

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КУБГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ)

На правах рукописи

МЕЛКОНЯН КАРИНА ИГОРЕВНА

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ И РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ
МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВ
И СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННЫХ ДЕФЕКТОВ**

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор И.М. Быков

Краснодар – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Общие свойства биоматериалов на основе природных полимеров.....	17
1.2 Характеристика коллагенов и их роль в репарации.....	20
1.3 Особенности процессов регенерации кожи при локальном воздействии биополимерными материалами	24
1.4 Биоматериалы на основе компонентов внеклеточного матрикса	30
1.5 Методы и подходы к децеллюляризации и рецеллюляризации ксеноматериалов	36
1.5.1 Химические агенты для децеллюляризации	42
1.5.2 Биологические агенты для децеллюляризации.....	45
1.5.3 Физическое воздействие и прочие агенты для децеллюляризации	48
1.5.4 Основные подходы к рецеллюляризации ксеноматериалов.....	49
1.6 Особенности ангиогенеза в децеллюляризованных матриксах	51
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	58
2.1 Получение дермы свиньи	59
2.2 Методология децеллюляризации дермы свиньи.....	60
2.3 Оценка качества децеллюляризации образцов	61
2.3.1 Количественный анализ ДНК	61
2.3.2 Окрашивание DAPI	62
2.3.3 Подкожная имплантация/инъекция образцов децеллюляризованных биоматериалов	62
2.4 Оценка влияния децеллюляризованных материалов дермы свиньи на фибробласты человека <i>in vitro</i>	63
2.5 Биохимические методы оценки децеллюляризованных материалов	66
2.5.1 Количественное определение содержания общего белка.....	66
2.5.2 Количественное определение содержания гликозаминогликанов	66
2.5.3 Количественное определение содержания гиалуроновой кислоты.....	67
2.6 Гистологические исследования	67

2.7 Иммуногистохимические исследования.....	68
2.8 Иммуноферментный анализ.....	69
2.9 Выделение, культивирование и характеристика дермальных фибробластов свиньи.....	70
2.10 Биомеханические тесты.....	71
2.11 Моделирование ожоговой раны и экспериментальное лечение мелких лабораторных животных.....	72
2.12 Статистическая обработка данных.....	73
ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ КАК МАТЕРИАЛА ДЛЯ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ.....	74
3.1 Сравнительный анализ результатов обработки образцов дермы свиньи детергентно-энзиматическим способом.....	74
3.2 Обоснование выбора оптимальной методики обработки дермы свиньи для получения децеллюляризованного дермального матрикса.....	80
ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО И РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	84
4.1 Разработка способа моделирования ожоговой раны на крупных лабораторных животных.....	84
4.2 Результаты сравнительной оценки эффективности применения децеллюляризованного и рецеллюляризованного дермального матрикса для лечения ожоговых ран в эксперименте.....	86
ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ В КАЧЕСТВЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ТКАНЕЗАМЕЩЕНИЯ.....	96
5.1 Разработка способа подготовки больших лоскутов дермы свиньи для создания децеллюляризованного дермального матрикса в качестве тканезамещающего материала.....	97
5.2 Способ децеллюляризации дермы свиньи для создания	

децеллюляризованного дермального матрикса в качестве тканезамещающего материала.....	99
5.3 Морфологический анализ тканевой реакции на подкожную имплантацию фрагментов децеллюляризованного дермального матрикса	105
5.4 Исследования биомеханической прочности децеллюляризованного дермального матрикса	111
ГЛАВА 6 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.....	116
6.1 Результаты экспериментального хирургического лечения грыжи передней брюшной стенки с использованием децеллюляризованного дермального матрикса	117
6.2 Результаты экспериментального применения децеллюляризованного дермального матрикса в качестве тканезамещающего материала при мастэктомии	123
ГЛАВА 7 ОЦЕНКА СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ГИДРОГЕЛЕВОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ.....	131
7.1 Подбор оптимальной методики обработки дермы свиньи для получения децеллюляризованного гидрогелевого материала.....	131
7.2 Биохимический анализ децеллюляризованного гидрогелевого материала	134
7.3 Результаты рецеллюляризации децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи фибробластами человека <i>in vitro</i>	138
7.4 Оценка местной токсичности децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи	143
ГЛАВА 8 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ГИДРОГЕЛЕВОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВЫХ РАН	146
8.1 Оценка эффективности заживления ожоговых ран при экспериментальном применении децеллюляризованного гидрогелевого материала.....	147

8.2 Динамика изменения содержания про- и противовоспалительных факторов в сыворотке при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс	158
8.3 Динамика изменения содержания факторов роста в сыворотке при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс	167
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	173
ВЫВОДЫ	188
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	191
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	192
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	194
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	227

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В последнее время в клинических ситуациях, характеризующихся выраженным тканевым дефицитом, всё большую значимость приобретают материалы на основе биополимеров – природных биомолекул, синтезируемых микроорганизмами, растениями и животными и обладающих оптимальной биосовместимостью. В частности, весьма актуальна разработка различных каркасов на основе биоактивных полимеров, которые не только обладают барьерными свойствами, но и положительно действуют на обмен веществ, ускоряя процессы репарационной регенерации тканевых дефектов [Образцова А.Е. и соавт., 2021; Владимирова О.В. и соавт., 2021; Абдуллаева Ж.Д. и соавт., 2024]. Проллиферативные, ангиогенные антибактериальные и иммуномодулирующие свойства биополимеров создают микросреду, благоприятную для процесса заживления [Sahana T.G. et al., 2018; Jackson J. et al., 2024]. На данный момент для восполнения тканевых дефектов используются биополимерные материалы на основе целлюлозы, альгинатов, гиалуроновой кислоты, коллагена и хитозана [Медушева Е.О. и соавт., 2023; Barbalinardo M. et al., 2025]. В клинической практике для тканезамещения применяются ксеногенные ацеллюлярные дермальные матриксы в различных областях, включая ортопедическую хирургию, реконструктивную хирургию, лечение ожогов и ран, андрологию, челюстно-лицевую хирургию, пластику брюшной стенки и отоларингологию, но необходимы дальнейшие исследования, чтобы полностью определить их будущий потенциал [Petrie K. et al., 2022]. При этом, становится очевидно, что монокомпонентные и синтетические материалы не смогут обеспечить необходимую степень терапевтической эффективности без наличия в своем составе клеточного компонента, способного оптимизировать и/или индуцировать репаративный гистогенез [Ter Horst B., 2018; Verdi J. et al., 2022]. Потенциальным источником природоподобного комплекса биополимеров, сходного с нативным внеклеточным матриксом (ВКМ), являются децеллюляризованные соединительнотканые

каркасы кожи и дермы. Децеллюляризация нативных органов и тканей способствует сохранению биохимического состава, тканевой структуры, а также механических свойств сохранившегося внеклеточного матрикса на оптимальном уровне и обеспечивает наличие адгезионных факторов для вторичного засеивания аутологичными клетками (рецеллюляризации). При разработке подобных материалов важно определить механизмы, которые позволяют клеткам правильно функционировать, пролиферировать, дифференцироваться и взаимодействовать с другими компонентами ткани. Основными источниками клеток, которые можно использовать для рецеллюляризации матриксов при заживления кожных ран, являются постнатальные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [Епифанов С.А. и соавт., 2021; Zhao J. et al., 2024]. Исследования показывают эффективность локального применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в ране, однако остается ряд вопросов, связанных с контролем поведения МСК *in situ*, влиянием микроокружения на жизнедеятельность клеток [Akasaka Y., 2022; da Costa Manso G.M. et al., 2023]. Показано, что компоненты ВКМ дермы играют ключевую роль в контроле таких особенностей клеточной физиологии как пролиферативная активность, способность к дифференцировке и миграции, потентность (стволовость) и уровень метаболизма [Cheng J. et al., 2019]. ВКМ дермы, полученный после децеллюляризации, может обеспечивать сигналы для адгезии, сайты связывания для факторов роста и ферментов, деградирующих ВКМ при миграции клеток [Исаева Е.В. и соавт., 2022]. Немаловажную роль в деградации коллагена и ремоделировании ВКМ играют матриксные металлопротеиназы, обуславливающие также миграцию кератиноцитов, агрегацию тромбоцитов и пролиферацию клеток [Diniz-Fernandes S.T. et al., 2018; Рогова Л.Н. и соавт., 2018]. Понимание механизмов, лежащих в основе данных функций важно для получения материалов, которые могут имитировать молекулы биологического распознавания, способные контролировать взаимоотношения между клетками и их естественным микроокружением, а также для разработки терапевтических подходов, позволяющих усилить репарацию при повреждении тканей.

Таким образом, оценка целесообразности использования децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриц дермы свиньи в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств и внедрение в клинику новых медицинских технологий с использованием данных средств является актуальным для фундаментальной медицины и практического здравоохранения.

Степень разработанности темы исследования

Состав биохимических компонентов децеллюляризованных каркасов зависит от метода децеллюляризации, поскольку эта процедура может приводить к потере биоактивных молекул. Изменение соотношения основных компонентов ВКМ — коллагена, фибронектина и ламинина может влиять на начальное связывание, пролиферацию и распределение МСК при рецеллюляризации матриц [Ahmed E. et al., 2021]. Многие методы децеллюляризации приводят к частичной деградации ключевых структурных белков (коллаген I/IV типов, ламинин) и потере сигнальных молекул (факторы роста, интегриновые лиганды), что снижает механическую стабильность и биоактивность децеллюляризованных конструкций в отношении тканеспецифических сигналов для регуляции хемотаксиса и пролиферации [Golebiowska A.A. et al., 2024]. Показано, что МСК преимущественно локализовались в областях, богатых фибронектином, коллагеном I и IV типа или ламинином в тканях легких, обработанных различными децеллюляризирующими реагентами [Ohata K. et al., 2020]. В децеллюляризованной на основе тритона X-100 матке МСК распределились равномернее, чем при использовании дезоксихолата натрия [Hellström M. et al., 2016]. Различная жесткость каркаса в результате использования агрессивных детергентов также может влиять на адгезию, распределение и дифференцировку клеток [Tiemann T. et al., 2020]. Более того, длительное хранение децеллюляризованных матриц, а также тип используемого стерилизующего агента существенно влияют на выживаемость засеянных МСК. Известно, что сохранение нативных механических и биохимических свойств матриц после децеллюляризации необходимо для поддержания нормальной диффузии

питательных веществ, роста и дифференцировки клеток. Следовательно, оптимизация щадящих неразрушающих алгоритмов децеллюляризации может сохранить активные компоненты ВКМ, необходимые для обеспечения успешной рецеллюляризации. При этом известны алгоритмы обработки, которые сохраняют остеоиндуктивные и васкулогенные свойства матриц. Деминерализованный костный матрикс применяется в качестве остеогенного материала благодаря способности индуцировать костную регенерацию, что связывают с присутствием в его составе костных морфогенетических белков (BMP), инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) и трансформирующего фактора роста- β (TGF β), а также структурно-сигнальных элементов [Ren J. et al., 2024]. Анализ детергент-обработанного децеллюляризованного матрикса человеческой почки выявил наличие гепарин-связывающих факторов роста, хотя их концентрации были значимо ниже, чем в нативной ткани [Ullah I. et al., 2019]. Аналогичные данные получены при изучении децеллюляризованной свиной кожи: сохранение в матриксе васкуло-эндотелиального фактора роста (VEGF) стимулировало повышенную секрецию VEGF человеческими фибробластами *in vitro* [R.D. Ventura et al., 2019]. Это подтверждает гипотезу о том, что даже частично сохраненные в децеллюляризованном матриксе факторы роста способны модулировать клеточное поведение через активацию сигнальных путей, связанных с пролиферацией и ангиогенезом. Было показано, что ревитализация ВКМ дермы кератиноцитами или фибробластами улучшает васкуляризацию, интеграцию каркаса и клеточную пролиферацию [Eweida A.M. et al., 2015; Zhu C. et al., 2019]. Использование различных материалов, рецеллюляризованных МСК (плацента, пуповина, амниотическая мембрана), также продемонстрировало, что они способствуют регенерации посредством привлечения эндотелиальных клеток и секреции VEGF, эпидермального фактора роста (EGF) и других биоактивных факторов [Ghasempour A. et al., 2024].

Однако репаративный потенциал децеллюляризованных и рецеллюляризованных материалов на основе ВКМ дермы изучен не полностью, а имеющиеся на данный момент результаты исследований в этой области

недостаточны для понимания тех процессов, которые лежат в основе особенностей действия материалов.

Цель исследования – дать патогенетическое обоснование применения децеллюляризированных и рецеллюляризированных материалов на основе дермы свиньи в качестве активирующих репарацию средств и выявить закономерности конструктивного ремоделирования соединительной ткани и кожи при замещении их повреждений и дефектов данными материалами.

Задачи исследования:

1. Оценить сохранность внеклеточного матрикса дермы свиньи, обработанной детергентно-энзиматическим методом без сшивающих химических агентов, с помощью анализа биохимических составляющих и морфологических характеристик относительно нативной дермы.

2. Определить функциональное воздействие децеллюляризированного матрикса дермы свиньи на жизнеспособность и метаболическую активность фибробластов дермы в условиях *in vitro* и его биомеханические характеристики для оценки эффективности дальнейшего применения в экспериментах *in vivo*.

3. Разработать способ моделирования ожоговой раны III и IV степени на крупном лабораторном животном для оценки воздействия децеллюляризированных и рецеллюляризированных матриксов дермы свиньи на процессы заживления, как при раннем, так и при этапном хирургическом лечении.

4. Определить целесообразность использования децеллюляризированных и рецеллюляризированных матриксов дермы свиньи в качестве активирующих репарацию кожи средств по динамике процессов эпителизации, коллагенизации и ангиогенеза, накоплению виментина на модели острой ожоговой раны крупных лабораторных животных.

5. Выявить особенности реорганизации соединительной ткани (коллагено- и ангиогенез, клеточная миграция, наличие клеток воспаления) в ответ на интеграцию децеллюляризированного матрикса дермы свиньи в дефект соединительной ткани у крупных лабораторных животных.

6. Провести оценку биохимического состава гидрогелевого

тканезамещающего материала, полученного химической децеллюляризацией дермы свиньи, включая анализ содержания сульфатированных гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты для оценки сохранности небелковых компонентов внеклеточного матрикса.

7. Определить регенеративный потенциал (скорость пролиферации, коллагеногенез, миграционную и метаболическую активность) децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи в условиях рецеллюляризации дермальными фибробластами человека *in vitro*.

8. Провести сравнительную оценку биохимических особенностей и эффективности репарационных процессов восстановления внеклеточного матрикса кожи (кератинизацию, коллагено- и ангиогенез) при применении децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи на модели ожоговой раны крыс.

9. Определить особенности воздействия децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи на процесс заживления по закономерностям изменения системных маркеров воспаления (TNF α , IL1 β , IL4, IL6, IL8, IL10) и репарации (IGF1, TGF β 1, PDGF A, VEGF A) в сыворотке крови на модели ожоговой раны крыс.

Научная новизна исследования. Впервые разработана технология забора дермы свиньи в лабораторных условиях с помощью дискового электродерматома, позволяющая целенаправленно получать лоскуты с заданными размерами.

Впервые предложена методика детергентно-энзиматической обработки дермы свиньи, позволяющая получить тканезамещающие матриксы различной массы с максимальным сохранением гистологической структуры без использования сшивающих токсических агентов, которые могут служить прототипами для последующей разработки раневых покрытий и хирургических имплантов.

Разработан способ моделирования ожоговой раны на крупном лабораторном животном (свинья), который позволяет проводить анализ приживления раневых покрытий, как при раннем, так и при этапном хирургическом лечении ожогов.

Обосновано репарационное действие рецеллюляризованных аллогенными

фибробластами матриксов на основе дермы свиньи при экспериментальном заживлении острой ожоговой раны крупных лабораторных животных в отношении эпителизации, коллагенизации и ангиогенеза.

Впервые показана эффективность применения децеллюляризированных несшитых матриксов дермы свиньи в качестве тканезамещающих средств, приводящих к формированию нормальной соединительной ткани на месте дефекта, содержащей основной компонент внеклеточного матрикса – коллаген I типа, фибробластоподобные клетки и эндотелиоциты.

Получены новые данные о ранней эпителизации (накоплении цитокератина), снижении темпов ресинтеза коллагена I типа; более эффективном накоплении коллагена IV типа и фибронектина при ремоделировании ВКМ в ответ на воздействие децеллюляризированного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи при ожоговой ране.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные об изменениях, возникающих в тканях при регенерации кожи на стадии ремоделирования в ответ на воздействие компонентов ВКМ дермы, могут послужить фундаментальной основой для разработки новых подходов в регенеративной медицине. Разработанные материалы могут быть использованы лабораториями научно-исследовательских институтов в сфере здравоохранения или биологического профиля, специализирующихся на клеточной или тканевой инженерии, для регуляции адгезии, дифференцировки, пролиферации и миграции клеток. Полученные данные могут быть использованы в разработке протоколов по применению децеллюляризированных и рецеллюляризированных материалов на основе дермы свиньи в комбустиологии (раневые покрытия, композиционные повязки на основе биополимерного геля, стимулирующие регенерацию кожи, что будет препятствовать дополнительному травмированию пациентов по сравнению с аутопластикой), дерматологии, реконструктивной хирургии (применение децеллюляризированных матриксов дермы в качестве хирургических имплантов для маммопластики и герниопластики) и регенеративной медицины (терапия трофических язв, создание искусственных эквивалентов кожи). Разработанные

подходы к терапии повреждений кожных покровов в ряде случаев помогут отказаться от оперативного вмешательства по восстановлению тканей, что имеет большое значение в медицинской практике, а также может способствовать научно обоснованному поиску и рациональному отбору новых средств для решения проблем реконструктивной пластической хирургии.

Методология и методы исследования

В ходе выполнения диссертационной работы использован комплекс биохимических, иммунологических (иммуноферментный анализ (ИФА), иммуногистохимический анализ (ИГХ)), гистологических и микроскопических методов исследования:

1. Детергентно-энзиматическое и детергентное воздействие на дерму свиньи методом децеллюляризации.

2. Биохимические исследования: количественное определение ДНК, общего белка, сульфатированных гликозаминогликанов (с-ГАГ), гиалуроновой кислоты (ГК) в гомогенатах ВКМ дермы свиньи.

3. Патофизиологические методы: моделирование ожоговых ран на крупных и мелких лабораторных животных.

4. Биофизические исследования: определение механической прочности, растяжимости.

5. Определение коллагена I, IV типов, фибронектина, цитокератина, виментина – компонентов ВКМ; CD31 – маркера эндотелиальных клеток; CD3, CD16b, CD68 – маркеров воспалительного процесса методом ИГХ анализа с последующей морфометрией.

6. Определение неспецифических системных маркеров воспаления (TNF α , IL1 β , IL4, IL6, IL8, IL10), репарации (IGF1, TGF β 1, PDGF, VEGF A) и коллагена I типа методом ИФА.

7. Гистоморфологический анализ: окраска гематоксилин-эозином, окраска по Массону, окраска толуидиновым синим, окраска DAPI.

8. Исследование биосовместимости и биодegradации децеллюляризованных матриц дермы *in vivo* (подкожная имплантация).

9. Клеточные культуральные работы: исследование морфологии, жизнеспособности, миграционной активности; МТТ-тест, PDT-тест; выделение и фенотипирование фибробластов кожи свиньи.

10. Статистическая обработка проводилась с использованием методов описательной статистики, данные представляли в виде среднего и стандартного отклонения или медианы с первым и третьим квартилем. Значимость различий между показателями оценивали в зависимости от характера распределения данных в выборках, с помощью стандартных критериев значимости: для сравнения независимых групп использовали критерий Манна-Уитни, для зависимых групп – критерий Вилкоксона. Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту:

1. Детергентно-энзиматическая обработка дермы свиньи позволяет получить тканезамещающий материал – децеллюляризированный дермальный матрикс с сохранением компонентов внеклеточного матрикса.

2. Патогенетическим обоснованием использования рецеллюляризованного дермального матрикса для лечения ожоговой раны является его положительные биологические эффекты на процессы эпителизации, коллагеногенеза и ангиогенеза раневой поверхности.

3. Применение децеллюляризованного дермального матрикса эффективно при замещении дефектов соединительной ткани, так как приводит к его полноценной морфофункциональной интеграции.

4. Децеллюляризированный гидрогелевый материал на основе дермы свиньи позволяет создать условия для регенерации ожоговой раны, а именно способствует ранней эпителизации, накоплению цитокератина и снижению ресинтеза коллагена, мобилизации защитно-приспособительных реакций за счет вовлечения медиаторов воспаления и иммуномодуляции.

Степень достоверности и апробации результатов

Диссертационная работа выполнена с применением современных высокотехнологичных методов научного исследования, статистическая обработка данных проведена с помощью программного решения GraphPadPrism (GraphPad

Software Inc, США) и пакета программ Microsoft Office (Microsoft, США), что обеспечило обоснованность и достоверность результатов работы, выводов и рекомендаций.

Основные результаты исследований представлены на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), X Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2020), VIII Международной научной Интернет-конференции «Физико-химическая биология» (Ставрополь, 2020), TERMIS EU 2020 (Манчестер, 2020), XVII научно-практической межрегиональной заочной конференции «Биомедицина и биомоделирование» (Москва, 2021), III Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии» (Анапа, 2021), Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (Сочи, 2021), VII Съезде биохимиков России, X российском симпозиуме «Белки и пептиды», VII съезде физиологов СНГ (Сочи, 2021), 6th International World Congress TERMIS (Маастрихт, 2021), научно-практической конференции с международным участием «БИОХИМИЯ XXI ВЕКА» (Краснодар, 2021), международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Белорусского государственного медицинского университета (Минск, 2021), III Международной конференции «Время научного прогресса» (Волгоград, 2022), 1-ом круглом столе «Новые полимерные и композиционные материалы: наука и бизнес» (Калининград, 2022), Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (Сочи, 2022), IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, 2022), II Международной научно-практической конференции «Клеточные технологии в экспериментальной медицине» (Курск, 2022), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2022), 26-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Пущино, 2023).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебную и методическую работу на кафедры ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, в работу хирургических отделений ГБУЗ «ККБ № 2», ГБУЗ ККБ СМП; ожоговых отделений ГБУЗ «НИИ – ККБ № 1 им. С.В. Очаповского», в научную работу лаборатории разработки и изучения новых технологий лечения заболеваний ГБУЗ «НИИ – ККБ № 1 им. С.В. Очаповского», а также в работу по производству раневых покрытий на предприятие ООО «АБ МЕДИКАЛ» (Приложение Б).

Личный вклад автора состоял в постановке цели и формулировании научных задач, научно-информационном поиске и анализе литературных данных. Участие автора более 85 % в сборе и обработке литературных источников, проведении лабораторных исследований и экспериментов. Самостоятельно проведено обобщение и анализ полученных материалов, статистическая обработка результатов, подготовлены тексты статей, тезисов, описание патентов, а также написан текст диссертации и иллюстративный материал, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Публикации по теме диссертации

Всего по материалам диссертации опубликовано 43 научные работы, в том числе 16 статей – в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 9 статей в журналах, входящих в международные базы данных и системы цитирования Web of Science и/или Scopus; 4 патента (RU) на изобретение; 23 тезиса в материалах российских и международных конференций и форумов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 237 страницах машинописного текста и состоит из введения, 8 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, иллюстрирована 16 таблицами и 80 рисунками. Список литературы содержит 324 источников, из которых 42 отечественных и 282 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие свойства биоматериалов на основе природных полимеров

Биополимеры (природные полимеры) представляют собой класс высокомолекулярных органических соединений, которые синтезируются в метаболических процессах живых систем. Их макромолекулярная структура характеризуется регулярной полимерной цепью, состоящей из гетерогенных мономерных звеньев, включающих: α -аминокислотные остатки, моносахариды, нуклеотиды, сложноэфирные фрагменты. Данные структурные единицы ковалентно ассоциированы посредством стабильных химических связей, что приводит к формированию следующих макромолекулярных комплексов: полипептидных структур, полисахаридных комплексов, полифенольных соединений, полиэфирных макромолекул. Каждый из указанных типов биополимеров характеризуется уникальной конформационной организацией и специфическими функциональными свойствами. Различают биополимеры растительного (альгинаты, крахмал, целлюлоза, натуральный каучук, пектины), животного (коллаген, гиалуроновая кислота, хитозан), грибного (хитин) и бактериального происхождения (бактериальная целлюлоза, экзополисахариды). Биополимерные материалы, используемые для закрытия раневых поверхностей или в качестве имплантируемых матриц, имеют преимущество перед синтетическими повязками благодаря их биосовместимости, биоразлагаемости, меньшей антигенности и способности к биоинтеграции [Sahana T.G. et al., 2018; Graça M.F. et al., 2020; Edo G.I. et al., 2025].

Современные медицинские повязки представляют собой композитные структуры, интегрирующие синтетические и биологические полимеры, что обеспечивает комплексное воздействие на раневой процесс. Оптимальные

перевязочные материалы характеризуются следующими функциональными характеристиками:

- обеспечение прямого контакта с раневой поверхностью;
- создание барьерного слоя против патогенной микрофлоры;
- минимизация инвазивного вмешательства;
- регуляция гемостаза;
- стимуляция репаративных процессов.

Терапевтическая эффективность достигается за счет формирования оптимальной микроклиматической среды и реализации контролируемой доставки антимикробных агентов. Существующие ограничения современных раневых покрытий включают: недостаточную биосовместимость, приводящую к травматизации при удалении повязки; нарушение газообмена вследствие низкой газопроницаемости; экономическую неэффективность из-за высокой стоимости; потребность в частой замене; недостаточную барьерную функцию; неэффективную регуляцию гемостаза. Данные факторы определяют необходимость дальнейшего совершенствования материалов для оптимизации процессов репаративной регенерации и повышения качества оказания медицинской помощи [Buyana V. et al., 2020].

Коллаген, целлюлоза, хитозан, альгинат, гиалуроновая кислота (ГК), фукоидан, каррагин являются наиболее широко используемыми биополимерами, которые обладают как антибактериальными, противовоспалительными, пролиферативными, так и другими биологическими эффектами на определенные клетки, играя тем самым ключевую роль в процессе заживления (Таблица 1).

Современные биоинженерные стратегии, привели к созданию из этих биополимеров материалов нового поколения для лечения раневых процессов. Физические и химические свойства биополимеров позволяют легко превращать их в гидрогели, пластины, смешивать с другими полимерами, для обеспечения повышенной механической прочности, биомиметических свойств, пористости и ряда других характеристик, необходимых для разработки раневых покрытий и хирургических имплантов [Nandhini J. et al., 2024]. В частности, хитозан обладает

рядом таких полезных свойств, как биосовместимость, биodeградация и относительная простота химической модификации по аминогруппе, однако материалы из хитозана обладают относительно низкими механическими свойствами, а формование изделий осуществляется из растворов, либо лиофилизацией, либо сшивкой. Решение этих недостатков может быть осуществлено путем совмещения полисахарида с термопластичными полиэфирами, такими как поликапролактон и/или полилактид. Вместе с тем, недостатками полиэфиров являются недостаточная клеточная адгезия, ввиду гидрофобности и образование кислот при их гидролизе в организме [Sanchez-Cid P. et al., 2022].

Таблица 1 – Разнообразие биополимеров и их биологическая роль в процессах заживления

Источник сырья	Биополимер	Биологический эффект	Ссылка
Плотная соединительная и хрящевая ткань животных	коллаген	индукция пролиферации фибробластов, хемотаксический фактор для макрофагов	[Das A. et al., 2019]
Клеточные стенки растений и бактерий	целлюлоза	поддержание влажной среды, впитывание раневого экссудата	[Kim M.H. et al., 2018]
Бурые водоросли	альгинаты, альгиновая кислота	активация моноцитов, индукция пролиферации и миграции фибробластов	[Aderibigbe B.A. et al., 2018]
Соединительная ткань животных	гиалуроновая кислота	индукция пролиферации и миграции фибробластов и кератиноцитов, противовоспалительный	[Marinho A. et al., 2021]
Экзоскелет ракообразных, моллюсков, насекомых; клеточная стенка грибов	хитозан	индукция пролиферации и миграции фибробластов и кератиноцитов продукции цитокинов; поляризация дендритных клеток и макрофагов	[Ghattas M. et al., 2025]
Бурые водоросли	фукоидан	ангиогенный, индукция пролиферации фибробластов и кератиноцитов	[Zeng H.Y. et al., 2018]

1.2 Характеристика коллагенов и их роль в репарации

Коллагены являются достаточно распространенными белками у всех млекопитающих, так как они являются основными компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ). Коллагены составляют около 1/3 от всего белка в организме человека и примерно 3/4 сухого веса кожи. Из различных типов коллагена лишь немногие используются в производстве биоматериалов на основе коллагена. На сегодняшний день идентифицировано 29 различных типов коллагена (тип XXIX принадлежит к классу коллагенов, содержащих домены фактора фон Виллебранда типа А 11), и все они имеют тройную спиральную третичную структуру, кроме коллагенов типа I, II, III, V и XI, которые имеют фибриллярную четвертичную структуру [Das A. et al., 2019; Khare E. et al., 2022; Gahlawat S. et al., 2024].

Каждая полипептидная цепь в тройной спирали коллагена состоит примерно из тысячи аминокислотных остатков. Эти цепи, выстроенные параллельно и закрученные в левозакрученную полипролиновую спираль II типа (РРII), закручиваются друг вокруг друга, образуя правозакрученную тройную спираль, которая стабилизируется межцепочечными водородными связями и внутрицепочечными $n \rightarrow \pi^*$ взаимодействиями [Miller E.J., 2018; Das A. et al., 2019].

В фибриллярном коллагене тройные спирали тропоколлагена собираются в фибриллы, которые агрегируются, образуя волокна. Эти образующие фибриллы коллагены имеют большие участки гомологичных последовательностей и представляют собой наиболее часто используемые формы биоматериалов на основе коллагена для заживления ран и в целях тканевой инженерии [Wang Y. et al., 2023].

Коллаген типа I является наиболее распространенным типом у животных и наиболее часто используется в медицине. У животных отдельные тройные спирали коллагена (тропоколлаген) образуют макроскопические волокна и сети в тканях, костях и базальной мембране [Aumailley M. et al., 2021; Gahlawat S. et al., 2024]. В большинстве мягких и твердых соединительных тканей коллагеновые фибриллы и

их сети составляют большую часть ВКМ и образуют высокоорганизованный трехмерный каркас, окружающий клетки. Коллаген также играет доминирующую роль в поддержании биологической и структурной целостности внеклеточного матрикса и является динамичным и гибким материалом, который подвергается постоянному ремоделированию для регуляции функционирования клеток и тканей [Khare E. et al., 2022].

Как и положено первичному структурному белку в организме, коллаген устойчив к протеолизу. Хотя пептидные связи в тройной спирали отделены от ферментативных активных центров, одноцепочечные участки могут расщепляться матриксными металлопротеиназами (ММП). В частности, коллагены типа I–III гидролизуются ММП-1, ММП-2, ММП-8, ММП-13 и ММП-14, которые представляют собой коллагеназы. Образовавшиеся фрагменты коллагена далее расщепляются желатиназами и неспецифическими протеазами. Другие ММП, такие как ММП-3 и ММП-9, способны связываться с коллагеном I типа, но не участвуют в его деградации [A. Jabłońska-Trypuć et al., 2016; S.T. Diniz-Fernandes et al., 2018; S.W. Manka et al., 2019].

Взаимодействия клетка-коллаген опосредованы четырьмя различными типами белков:

- рецепторами (такими как гликопротеин VI), которые распознают пептидные последовательности, содержащие единицу Pro-Hyp-Gly,
- рецепторами семейства интегринов и рецептором домена дискоидина 1 и 2, которые связываются с последовательностью Phe-Hyp-Gly,
- рецепторами интегринового типа, которые распознают криптические мотивы внутри коллагена,
- рецепторами со сродством к неколлагеновым доменам [Salvatore L. et al., 2021; Roth J. et al., 2023].

Коллаген и фрагменты его протеолитического расщепления (например, желатин) участвуют в восстановлении тканей. Коллаген I типа является наиболее важным компонентом, участвующим в восстановлении тканей [Будкевич Л.И. и соавт., 2018]. Во время воспалительной фазы после травмы высвобождается

несколько протеолитических ферментов, которые расщепляют коллаген на более мелкие фрагменты. Аминокислотные последовательности RGD этих фрагментов являются хемотаксическими факторами для макрофагов и митогенными для фибробластов, вызывая образование грануляционной ткани и пролиферацию [Kumai J. et al., 2019]. Интегрины являются рецепторами белков внеклеточного матрикса и контролируют разнообразные биологические функции, такие как клеточная адгезия, миграция, пролиферация, дифференцировка и жизнеспособность. Интегрины представляют собой гетеродимеры, состоящие из α - и β -субъединиц, и на данный момент идентифицировано 24 подтипа. С момента своего открытия мотив Arg-Gly-Asp (RGD) использовался в широком спектре исследований в качестве стандарта пептидов клеточной адгезии, связывающих интегрины. Подтипы интегринов, с которыми связывается RGD, включают $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$, $\alpha \nu\beta 6$, $\alpha \nu\beta 8$ и $\alpha 11\beta 3$. Примечательно, что сродство и селективность к различным подтипам интегринов различаются в зависимости от соседних с RGD последовательностей и конформации пептидов. Например, циклический пептид RGD, названный циленгитидом, проявляет гораздо более высокое сродство к интегринам $\alpha \nu\beta 3$ и $\alpha \nu\beta 5$, чем линейные пептиды RGD. Ожидается, что соединения на основе RGD будут использоваться в качестве лигандов интегринов для разработки лекарств с адресной доставкой лекарств и в тканевой инженерии. Многие белки (такие как декорин и ламинин), которые содержат аминокислотные последовательности RGD или аналогичные последовательности, распознающие интегрины, могут связываться как с коллагеном, так и с интегринными, способствуя клеточной адгезии и пролиферации [Yamada Y. et al., 2023; Jadhav K. et al., 2025]

Высокая биосовместимость и внутренняя биоразлагаемость эндогенными коллагеназами делает экзогенный коллаген идеальным для использования в биомедицинских целях. Некоторые из продуктов деградации коллагена типов I–III, в том числе экзогенные, индуцируют хемотаксис фибробластов, и считается, что такая деградация способствует восстановлению структуры и функциональности тканей. Точно так же в эпителии кератиноциты взаимодействуют с желатином и

подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу, тем самым способствуя миграции, необходимой для восстановления тканей [Tahri S. et al., 2023]. Баланс между синтезом и деградацией коллагена является ключевым фактором, определяющим судьбу заживления. При хронических ранах скорость распада коллагена превышает скорость синтеза из-за нарушения соотношения ММП/ТИМП (тканевой ингибитор металлопротеиназ), из-за чего новообразованные коллагены расщепляются на фрагменты, продлевая фазу воспаления. Добавление экзогенного коллагена на раневую поверхность может изменить процесс заживления, так как желатин, образующийся в результате расщепления этого коллагена, в дополнение к нативному коллагену, деактивирует избыток ММП и индуцирует пролиферацию, завершая фазу воспаления [Singh D. et al., 2023].

Биоразлагаемый и нетоксичный экзогенный коллаген более биосовместим, чем другие природные полимеры, и лишь слабо антигенен [Sionkowska A. et al., 2021]. Основными источниками коллагена являются кожа и сухожилия крупного рогатого скота, свиней, слизистая мочевого пузыря и кишечника. Коллагены используются в двух формах; либо в виде децеллюляризованного коллагенового матрикса, сохраняющего нативные свойства ВКМ, либо в виде коллагена, полученного путем выделения, очистки и деполимеризации [Pillai N.S. et al., 2024; Tabatabai T.S. et al., 2024]. Скорость деградации экзогенного коллагена может регулироваться с помощью перекрестного сшивания химическими, физическими или ферментативными способами [Marzec E., 2018; Qiao S. et al., 2024]. Физиологическое действие коллагена может быть улучшено путем модификации поверхности, деполимеризации, добавления противовоспалительных и антимикробных веществ и т.д. Улучшение физических, механических и функциональных свойств биополимеров может быть достигнуто с помощью электроспиннинга, создания скаффолдов и комбинаций с другими молекулами лекарств [Wang F. et al., 2020].

ПЭГилированный оксид графена и кварцетин, включенные в бесклеточный дермальный коллагеновый матрикс, показали дифференцировку мезенхимальных

стволовых клеток в адипогенные и остеобластные клетки, способствуя клеточной адгезии, отложению коллагена, ангиогенезу в модели диабетической раны [Chu J. et al., 2018]. Коллаген и сульфатированный конъюгат ксилорамноглиуронана, полученные с помощью электроспиннинга показали, что коллагеновое выравнивание близко имитирует нативную дерму с повышенной прочностью на растяжение, способствующей пролиферации фибробластов [Kang L. et al., 2018].

Ориентация пучков коллагена может играть важную роль в определении процесса восстановления тканей. Нановолоконный каркас коллагена, уложенный в виде корзинчатого переплетения, аналогичного анатомическим особенностям нормальной кожи, усиливал процесс заживления за счет уменьшения воспаления, ускорения миграции фибробластов и кератиноцитов и стимулирования ангиогенеза [Sun L. et al., 2018; Gardeazabal L. et al., 2024]. Паттерн электропрядения коллагена и поликапролактона показал ускоренную направленную миграцию и пролиферацию фибробластов [Kim J.I. et al., 2018].

Материалы для заживления ран на основе коллагена в виде губок, гидрогелей, пленок, мембран, порошка и лиофилизированных листов коммерчески доступны под разными торговыми названиями. Чаще всего используются; Biopad, Helix bioactive collagen, Stimulen, Biostep, Citrix, Cellerate, Cutimed, Derma Col, Fibracol и т.д. Активный компонент этих продуктов варьируется, и использование соответствующих продуктов для конкретных типов ран влияет на терапевтический результат [Varaprasad K. et al., 2017].

