия