

DOI: 10.15825/1995-1191-2023-1-113-122

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ФОРМ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ МАТРИКСОВ ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

А.А. Кондратенко, Л.И. Калюжная, Д.В. Товпеко, В.С. Шевелева, Р.И. Глушаков
ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Применение тканеинженерных продуктов (ТИП) из внеклеточного матрикса децеллюляризованных тканей и органов для лечения глубоких повреждений кожи является одним из методов тканевой инженерии, способствующих регенеративному типу заживления. Бесклеточные препараты воспроизводят иерархическую сложность тканей, имитируют структурные, биохимические и механические сигналы, необходимые для привлечения клеток, а также являются источником биологически активных молекул. Биоматериал пуповины человека имеет фетальный фенотип при внеэмбриональном происхождении, а потому доступен и не имеет этических ограничений при его использовании. В лаборатории тканевой инженерии научно-исследовательского центра Военно-медицинской академии был разработан и запатентован ТИП из высокорегенеративной пуповины человека в форме матрикса и гидрогелевого матрикса. Для изучения регенеративного потенциала гидрофиллизаты тканеинженерных твердотельного и гидрогелевого матриксов были имплантированы в области полнослойных кожных ран мини-свиньи *in vivo*. Были проанализированы внешние признаки воспалительной реакции и гистологические снимки биоптатов из зон имплантации лиофилизатов. Исследовано влияние «кондиционированных» лиофилизатами обоих матриксов питательных сред на жизнеспособность и миграционную активность клеток фибробластоподобной морфологии, выделенных из кожи мини-свиньи. Лиофилизаты матриксов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показали хорошую биосовместимость и биологическую активность. Имплантация образцов способствовала более быстрому образованию зрелого эпидермиса по сравнению с контролем.

Ключевые слова: тканевая инженерия, твердотельный матрикс, гидрогелевый матрикс, пуповина человека, полнослойная кожная рана.

BIOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN UMBILICAL CORD-DERIVED LYOPHILIZED TISSUE-ENGINEERED MATRICES

A.A. Kondratenko, L.I. Kalyuzhnaya, D.V. Tovpeko, V.S. Sheveleva, R.I. Glushakov
Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

The use of tissue-engineered products (TEP) from decellularized extracellular matrix (dECM) to treat deep skin lesions is a tissue engineering method that promotes regenerative healing. Cell-free preparations reproduce the hierarchical complexity of tissues, mimic structural, biochemical and mechanical signals that are necessary to attract cells, and are a source of bioactive molecules. The human umbilical cord biomaterial has a fetal phenotype with extra-embryonic origin, and therefore is available and has no ethical limitations in its use. The tissue engineering laboratory at Kirov Military Medical Academy developed and patented a TEP from the highly regenerative human umbilical cord in the form of matrix and hydrogel matrix. To study its regenerative potential, lyophilisates of tissue-engineered solid-state and hydrogel matrices were implanted around mini pig full-thickness wounds *in vivo*. The external signs of inflammatory response and the histological images of biopsy specimens from the lyophilizate implantation areas were analyzed. The effect of nutrient media, «conditioned» with lyophilisates of both matrices, on the viability and migration activity of fibroblast-like cells, isolated from

Для корреспонденции: Кондратенко Альбина Александровна. Адрес: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6. Тел. (812) 292-32-63. E-mail: kondraa24@gmail.com

Corresponding author: Albina Kondratenko. Address: 6, Akademika Lebedeva str., St. Petersburg, 194044, Russian Federation. Phone: (812) 292-32-63. E-mail: kondraa24@gmail.com

этилового спирта дермопанчем DMP08 диаметром 8 мм (Sterylab, Италия) пятикратно с интервалом 7 суток наносили по два полнослойных кожных дефекта глубиной 1 см. В опытные раны помещали 0,01 г лиофилизата тканеинженерного твердотельного матрикса. Наблюдение за поведением животного, местные кожные реакции регистрировали ежедневно в течение всего эксперимента с фотографированием ран с масштабной линейкой в кадре для калибровки.

Спустя 35 суток забирали биопсию со всех опытных и контрольных ран. Далее спустя две недели эксперимент повторяли, но в раны вносили лиофилизат тканеинженерного гидрогелевого матрикса (0,01 г). Извлечение биоптатов и фотографирование ран проводили в аналогичные сроки. Биопсийный материал фиксировали в нейтральном формалине в течение 24 часов, заливали в парафин и изготавливали гистологические срезы, которые окрашивали по Ван-Гизону и по Гейденгайну («Биовитрум», Россия) по инструкциям производителя. Препараты анализировали с помощью микроскопа Axio Imager 2M (Carl Zeiss, Германия).

Гистологическую оценку острого воспаления (ГООВ) проводили на сроках 1 и 2 недели по шкале от 0 до 15. Были оценены следующие критерии воспаления: количество нейтрофильной клеточной инфильтрации в дерме (0–3 балла); количество нейтрофильной клеточной инфильтрации в гиподерме (0–3 балла); отек (0–3 балла); кровотечение (0–3 балла); некроз (0–3 балла). Критерии, используемые для определения количества клеточных инфильтратов, были следующими: 0 – в нормальных гистологических пределах; 1 – рассеянный; 2 – сгруппированные или узловые; 3 – диффузный. Гистологическая оценка отека: 0 – нет; 1 – фокальный; 2 – локальный; 3 – диффузный. Степень кровоизлияния: 0 – нет; 1 – мягкий; 2 – умеренный; 3 – тяжелый. Объем некрозов: 0 – нет; 1 – фокальный; 2 – узловый/региональный; 3 – диффузный [2].

Подсчет количественных данных проводили в программе ImageJ. Определяли относительную площадь раневого дефекта, относительную площадь сосудистого русла, средний диаметр сосудов и толщину эпителия. Для подсчета каждого морфометрического показателя исследовали по 5 полей зрения в каждом срезе, общее количество измерений – 10.

Выделение и масштабирование клеток кожи мини-свиньи фибробластоподобной морфологии

Фрагменты кожи, извлеченные для производства полнослойных кожных ран, после удаления слоя жира трижды промывали физиологическим раствором с антибиотиками (пенициллин, стрептомицин для культур клеток, «БиолоТ», Россия). Далее кожные

фрагменты измельчали стерильными ножницами, помещали в культуральные флаконы 25 см² (Thermo scientific, США) и добавляли по 5 мл питательной среды (культуральная среда DMEM («БиолоТ», Россия), 10% фетальной сыворотки теленка (HyClone, США), гентамицина для культур клеток 100 ЕД/мл («БиолоТ», Россия). После получения первичную смешанную популяцию клеток фибробластоподобной морфологии вели с пересевами каждые 7 суток с разведением 1 : 5 в культуральных флаконах 25 см². Клеточный материал открепляли от пластика раствором Трипсина-Версена 0,02% («БиолоТ», Россия) в соотношении 1 : 3 при температуре 37 °С в течение 5–7 минут. После инактивации трипсина питательной средой с фетальной бычьей сывороткой клеточный материал осаждали центрифугированием при 3500 об./мин в течение 5 минут. Дважды отмывали питательной средой при тех же условиях. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали, производили подсчет клеток в камере Горяева по общепринятой методике.

Оценка влияния лиофилизированных ТИП на метаболическую активность клеток кожи мини-свиньи

Клетки кожи мини-свиньи фибробластоподобной морфологии 4-го пассажа культивировали в 96-луночных планшетах (Sigma-Aldrich, США) по 150 мкл в концентрациях 13 тыс. клеток на 1 лунку. Для исследования влияния лиофилизатов обоих матриксов на жизнеспособность клеток использовали «кондиционированные» питательные среды, полученные посредством прединкубации в питательной среде вышеуказанного состава исследуемых образцов ТИП (1 мг/мл 24 часа при 4 °С для сохранения стерильности). Исследование цитотоксичности направлено главным образом на изучение действия растворимых веществ, содержащихся в ТИП, включая использованный для децеллюляризации додецилсульфат натрия. В выборе концентрации 1 мг/мл руководствовались предполагаемым количеством и способом клинического применения ТИП.

Через сутки после адгезии клеток к поверхности культурального пластика производили замену исходной среды на «кондиционированные» среды, а в контрольных лунках на стандартную культуральную среду (n = 32). Планшет инкубировали еще сутки при 37 °С в 5% CO₂. Затем вносили в каждую лунку раствор красителя резазурина («Биокомпас-С», Россия) с конечной концентрацией в лунке 11,2 мкмоль/мл в объеме, равном 10% от общего объема культуральной жидкости. Краситель резазурин перед внесением в лунку растворяли в фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 («БиолоТ», Россия). Через 4 часа инкубации и встряхивания (2 мин, 37 °С) на орбитальном шейкере (Biosan, Латвия) измеряли уровень флуоресценции

на микропланшетном ридере Victor X5 (Perkin Elmer, США) при длине волны 590 нм с использованием длины волны возбуждения 560 нм. Результаты выражали в процентах относительно контроля.

Оценка миграционной активности клеток кожи мини-свиньи

Клетки кожи мини-свиньи фибробластоподобной морфологии 4-го пассажа культивировали в 12-луночных планшетах (Sigma-Aldrich, США) по 500 мкл в концентрациях 45 тыс. клеток на 1 лунку. Для исследования влияния образцов лиофилизатов матриксов на пролиферативную активность клеток после достижения 80–90% конфлюэнтности стерильным наконечником пипетки наносили «царапину» для повреждения монослоя клеток. Далее в опытные лунки помещали по 0,5 мг лиофилизированных форм ТИП и продолжали культивирование ($n = 4$). Спустя сутки в каждую лунку вносили раствор красителя кальцеина («Ленреактив», Россия) в концентрации 1 : 3000 в фосфатно-солевом буфере («БиолоТ», Россия) и инкубировали 30 мин в CO_2 -инкубаторе. После двукратного промывания фосфатно-солевым буфером регистрацию изображения проводили на микроскопе Zeiss LSM-880 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 494 нм и регистрацией 517 нм. Определяли относительную остаточную площадь дефекта монослоя клеток.

Статистическую обработку количественных данных проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми на уровне $p < 0,05$ (Statistics 7.0). Количественные данные представлены в виде медианы, 25% и 75% квартилей (Me, Q1; Q3).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Лиофилизированный тканеинженерный твердотельный матрикс из пуповины человека (рис. 1, а) –

это лекарственная форма пористой массы, готовая к употреблению. Матрикс не содержит ядер клеток исходного биоматериала, состоит из коллагена, сохраняет в своем составе гликозаминогликаны (ГАГ) и важнейшие компоненты базальных мембран. После децеллюляризации Вартонова студня пуповины волокна коллагена сохраняют структурную трехмерную организацию [7, 8]. Тканеинженерный гидрогелевый матрикс – продукт ферментативной обработки матрикса (пепсином), содержит пептиды, ГАГ и свободные факторы роста, прежде фиксированные в структурах тканеинженерного матрикса. Гидрогелевая форма матрикса обладает способностью к полимеризации и гелеобразованию при физиологических условиях *in vivo* и *in vitro*. Тканеинженерный гидрогелевый матрикс является инъекционной лекарственной формой, показавшей эффективность в заживлении глубоких моделированных дефектов синовиального внутрисуставного хряща [9]. Однако гидрогелевый матрикс в лиофилизированной форме для лечения глубоких повреждений кожи представляется наиболее удобным. Лиофилизированная форма гидрогелевого матрикса может быть использована без необходимости предварительной подготовки. Сухая форма очень гигроскопична и активно поглощает раневой экссудат (неопубликованные данные). При необходимости продукт может быть регидратирован в инъекционный гидрогелевый матрикс. Лиофилизированный тканеинженерный гидрогелевый матрикс, подобно лиофилизированному тканеинженерному твердотельному матриксу, имеет гетеропористую структуру (рис. 1, б).