1.3 Особенности процессов регенерации кожи при локальном воздействии биополимерными материалами

Травмы кожи представляют серьезный риск для здоровья человека, поскольку такие функции кожи как, теплоизоляция, задержка жидкости в организме и защита от экзогенных патогенов зависят от повреждений кожи [Поляков А.В. и соавт., 2019; И.С. Кудряшова и соавт., 2021].

Процесс эндогенного заживления начинается почти мгновенно, что обеспечивает достаточно быстрое физиологическое заживление раны. Кровотечение останавливается в течение нескольких минут за счет агрегации тромбоцитов и образования фибриновых сгустков. Этот сгусток останавливает кровоток, уменьшает последующую кровопотерю и действует как каркас для миграции иммунных и резидентных клеток кожи. Гистамин, брадикинин и лейкотриены, вырабатываемые близлежащими тучными клетками, притягивают иммунные клетки и способствуют расширению кровеносных сосудов. Нейтрофилы активируются первыми после повреждения кожи и выделяют хемоаттрактанты, включая липидные медиаторы, перекись водорода, молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), хемокины. Активированные нейтрофилы образуют нейтрофильные внеклеточные ловушки (протеолитический гидролиз и окислительный взрыв, при котором выделяются активные формы кислорода). Макрофаги фагоцитируют нейтрофилы, которые подверглись обширному апоптозу на конечных стадиях воспаления. Макрофаги (также называемые M1-фенотипом) играют важную роль на ранних стадиях заживления ран, поскольку они способствуют ангиогенезу и фиброплазии, синтезируют оксид азота и переводят рану из воспалительной в пролиферативную фазу. Они продуцируют провоспалительные цитокины, включая $TNF\alpha$, $IL1\beta$ и $IL6$. Уменьшение воспаления и восстановление гомеостаза тканей становится возможным благодаря способности макрофагов развивать противовоспалительные свойства и поддерживать заживление тканей при развитии противовоспалительного фенотипа M2. В ответ на $IL4$ и $IL13$ или апоптотические нейтрофилы M2-макрофаги продуцируют тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста- β ($TGF\beta$), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF1) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), которые стимулируют пролиферацию кератиноцитов и фибробластов. Дендритные клетки представляют антигены, которые стимулируют Т-клеточный ответ. Хелперные Т-клетки 1 (Th1), которые оказывают провоспалительное действие во время острой воспалительной фазы раны, в первую очередь стимулируются $IFN\ \gamma$. Т-клетки становятся все более

и более поляризованными на протяжении всей воспалительной фазы, которая в конечном итоге переходит в ответ Th2. Эти клетки продуцируют IL4, IL5, IL10 и IL13, которые являются противовоспалительными, а также имеют значительные профибротические эффекты. Клетки Th17 вызывают иммунный ответ, который перекрывается с иммунными ответами Th1 и Th2, способствуя фолликулярному неогенезу и провоспалительным эффектам посредством рекрутирования нейтрофилов и реэпителизации раны. Более того, было обнаружено, что регуляторные Т-клетки (Treg) также способствуют гомеостазу тканей и регенерации после их повреждения за счет уменьшения чрезмерного воспаления [Оразов М.Р. и соавт., 2017; Russell D.G. et al., 2019; Hong Y.-K. et al., 2023; Zhu M. et al., 2023].

По мере сокращения площади раны грануляционная ткань трансформируется в более стабильный внеклеточный матрикс. Общая продолжительность процесса заживления зависит от возраста и состояния здоровья пациента (отрицательными факторами являются, например, диабет или венозная недостаточность), а также от внешних факторов, таких как наличие инородных тел или инфекций в ране. Закрывание острых ран происходит в соответствии с описанным выше процессом и заканчивается в течение 8–12 недель [Легонькова О.А., 2016; Абдуллаева Ж.Д. и соавт., 2024]. Напротив, хронические раны застывают в фазе воспаления, сопровождаясь значительным экссудатом, тяжелыми инфекциями, болью и некрозом тканей. В результате для полного заживления хронических ран может потребоваться несколько месяцев или лет.

Раневая поверхность при хронических трофических язвах, сахарном диабете и контактных дерматитах характеризуются дефектным ремоделированием ВКМ в результате длительного воспалительного процесса, что препятствует нормальной реэпителизации. Неспособность эпидермальных клеток к нормальной миграции по дну раневой зоны приводит к развитию гиперпролиферирующих клеток на границе раны. Одной из причин является гиперэкспрессия компонентов ВКМ – фибронектина и тромбоспондина, что приводит к клеточной дисфункции и дисрегуляции, в частности, к ингибированию апоптоза фибробластов и

кератиноцитов [Иванова В.П. и соавт., 2017; Дуданов И.П. и соавт., 2022]. Также описаны различия в нарушении регуляции репарации в отношении острых и хронических раневых процессов. На первой стадии раневого процесса в репарации участвуют клетки иммунной системы – макрофаги, которые активно продуцируют факторы роста и цитокины, способствующие переходу раны в стадию пролиферации за счет усиления синтеза коллагена и организации различных компонентов ВКМ. В дальнейшем происходит снижение количества макрофагов и миграция кератиноцитов на дно раны, а также взаимодействие между ММП, интегринами, противовоспалительными цитокинами, что приводит к усилению синтеза основных компонентов ВКМ. Репарация опосредована действием противовоспалительных цитокинов, которые приводят к физиологическому снижению концентрации ММП, способных к разрушению факторов роста и компонентов ВКМ [Чупрынин Г.П. и соавт., 2023].

ММП относятся к семейству цинкзависимых эндопептидаз, которые обеспечивают деградацию белковых компонентов ВКМ и базальных мембран. Данные протеазы подразделяют на 4 основных подсемейства: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, мембраносвязанные ММП. Коллагеназы участвуют в деградации фибриллярных коллагенов, к желатиназам относят ММП-2 (желатиназу А) и ММП-9 (желатиназу В), способных расщеплять коллаген IV и V типа, эластин, входящий в состав базальных мембран, денатурированный коллаген и ряд белков соединительнотканного ВКМ. Таким образом, концентрация ММП при заживлении раневых дефектов способна влиять на скорость перестройки ВКМ и на процессы синтеза коллагена всех типов. В частности, высокий уровень ММП-9 в раневом инфильтрате является маркером острого воспаления и дефектного заживления ран при некоторых патологиях. Так установлено, что отношение ММП-9 к тканевому ингибитору металлопротеазы-1 (TIMP-1) в экссудате снижается в ходе эффективного лечения раневых дефектов у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа в отличие от группы лиц с плохо заживающими язвенными дефектами и нормальным углеводным обменом, у которых этот показатель остается повышенным [Ермолова Д.А. и соавт., 2017; Муромцева Е.В. и соавт., 2022;

Kandhwal M. et al., 2022; Molière S. et al., 2023].

Повреждение коллагена I типа является фактором, индуцирующим продукцию цитокинов лейкоцитами, что обеспечивает хемотаксис необходимых типов клеток в очаг поражения. Фибронектин посредством интегринов связывает клетки, обеспечивая их депонирование в области раны, помимо этого молекулы фибронектина, полимеризуясь, меняют свою конформацию, что сопряжено с потерей экспрессии интегринов, а также других молекул, опосредующих регуляторную активность фибронектина в отношении формирования клеточно-матриксных адгезионных контактов, передачи сигнала клеткам [Shoari A. et al., 2025]. Ламинин участвует в неоангиогенезе, ламинин-5 восстанавливает целостность базальной мембраны в области дермоэпидермального соединения [Yu Y. et al., 2023]. Гиалуроновая кислота способствует удержанию воды во внеклеточном матриксе, а также вместе с другими ГАГ функционирует как сигнальная молекула, регулируя синтез и секрецию фибробластами и эндотелиальными клетками необходимых для дальнейшего восстановления ткани факторов роста и цитокинов [Abatangelo G. et al., 2020; Halper J., 2021].

Имплантированные биоматериалы также запускают иммунный ответ, начиная с адсорбции белков на поверхности биоматериала, что привлекает макрофаги и другие иммунные клетки. Со временем макрофаги могут либо снизить воспаление и способствовать заживлению, либо вызвать фиброзную инкапсуляцию биоматериала, что во многом зависит от фенотипа макрофагов, поэтому модуляция взаимодействия макрофагов с биоматериалом имеет решающее значение для улучшения интеграции имплантата. На ранних стадиях обычного восстановления тканей макрофаги поляризуются к фенотипу M1 (примерно через 1-3 дня) и переходят к фенотипу M2 на более поздних стадиях (примерно через 4-7 дней). Однако длительное доминирование макрофагов M1 может привести к чрезмерному воспалению, которое препятствует регенерации тканей. Макрофаги M1 известны своей высокой экспрессией VEGF, способствующего ангиогенезу, в то время как макрофаги M2 в первую очередь экспрессируют PDGF-BB, стабилизируя рост сосудов. Поскольку васкуляризация необходима для восстановления тканей,

поддержание умеренного и регулируемого воспаления имеет решающее значение, поэтому для успешной регенерации тканей необходим своевременный переход от макрофагов M1 к макрофагам M2 [Jackson J. et al., 2025].

Децеллюляризованные скаффолды, имитирующие нативный ВКМ, обладают противовоспалительным действием и приводят к поляризации M2 макрофагов, поддерживают клеточную адгезию, миграцию и дифференцировку и способствуют заживлению тканей, сохраняя FGF-1 и FGF-2, усиливая поляризацию макрофагов в направлении фенотипа M2 [Hong J.Y. et al., 2020].

Процесс восстановления тканей контролируется взаимодействием факторов роста со специфическими рецепторами клеточной поверхности; эти взаимодействия стимулируют миграцию клеток, запускают ангиогенез, эпителизацию и способствуют образованию матрикса и ремоделированию поврежденного участка. Было исследовано несколько семейств факторов роста для заживления ран, таких как эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор роста бета ($TGF\beta$) и фактор роста тромбоцитов (PDGF). Также появляются данные о роли фактора 1, полученного из стромальных клеток (SDF-1), в регуляции миграции и пролиферации эпидермальных клеток во время заживления ран. EGF секретируется тромбоцитами, макрофагами и фибробластами и играет важную роль в эпителизации. FGF вырабатывается кератиноцитами, тучными клетками, фибробластами, эндотелиальными клетками, гладкомышечными клетками и хондроцитами; он способствует образованию грануляционной ткани, эпителизации и образованию ВКМ. Тромбоциты, кератиноциты, макрофаги, лимфоциты и фибробласты продуцируют $TGF\beta$, который играет решающую роль в воспалении, образовании грануляционной ткани, эпителизации, а также образовании и ремоделировании матрикса. PDGF вырабатывается тромбоцитами, кератиноцитами, макрофагами, эндотелиальными клетками и фибробластами и также играет роль на каждом этапе заживления ран [Tottoli E.M. et al., 2020].

Известно, что как PDGF, так и $TGF\beta$ ускоряют заживление ран *in vivo*, но посредством специфических механизмов. В частности, PDGF является

хемоаттрактантом для макрофагов и фибробластов и стимулирует экспрессию ими факторов роста, включая TGF β . Хотя было показано, что местное применение факторов роста ускоряет заживление ран, существуют ограничения для их широкого терапевтического применения, так как факторы быстро разрушаются под действием протеолитических ферментов, поэтому многие исследования направлены на поиск правильной комбинации биоматериалов и факторов роста, чтобы разработать подходящий носитель для сохранения их целостности и стабильности [Tottoli E.M. et al., 2020].

Таким образом, последние исследования в области тканевой инженерии и регенеративной медицины привели к лучшему пониманию процессов заживления ран и разработке различных методов восстановления и регенерации кожи. Перевязка ран с использованием биологических материалов, клеточных компонентов и факторов роста представляет значительный интерес для исследований [Petrosyan A. et al., 2016; Дремина Н.Н. и соавт., 2021; Zhang M. et al., 2023]. На сегодняшний день известно несколько типов искусственных каркасов, которые получены различными методами [Жуковский В.А., 2016; Avishai E. et al., 2017]. Идеальный искусственный каркас должен обладать высокой биосовместимостью, хорошей биоразлагаемостью и механическими свойствами, подходящим размером пор и высокой пористостью [Farahani M. et al., 2021; Саганов В.П. и соавт., 2022].

1.4 Биоматериалы на основе компонентов внеклеточного матрикса

В настоящее время растет потребность в новых материалах для восстановления кожных дефектов, вызванных травмами, ожогами, инфекциями и системными патологиями [Mao C. et al., 2017; Xi Y. et al., 2018; Coenen A.M. et al., 2018; Rathna R.P. et al., 2024]. Современные методы лечения дефектов кожи включают аутологичные кожные трансплантаты, аллотрансплантаты, применение биологических и искусственных каркасов [Wang C. et al., 2019; Шевлюк Н.Н. и соавт., 2020; Wen Q. et al., 2020; Kolimi P. et al., 2022]. Однако аутоотрансплантаты

вызывают длительные послеоперационные осложнения, как в области дефекта, так и в месте донорства. Аллотрансплантаты подвержены риску вирусной инфекции, передачи заболеваний и иммунного отторжения [Морозов А.М. и соавт., 2020]. В последние годы искусственные каркасы стали альтернативной методикой лечения, так как они не имеют недостатков аутотрансплантатов и аллотрансплантатов. Ткани животного происхождения тысячелетиями использовались для прикрытия обширных ран. Их неограниченная доступность – одно из преимуществ использования гетерологичных матриц. Кожа свиньи является одной из нескольких исследуемых гетерологичных матриц, в основном из-за ее высокого сходства с кожей человека и ее биосовместимости, механической устойчивости и низкой антигенности [Ventura R.D. et al., 2019; Ventura R.D. et al., 2020]. Свиная кожа является хорошо подходящей временной повязкой на рану при ожогах второй степени и обычно способствует заживлению без рубцов со средним временем заживления около 10 дней [Chua A.W.C. et al., 2016; Rahimnejad M. et al., 2017].

Биоматериалы на основе природного коллагена можно разделить на две категории в зависимости от степени их очистки: децеллюляризованные коллагеновые матрицы, сохраняющие исходные свойства ткани и структуру ВКМ; и более рафинированные каркасы, полученные путем экстракции, очистки и полимеризации коллагена [Nowacki M. et al., 2017; Peng Y. et al., 2022; Neishabouri A. et al., 2022]. Децеллюляризация коллагена влечет за собой сочетание физических (мгновенная заморозка или высокое давление), химических (кислотная или щелочная обработка, хелатирование с ЭДТА или обработка детергентами или растворами с высокой осмолярностью) и ферментативных (например, расщепление трипсином) методов для получения коллагена [Yu X. et al., 2016].

Коллаген в этой форме часто используется в качестве шовного материала, сердечных клапанов, протезов связок и скаффолдов. Создание каркасов на основе коллагена включает добавление к растворам коллагена других биополимеров, таких как эластин, ГАГ и хитозан [Zhu D. et al., 2017; Costa F. et al., 2018; Sanchez-Cid P. et al., 2022]

Производство таких биоматериалов требует выделения и очистки коллагена

из натуральных тканей. Однако растворению коллагена препятствует его низкая растворимость из-за многочисленных ковалентных поперечных связей. Нативный коллаген нерастворим в органических растворителях, но может растворяться в водных растворах, в зависимости от существующих поперечных связей. Наиболее распространенные растворители включают нейтральный солевой раствор (0,15–0,20 М NaCl), разбавленный раствор кислоты (0,5 М уксусная кислота) или раствор протеолитических ферментов, поскольку трехспиральный домен коллагена устойчив к протеазам, таким как пепсин, химотрипсин или фицин при температуре ниже ~ 20 °С. Однако пепсин при весовом соотношении фермента к сухой ткани 1 : 10 в разбавленной уксусной кислоте обеспечивает среду, в которой коллаген может легко набухать и растворяться [Manou D. et al., 2019; Alberts A. et al., 2025; Ren Y. et al., 2025]. Создание искусственных каркасов, имитирующих внеклеточный матрикс, является одним из наиболее важных шагов в тканевой инженерии. Комбинация различных типов материалов для естественной тканевой инженерии в первую очередь предназначена для получения искусственных каркасов, максимально похожих на ВКМ [Meleshina A. et al., 2017; Milan P.V. et al., 2020; Shalaby M. et al., 2020; Farag M.M., 2023; Kusnadi K. et al., 2024]. В частности, был разработан и применен комплекс коллагена и хитозана, сшитого глутаровым альдегидом, имитирующий внеклеточный матрикс [Grabska-Zielińska S. et al., 2022]. Однако остатки сшивающего агента в каркасе являются источником токсичных побочных продуктов, таких как мономер глутаральдегида и гемиацеталь, которые влияют на рост эндотелиальных клеток. Показано, что глутаровый альдегид не имеет преимуществ во многих методах лечения тканеинженерными каркасами. Также был разработан каркас, сконструированный из трех основных компонентов внеклеточного матрикса кожи человека, коллагена, хондроитинсульфата и гиалуроновой кислоты, которые ближе по составу к внеклеточному матриксу дермы. В данном исследовании коллаген экстрагировали из кожи кислотным гидролизом, каркас сшивался гидрохлоридом 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, который также имел определенную степень токсичности [Murphy C.A. et al., 2024].

Желатин является одним из биополимеров, который обычно используется при

разработке раневых покрытий и в области тканевой инженерии, так как он является естественным имитатором внеклеточного матрикса тканей и органов человека. Свойства желатина, которые привлекли внимание большинства биомедицинских исследований, включают превосходную биосовместимость, хорошую биоразлагаемость, взаимодействие с клетками, неиммуногенность, а также его высокую технологичность, доступность и экономическую эффективность. Довольно низкая антигенность желатина также делает его хорошо зарекомендовавшим себя биополимером, используемым в многочисленных биологических приложениях. Однако желатин является гидрофильным белком и обычно требуется химическая сшивка для улучшения его механических характеристик и стабильности [Zheng Y. et al., 2018; Gaspar- Pintilieşcu A. et al., 2019; Ndlovu S.P. et al., 2021; Cao H. et al., 2024].

Дерма обладает высокой физической прочностью и гибкостью, а также обширной сосудистой сетью, в 1913 году впервые была подтверждена возможность её применения в качестве алло- и аутографтов, так как она ингибировала образование грануляционной ткани и образование рубцов [Omranifard M., 2014].

Децеллюляризованные (ацеллюлярные) матриксы представляют собой лоскут бесклеточной ткани, полученный из кожи животных или человека, который содержит все компоненты ВКМ и сохраняет соответствующую структуру. На сегодняшний день эксперименты на животных и первоначальные клинические испытания показали, что децеллюляризованные дермальные матриксы (ДДМ), соответствующие по микроструктуре ВКМ дермы, можно эффективно применять для восстановления дефектов кожи и соединительных тканей и с 1990-х годов ДДМ производятся в виде различных коммерческих продуктов [Cui H. et al., 2019].

Перспективным направлением в лечении ожогов является применение децеллюляризованной трупной кожи. Основными преимуществами такого биологического материала являются состав и организация используемой дермы, аналогичные собственной дерме пациента, позволяющие использовать ее как временное биологическое покрытие [Сачков А.В. и соавт., 2018]. В частности, регенеративная тканевая матрица AlloDerm™ была разработана корпорацией LifeCell в 1990-х годах; этот материал получен из аллогенной дермы трупа

человека, которая хранится в банках тканей в соответствии со стандартами, установленными Американской ассоциацией банков тканей [Petrie K. et al., 2022; Dueñas-Rodríguez B. et al., 2023]. Свежую человеческую дерму децеллюляризируют на вошере в диспазе и Тритоне X-100 или додецилсульфате натрия, не допуская нарушения пучков коллагена и базальных мембран, а затем лиофилизируют для дальнейшего применения. Было доказано, что AlloDerm™ способствует клеточной адгезии *in vitro*, хотя клетки на AlloDerm™ распределяются в основном на внешней поверхности. AlloDerm был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для замещения поврежденной и несостоятельной кожи, например, как покрытие донорских участков, таких как радиальный лоскут предплечья, в виде листового трансплантата без покрывающего его расщепленного трансплантата. После нанесения на раневое ложе AlloDerm™ происходит быстрая инфильтрация клетками из области шва через 6 недель, в то время как центральные области имплантированного материала остаются свободными от клеток более 12 недель.

На сегодняшний день AlloDerm™ вместе с аутологичными кожными трансплантатами широко применяются для покрытия ожоговых ран, тем самым уменьшая последующее рубцевание. Известно, что AlloDerm™ применяется для восстановления гортани, влагалища и других дефектов мягких тканей, также для покрытия протезов и восстановления поврежденных стенок таза и брюшной полости. Широкие перспективы продемонстрировало применение ДДМ в качестве заменителя кожи после рецеллюляризации с помощью аллогенных кератиноцитов, стволовых клеток, полученных из жировой ткани, фибробластов и эндотелиальных клеток пупочной вены человека [Petrie K. et al., 2022].

Коммерчески доступны и другие матриксы, в том числе продукты децеллюляризованной дермы, полученные из свиной дермы, такие как Medeor® Matrix, Permacol™, Strattice™ и Gelfoam™ [Peng W. et al., 2022; Dilek Ö.F. et al., 2024].

Получение ДДМ Strattice™ состоит из трех этапов: деэпидермизация с помощью NaCl, содержащего Triton X-100, децеллюляризация с помощью

дезоксихолата натрия и удаление ДНК с помощью ДНКазы, показано, что данный матрикс может обеспечивать сигналы хемотаксиса для облегчения агрегации клеток и ингибировать индукцию клеточного апоптоза [Mulier K.E. et al., 2011]. Medeor® Matrix – еще один продукт децеллюляризованной свиной дермы, производимый корпорацией Kensey Nash с использованием запатентованного процесса OPTRIX™, который включает циклы обработки органическими растворителями, детергентами, растворами солей и ферментов. Разница между Strattice™ и Medeor® Matrix заключается в том, что последний сохраняет больше фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и трансформирующего фактора роста TGFβ. Кроме того, кондиционированная среда от Medeor® Matrix положительно влияет на пролиферацию и миграцию клеток. Более того, этот материал демонстрирует повышенную адгезию к клеткам по сравнению с другими продуктами децеллюляризованной дермы. Благодаря оптимальному сшиванию хирургические имплантаты Permacol™ обладают длительной структурной стабильностью, что обеспечивает целостность имплантированного трансплантата во время процесса заживления ран *in vivo*. Кроме того, Permacol™ обладает высокой прочностью и используется при пластике вентральной грыжи и реконструкции брюшной стенки, однако использование сшивающих реагентов может способствовать плохой адгезии клеток [Niespielak P. et al., 2021; Gossetti F. et al., 2021; Kharbikar B.N. et al., 2022].

Таким образом, децеллюляризованная дерма обладает микроструктурой ВКМ дермы и используется в качестве сырья для нескольких коммерческих медицинских хирургических имплантов. Однако её применимость ограничена плохой проникающей способностью клеток. Кроме того, имплантация дермального каркаса, полученного различными методами децеллюляризации, может приводить к ремоделированию M1-подобного фенотипа макрофагов, который является провоспалительным [Mimura K. et al., 2016].

В последние годы наблюдается рост интереса к такой группе материалов, как гидрогели, которые обладают высокой биосовместимостью и способностью имитировать высокогидратированные ткани организма. В состав гидрогелей

возможно включение клеток, регуляторных пептидов и факторов роста, что в перспективе может обеспечить этому классу материалов лидирующие позиции на рынке костно-дермальных материалов [Xu W. et al., 2020; Zheng M. et al., 2023].

Спектр средств на гидрогелевой основе, предназначенных для коррекции эстетических недостатков и лечения ран, достаточно велик и постоянно пополняется. Жидкая или гель-форма ВКМ может дополнительно расширить клиническое использование скаффолдов дермы, позволяя материалу посредством минимально инвазивных методов доставляться на необходимые участки. Солюбилизированный ВКМ может быть внесен катетером или иглоуправляемыми хирургическими методами на различные по строению анатомические участки [Spang M.T. et al., 2018; Lohrasbi S. et al., 2020; Feng W. et al., 2023]. При этом в процессе обработки дермы должны быть минимизировать этапы, которые могут уничтожить активные факторы роста и низкомолекулярные пептиды, имеющиеся в нативном ВКМ, для сохранения биологической активности гелевой формы. Исследования показали, что может быть получена гель-форма из подслизистой тонкой кишки свиньи, которая способна поддерживать рост и дифференцировку клеток *in vitro*, но для получения этой гель формы необходим агрессивный процесс очистки коллагена, который, вероятно, приведет к потере биоактивных молекул [Chen X.Y. et al., 2022].

1.5 Методы и подходы к децеллюляризации и рецеллюляризации ксеноматериалов

ВКМ, полученный из децеллюляризованной ткани, все чаще используется в регенеративной медицине и тканевой инженерии, включая использование трехмерных каркасов ВКМ, полученных путем децеллюляризации всего органа. Биологические хирургические материалы, состоящие из ВКМ, создают из различных аллогенных или ксеногенных тканей, включая дерму, мочевого пузыря,

тонкую кишку, легкие, пульпозные ядра, амниотическую оболочку, перикард и сердечные клапаны [Fu R.H. et al., 2014; Gholipourmalekabadi M. et al., 2015; Yu L. et al., 2020; Cady E. et al., 2020; Zhang X. et al., 2021; McInnes A.D. et al., 2022].

Потенциальное преимущество тканевой специфичности для поддержания выбранных клеточных функций и фенотипа было подтверждено исследованиями клеток и внеклеточного матрикса, выделенных из тканей и органов, таких как печень, дыхательные пути, нервы, жировая и молочная железа [Heath D.E. et al., 2019; Hoshiba T. et al., 2023].

Было показано, что внеклеточный матрикс влияет на клеточный митогенез и хемотаксис, направляет дифференцировку клеток и вызывает реакции ремоделирования ткани [Hussey G.S. et al., 2018; McInnes A.D. et al., 2022; Chen X.Y. et al., 2022]. Вполне вероятно, что трехмерная ультраструктура, топология поверхности и состав ВКМ способствуют этим эффектам. Имеются также данные о том, что остаточный клеточный материал ослабляет или полностью сводит на нет преимущества конструктивного ремоделирования тканей вместо биологических каркасных материалов *in vivo* [Reing J.E. et al., 2010; Tabatabai T.S. et al., 2024]. Таким образом, методы обработки тканей, включая децеллюляризацию, являются решающими факторами клинического успеха.

Наиболее эффективные агенты для децеллюляризации каждой ткани и органа будут зависеть от многих факторов, включая клеточность ткани (например, печень или сухожилие), плотность (например, дерма или жировая ткань), содержание липидов (например, мозг или мочевого пузыря), и толщину (например, дерма по сравнению с перикардом). Следует понимать, что каждый агент и метод удаления клеток изменит состав ВКМ и вызовет некоторую степень нарушения его ультраструктуры. Целью децеллюляризации является минимизация этих нежелательных эффектов, а не их полное предотвращение. Обзор некоторых обычно используемых агентов (например, химических, ферментативных и физических) и их воздействия на клеточные и внеклеточные компоненты ткани представлены в Таблице 2. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс демонстрирует значительный потенциал в качестве фундаментального

компонента или модификатора тканеинженерных конструкций (ТИК), однако его клиническое применение сопряжено с рядом существенных ограничений. Ключевые ограничения использования децеллюляризованных материалов обусловлены вариабельностью сохранения биоактивных компонентов в процессе децеллюляризации, а также их стабильностью при последующих технологических манипуляциях, включая стерилизационные процедуры и методы консервации.

Механизмы взаимодействия между внеклеточным матриксом и клетками в условиях *in vivo* требуют дальнейшего детального изучения. В частности, остаётся недостаточно исследованным компонентный состав ВКМ, определяющий специфические паттерны клеточного поведения, репаративные процессы и ангиогенез [Исаева Е.В. и соавт., 2022].

Таким образом, несмотря на доказанный терапевтический потенциал децеллюляризованного ВКМ, необходимы дополнительные фундаментальные исследования для оптимизации его применения в клинической практике.

Таблица 2 – Отдельные агенты и методы децеллюляризации тканей

Агент/Техника	Способ действия	Воздействие на ВКМ
1	2	3
Химические агенты		
Кислоты и основания	Растворяют цитоплазматические компоненты клеток, разрушают нуклеиновые кислоты, имеют тенденцию к денатурации белков	Могут повредить коллаген, ГАГ и факторы роста
Гипотонические и гипертонические растворы	Вызывают лизис клеток за счет осмотического шока, нарушают взаимодействия ДНК-белок	Эффективно лизируют клетки, но не эффективно удаляют клеточные остатки
Неионогенные моющие средства: – Тритон X-100	Нарушают взаимодействия ДНК-белок, нарушают взаимодействия липид – липид и липид-белок и, в меньшей степени, взаимодействия белок-белок	Эффективность применения зависит от ткани (более эффективное удаление клеток из тонких тканей); происходит некоторое нарушение ультраструктуры и удаление ГАГ
Ионные моющие средства:	Солбализируют клеточные и ядерные мембраны, склонны к денатурации белков	
– додецилсульфат натрия (ДСН)		Эффективно удаляет остатки ядер и цитоплазматические белки из плотных тканей, имеет тенденцию разрушать ультраструктуру, удаляет ГАГ и факторы роста, повреждает коллаген
– дезоксихолат натрия		Эффективность зависит от толщины ткани, характерно некоторое нарушение ультраструктуры и удаление ГАГ
– Тритон X-200		Более эффективно удаляет клетки из тонких тканей, но с большим нарушением ультраструктуры по сравнению с другими детергентами

Продолжение таблицы 2

1	2	3
Циттерийонные моющие средства:	Проявляют свойства неионогенных и ионогенных детергентов	
– CHAPS		Эффективно удаляет клетки с легким нарушением ультраструктуры в тонких тканях
– Сульфобетайн-10 и -16 (СБ-10, СБ-16)		Эффективно удаляет клетки с легким нарушением ультраструктуры в тонких тканях
Растворители:	Лизис клеток путем обезвоживания, сольubilизации и удаления липидов	
– Спирты		Эффективно удаляют клетки из плотных тканей и инактивирует пирогены, но сшивают и осаждают белки, в том числе коллаген
– Ацетон		Эффективность зависит от толщины ткани, плотные ткани теряют коллаген, но влияние на их механические свойства минимальное
– Трибутилфосфат (ТБФ)	Образует устойчивые комплексы с металлами, нарушает белок-белковые взаимодействия	
	Биологические агенты	
Ферменты:		
– Нуклеазы	Катализируют гидролиз рибонуклеотидных и дезоксирибонуклеотидных цепей	Трудно удалить из ткани, могут вызвать иммунный ответ
– Трипсин	Расщепляет пептидные связи на С-конце Arg и Lys	Длительное воздействие может нарушить ультраструктуру ВКМ, удаляет такие составляющие ВКМ, как коллаген, ламинин, фибронектин, эластин и ГАГ, более медленное удаление ГАГ по сравнению с детергентами
– Диспаза	Расщепляет специфические пептиды, в основном фибронектин и коллаген IV	Длительное воздействие может нарушить ультраструктуру ВКМ, удаляет компоненты ВКМ, такие как фибронектин и коллаген IV

Окончание таблицы 2

1	2	3
Хелатирующие агенты (ЭДТА, ЭГТА)	Связывают ионы металлов, тем самым нарушая адгезию клеток к ВКМ	Обычно используются с ферментативными методами (например, с трипсином), но могут использоваться и с другими агентами, так как неэффективны при отдельном применении
Физические и прочие агенты		
Температура (замораживание и оттаивание)	Внутриклеточные кристаллы льда разрушают клеточную мембрану	Повреждение ВКМ
Прямое приложение силы, гомогенизация	Механическое разрушение клеток	Повреждение ВКМ
Давление	Механическое разрушение клеток	Повреждение ВКМ
Электропорация	Импульсные электрические поля разрушают клеточные мембраны	Повреждение ВКМ
Перфузия	Облегчает химическое воздействие и удаление клеточного материала	Давление, связанное с перфузией, может нарушить ВКМ
Градиент давления на ткань	Облегчает химическое воздействие и удаление клеточного материала	Градиент давления может нарушить ВКМ
Сверхкритическая жидкость	Давление может привести к разрыву клеток, сверхкритическая жидкость способствует химическому воздействию и удалению клеточного материала	Давление, необходимое для сверхкритической фазы, может нарушить ВКМ
Ударно-волновое воздействие	Может лизировать клетки, но чаще используется для облегчения химического воздействия и удаления клеточного материала	Агрессивное воздействие или обработка ультразвуком могут нарушить ВКМ

1.5.1 Химические агенты для децеллюляризации

Кислоты и основания вызывают или катализируют гидролитическую деградацию биомолекул, способствуют вымыванию ядерной ДНК из внеклеточного матрикса, разрушая нуклеиновые кислоты и солюбилизируя цитоплазматические компоненты [Neishabouri A. et al., 2022].

Надуксусная кислота является распространенным дезинфицирующим средством, которое также выполняет функцию децеллюляризатора, удаляя остаточные нуклеиновые кислоты с минимальным влиянием на состав и структуру внеклеточного матрикса [Syed O. et al., 2014]. Уксусная кислота повреждает и удаляет коллагены с соответствующим снижением прочности ВКМ, но не влияет на с-ГАГ [Neishabouri A. et al., 2022].

Основания (например, гидроксид кальция, сульфид натрия и гидроксид натрия) достаточно агрессивны и обычно используются для удаления волос или шерсти из образцов дермы на ранних стадиях децеллюляризации. Однако основания могут полностью вымывать факторы роста из матрикса и снижать механические свойства ВКМ более значительно, чем другие химические и ферментативные агенты. Основным механизмом, посредством которого такие основания, как гидроксид натрия, снижают механические свойства, является расщепление коллагеновых фибрилл и нарушение поперечных связей коллагена [Zahmati A.H.A. et al., 2017; Neishabouri A. et al., 2022].

Гипертонический солевой раствор нарушает молекулярные взаимодействия ДНК-белок, гипотонические растворы могут легко вызвать лизис клеток за счет простых осмотических эффектов с минимальными изменениями в молекулах матрикса и его архитектуре. Для достижения максимального осмотического эффекта ткани необходимо поочередно погружать в гипер- и гипотонические растворы в течение нескольких циклов. Подобные растворы также помогают вымыть остатки клеток из ткани после лизиса [Neishabouri A. et al., 2022].

Ионные, неионные и цвиттерионные детергенты солюбилизируют клеточные мембраны и отделяют ДНК от белков, поэтому они также эффективны при

удалении клеточного материала из ткани [Alshaikh A.B. et al., 2019]. Степень удаления белков ВКМ и ДНК детергентами увеличивается со временем воздействия и зависит от типа ткани, органа и возраста донора. Сочетание нескольких детергентов увеличивает потерю компонентов ВКМ, но также обеспечивает более полное удаление детергента из внеклеточного матрикса после децеллюляризации [Heath D.E. et al., 2019; Neishabouri A. et al., 2022].

Неионогенные детергенты, такие как Тритон X-100, могут сильно разрушать липид-липидные и липид-белковые связи, но они менее эффективны при белок-белковом взаимодействии. Хотя они сохраняют ультраструктуру децеллюляризованной ткани и сохраняют факторы роста, они менее эффективны в удалении клеточного материала, чем додецилсульфат натрия (ДСН). Тритон X-100 не подходит для тканей, важными составляющими которых являются ГАГ и липиды. Тритон X-100 может эффективно удалять клеточные остатки из более толстых тканей, таких как перикард, клапаны, где ферментативные и осмотические методы недостаточны, с сопутствующей потерей белка ВКМ, сопровождающейся снижением неблагоприятного иммунного ответа *in vivo* [Bonato P. et al., 2020; Zhao J. et al., 2024].

Додецилсульфат натрия (ДСН) является более эффективным чем Тритон X-100 для удаления ядер из плотных тканей и органов, таких как почки и височно-нижнечелюстной сустав, при сохранении биомеханики тканей. Добавление детергента ДСН к протоколу децеллюляризации значительно влияет на степень удаления клеточных ядер, но при этом происходит разрушение ультраструктуры ВКМ и элиминация факторов роста [Gilpin A. et al., 2017]. Таким образом, ДСН, как правило, более эффективен для удаления клеточных остатков из тканей по сравнению с другими детергентами, но также более разрушительно действует на ВКМ. Неионогенные детергенты, такие как Triton X-100, более эффективны для удаления липидов из тканей, чем ионные детергенты, такие как дезоксихолат [Neishabouri A. et al., 2022; Narciso M. et al., 2022].

Цвиттерионный детергент 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат – CHAPS наиболее эффективен для удаления клеток из более

тонких тканей, таких как легкие, и может быть неэффективен для децеллюляризации более толстых тканей, при использовании в комбинации с ДСН или отдельно для относительно бесклеточных тканей [Tsuchiya T. et al., 2014]. Сравнительное исследование использования детергентов для децеллюляризации периферических нервов показало лучшее сохранение ультраструктуры при обработке неионогенными и цвиттерионными детергентами, но лучшее удаление клеток ионными детергентами [Lovati A.V. et al., 2018].

Необходима тщательная обработка каркаса для того, чтобы вымыть остаточные химические вещества из внеклеточного матрикса после децеллюляризации, так как детергенты, особенно такие как ДСН, проникают в толстые или плотные ткани и вызывают цитотоксичность даже при сниженных концентрациях агента и подавляют регенеративные свойства бесклеточного каркаса ВКМ. Даже тонкие ткани, такие как створки клапана, требуют многократных (более шести) промывок с перемешиванием для полного удаления детергентов [Zahmati A.N.A. et al., 2017].

Спирты, такие как глицерин, способствуют децеллюляризации тканей путем обезвоживания и лизиса клеток. Изопропанол, этанол и метанол, более эффективны, чем липаза, в удалении липидов из тканей и обработка жировой ткани достаточно эффективна за относительно короткий период времени. Следует соблюдать осторожность при обработке тканей спиртами, такими как этанол и метанол, из-за их способности осаждать белки (поэтому они используются в качестве фиксаторов тканей в гистологии) и повреждать ультраструктуру ВКМ [Ventura R.D. et al., 2019; Neishabouri A. et al., 2022].