Имплантиция обоих образцов лиофилизатов не приводила к возникновению внешних признаков развития воспалительной реакции, таких как отек, гиперемия и повышение температуры в месте имплантации. По мере заживления площадь ран постепенно уменьшалась. Спустя 3 недели в контроле

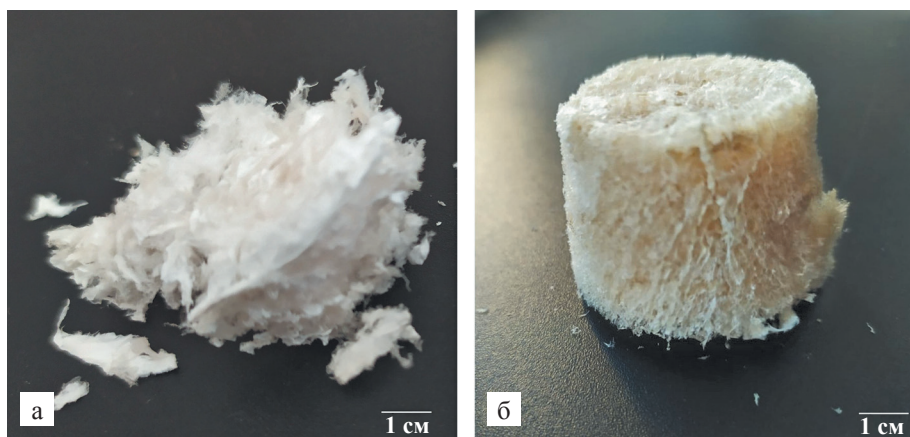


Рис. 1. Лиофилизированные тканеинженерные твердотельный (а) и гидрогелевый (б) матриксы

Fig. 1. Lyophilized tissue-engineered solid-state (a) and hydrogel (б) matrices

площадь раны составила 60,74% от изначальной площади дефекта; рана, содержащая лиофилизат твердотельного матрикса, составляла уже 58,89%, и рана, обработанная лиофилизатом гидрогелевого матрикса, – 55,02%. Через 4 и 5 недель результаты планиметрии были, соответственно, следующими: 53,98 и 48,05% в контроле; 51,08 и 30,34% в присутствии лиофилизата твердотельного матрикса; 50,27 и 42,69% при обработке лиофилизатом гидрогелевого матрикса.

Анализ гистологических препаратов спустя 1 и 2 недели показал сопоставимые значения показателя ГООВ в ранах с лиофилизированными ТИП и в контроле. Через 7 суток после нанесения ран индекс ГООВ в контроле составил 7,5 (7,0; 9,0), в образцах, содержащих тканеинженерный матрикс – 7,0 (6,0; 8,0) и тканеинженерный гидрогелевый матрикс – 7,0 (6,0; 8,0). Разница не была статистически значимой. Спустя две недели показатели были: 6,0 (6,0; 6,0) в контроле, 6,0 (6,0; 7,0) с тканеинженерным матриксом и 6,0 (5,0; 7,0) с гидрогелевым матриксом. Разница также статистически не значима. Полученные результаты свидетельствуют о том, что помещение ТИП (и твердотельной, и гидрогелевой форм) в раны не вызвало чрезмерной воспалительной реакции, но в то же время не угнетало физиологический процесс воспаления.

Интенсивное заполнение пространства дефектов грануляционной тканью наблюдали в опытных и контрольных ранах уже спустя неделю (рис. 2).

Плотность сосудистого русла в окружающих раны с лиофилизированными ТИП тканях статистически значимо превышала показатели в контроле. Удельная площадь сосудов в тканях вокруг ран спустя неделю составила 3,65% (3,65%; 3,77%), 5,63% (5,12%; 5,84%) и 4,76% (4,50%; 5,02%) в контроле и опытных

группах (лиофилизаты) соответственно ($p = 0,009$ для твердотельного матрикса и $p = 0,028$ для гидрогелевого матрикса по сравнению с контролем). Средний диаметр сосудов в тканях, окружающих рану, составлял 14,88 (13,92; 15,88), 10,40 (10,03; 10,64) и 10,88 (9,30; 11,57) мкм в контроле и опытных группах соответственно ($p = 0,008$; $p = 0,007$). Удельная площадь сосудов грануляционной ткани статистически значимо не отличалась в контрольных и опытных образцах. С увеличением срока наблюдений изменения этих показателей не были статистически значимыми.

Наиболее заметные отличия наблюдали при формировании эпителия при использовании лиофилизированных ТИП. Спустя неделю эпителизация контрольной раны (в отличие от опытов) произошла не полностью, при этом толщина формирующегося эпителия составила 47,45 (46,65; 48,65), в ране, содержащей лиофилизат твердотельного матрикса, – 73,76 (71,73; 75,77), в ране с лиофилизатом гидрогелевого матрикса – 75,35 (70,55; 79,83) мкм ($p = 0,0001$ для обоих лиофилизатов по сравнению с контролем). Спустя две недели: 59,83 (58,22; 61,54), 91,90 (88,27; 92,02), 88,15 (85,73; 90,01) мкм соответственно. Через три недели: 68,98 (68,89; 71,74), 116,85 (110,74; 119,03) и 109,47 (106,12; 115,47) мкм соответственно. Через четыре недели: 88,83 (79,06; 90,84), 140,38 (133,47; 143,43), 132,56 (131,84; 138,45) мкм соответственно. Через пять недель: 124,40 (121,64; 125,38), 159,16 (157,48; 161,99), 155,48 (152,12; 159,36) мкм соответственно. Разница в значениях данного показателя в опытных ранах по сравнению с контролем на всех этапах исследований была статистически значима ($p = 0,0001$).

Формирующийся эпителий контрольных ран спустя неделю состоял из тонкого слоя клеток неправильной формы. С увеличением сроков исследова-

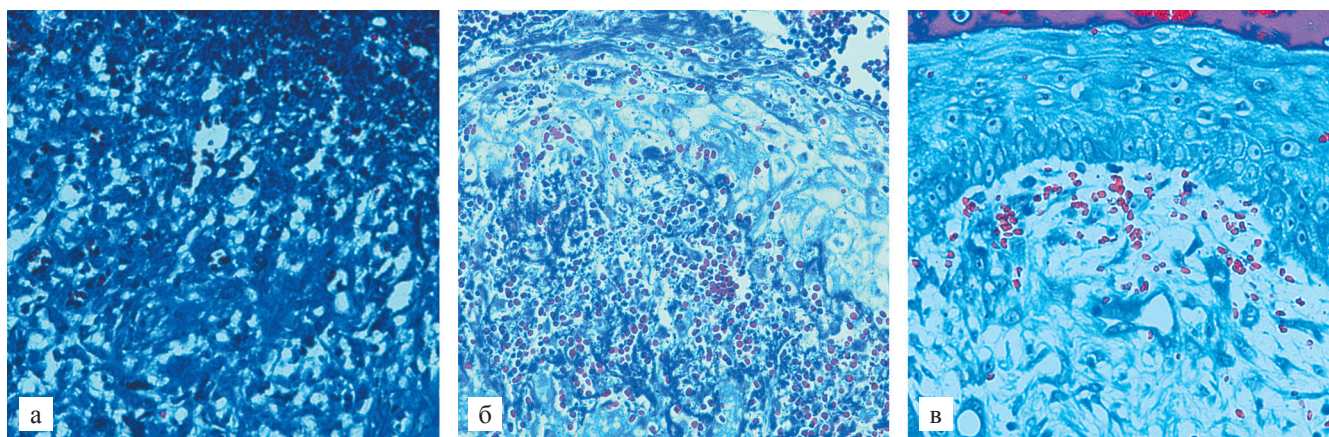


Рис. 2. Полнослойные кожные раны спустя 1 неделю в контроле (а), содержащие лиофилизаты тканеинженерного твердотельного матрикса (б) и тканеинженерного гидрогелевого матрикса (в). Окраска по Гейденгайну, $\times 400$

Fig. 2. Full-thickness skin wounds at week 1 in the control (a), wounds containing lyophilisates of tissue-engineered solid matrix (б) and tissue-engineered hydrogel matrix (в). Heidenhain's stain; $400\times$

ния (3–4 недели) происходило отчетливое выделение базального и шиповатого слоев эпителия (рис. 3). В опытных ранах формирование эпителия происходило быстрее (рис. 4). Отчетливые слои клеток с большим количеством «гребешков» Рете наблюдали в ранах, содержащих гидрогелевый матрикс, уже на первой неделе. Кератиноциты шиповатого слоя в ранах, содержащих твердотельный матрикс, визуализировались более крупными и зрелыми уже спустя две недели, они имели крупные округлые ядра и были легко отличимы от клеток базального и зернистого слоев.

К концу исследования морфология клеточных слоев эпителия всех ран была не отличима от нормальной кожи свиньи (рис. 4). При окрашивании трихромом в образцах из ран, содержащих лиофи-

лизированные ТИП, наблюдали образование коллагеновых структур в области грануляционной ткани уже на третьей неделе исследования. В контроле сходная картина была только спустя пять недель.

Гидролизат твердотельного матрикса, имплантированный в раневое ложе, визуализировался в толще грануляционной ткани на начальных сроках исследования (рис. 5) и постепенно подвергался биодеградации, перемещаясь через сосочковую и ретикулярную зоны в область гиподермы.

Лиофилизированный гидрогелевый матрикс, имплантированный в раневое ложе, также подвергался деградации, и следы его постепенно оттеснялись в область гиподермы к 5-й неделе исследований (рис. 6).

Важно, что вокруг деградируемых лиофилизированных ТИП не формировалась плотная соедини-

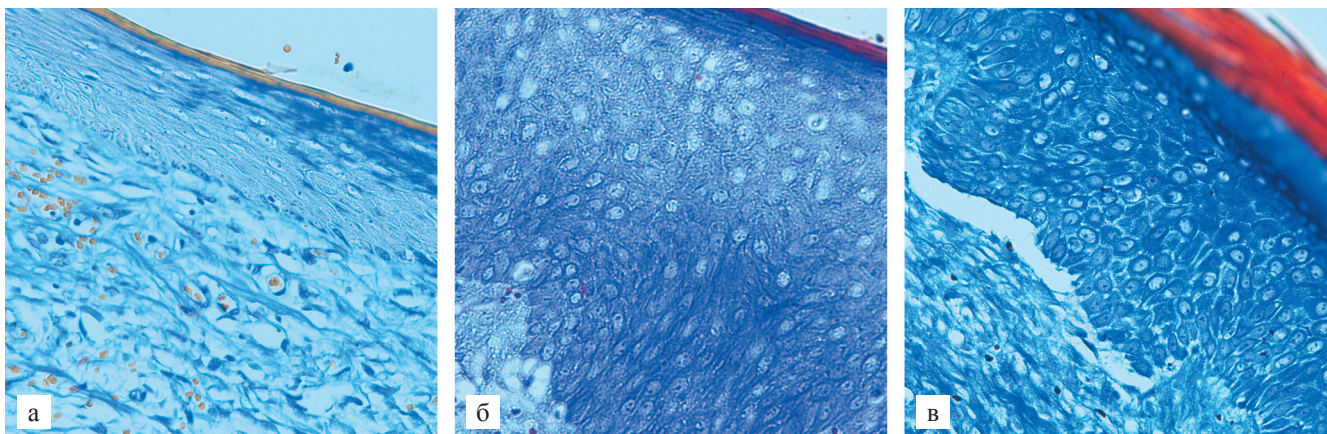


Рис. 3. Неоэпителий в области полнослойных кожных ран спустя 3 недели в контроле (а), содержащих лиофилизаты тканеинженерных твердотельного (б) и гидрогелевого матриксов (в). Окраска по Гейденгайну, ×100