Ацетон также можно использовать для удаления липидов во время децеллюляризации. Однако, как и со спиртами, использование ацетона приводит к повреждению ультраструктуры внеклеточного матрикса. По сравнению с обработкой детергентами, ацетон сшивает ВКМ, образуя более жесткие каркасы с механическими свойствами, еще более далекими от свойств нативной ткани. Трибутилфосфат представляет собой органический растворитель с вирулицидными свойствами. Для децеллюляризации плотных тканей, таких как

сухожилия, трибутилфосфат показал себя более эффективным, чем детергенты, такие как Тритон X-100 и ДСН [Narciso M. et al., 2022; Neishabouri A. et al., 2022].

1.5.2 Биологические агенты для децеллюляризации

Ферменты, описанные в протоколах децеллюляризации различных тканей, включают нуклеазы, трипсин, коллагеназу, липазу, диспазу, термолизин, α -галактозидазу и др. Ферменты обеспечивают высокую специфичность удаления клеточных остатков или нежелательных компонентов ВКМ. Однако полное удаление клеток только ферментативной обработкой затруднено, а остатки ферментов могут нарушить рецеллюляризацию или вызвать неблагоприятный иммунный ответ.

Нуклеазы (например, ДНКазы и РНКазы) расщепляют последовательности нуклеиновых кислот и поэтому способствуют их удалению после лизиса клеток в тканях. Эндонуклеазы, такие как бензоназа, могут быть более эффективными, чем экзонуклеазы, потому что они расщепляют нуклеотиды в середине последовательности и, таким образом, более эффективно фрагментируют ДНК при подготовке к ее удалению [Heath D.E. et al., 2019].

Трипсин, представляющий собой сериновую протеазу, обычно используется в качестве ферментативного агента децеллюляризации. Однако белки ВКМ, такие как коллагены, обладают ограниченной устойчивостью к расщеплению трипсином, поэтому воздействие трипсина на ткани следует использовать с осторожностью. По сравнению с детергентами трипсин больше разрушает эластин и коллаген и медленнее удаляет клетки, но лучше сохраняет содержание ГАГ [Sajith S., 2017; Moffat D. et al., 2022]. Нарушение трипсином ВКМ может быть связано с изменениями его механических свойств. Удаление клеток и компонентов внеклеточного матрикса трипсином зависит от времени, и полная децеллюляризация одним только трипсином может потребовать длительной инкубации даже для тонких тканей. Трипсин можно эффективно использовать для

разрушения ультраструктуры ткани и улучшения проникновения последующих агентов децеллюляризации; поэтому воздействие трипсина в качестве начального шага в протоколе децеллюляризации тканей может быть желательным или даже необходимым, особенно для полного удаления клеточных ядер из плотных тканей [Heath D.E. et al., 2019; Moffat D. et al., 2022].

Коллагеназу можно использовать во время децеллюляризации, но только в том случае, если сохранение ультраструктуры и максимальное удержание коллагена не являются критическими для предполагаемого клинического применения полученного ВКМ. Липаза способствует делипидированию, но ее обычно недостаточно для удаления всех липидов при использовании отдельно [Heath D.E. et al., 2019].

Ферментативное расщепление также может осуществляться протеазами и эстеразами, такими как диспаза, коллагеназа, фосфолипаза А2 и хондроитиназа ABC. Диспаза представляет собой нейтральную протеазу, которая быстро, но осторожно отделяет клетки от ткани путем селективного расщепления фибронектина и коллагена IV типа. Это делает его идеальным для децеллюляризации базальной мембраны тканей, которые преимущественно состоят из коллагена IV и ламинина. Диспазу и трипсин можно последовательно использовать для улучшения удаления клеток из более толстых тканей, таких как дерма, в сочетании с детергентами, а повторные обработки диспазой могут улучшить децеллюляризацию. Использование фермента, такого как диспаза или термолизин, в качестве единственного агента децеллюляризации эффективно только для удаления клеток с поверхности ткани. Что касается разделения базальной мембраны и ВКМ, то термолизин оказывает меньшее разрушительное воздействие по сравнению с диспазой [Asadi M. et al., 2021; Liu C. et al., 2022].

Децеллюляризованные ксеногенные ткани можно обрабатывать α -галактозидазой для удаления иммуногенного антигена клеточной поверхности галактозы- α -(1,3)-галактозы (Gal-эпитоп) [Kasravi M. et al., 2023].

Хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА), способствуют

диссоциации клеток от белков ВКМ за счет связывания ионов металлов [Asadi M. et al., 2021]. Вполне вероятно, что хелатирующие агенты способствуют нарушениям белок-белковых взаимодействий по тому же механизму. Одних только хелатирующих агентов недостаточно для поверхностного удаления клеток, поэтому их обычно используют в сочетании с ферментами, такими как трипсин, или детергентами. Комбинированная эффективность хелатирующих агентов и простых гипер- или гипотонических растворов для децеллюляризации неизвестна [Zhao J. et al., 2024].

Токсины, такие как латрункулин, позволяют исследователям использовать природные цитотоксические агенты для децеллюляризации. A.R. Gillies и соавт. продемонстрировали удаление ДНК и внутриклеточных белков из плотной ткани передней большеберцовой мышцы с использованием только латрункулина В, гипер- и гипотонических растворов и обработки ДНКазой [Gillies A.R. et al., 2011]. Этот метод был лучше в удалении ДНК и сохранении ГАГ по сравнению с методом децеллюляризации с использованием ферментов и детергентов, а пассивное механическое тестирование каркаса ВКМ и нативной ткани показало аналогичные свойства.

Ингибиторы сериновых протеаз, такие как фенилметилсульфонилфторид, апротонин и лейпептин, предотвращают нежелательное повреждение внеклеточного матрикса, которое в противном случае могло бы возникнуть в результате высвобождения внутриклеточных протеаз во время лизиса клеток. Антибиотики и антимикотики, такие как пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В и азид натрия, могут использоваться для минимизации микробного загрязнения во время децеллюляризации, но также представляют собой потенциальное нормативное препятствие для клинического применения биологических каркасов [Liu J. et al., 2024].

1.5.3 Физическое воздействие и прочие агенты для децеллюляризации

Процесс замораживания-оттаивания эффективно лизирует клетки в тканях и органах, но поврежденные мембраны и внутриклеточное содержимое остается, и требует удаления в последующих стадиях обработки. Один цикл замораживания-оттаивания может уменьшить неблагоприятные иммунные реакции, такие как инфильтрация лейкоцитами в васкуляризованных каркасах ВКМ [Cravedi P. et al., 2017]. Многократные циклы замораживания-оттаивания могут использоваться для эффективной децеллюляризации и, при этом, существенно не увеличивают потерю белков ВКМ из ткани. Процесс замораживания-оттаивания вызывает незначительные нарушения ультраструктуры ВКМ и поэтому его следует использовать только тогда, когда такие эффекты приемлемы в конечном продукте, в частности это целесообразно для обработки механически прочных тканей, так как механические свойства при этом изменяются минимально [Heath D.E. et al., 2019; Liu J. et al., 2024].

Клетки на поверхности ткани или органа (например, мочевого пузыря, тонкого кишечника, кожи, амниона) можно эффективно удалить механически в сочетании с обработкой ферментами, гипертоническим раствором или хелатирующими агентами, все эти способы облегчают диссоциацию клеток от лежащей под ними базальной мембраны. Однако подлежащая ультраструктура и целостность базальной мембраны неизменно повреждаются любым прямым приложением механической силы [Neishabouri A. et al., 2022].

Гидростатическое давление требует относительно небольшого времени и может быть более эффективным, чем детергенты или ферменты для удаления клеток из кровеносных сосудов и тканей роговицы, хотя образование барических кристаллов льда может разрушить ультраструктуру ВКМ. Повышение температуры во время децеллюляризации под давлением предотвращает образование кристаллов льда, но может нарушить внеклеточный матрикс из-за связанного с этим увеличения энтропии, которое можно смягчить коллоидами, такими как декстран [Hashimoto Y. et al., 2024].

Нетермическая необратимая электропорация (NTIRE) также была исследована как один из подходов к децеллюляризации тканей. Микросекундные электрические импульсы прикладывают к резидентным клеткам ткани, вызывая образование микропор в клеточной мембране из-за дестабилизации электрического потенциала. Наличие микропор вызывает нарушение клеточного гомеостаза и приводит к гибели клеток [Song Y. et al., 2021].

1.5.4 Основные подходы к рецеллюляризации ксеноматериалов

Функционализация децеллюляризованных матриц (скаффолдов) представляет собой сложную задачу из-за ограничений, связанных с рецеллюляризацией, включая поиск наиболее оптимального типа клеток и наилучшего способа контроля их распределения внутри скаффолдов для создания тканеинженерных конструкций. Часто используют стволовые клетки, в частности мезенхимальные стволовые клетки (МСК), в качестве альтернативных клеток для репопуляции и функциональной адаптации матриц. МСК могут быть получены из различных источников и обладают терапевтическим эффектом при широком спектре воспалительных/дегенеративных заболеваний. Наиболее распространенные типы МСК, используемые при рецеллюляризации, получают из жировой ткани (МСК-ЖТ) и из костного мозга (МСК-КМ). Оба источника МСК относительно доступны и могут быть получены в достаточном количестве. Эти клетки обладают обширными пролиферативными возможностями для прохождения мультилинейной дифференцировки. При сравнении эффективности двух типов клеток при репопуляции децеллюляризованных легких обнаружили, что оба типа клеток демонстрируют одинаковую способность к инвазии, прикреплению и пролиферации [Gilpin S.E. et al., 2018].

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES) также являются широко используемым типом клеток в тканевой инженерии для поддержки ангиогенеза. Совместный посев HUVES с МСК-ЖТ в децеллюляризованные

каркасы способствует формированию сосудоподобных структур и демонстрирует эффективную интеграцию после имплантации. HUVEC часто используются для исследований *in vitro*, так как их клиническое применение ограничено из-за потенциальной иммуногенности. Кроме того, сохранение фенотипа и функциональности HUVEC при длительном культивировании является сложной задачей из-за высокой скорости апоптоза после множественных пассажей клеточной культуры [El-Mallah J.C. et al., 2025].

Для пролиферации и равномерной стратификации реципиентных кератиноцитов над/внутри ВКМ традиционно считалось, что оптимальная среда требует присутствия фибробластов. Вероятно, это связано с паракринным взаимодействием между двумя типами клеток. Однако в исследовании *in vitro* пришли к выводу, что формирование хорошо организованного эпителия на децеллюляризованном дермальном матриксе зависит главным образом от присутствия неповрежденной базальной мембраны, но в значительной степени не зависит от присутствия культивируемых фибробластов. Другие группы продемонстрировали усиленную миграцию кератиноцитов на стерилизованной коже после удаления антигенов базальной мембраны, но в присутствии фибробластов в условиях нормальной концентрации внеклеточного кальция. Эти условия, вероятно, отражают ситуацию *in vivo* при нормальном заживлении ран, когда базальная мембрана травматически повреждена, а количество фибробластов увеличивается для заживления раны [Eweida A.M. et al., 2015].

В зависимости от состояния дифференцировки клеточного компонента для рецеллюляризации бесклеточных каркасов можно использовать три стратегии. Первая стратегия заключается в культивировании низкодифференцированных стволовых клеток (например МСК) *in vitro* для обеспечения их прикрепления и пролиферации. Впоследствии эти культивируемые клетки трансплантируются для дальнейшей дифференцировки и созревания *in vivo*. Преимущество этой стратегии заключается в сокращении времени, необходимого для полного созревания и функционирования посеянных клеток после имплантации *in vivo*. Однако длительное культивирование *in vitro* может привести к гипоксии клеток, что

негативно отразится на их противовоспалительных или иммуномодулирующих свойствах. Вторая стратегия заключается во внесении недифференцированных МСК в децеллюляризованные каркасы непосредственно перед трансплантацией, при этом этап культивирования тканей *in vitro* пропускается. Преимущество посева клеток *in situ* заключается в улучшении дифференцировки и равномерной миграции клеток. Третья стратегия предполагает засев децеллюляризованных каркасов уже дифференцированными МСК с последующим культивированием органов *in vitro* перед трансплантацией. Эта стратегия рецеллюляризации позволяет получить сложные каркасы с тканеспецифичными фенотипами. [Ahmed E. et al., 2021].

Также известен метод рецеллюляризации *in vivo* при котором рецеллюляризованный кожно-жировой лоскут с рецеллюляризованной сосудистой сетью интегрируется микрохирургически с помощью реанастомоза бестимусным животным и, в дальнейшем, успешно подвергается неоваскуляризации и структурному ремоделированию [Zhang Q. et al., 2016].

1.6 Особенности ангиогенеза в децеллюляризованных матриксах

Несмотря на многочисленные экспериментальные исследования, демонстрирующие возможность применения ТИК, в клинической практике они используются не так широко [Williams D.F. et al., 2019]. Основной причиной является недостаточная васкуляризация, так как ТИК, как правило, имеют достаточно большие размеры, значительно ограничивающие формирование сети кровеносных сосудов, которая способна обеспечить клетки питательными веществами и в дальнейшем поддержать быструю регенерацию ткани [Mastrullo V. et al., 2020; Shukla A.K. et al., 2024]. Необходимо отметить, что использование таких методов, как 3D-биопринтинг, электроспиннинг, применение факторов роста и клеток различного типа, не способствует эффективной васкуляризации, несмотря на достижение тканеподобной структуры ТИК [Fernandez de Grado G. et al., 2018;

Williams D.F. et al., 2019]. Усложнение и увеличение размера ТИК ограничивает степень диффузии газов, поступление питательных веществ и интеграцию сети кровеносных сосудов, при этом одной из главных задач становится обеспечение постоянного и контролируемого выделения факторов роста, так как они способствуют адгезии, миграции и пролиферации клеток, а также стимулируют ангиогенез в ТИК.

При выборе наиболее оптимального скаффолда, способствующего воссозданию особенностей кровоснабжения органа или ткани, необходимо учитывать структурные особенности каркаса, биологическую совместимость и время его деградации. Ключевую роль играет наличие в каркасе специфических белков внеклеточного матрикса, так как компоненты ВКМ (коллаген, ламинин, фибронектин, энтактин, гиалуроновая кислота, протеогликаны, ГАГ и др.) проявляют проангиогенные свойства. Так, например, большое количество исследований *in vitro* показало, что растущие капилляры синтезируют фибронектин, сборка которого обеспечивает регуляцию и необходима для морфогенеза капилляров [Schumacher D. et al., 2022; Grilo G.A. et al., 2023]. Таким образом, существенным недостатком синтетических полимеров при создании ТИК и её последующей имплантации является отсутствие компонентов, связывающих клетки и ВКМ.

Каркасы, полученные методом децеллюляризации, являются наиболее перспективными при создании тканеинженерных органов и тканей. Данная процедура позволяет решить одну из главных проблем регенеративной медицины, а именно отторжение трансплантата, а также позволяет сохранить различные факторы роста и хемокины, способствующие ангиогенезу, пролиферации и дифференцировке клеток. Однако децеллюляризация может приводить к уплотнению и сближению волокон коллагена и не позволяет точно контролировать размер пор, что важно для обеспечения клеточной инфильтрации, васкуляризации, диффузии питательных веществ и кислорода в ТИК [Gilpin A. et al., 2017; Mazloomnejad R. et al., 2023].

Предполагаемыми активаторами ангиогенеза являются ангиопоэтины и их

Tie-рецепторы, тромбоцитарный фактор роста (PDGF-B), эфрины (Eph-B) и их рецепторы, которые также могут влиять на ремоделирование сосудов. Первым активатором ангиогенеза является сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF, ангиотензины, так же как эфрины и их рецепторы регулируют процессы инвагинации на более поздних стадиях. VEGF стимулирует формирование нового капиллярного сегмента посредством вовлечения перицитов и гладкомышечных клеток. Данные периэндотелиальные клетки важны для целостности формирующихся сосудов. В частности, для перицитов описаны три основные функциональные роли: сократимость, регуляция активности эндотелиальных клеток и макрофагов [Lee C. et al., 2025]. Известно, что взаимодействие Tie-2 и ангиопоэтина-1 поддерживает межклеточные связи эндотелиальных клеток, стабилизирует сосудистую стенку и способствует формированию сосуда [Liu Z.L. et al., 2023].

Другими известными медиаторами ангиогенеза являются: фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор роста бета ($TGF\beta$), доказано ангиогенное действие ангиопоэтина (ANGPT-1,2), инсулиноподобного фактора роста, ангиогенина, интерлейкина-8 и интерлейкина-6. Кроме этого, большое значение имеют такие факторы как: фактор роста гепатоцитов, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор некроза опухоли альфа ($TNF-\alpha$), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), пролиферин, лептин, NO, простагландины и молекулы клеточной адгезии (интегрины, селектины и кадгеринины) [Harjunpää H. et al., 2019].

Наряду с факторами, оказывающими стимулирующее воздействие на ангиогенез, существует ряд биологически активных веществ, обладающих выраженным супрессорным влиянием. Наиболее изучены эндостатин (фрагмент коллагена XVIII) и ангиостатин (фрагмент плазминогена) [Li M. et al., 2021; Ismail A.A. et al., 2021]. К ингибиторам ангиогенеза также относятся интерферон γ , вазогин-1 (VASH-1), тромбоспондины-1,2 (TSP-1,2), интерлейкин-4 и т.д. [Zhang K. et al., 2020; Pei Y.A. et al., 2022; Peluzzo A.M. et al., 2022].

Продукты гликолиза, в частности лактат, также являются стимуляторами

ангиогенеза. Повышенное содержание лактата потенцирует активацию Tie-2 (рецепторов ANGPT) и VEGFR-2 [Sack K.D. et al., 2020].

Для регуляции ангиогенеза важны и биомеханические факторы. Эндотелиальные клетки подвергаются различным механическим воздействиям, связанным с движением крови: напряжение сдвига, трансэндотелиальный ток жидкости, циклическая деформация и другие. Установлено, что изменение параметров гемодинамики может влиять на активность ангиогенных реакций эндотелиальных клеток. В настоящее время показано, что биомеханические факторы изменяют экспрессию генов и регулируют не только активность миграции, деления и апоптоза эндотелиоцитов, но и выработку ими ангиогенных факторов [Peng Z. et al., 2019].

Внеклеточный матрикс необходим для всех стадий ангиогенеза. У взрослых ангиогенез начинается с активации эндотелиальных клеток, деградации базальной мембраны сосудов и прорастания сосудов в интерстициальный матрикс. Во время этой фазы прорастания связывание ВКМ с интегринами обеспечивает критическую сигнальную поддержку для пролиферации, выживания и миграции эндотелиальных клеток. ВКМ также вовлечен в молекулярный сигналинг цитоскелету эндотелиальных клеток, чтобы инициировать морфогенез кровеносных сосудов [Hielscher A. et al., 2016; Eelen G. et al., 2020].

Поэтому наиболее эффективно применение предварительно децеллюляризованных биологических материалов, так как компоненты ВКМ обеспечивают сигналы, влияющие на адгезию, миграцию, пролиферацию, выживание и дифференцировку различных типов клеток за счет содержания большого количества доменных структур, которые становятся активными после протеолитического расщепления, а также обладают значительным ангиогенным потенциалом (Таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительная характеристика различных методов децеллюляризации

Метод	Реагенты	Факторы роста после децеллюляризации			Источник
		VEGF	FGF/PGF	ДНК	
Детергентно-энзиматический (свиная дерма)	Органические растворители	1050 ± 0,05 пг/г	900 ± 0,05 пг/г	Удаление на 94 %	[D.M. Hoganson et al., 2010]
	Детергенты и ферменты			756 ± 72,3 нг/мг	
	Растворы солей			25,2 ± 4,4 нг/мг	
Детергентно-энзиматический (пищевод)	Тритон X-100	Нет данных	Нет данных	Удаление ДНК на 92 %	[Е.А. Губарева и соавт., 2019]
	ДСН			123,85 ± 22,61 нг/мг	
	Трипсин				
Детергентно-щелочной (диафрагма)	Тритон X-100	0,580 ± 0,06 пг/мг для нативной ткани,	Нет данных	Удаление на 97 %	[M.E. Alvarèz Fallas et al., 2018]
	Гидроксид аммония	0,068 ± 0,02 пг/мг для децелляризированной диафрагмы			
Детергентный (трахея)	0,01 % ДСН (24 ч)	Нет данных	Нет данных	Удаление на 51,58 %	[L. Liu et al., 2021]
	0,1 % ДСН (24 ч)				
	0,2 % ДСН (3 ч)				
	0,1 % ДСН				
	Тритон X-100				
Детергентно-ферментативный (трахея)	Тритон X-100 с добавлением CHAPS	Нет данных	Нет данных	Удаление 96 %	[Д.С. Барановский и соавт., 2017]
	ДМСО и ДНКазы I			2,442 ± 0,114 нг/мкг	
				0,101 ± 0,030 нг/мкг	
Детергентный (печень)	Тритон X-100	Нет данных	1,24 ± 1,04 пг/г	1576 ± 379 нг/мг	[B. Struecker et al., 2017]
	ДСН				

Таким образом, выбор наиболее оптимальных способов децеллюляризации с сохранением компонентов для стимуляции ангиогенеза и максимально возможным удалением ДНК должен способствовать решению ряда проблем в области тканевой инженерии

Децеллюляризованный ВКМ сохраняет сложную сосудистую структуру, но требуется время для формирования новых кровеносных сосудов и интеграции с тканями организма, что ограничивает успешное применение скаффолдов при повреждениях кожи. Для преодоления этого недостатка разрабатываются специальные биореакторы, которые обеспечивают пульсирующую перфузию сосудистой сети и культивирование эндотелиальных клеток на границе раздела фаз воздух-жидкость, что необходимо для васкуляризации эквивалентов кожи [Groeber F. et al., 2013; Groeber F. et al., 2016].

Результаты исследований в области тканевой инженерии, посвященные выбору метода децеллюляризации, сведены к подбору времени и порядка воздействия растворов на орган. Модификация протоколов децеллюляризации органов и тканей ограничена либо сокращением общей продолжительности протокола за счет выбора более жестких параметров децеллюляризации, что приводит к ухудшению биомеханических свойств биологического каркаса, либо максимальным сохранением свойств нативной ткани, путем подбора более щадящих параметров обработки биологического материала, что неизбежно приводит увеличению продолжительности процесса децеллюляризации и повышению риска бактериальной контаминации биологического каркаса. Однако необходимо отметить, что характер протокола децеллюляризации влияет не только на биомеханические свойства материала, но и на проангиогенные свойства биологического каркаса.

Резюме

В настоящее время растет потребность в новых материалах для восстановления тканевых дефектов, вызванных травмами, ожогами, инфекциями и системными патологиями. Кожа свиньи является одной из нескольких

исследуемых гетерологичных матриц, в основном из-за ее высокого сходства с кожей человека и ее биосовместимости, механической устойчивости и низкой антигенности. Ксеногенные материалы на основе природного коллагена можно разделить на две категории в зависимости от степени их очистки: децеллюляризованные коллагеновые матрицы, сохраняющие исходные свойства ткани и структуру ВКМ; и более рафинированные каркасы, полученные путем экстракции, очистки и полимеризации коллагена. При этом децеллюляризация может осуществляться по различным технологиям – с помощью физических, биологических и химических методов. К физическим относятся методики с применением экстремальных температур, механического давления, критических концентраций CO_2 и механического воздействия. Необходимым условием проведения децеллюляризации ткани является количественная оценка остаточного ДНК. Преобладающим источником для изготовления большинства децеллюляризованных матриксов для медицинского применения являются ксеногенные ткани. Поэтому процедура получения очищенного ВКМ должна обеспечивать отсутствие реакции отторжения ксенотрансплантата при его имплантации в ткани пациента. Кроме того, помимо тщательного удаления клеток необходимо учитывать, что различные методы децеллюляризации могут оказывать в той или иной мере нежелательное влияние на ВКМ, получаемый в результате обработки. При выборе наиболее оптимального скаффолда, способствующего воссозданию особенностей кровоснабжения органа или ткани, необходимо учитывать структурные особенности каркаса, биологическую совместимость и время его деградации. Ключевую роль играет наличие в каркасе специфических белков внеклеточного матрикса, так как компоненты ВКМ (коллаген, ламинин, фибронектин, гиалуроновая кислота, протеогликаны, ГАГ и др.) проявляют проангиогенные и репарационные эффекты.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было одобрено локальным Независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 96 от 29.01. 2021 г.). Экспериментальная часть исследования осуществлялась в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств», с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Кормление осуществлялось коммерческими кормами в соответствии с суточными нормами (Приказ ректора ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России от 09.07.2015 г. № 527 «О создании комиссии по определению норм кормления лабораторных животных»), искусственное освещение было циклическим (день/ночь – 12 ч/12 ч), режим поения – *ad libitum*.

Экспериментальные работы с участием лабораторных животных проводились на базе учебно-производственного отдела (вивария) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (г. Краснодар). Общая площадь для содержания животных, поступающих из сертифицированных питомников, составляет 300 м². Виварий оснащен центральным отоплением, естественным и искусственным освещением, принудительной приточно-вытяжной вентиляцией, а также подводкой горячей и холодной воды. Мелкие лабораторные животные содержались в системе индивидуально вентилируемых клеток с блоком ВЕНТ-БИО-1М (АНО «АВТех», Россия), крупные лабораторные животные – в индивидуальных металлических клетках с деревянным настилом (размерами 1,5 х 2 х 2 м), после периода карантина (14 дней) включались в исследование. Операционный блок вивария оснащен ветеринарным наркозно-дыхательным аппаратом Mindray Veta 3 («Mindray», Китай) и оборудован в соответствии с международными санитарно-эпидемиологическим требованиями к содержанию экспериментально-биологических клиник.

Различные виды исследований проводились на базе центральной научно-исследовательской лаборатории и кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России. Эксперимент по пересадке децеллюляризированных и рецеллюляризированных дермальных матриксов проводили на поросенке породы Ландрас (возраст 15 недель, масса 25,5 кг). Закрывание грыжевого дефекта было выполнено на трёх свиных-грыженосителях породы Ландрас возрастом 4-6 месяцев массой $27 \pm 6,1$ кг. Моделирование субпекторального кармана проводилось на 2 свиных породы Ландрас (возраст 4 месяца, самки, вес $33 \pm 1,7$ кг). Экспериментальное лечение ожоговой раны было проведено на 60 половозрелых самцах крыс Сфинкс массой 160–200 г.

2.1 Получение дермы свиной

Основой для создания ксенодермальных биоматериалов была нативная кожа поросят породы Ландрас (гибридная датская беконная порода) возрастом 3,5–5,5 месяца ($n = 4$). Животные были получены из учебно-опытного хозяйства «Краснодарское», входящего в структуру ФГБОУ ВО КубГАУ, со всеми соответствующими ветеринарными документами.

Животным вводили летальные дозы золетила (1 мг/кг, «Virbac», Франция) и ксилазина (4 мл/кг, «Rometar Spofa», Чехия). Забор дермы проводили с боковых поверхностей и спины животных, донорский участок кожи предварительно обрабатывали, затем удаляли эпидермис с помощью электродерматома ДЭ-60-01 и ДЭ-100-01 (ЗАО «Ассоциация Аэрокосмических Инженеров», Россия), после чего забирали образцы дермы (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Забор лоскута дермы свиньи электрическим дерматомом ДЭ-100-01

Полученные образцы дермы свиньи промывали стерильным физиологическим раствором (ООО «МОСФАРМ», Россия), помещали в маркированные zip-пакеты и хранили при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1–6 месяцев для предварительной криодеструкции клеточных элементов дермы.

2.2 Методология децеллюляризации дермы свиньи

Для проведения децеллюляризации и химической обработки образцов дермы свиньи использовались следующие реагенты:

- детергенты: тритон X-100 («Sigma-Aldrich», США), дезоксихолат натрия («Sigma-Aldrich», США);
- химические агенты: NaOH («Вектон», Россия), H_2O_2 («Йодные Технологии и Маркетинг», Россия), борная кислота («Реахим», Россия), $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ («ThermoFisher Scientific», США), KCl («Реахим», Россия), NaCl («Реахим», Россия), CaCl_2 («Реахим», Россия), фосфатно-солевой буфер («Gibco», Великобритания);
- ферменты: Трипсин-Версен («Биолот», Россия), свиная панкреатическая ДНК-аза I 2000 ЕД («Sigma-Aldrich», США).

Все необходимые для децеллюляризации растворы готовили с использованием дистиллированной воды. Последовательность воздействия и

концентрации растворов подбирались экспериментально и конечные алгоритмы децеллюляризации свиной дермы для получения различных биоматериалов представлены в главах 3, 5 и 7.

Обработка растворами ферментов проводилась с использованием шейкера-инкубатора Excella E24 («New Brunswick», США) при температуре 37 °С, остальными растворами – на орбитальном шейкере Biosan PSU-10 («Biosan», Латвия) при комнатной температуре. После каждого воздействия на образец раствором, он промывался деионизированной водой, подготовленной с помощью системы очистки воды Milli-Q Integral 3 («Millipore», Франция).

2.3 Оценка качества децеллюляризации образцов

2.3.1 Количественный анализ ДНК

После децеллюляризации свиной дермы в образцах определяли содержание остаточной ДНК с использованием набора реагентов для выделения ДНК Dneasy Blood and Tissue Kit («Qiagen», Швеция) по протоколу фирмы-изготовителя с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 («ThermoFisher Scientific Inc.», США). Образцы лизировали непосредственно протеиназой К, измеряли оптическую плотность при длине волны 655 нм в трех независимых пробах, каждую в 3 итерациях. Критерием качества имплантируемых биологических материалов в отношении количества ДНК считали концентрацию менее 50 нг/мг ткани [P.M. Crapo et al., 2011].

2.3.2 Окрашивание DAPI

Парафиновые срезы полученных материалов (толщина 4–5 мкм) фиксировали 4 % формальдегидом в течение 10 минут. Затем к образцам добавляли 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) («Sigma Aldrich», США), разведение 1 : 1000, и инкубировали в темноте в течение 5 минут.

Флуоресцентные исследования проводились в 3 полях зрения/срезах для каждого образца на флуоресцентном микроскопе Olympus CX 41 («Olympus», Япония) с использованием синего светофильтра, данные и изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Olympus CellSens Entry («Olympus», Япония).

Критерием качества имплантируемых биологических материалов в отношении деструкции клеточных ядер считали отсутствие видимого ядерного материала в срезах тканей, окрашенных DAPI [Crapo P.M. et al., 2011].

2.3.3 Подкожная имплантация/инъекция образцов децеллюляризованных биоматериалов

Подкожная имплантация образцов биоматериалов была выполнена самцам крыс Wistar ($n = 32$), возрастом 6 месяцев, массой 260 ± 20 г. Животных наркотизировали растворами Золетила 100 (14 мл/кг; «Virbac», Франция) и Седамидина (1,2 мл/кг; «ВИК – здоровье животных», Россия), затем выполняли введение исследуемых материалов под кожу в межлопаточной области, образцы децеллюляризованого дермального матрикса (ДДМ) или нативной дермы свиньи помещались в подкожный карман на холке крысы и фиксировались двумя швами, затем кожная рана ушивалась непрерывным швом. На 7-е, 14-е, 21-е и 60-е сутки после подкожного введения образцов ДДМ выполняли эксплантацию образцов, проводили их гистологический и иммуногистохимический анализ.

Образцы децеллюляризованного гидрогелевого материала инъекционно

вводились в объеме 200 мкл в межлопаточную область самцам крыс Wistar ($n = 10$), возрастом 6 месяцев, массой 240 ± 15 г. На 3-е, 7-е сутки после подкожного введения образцов выполняли эксплантацию образцов, проводили их гистологический анализ (окрашивание гематоксилин-эозином).

Крыс выводили из наркоза введением Антимедина (20 мг/кг; «Апиценна», Россия).

2.4 Оценка влияния децеллюляризированных материалов дермы свиньи на фибробласты человека *in vitro*

В исследовании была использована клеточная линия человеческих фибробластов линии DF-1 (кожа век взрослого донора), полученная из центра коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» ИНЦ РАН г. Санкт-Петербург, паспортизированная и подтверждённая по морфологическим и молекулярным критериям (Приложение В).

Клетки культивировали в полной питательной среде (ППС), содержащей среду DMEM («Gibco», Англия), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой и 1% пенициллин-стрептомицином (НПП «ПанЭко», Россия), при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Для анализа цитотоксичности децеллюляризированных материалов дермы свиньи клетки инкубировали в среде DMEM с образцами биоматериалов в течение суток, затем проводили окрашивание флуоресцентными красителями кальцеином-AM и гомодимером этидия, входящими в состав тест-системы Live/Dead («ThermoFisher Scientific Inc.», США), согласно инструкции производителя, при этом живые клетки приобретали зелёное, а мёртвые – красное свечение. Визуализация флуоресцентного свечения проводилась на флуоресцентном микроскопе Olympus CX 41 («Olympus», Япония) с использованием соответствующих светофильтров с помощью программного обеспечения Olympus CellSens Entry («Olympus», Япония). Количественный учет

площади и интенсивности флуоресцентного окрашивания проводился с использованием программы ImageJ (National Institution of Health, США).

Для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест) образцы биоматериалов инкубировали с клетками в среде DMEM в течение 3 часов в темноте в присутствии желтой соли тетразолия (МТТ) (соотношение питательной среды к МТТ – 10 : 1), затем добавляли раствор 10 % додецилсульфата натрия в 0,01 М HCl и инкубировали 1 час. Положительным контролем служили лунки, где инкубировались только дермальные фибробласты, отрицательным контролем были лунки с питательной средой DMEM. Интенсивность протекания реакции восстановления МТТ митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 («ThermoFisher Scientific Inc.», США) при длине волны 560 нм.

Для оценки биосовместимости децеллюляризованного гидрогелевого материала была проведена совместная инкубация с клеточной линией DF-1. Для этого в лунки 6-луночного планшета добавляли 200 000 клеток, затем растворы, содержащие ППС и гидрогель в различных соотношениях (9:1, 5:1, 3:1, 1,8:1). В качестве контроля использовалась ППС без добавления ксенодермального гидрогеля. Эксперимент проводили в трёх повторностях. Выживаемость, пролиферативную активность и морфологические характеристики клеток оценивали через 24 и 72 часа инкубации при температуре +37°C, 5% CO₂. Мониторинг морфологии клеток проводили с помощью программного обеспечения «Mosaic 2.4» («Tucsen Photonics», Китай). Подсчёт количества клеток и процента мёртвых клеток выполнялся на автоматическом счётчике клеток «Bio-Rad TC20» («Bio-Rad Laboratories», США) с использованием трипанового синего («Sigma Aldrich», США).

Миграционную активность клеток оценивали с использованием метода «царапины» (scratch assay) в условиях *in vitro*. Клетки дермальных фибробластов 3-го пассажа высевали в 48-луночные планшеты («Corning», США) в плотности, обеспечивающей формирование плотного монослоя (2×10^5 клеток/лунку), в течение 24 часов культивирования при стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂,

ППС). После достижения 90-100% конfluenceности культуральную среду удаляли, клетки дважды промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (рН 7,4, «Биолот», Россия), после чего в центральной части каждой лунки наносили линейное механическое повреждение монослоя с помощью стандартного стерильного наконечника для автоматической пипетки (наконечник 200 мкл, диаметр узкого отверстия $0,45 \pm 0,04$ мм). Изменение площади «царапины» фиксировали через 0 и 24 часа. Количественный анализ полученных изображений проводили с использованием программы ImageJ/Fiji со встроенным плагином Wound healing size tool, позволяющим автоматически рассчитывать площадь «царапины». Миграционная активность рассчитывалась по формуле:

$$\frac{S_0 - S_{24}}{S_0} * 100, \quad (1)$$

где S_0 и S_{24} – площадь области, свободной от клеток в нулевой точке и через 24 часа.

Для количественной оценки пролиферативной активности фибробластов человека использовали метод расчёта времени удвоения популяции клеток – PDT-тест (population doubling time). Клетки высевали в 12-луночные планшеты в плотности 5×10^4 клеток/см². Инкубацию проводили в течение 72 часов в стандартных условиях культивирования. По окончании инкубации клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко, без Ca^{2+} и Mg^{2+} («Биолот», Россия), открепляли с помощью раствора Трипсина-Версена 1:1 («Биолот», Россия), и подсчитывали их концентрацию в автоматическом счётчике клеток «Bio-Rad TC20» («Bio-Rad Laboratories», США) с использованием трипанового синего («Sigma Aldrich», США).

Расчёт PDT производился по формуле:

$$PDT = \frac{t \times \log 2}{\log N_t - \log N_0}, \quad (2)$$

где t – время культивирования (ч), N_0 – число клеток на момент посева, N_t – число клеток на момент снятия. Каждое измерение проводилось в трёх независимых повторах.

2.5 Биохимические методы оценки децеллюляризированных материалов

2.5.1 Количественное определение содержания общего белка

Образцы свиной нативной дермы и децеллюляризированных матриксов взвешивали, измельчали ножницами и растирали в ступке с кварцевым песком на сухом льду, а затем получали 10% гомогенат с помощью гомогенизатора Heidolph Silent Crusher homogenizer («Heidolph Instruments», Германия) в буферном растворе (трис-НСl, рН=7,4) с добавлением 0,25 М сахарозы. В гомогенатах нативной дермы свиньи и децеллюляризированных материалов определяли содержание белка с помощью набора реактивов «Диахим-Общий белок» («НПФ Абрис+», Россия), в основе которого лежал биуретовый метод. Для этого к 20 мкл исследуемого образца, контроля (дистиллированной воды) и калибратора (бычий сывороточный альбумин (70 г/л) в растворе хлорида натрия) добавляли по 1 мл монореагента из гидроксида натрия, йодида калия, тартрата натрия-калия и сульфата меди (II), смешивали и инкубировали 10 мин при температуре 37°C. По окончании инкубации измеряли оптическую плотность пробы ($E_{\text{пробы}}$) и калибратора ($E_{\text{калибратора}}$) против контроля при 540 нм. Расчёт производили по формуле:

$$C=60* \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибратора}}} \text{ г/л} \quad (3)$$

2.5.2 Количественное определение содержания гликозаминогликанов

Проводили набором реагентов «Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay» («Biocolor Ltd.», Ирландия) по протоколу фирмы производителя. Принцип метода заключается в количественном связывании красителя для анализа сульфатированных протеогликанов и ГАГ. Анализ можно использовать для измерения общего содержания с-ГАГ, а также можно использовать для определения соотношения О- и N-сульфатированных гликозаминогликанов в

исследуемых образцах. Метка красителя, используемая в анализе, представляет собой 1,9-диметилметиленовый синий, и краситель применяется в условиях, которые обеспечивают специфическую метку для сульфатированного полисахаридного компонента протеогликанов или свободных от белка цепей с-ГАГ.