Fig. 3. Neoepithelium in the area of full-thickness wounds at week 3 in controls (a), wounds containing lyophilisates of tissue-engineered solid-state (б) and hydrogel matrices (в). Heidenhain's stain; 100×

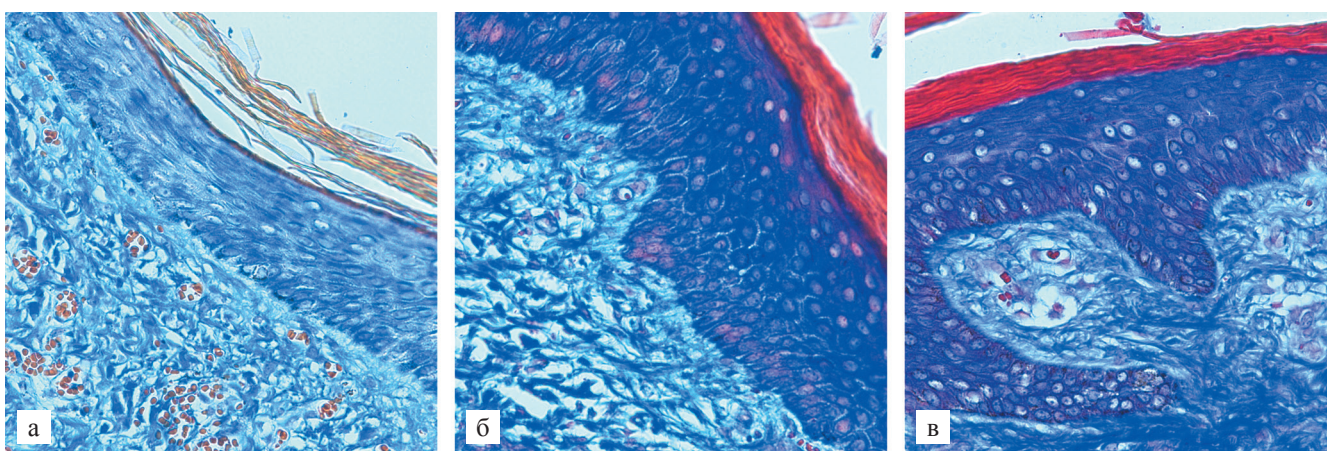


Рис. 4. Дифференцированный эпителий в области полнослойных кожных ран спустя 5 недель в контроле (а), ранах, содержащих тканеинженерный матрикс (б) и лиофилизат тканеинженерного гидрогелевого матрикса (в). Окраска по Гейденгайну, ×400

Fig. 4. Differentiated epithelium in the area of full-thickness wounds at week 5 in the control (a), wounds containing tissue-engineered matrix (б) and tissue-engineered hydrogel matrix lyophilisate (в). Heidenhain's stain; 400×

тельно-тканная капсула и не была обнаружена массивная инфильтрация лейкоцитарными клетками на протяжении всего периода исследований. Это может означать, что продукты не воспринимались клетками реципиента как инородные.

Исследование *in vitro*, выполненное на клетках, выделенных из полнослойных кожных эксплантов мини-свиньи, показало отсутствие цитотоксических свойств растворимых компонентов лиофилизированных ТИП. Метаболическая активность клеток в тесте аламаровым синим в контроле была принята за 100%, при этом для твердотельного и гидрогелевого матриксов она составила 101,66% (94,54%; 104,72%) и 100,76% (88,82%; 110,69%) соответственно ($p = 0,916$).

Миграционная активность клеток фибробластоподобной морфологии, выделенных из полнослойных

кожных эксплантов свиньи и культивированных в присутствии лиофилизированных ТИП, статистически значимо была большей, чем в контроле. В контроле через сутки нанесенная «царапина» покрывалась клетками на 68,74% (63,74%; 71,26%), в присутствии лиофилизата твердотельного и гидрогелевого матриксов – 75,43% (74,22%; 78,26%) и 76,74% (68,31%; 76,03%) соответственно, со статистической недостоверной разницей по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Заживление кожной раны представляет собой последовательную смену фаз альтерации, гемостаза, сосудистых реакций и пролиферации. Сбои в этом хорошо скоординированном процессе могут вызвать патологическое заживление. Например, защитная функция нейтрофилов (фагоцитоз), необходимая для

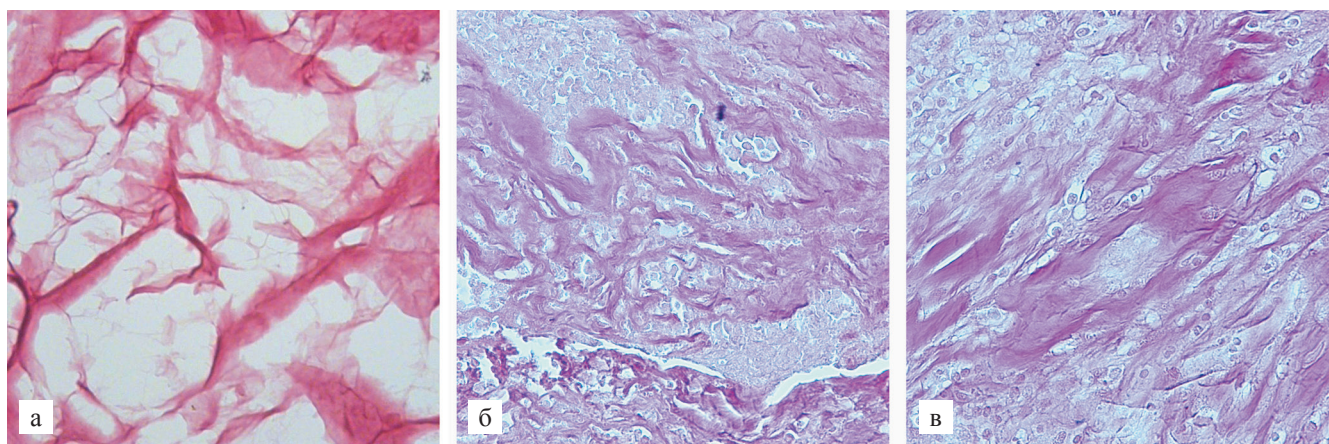


Рис. 5. Лиофилизат тканеинженерного твердотельного матрикса (а), лиофилизат с компонентами крови спустя 1 неделю (б) и интегрированный лиофилизат матрикса в области гиподермы спустя 5 недель (в). Окраска по Ван-Гизону, $\times 400$

Fig. 5. Tissue-engineered solid-state matrix lyophilisate (a), lyophilisate with blood components at week 1 (б) and integrated lyophilisate of matrix in the hypodermis at week 5 (в). Van Gieson's stain; $400\times$

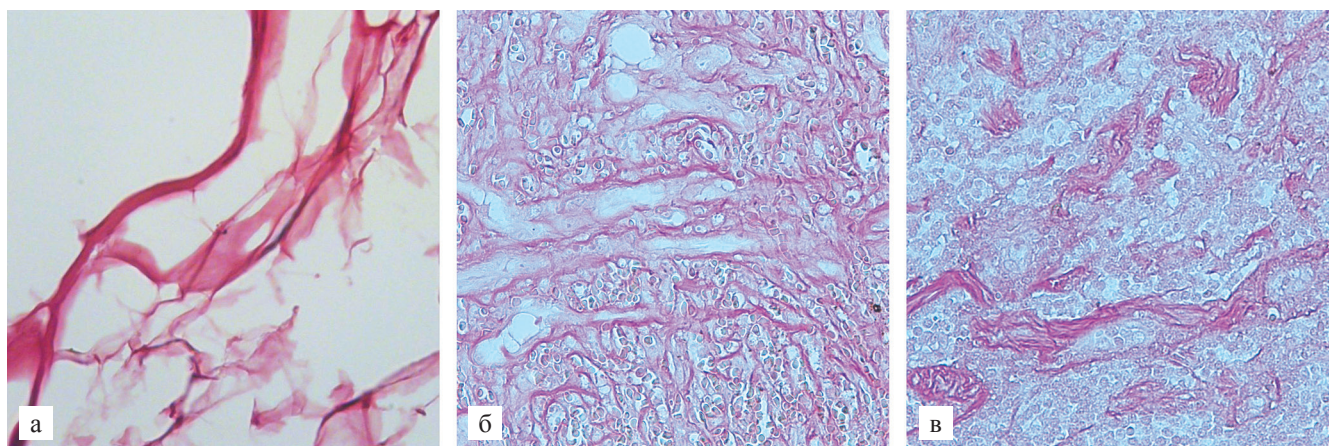


Рис. 6. Лиофилизат гидрогелевого матрикса (а), гидрогелевый матрикс с компонентами крови спустя 1 неделю (б) и интегрированный гидрогелевый матрикс в области гиподермы спустя 5 недель (в). Окраска по Ван-Гизону, $\times 400$

Fig. 6. Lyophilisate of hydrogel matrix (a), hydrogel matrix with blood components at week 1 (б) and integrated hydrogel matrix in the hypodermis at week 5 (в). Van Gieson's stain; $400\times$

очищения раны от микроорганизмов и некротических тканей, при ее избыточности приводит к вторичной альтерации окружающих тканей активными кислородными радикалами, а дифференцировка мигрирующих в область раневого дефекта макрофагов определяет исход пролиферации и заживления [10]. Качественная эпителизация является гарантом восстановления функций поврежденной кожи. В основе этих процессов лежат многочисленные биохимические механизмы и сигнальные пути, в которых ВКМ выполняет ведущую функцию [1]. Лиофилизированные продукты из ВКМ пуповины человека, помещенные в раны, частично восполняли утраченный объем и служили субстратом для прикрепления клеток. Такая механическая функция лиофилизированных ТИП способствовала скорейшей остановке кровотечения и заполнению раневого ложа грануляционной тканью в кратчайшие сроки.

Описанные в литературе результаты применения ТИП из ВКМ различного происхождения показали, что скорость деградации, иммуногенность и способность вызывать лейкоцитарную инфильтрацию являются важными предикторами совместимости и эффективности биоматериалов [11]. Отсутствие местной острой воспалительной реакции на инородное тело (лиофилизаты матрикса и гидрогелевого матрикса из пуповины человека для реципиента-свиньи) и отсутствие цитотоксичности полученных продуктов для клеток мини-свиньи *in vitro* также способствовали регенеративному течению процесса заживления. Опубликованные нами ранее результаты нецитотоксичности ТИП для дермальных фибробластов человека, как и для клеток органов разных видов лабораторных животных, позволяют предположить биосовместимость бесклеточных продуктов из пуповины человека [8].

Исход заживления во многом зависит от восстановления местной сосудистой сети, доставляющей питательные вещества и удаляющей метаболиты. Существенным преимуществом лиофилизированных ТИП из пуповины человека является высвобождение при его биодеградации большого количества биологически активных молекул (факторов роста), способствующих миграции эндотелиоцитов и капиллярогенезу. Структурная реорганизация ВКМ Вартонова студня в процессе децеллюляризации позволяет фиксированным к каркасным белкам факторам роста (таким как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β) и др.) присутствовать в лиофилизированных ТИП в больших концентрациях по сравнению с исходным биоматериалом пуповины [12, 13]. В этом исследовании показано увеличение удельной площади сосудистого русла в тканях, окружающих рану с лиофилизированными ТИП, и одновременное уменьшение их диаметра в фазу угасания сосудистых реакций,

что может быть следствием активного образования новых капилляров. Подобное явление описано в научной литературе [14]. Установленная нами большая миграционная активность *in vitro* клеток кожи свиньи в присутствии лиофилизированных ТИП подтверждает предположение о хемотаксических свойствах лиофилизированных ТИП.