2.5.3 Количественное определение содержания гиалуроновой кислоты

Проводили набором реагентов «Purple-Jelley Hyaluronic Acid assay kit» («Biocolor Ltd.», Ирландия) по протоколу фирмы производителя. Принцип метода заключается в удалении тканевого белка и сульфатированных гликозаминогликанов перед измерением изолированной гиалуроновой кислоты, затем непосредственно выделение и измерение оптической плотности комплекса краситель «Stains-all» гиалуроновой кислотой (пределом обнаружения 0,2 мкг) при длине волны 655 нм.

2.6 Гистологические исследования

Полученные образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине, дегидратировали с последующим заключением в парафин при помощи гистопроцессора Leica TP1020 («Leica», Германия) по стандартной методике. Заливку в парафин выполняли на модульной установке EG1150H («Leica», Германия). Для общегистологической оценки препаратов при помощи ротационного микротома RM2235 («Leica», Германия) получали парафиновые срезы толщиной 4 мкм на высоко адгезивных стеклах с последующей депарафинизацией, гидратацией, окрашиванием.

Для гистологической оценки тканей выполняли окрашивание гематоксилином-эозином, по Массону («БиоВитрум», Россия) по инструкции

изготовителя. Для выявления тучных клеток в образцах соединительной ткани регенерата кожи при экспериментальном лечении ожоговых ран окрашивали толуидиновым синим. Для каждого препарата подсчет тучных клеток велся в 10 полях зрения при увеличении $\times 200$ с последующим пересчетом на площадь одного поля зрения ($0,074 \text{ мм}^2$). Для характеристики активности тучных клеток рассчитывалась степень дегрануляции по формуле:

$$\text{СД} = \frac{\text{ДФ}}{\text{ТК}} \times 100, \quad (4)$$

где СД – степень дегрануляции; ДФ – количество дегранулировавших тучных клеток, а ТК – общее количество тучных клеток.

Для количественной оценки патогистологических изменений использовали компьютерную морфометрию с помощью программного обеспечения Image J (National Institution of Health, США) и плагина ИНС metrics. Оценку диаметра кровеносных сосудов и коллагеновых волокон выполняли с помощью инструмента «ручное выделение».

2.7 Иммуногистохимические исследования

При иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании использовали термическую демаскировку антигена и поликлональные антитела к Т-лимфоцитарному рецептору – CD3 («Abcam», Великобритания), маркеру нейтрофилов – CD16b («Abcam», Великобритания); к маркеру эндотелиальных клеток – CD31 («Abcam», Великобритания) и к макросиалину моноцитов и макрофагов – CD68, («Abcam», Великобритания), к фибробластам дермы anti-Vimentin antibody («Abcam», США), к цитокератинам Anti-pan Cytokeratin antibody («Abcam», США), к компонентам ВКМ – фибронектину («FineTest», Китай), коллагену I («FineTest», Китай) и IV типа («FineTest», Китай) согласно инструкции производителя. Все образцы до и после имплантации исследовали с помощью микроскопа Olympus CX 41 («Olympus», Япония) при различном увеличении. При количественном подсчёте результатов иммуногистохимического исследования

использовали цветовую сегментацию с выделением зеленого канала, бинаризацию по цвету и инструмент «анализатор частиц» с помощью программного обеспечения Image J (National Institution of Health, США) и плагина ИНС metrics. Затем рассчитывали КПО – коэффициент площади окрашивания, который представляет собой отношение площади, занимаемой иммунореактивным цветным продуктом, к общей площади среза.

2.8 Иммуноферментный анализ

Содержание коллагена I типа определяли в гомогенатах нативной дермы свиньи, децеллюляризованных матриксов, в децеллюляризованном гидрогелевом материале и супернатантах, которые собирали после 48 часов инкубации с исследуемым материалом. Получение гомогенатов описано в разделе 2.5.1.

Содержание цитокинов интерлейкина-1 бета ($IL1\beta$), интерлейкина-4 ($IL4$), интерлейкина-6 ($IL6$), интерлейкина-8 ($IL8$), интерлейкина-10 ($IL10$), фактора некроза опухоли альфа ($TNF\alpha$), фактора роста тромбоцитов ($PDGF A$), фактора роста эндотелия сосудов ($VEGF A$), трансформирующего фактора роста бета ($TGF\beta1$) и инсулиноподобного фактора роста 1 ($IGF1$) определяли в сыворотке крови животных до и после нанесения ожоговой раны в динамике репарации на 1-е, 3-е, 7-е, 14-е сутки. Для получения сыворотки кровь забирали из хвостовой вены в пробирки с активатором свертываемости (оксид кремния), затем центрифугировали 5 минут в режиме 2500 об/мин. Исследования проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Filter Max F5 («Molecular Devices», США) с использованием соответствующих наборов реагентов ELISA (кат. номера: SEA571Po; SEA571Hu; SEA071Ra; SEA077Ra; SEA079Ra; SEA080Ra; SEA056Ra; SEA133Ra; SEA528Ra; SEA143Ra; SEA124Ra; SEA050Ra, «Cloud-Clone Corp.», Китай) согласно протоколу производителя.

2.9 Выделение, культивирование и характеристика дермальных фибробластов свиньи

Дермальные фибробласты свиньи были выделены из кожи поросенка породы Ландрас путем их механического измельчения и добавления 0,2 % раствора коллагеназы и раствора трипсин-ЭДТА с последующим инкубированием в течение 18–20 часов. Затем выполнялось механическое разделение эпидермиса от дермы, повторное измельчение образцов и три цикла отмывки фосфатно-солевым буфером. К осадку добавляли 1 % раствор коллагеназы в соотношении «фермент: осадок» – 3 :1 и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут. Полученную суспензию 3 раза отмывали в большом количестве фосфатно-солевого буфера, затем переносили в культуральные флаконы. Дальнейшее культивирование проводили в полной питательной среде (ППС), состоящей из среды DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 1 % антибиотика-антимикотика пенициллин-стрептомицина (НПП «ПанЭко», Россия). На втором пассаже клетки отмывали фосфатно-солевым буфером от ППС, добавляли BSA-буфер («BD Pharmingen», США) и окрашивали с помощью моноклональных антител против CD90, меченных FITC («BD Pharmingen», США) и моноклональных антител против CD105, меченных PE («BD Pharmingen», США), а затем исследовали на проточном цитометре BD FACS Calibur («Becton Dickinson», США) (Рисунок 2).

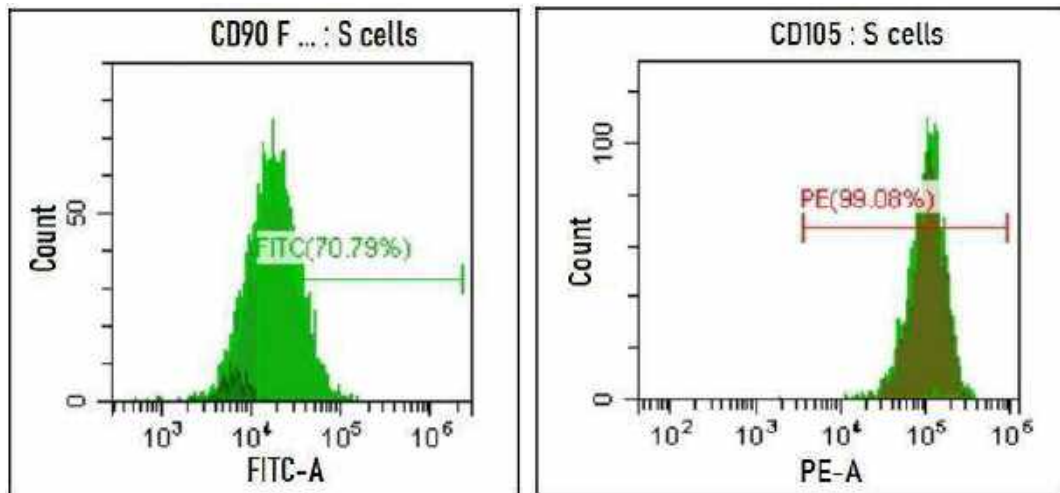


Рисунок 2 – Результат фенотипирования клеток, выделенных из дермы свиньи на маркеры стволовых клеток CD90 и CD105

Данные клетки в дальнейшем использовались для засеивания децеллюляризированных дермальных матриц статическим методом в 6-луночной планшете клеточной суспензией из расчета 25000 кл/см² в течение 48 часов в CO₂-инкубаторе.

2.10 Биомеханические тесты

Для сравнительной оценки механических свойств все образцы были разделены на 3 группы: в первую вошли образцы ДДМ (дерма свиньи, обработанная детергентно-энзиматическим способом) (n = 15), во вторую группу – нативные образцы свиной дермы, не прошедшие обработку (n = 15), контрольную группу составили образцы разрешенного к применению в РФ ксенотрансплантата для герниопластики «Permacol Surgical Implant®» («Covidien», Франция) (n = 15).

Исследование напряжения, относительной деформации при разрыве и начального модуля упругости образцов было проведено с помощью универсальной разрывной машины Instron 1122 («Instron», США). Был применён следующий режим испытаний: скорость растяжения 20 мм/мин, температура 23 ± 1 °С, влажность – 45 %, давление – 762 мм рт. ст. Базовая длина образцов – 30 мм,

испытания – во влажном состоянии. Перед началом испытаний образцы нарезались и помещались в специальные рамки с целью минимизации их деформации при заправке в разрывную машину.

На основе полученных диаграмм растяжения определялись вышеперечисленные механические характеристики образцов по следующим формулам:

$$\sigma_p = \frac{P_p}{F_0}, \quad (5)$$

где σ_p – напряжение (МПа), P_p – разрывная нагрузка (Н), а F_0 – площадь поперечного сечения (мм²);

$$\varepsilon_p = \frac{\Delta l}{l_0}, \quad (6)$$

где ε_p – относительная деформация при разрыве (%), Δl – абсолютное удлинение (мм), а l_0 – начальная длина (мм);

$$E_0 = \frac{\Delta \sigma}{\Delta \varepsilon}, \quad (7)$$

где E_0 – начальный модуль упругости (МПа). Начальный модуль упругости определялся приращением начального прямолинейного участка.

При построении диаграммы растяжения образцов биоматериалов в программе Origin 8.5.1 («OriginLab Corporation», США) были использованы средние арифметические полученных значений.

2.11 Моделирование ожоговой раны и экспериментальное лечение мелких лабораторных животных

Экспериментальное лечение с применением децеллюляризованного гидрогелевого материала было проведено на 60 половозрелых самцах крыс Сфинкс массой 160–200 г. Крысы были разделены на три группы: группа 1 – крысы без

лечения, или контрольная группа ($n = 20$), группа 2 – крысы с лечением комбинированной противомикробной мазью «Левомеколь®» (диоксометилтетрагидропиримидин + хлорамфеникол) (ООО «НИЖФАРМ», Россия), или группа сравнения ($n = 20$), и группа 3 – крысы с лечением децеллюляризированным гидрогелевым материалом, или опытная группа ($n = 20$). Всем животным под общим газовым наркозом «Изофлуран» (индукция 2–5 %, поток 0,25–4 %; ООО «Миралек», Россия) в области холки наносили контактные ожоговые раны с помощью металлического груза массой 100 г и диаметром 3 см, нагретого до 100 °С в кипящей воде, в течение 15 с. Раны крыс опытной группы и группы сравнения обрабатывали каждый день до 7-го дня эксперимента включительно в объёме 0,3 г. Всем животным после оперативного вмешательства вводился анальгезирующий препарат «Флекспрофен 2,5 %» (5 мг кетопрофена/кг; «Нита-Фарм», Россия) и антибиотик «Конвенция» (5 мг/кг; «Zoetis», США). Образцы кожи у крыс брались с помощью устройства для биопсии кожи диаметром 8 мм («Medax», Италия) на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки с прилежащими тканями для гистологического исследования.

2.12 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Office 2016, Graph Pad Prism version 6.04 (США). Применялись методы дескриптивной статистики, анализ средних и распределений ($M \pm SD$), медианы с первым и третьим квартилем ($Me [Q_1; Q_3]$), проводилось построение кривых распределений с последующей нормализацией, а также вычисление абсолютных и относительных частот изучаемых показателей. Различия оценивали в зависимости от характера распределения данных в выборках, с помощью: χ^2 Пирсона, F-критерия Фишера, для сравнения независимых групп использовали критерий Манна-Уитни, для сравнения зависимых групп использовали критерий Вилкоксона. Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ КАК МАТЕРИАЛА ДЛЯ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ

На первом этапе исследования был проведён сравнительный анализ эффективности двух алгоритмов обработки дермы свиньи с целью получения нешпигованного химическими агентами децеллюляризованного дермального матрикса (ДДМ) для использования в качестве раневого покрытия, так как выбор оптимального способа получения внеклеточного матрикса (ВКМ) является решающим при переходе к *in vivo* этапу исследования. Критериями выбора при подборе алгоритма обработки дермы для получения биоматериала было: отсутствие токсичности, в том числе цитотоксичности, дермального матрикса (при недостаточной степени отмывки реагентов); простота методики; небольшая продолжительность методики; минимальное разрушение гистоархитектоники ВКМ с сохранением тканеспецифичности; полное разрушение и удаление клеток и клеточных структур.

3.1 Сравнительный анализ результатов обработки образцов дермы свиньи детергентно-энзиматическим способом

Для обработки дермы свиньи были применены два алгоритма децеллюляризации на основе детергент-энзиматического метода, которые позволяют наиболее полным образом удалять клетки из тканей, но в то же время обладают щадящими свойствами по отношению к белкам внеклеточного матрикса. В основе алгоритма № 1 было использование раствора дезоксихолата натрия и тритона X-100, в алгоритме № 2 был использован только дезоксихолат натрия (Таблица 4).

Таблица 4 – Алгоритмы детергентно-энзиматической обработки дермы свиньи

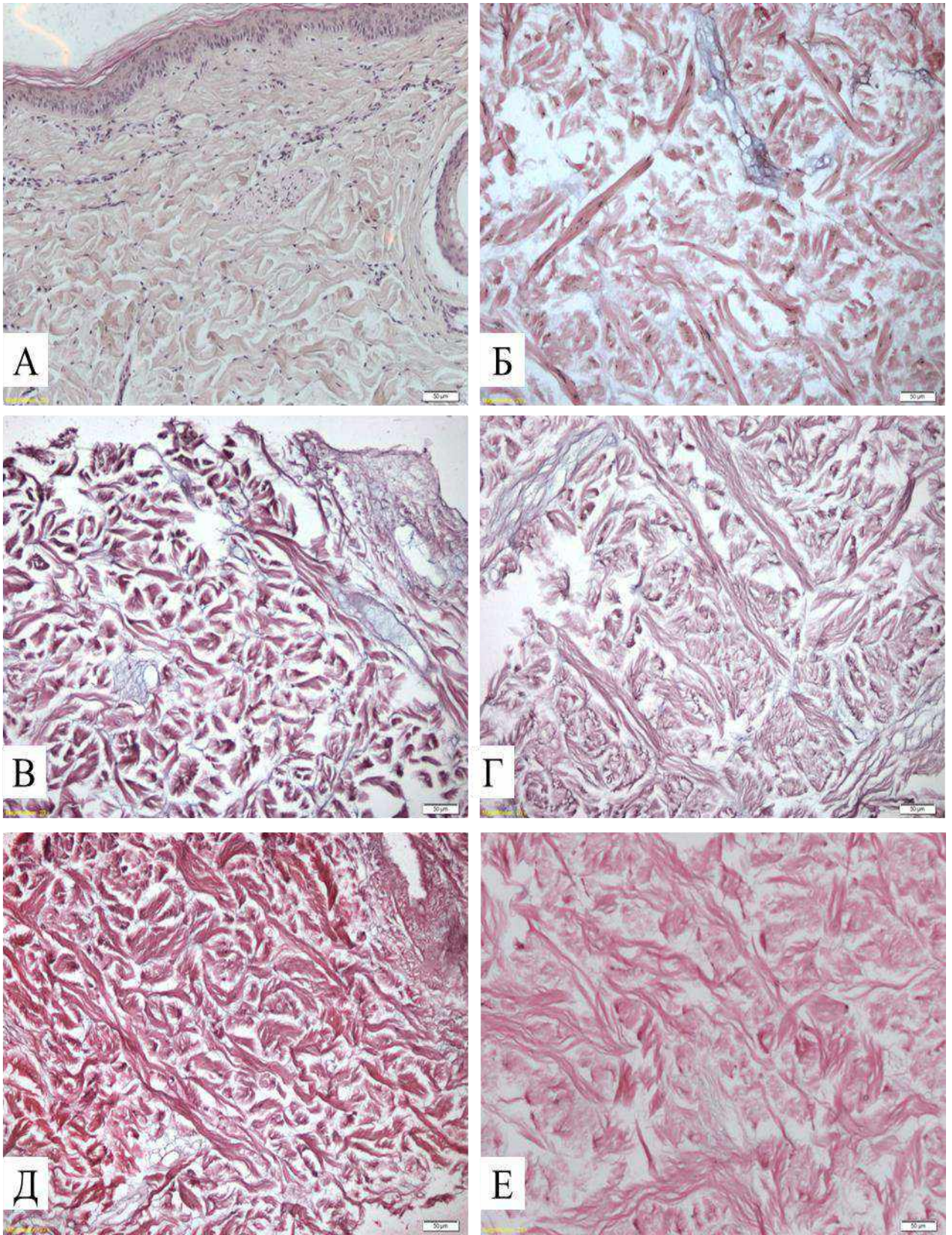
Реагент/воздействие		Время, ч	Температура, °С	Режим, об/мин
Алгоритм № 1 (n = 15)	замораживание	72	-80	–
	трипсин-Версен 1:1	18	+37	170
1 цикл	тритон X-100 1 %	2	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	2	+20–25	170
2 цикл	тритон X-100 1 %	2	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	2	+20–25	170
3 цикл	тритон X-100 1 %	2	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	2	+20–25	170
4 цикл	тритон X-100 1 %	2	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	2	+20–25	170
5 цикл	тритон X-100 1 %	2	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	2	+20–25	170
	панкреатическая ДНКаза I, 2000 ЕД	4	+37	100
Алгоритм № 2 (n = 15)	замораживание	72	-80	–
	Трипсин-Версен 1:1	18	+37	170
1 цикл	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	4	+20–25	170
2 цикл	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	4	+20–25	170
3 цикл	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	4	+20–25	170
4 цикл	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	4	+20–25	170
5 цикл	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	4	+20–25	170
	панкреатическая ДНКаза I, 2000 ЕД	4	+37	100

Сырьём для обработки детергентно-энзиматическим способом послужили образцы дермы свиньи размерами $3 \pm 0,1 \times 3 \pm 0,1 \times 0,03$ см ($n = 30$). После каждого воздействия матрикса промывали в деионизированной воде в течение 30 минут.