Основное вещество грануляционной ткани откладывается в раневом ложе фибробластами. Происхождение фибробластов, образующих грануляционную ткань при глубоких полнослойных повреждениях кожи, еще окончательно не выяснено. Исследования на кроликах идентифицировали адвентицию сосудов и перициты ниже *panniculus carnosus* и жирового слоя как источник грануляционных фибробластов. У мышей была показана возможность трансформации циркулирующих в крови гемопоэтических клеток с мезенхимальными характеристиками *in situ* в ране. Вероятно, множественные субпопуляции фибробластов вместе формируют грануляционную ткань. В свою очередь, термин «фибробласты» обозначает очень гетерогенную популяцию клеток, обладающих разной способностью к отложению ВКМ, дифференцированию в миофибробласты и/или сокращению раны. Фибробласты в разных участках кожи могут иметь различное происхождение, и ни один поверхностный маркер не присущ всем линиям фибробластов. Это делает идентификацию происхождения фибробластов в грануляционной ткани интересной и сложной задачей [15].

Резепитализация полнослойных кожных ран происходит исключительно из краев раны. Супрабазальный кератиноцит края поврежденного эпидермиса, удлиняясь, натягивается на расположенную под ним клетку базального слоя, и достигая области раневого ложа, приобретает способность к делению. Закрытие раневой поверхности происходит по мере того как следующий кератиноцит супрабазального слоя края раны подвергается аналогичному процессу. Базальные кератиноциты продвигающегося слоя эпидермиса обладают повышенной митотической активностью, имеют меньшее количество десмосом и большее количество щелевых контактов. При разрушении базальной мембраны человеческие кератиноциты мигрируют по временной матрице, при этом было показано, что их формирующиеся цитоплазматические отростки окружены ламинином. Но остается неясным, служит ли ламинин субстратом для адгезии или вырабатывается клетками в ответ на контакт с коллагеном. Некоторые исследования показали, что мигрирующие кератиноциты человека не продуцируют компоненты базальной мембраны [15].

Согласно общепринятому представлению, фибробласты и эндотелиоциты дермы вырастают в первичный сгусток, заполняющий раневое пространство, а эпидермис нарастает сверху, покрывая

грануляционную ткань [10]. Существует предположение, что фибробласты и перициты способны мигрировать из подкожных слоев, волосяных фолликулов и потовых желез, а не из относительно бессосудистой и мало заселенной клетками сетчатой дермы [16]. В нашем исследовании механическое заполнение области дефекта и постепенная интеграция и ревакуляризация трансплантата с образованием собственного ВКМ способствовали уменьшению сроков образования зрелого эпидермиса.

Не только механическое заполнение раны, но и качественный состав ТИП, включающий структурные элементы базальной мембраны и функциональные молекулы, играют роль в формировании качественного зрелого эпителия. Статистически значимая толщина эпителия в ранах с лиофилизированными ТИП была большей по сравнению с контролем. Предположительно это может быть как следствием присутствия в них факторов роста, так и выявленных нами в лиофилизированных ТИП молекул базальных мембран, таких как коллаген IV типа и ламинин [7]. Deshpande et al. в своих исследованиях *in vitro* заметили, что включение фибробластов в бесклеточный дермальный матрикс с отсутствующими в нем компонентами базальной мембраны не оказывало существенного влияния на формирование эпителия [3].

В ранах при введении лиофилизата тканеинженерного гидрогелевого матрикса дифференцировка и созревание эпителиоцитов происходили наиболее активно не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с лиофилизатом тканеинженерного твердотельного матрикса. В них уже спустя неделю были обнаружены признаки формирования эпидермальных утолщений Rete, в то время как в контрольной ране на этом сроке исследования даже процесс формирования тонкого слоя эпителиоцитов был не завершен. Отчетливая дифференцированность клеток слоев эпителия, характеризующая их зрелость, при использовании гидрогелевого матрикса была более заметной уже на второй неделе эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных нами экспериментальных исследований влияния бесклеточных лиофилизатов тканеинженерных матриксов на изолированный клеточный материал *in vitro* и заживление в модели *in vivo* показали их биосовместимость и биологическую активность. Лиофилизаты способствуют регенеративному типу заживления глубоких кожных ран при имплантации *in vivo* быстрее, чем в контроле, формируя зрелый эпителиальный пласт. Лиофилизированная гидрогелевая форма тканеинженерного матрикса способствует созреванию эпидермиса с образованием эпидермальных утолщений быстрее, чем лиофилизат твердотельного матрикса. Предположительно данный эффект может быть обусловлен действием

факторов роста, присутствующих в гидрогелевой форме матрикса в несвязанном состоянии. Полученные результаты позволяют разработать научно обоснованную программу доклинических исследований безопасности и эффективности лиофилизированных ТИП из пуповины человека в соответствии с требованиями ГОСТ Р 56699-2015.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Seaton M, Hocking A, Gibran NS. Porcine models of cutaneous wound healing. *ILAR Journal*. 2015; 56 (1): 127–138. doi: 10.1093/ilar/ilv016. PMID: 25991704.
2. Liang Y, Tian H, Liu J, Lv Y, Wang Y, Zhang J, Huang Y. Application of stable continuous external electric field promotes wound healing in pig wound model. *Bioelectrochemistry*. 2020; 135: 107578. doi: 10.1016/j.bioelechem.2020.107578. PMID: 32534380.
3. Eweida AM, Marei MK. Naturally occurring extracellular matrix scaffolds for dermal regeneration: do they really need cells? *BioMed Research International*. 2015; 839694: 9. <https://doi.org/10.1155/2015/839694>.
4. Фоминых ЕМ, Митрофанов ВН, Живцов ОП, Стручков АА, Зубрицкий ВФ, Лебедева ЮН и др. Трансплантация тканевых эквивалентов в лечении некоторых повреждений кожи. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020; 22 (1): 165–173. Fominykh YM, Mitrofanov VN, Zhivtsov OP, Struchkov AA, Zubritskiy VF, Lebedeva YuN i dr. Transplantatsiya tkanevykh ekvivalentov v lechenii nekotorykh povrezhdeniy kozhi. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2020; 22 (1): 165–173. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-1-165-173>.
5. Marques MR. Enzymes in the dissolution testing of gelatin capsules. *AAPS PharmSciTech*. 2014; 15 (6): 1410–1416. doi: 10.1208/s12249-014-0162-3.
6. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сент. 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей [Электронный ресурс]. *Гарант: информационно-правовое обеспечение*. Режим доступа: <http://base.garant.ru/70350564/ce210ed70e5daea1ed719396b4dabe87/> (дата обращения: 22.10.2022 г.). *Direktiva Evropeyskogo parlamenta i Soveta Evropeyskogo Soyuzha 2010/63/ES ot 22 sent. 2010 g. o zashchite zhivotnykh, ispol'zuyushchikhsya dlya nauchnykh tseley [Elektronnyy resurs]*. *Garant: informatsionno-pravovoe obespechenie*. Rezhim dostupa: <http://base.garant.ru/70350564/ce210ed70e5daea1ed719396b4dabe87/> (data obrashcheniya: 22.10.2022 g.).
7. Кондратенко АА, Калюжная ЛИ, Соколова МО, Чернов ВЕ. Сохранность важнейших структурных компонентов пуповины человека после децеллюляризации как этапа изготовления высокорегенеративного раневого покрытия. *Биотехнология*. 2021; 37 (5): 61–65. Kondratenko AA, Kalyuzhnaya LI, Sokolova MO, Chernov VE.

- Chernov VE. Sokhrannost' vazhneyshikh strukturnykh komponentov pupoviny cheloveka posle detsellyulyarizatsii kak etapa izgotovleniya vysokoregenerativnogo ranevogo pokrytiya. *Biotekhnologiya*. 2021; 37 (5): 61–65. doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-5-61-65.
8. Калюжная ЛИ, Соколова МО, Чернов ВЕ, Земляной ДА, Чеботарев СВ, Чалисова НИ и др. Влияние бесклеточного матрикса пуповины человека на динамику роста и жизнеспособность культивируемых клеток человека и животных *ex vivo*. *Гены и клетки*. 2021; 3: 72–79. *Kalyuzhnaya LI, Sokolova MO, Chernov VE, Zemlyanoy DA, Chebotarev SV, Chalissova NI i dr. Vliyaniye beskletochnogo matriksa pupoviny cheloveka na dinamiku rosta i zhiznesposobnost' kul'tiviruyemykh kletok cheloveka i zhivotnykh ex vivo. Geny i kletki*. 2021; 3: 72–79. doi: 10.23868/202110010.
 9. Калюжная ЛИ, Хоминец ВВ, Чеботарев СВ, Харкевич ОН, Кудяшев АЛ, Чернов ВЕ и др. Применение биоматериала из пуповины человека для восстановления повреждений суставного хряща. *Профилактическая и клиническая медицина*. 2019; 4 (73): 45–52. *Kalyuzhnaya LI, Khominets VV, Chebotarov SV, Kharkevich ON, Kudyashev AL, Chernov VE i dr. Primeneniye biomateriala iz pupoviny cheloveka dlya vosstanovleniya sustavnogo khryashcha. Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2019; 4 (73): 45–52.
 10. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Advances in Wound Care (New Rochelle)*. 2016; 5 (3): 119–136. doi: 10.1089/wound.2014.0561.
 11. Brown SJ, Surti F, Sibbons P, Hook L. Wound healing properties of a fibrin-based dermal replacement scaffold. *Biomed Phys Eng Express*. 2021; 8 (1). doi: 10.1088/2057-1976/ac4176. PMID: 34883468.
 12. Dubus M, Scomazzon L, Chevrier J, Montanede A, Baldit A, Terryn C et al. Decellularization of Wharton's Jelly Increases Its Bioactivity and Antibacterial Properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022; 10: 828424. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.828424>.
 13. Ramzan F, Ekram S, Frazier T, Salim A, Mohiuddin OA, Khan I. Decellularized Human Umbilical Tissue Derived Hydrogels Promote Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering*. 2022; 9: 239. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9060239>.
 14. Коняева АД, Варакута ЕЮ, Лейман АЕ. Морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла в слизистой оболочке полости рта в ходе заживления раневого дефекта при использовании полимерной мембраны. *Биомедицина*. 2021; 17 (4): 57–67. *Konyayeva AD, Varakuta YY, Leyman AY. Morfofunktsional'nyye izmeneniya sosudov mikrotsirkulyatornogo rusla v slizistoy obolochke polosti rta v khode zazhivleniya ranevogo defekta pri ispol'zovanii polimernoy membrany. Biomeditsina*. 2021; 17 (4): 57–67. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-57-67>.
 15. Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J Cell Commun Signal*. 2016; 10 (2): 103–120. doi: 10.1007/s12079-016-0330-1.
 16. Константинова МВ, Хайцев НВ, Кравцова АА, Балашов ЛД. Основные проблемы заживления ран и использование заменителей кожи. *Педиатр*. 2015; 6 (2): 85–95. *Konstantinova MV, Khaytsev NV, Kravtsova AA, Balashov LD. Osnovnyye problemy zazhivleniya ran i ispol'zovaniye zameniteley kozhi. Pediatr*. 2015; 6 (2): 85–95.

Статья поступила в редакцию 27.10.2022 г.
The article was submitted to the journal on 27.10.2022