Различие в алгоритме предложенных методик было продиктовано желанием сократить время воздействия дезоксихолата натрия на ткани и оценить разницу в эффекте воздействия на ткани в сравнении с алгоритмом, в котором использован более мягкий по своему действию на ВКМ детергент – тритон X-100. Следует отметить, что на первых этапах разработки способа получения ДДМ одним из реагентов выбора был раствор додецилсульфата натрия. Однако, высокая концентрация вещества, необходимая для разрушения клеток дермы, оказывала значительное повреждающее воздействие на волокна ВКМ. Невозможность полностью элиминировать действующий раствор из матрикса приводила к значительному цитотоксическому действию на клетки, таким образом, полученные данные заставили отказаться от дальнейшего применения раствора додецилсульфата натрия.

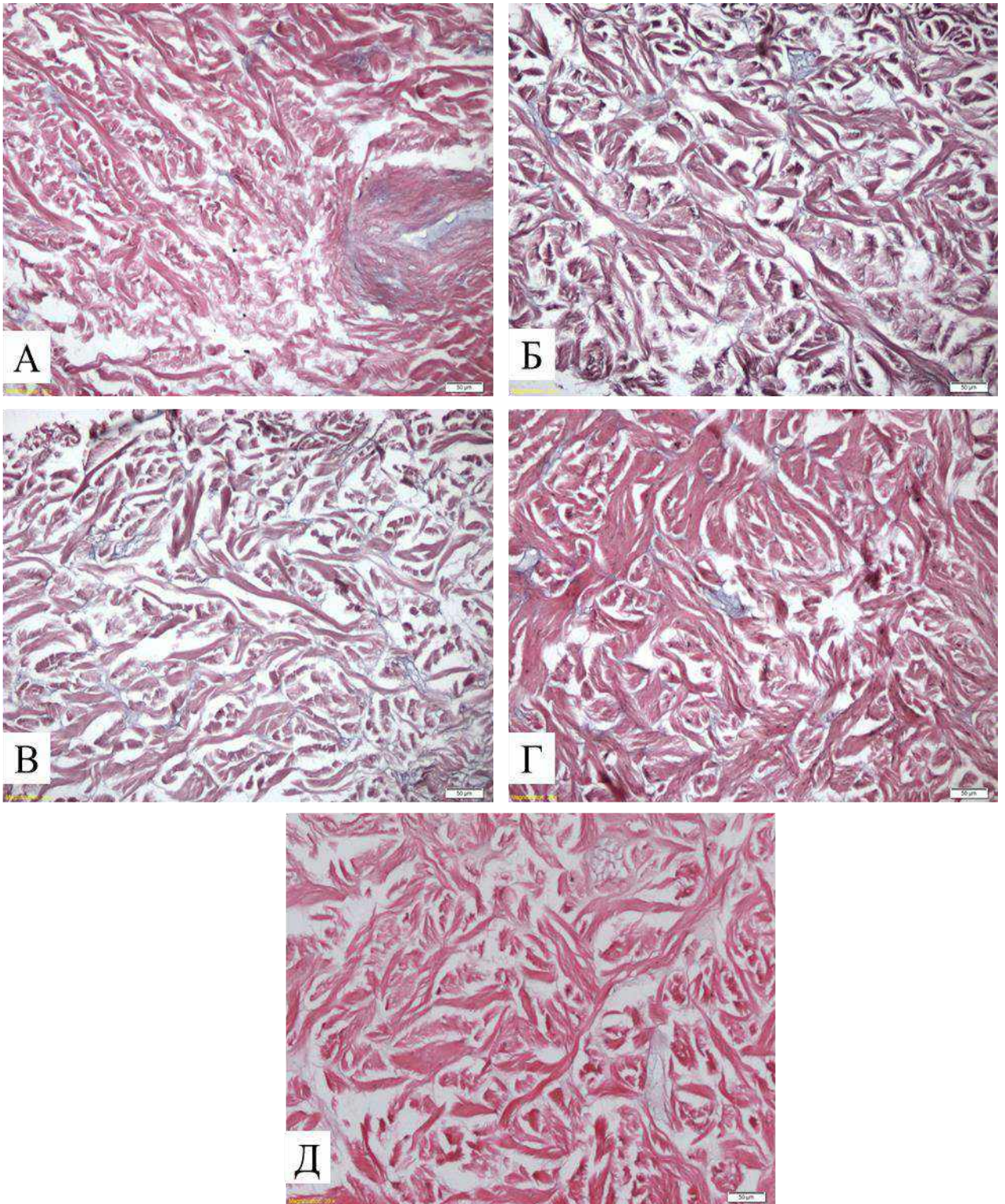
Общим для двух предложенных методик была предварительная обработка дермы раствором трипсин-Версена, так как нативная дерма свиньи имела участки эпителиального слоя и базальной мембраны. Данный фермент эффективно воздействует на клетки плоского эпителия, удаляя их, а также разрыхляет саму дерму, делая ее более восприимчивой к воздействию детергентов.

Окрашивание гематоксилином и эозином, проводимое после каждого цикла обработки детергентами, показало, что сохранные клетки и клеточные ядра в матриксе отсутствовали уже после второго цикла обработки по алгоритму № 1 и после первого цикла обработки по алгоритму № 2. Однако, большое количество базофильно окрашенных нитей матрикса, присутствовавшее в срезах, и высокое количественное содержание ДНК в тканях продиктовали необходимость увеличения количества циклов обработки до пяти в обоих случаях (Рисунок 3, Рисунок 4).



А – нативная дерма, Б – Е – дерма после 1 – 5 цикла обработки детергентами соответственно. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. х 200

Рисунок 3 – Динамика последовательных изменений структуры ВКМ дермы в процессе децеллюляризации по алгоритму №1



А – Д – после 1 – 5 цикл обработки детергентами соответственно (гистологическая структура нативной дермы представлена на рисунке 3А).

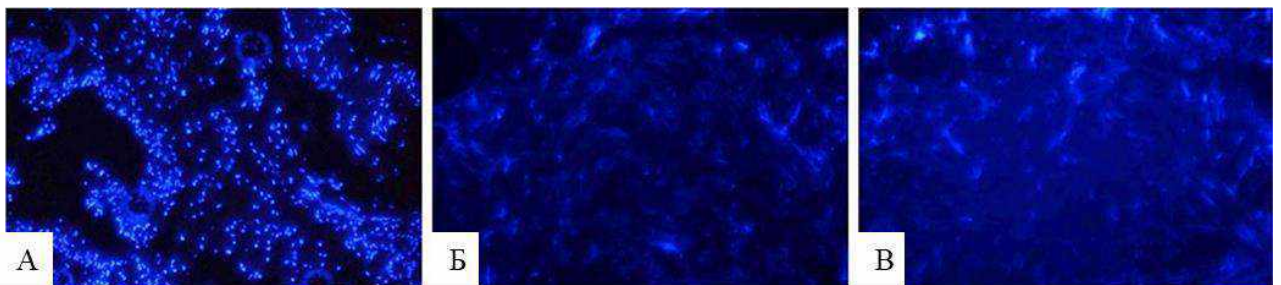
Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. х 200

Рисунок 4 – Динамика последовательных изменений структуры ВКМ дермы в процессе децеллюляризации по алгоритму №2

Окраска ДНК в образцах дермы с помощью флуорофора DAPI (тест на наличие интактных ядер и ядерного материала) подтвердила эффективность использования двух предложенных методик В нативной дерме клеточные ядра активно флуоресцировали и были выявлены в большом количестве (Рисунок 5).

В децеллюляризованных образцах обнаружили лишь незначительную флуоресценцию остаточной ДНК и аутофлуоресценцию волокон ВКМ после проведения пятого цикла обработки по каждому из алгоритмов.

В результате обработки растворами ферментов и детергентов образцы дермы приобрели молочно-белый цвет, были достаточно прочными, растяжимыми и легко моделировались по форме (Рисунок 6).



А – образцы нативной дермы свиньи; Б – образцы дермы свиньи после обработки по алгоритму № 1; В – образцы дермы свиньи после обработки по алгоритму № 2

Рисунок 5 – Результаты определения наличия интактных ядер. Окрашивание

DAPI. Ув. $\times 200$

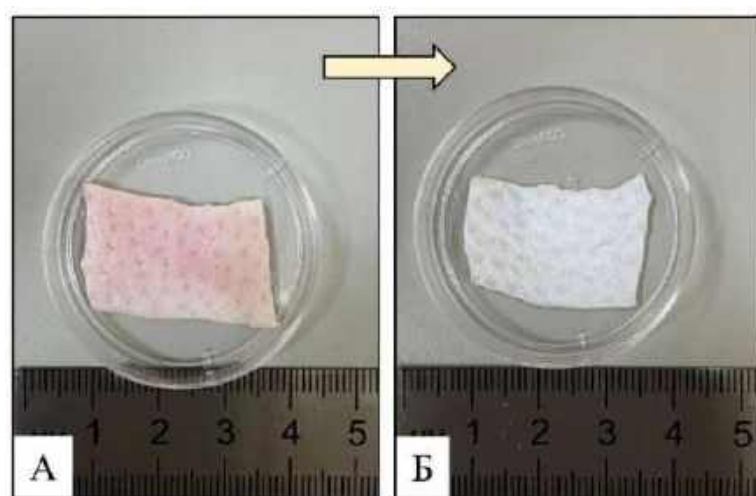


Рисунок 6 – Внешний вид образцов дермы свиньи до (А) и после (Б) обработки детергентно-энзиматическим способом по алгоритму № 1

3.2 Обоснование выбора оптимальной методики обработки дермы свињи для получения децеллюляризованного дермального матрикса

Одним из необходимых критериев качества, разрабатываемых децеллюляризованных матриксов является определение остаточного содержания ДНК. Количественный анализ показал, что содержание ДНК в децеллюляризованной дерме после пятого цикла обработки снижалось до 13,7 % ($45,4 \pm 2,8$ нг/мг ткани) и 12,1 % ($40,1 \pm 3,1$ нг/мг ткани) по алгоритму № 1 и № 2, соответственно, по отношению к количеству ДНК в нативной дерме ($330,4 \pm 12,3$ нг/мг ткани) ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$) (Рисунок 7).

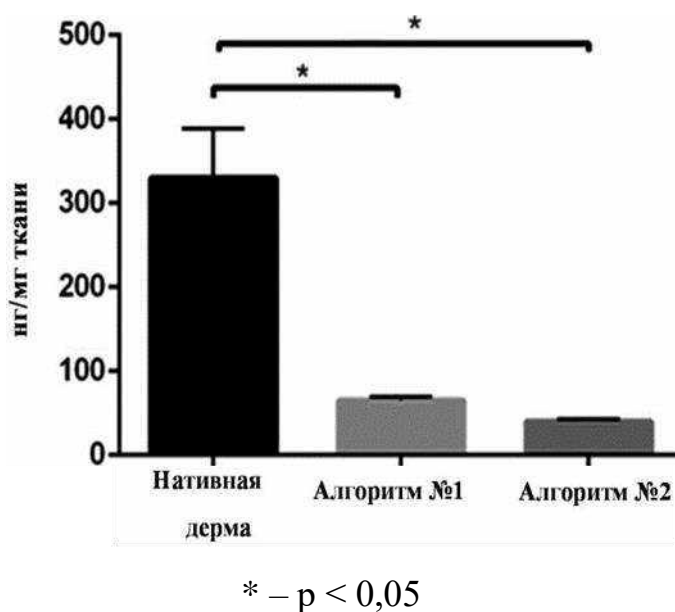


Рисунок 7 – Результаты количественного анализа содержания ДНК в нативной и децеллюляризованной дерме свињи

Полученные результаты свидетельствовали об эффективности двух исследуемых алгоритмов децеллюляризации дермы свињи в отношении удаления ядерного материала.

Образцы ДДМ, полученные по двум предложенным алгоритмам, культивировали совместно с дермальными фибробластами, выделенными из дермы свињи (см. раздел 2.4), затем проводили оценку метаболической активности и жизнеспособности клеток.

МТТ-тест выявил во всех опытных образцах живые, метаболически активные клетки. Жизнеспособность клеток оказалась достаточно высокой и сопоставимой при культивировании в присутствии образцов дермы децеллюляризированной по алгоритму № 1 и алгоритму № 2 ($p > 0,05$) (Рисунок 8).

В целом, при сравнении всех групп по результатам МТТ-теста, было установлено, что образцы ДДМ, полученные по алгоритму № 1 и № 2, являются биосовместимыми и не обладают цитотоксичностью по отношению к аллогенным клеткам дермы свиньи.

Дифференциальное выявление живых (флуоресценция с кальцеином) и мертвых (флуоресценция с гомодимером этидия) клеток, позволило дополнительно визуализировать живые клетки во время статичной рецеллюляризации каркаса (Рисунок 9). Было установлено, что культивированные клетки сохраняли свою жизнеспособность на обоих полученных матриксах в течение 72 часов. На первые сутки инкубации наибольшая жизнеспособность клеток отмечалась в лунках с образцами ДДМ, полученными по алгоритму № 1 по сравнению с алгоритмом № 2 на фоне контрольных лунок.

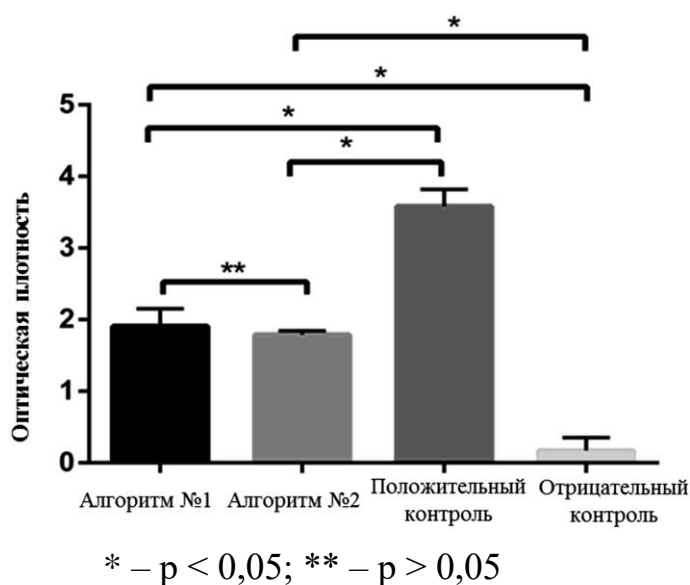
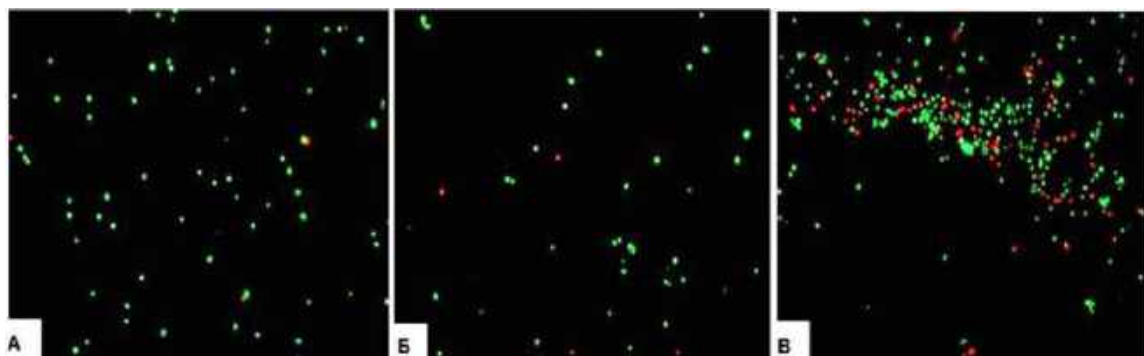


Рисунок 8 – Результаты МТТ-теста для образцов ДДМ



А – контроль; Б – алгоритм № 1; В – алгоритм № 2

Рисунок 9 – Оценка цитотоксичности образцов ДДМ методом Live/Dead через 24 часа после инкубации. Кальцеин АМ и гомодимер этидия. Ув. $\times 100$

Результаты количественного анализа данных о степени жизнеспособности и пролиферативной активности дермальных фибробластов при культивировании в присутствии матриксов на основе дермы, полученные с помощью программного обеспечения Olympus cellSens Entry, представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Оценка пролиферативной активности и жизнеспособности клеток на образцах ДДМ, полученных по различным алгоритмам обработки

Группа	Количество живых клеток	Количество мертвых клеток	Общее количество клеток	% живых клеток
24 часа инкубации				
Контроль	76,50 \pm 3,08	6,50 \pm 2,88	83,01 \pm 5,51	92,32
Алгоритм № 1	70,83 \pm 4,17	8,67 \pm 4,18	79,5 \pm 6,83	89,36
Алгоритм № 2	39,17 \pm 3,19*	6,50 \pm 2,43	45,67 \pm 3,78*	85,89*
72 часа инкубации				
Контроль	319,00 \pm 10,24	12,33 \pm 1,86	331,33 \pm 9,48	96,27
Алгоритм № 1	153,67 \pm 13,33*	13,33 \pm 3,33	167,00 \pm 11,00*	92,05
Алгоритм № 2	191,5 \pm 7,89*	71,33 \pm 4,46*	262,83 \pm 10,80*	72,87*
Примечание: * - $p < 0,05$, различия значимы относительно контроля				

Из данных Таблицы 5 видно, что несмотря на высокую пролиферативную активность клеток, культивируемых в присутствие образцов ДДМ, полученных по алгоритму № 2, процент погибших клеток был выше, чем в лунках с образцами, полученными по алгоритму № 1. Разница в результатах связана с меньшей длительностью обработки дермы раствором дезоксихолата натрия при выполнении

алгоритма № 1 и, как следствие, меньшим его остаточным содержанием в матриксе.

Резюме

Поиск оптимального алгоритма обработки ткани является основополагающим для дальнейшего использования ДДМ в качестве раневого покрытия, что продиктовано, прежде всего, получением такого биопластического материала, который бы максимально соответствовал нативному внеклеточному матриксу дермы, был биосовместим и активно функционален.

Проведенный сравнительный анализ двух методик децеллюляризации дермы свиньи показал, что оба алгоритма эффективно удаляют клетки и ядерный материал, при этом архитектура межклеточного вещества сохраняется неповрежденной, так как не происходит разрушения волокнистых структур. Но при оценке биосовместимости матриксов преимущества продемонстрировал ДДМ, обработанный комплексно детергентами дезоксихолатом натрия и тритоном X-100 по алгоритму № 1, так как ДДМ, обработанный по алгоритму № 2 не только снижал метаболическую активность фибробластов, но и достоверно уменьшал их жизнеспособность.

ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО И РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

4.1 Разработка способа моделирования ожоговой раны на крупных лабораторных животных

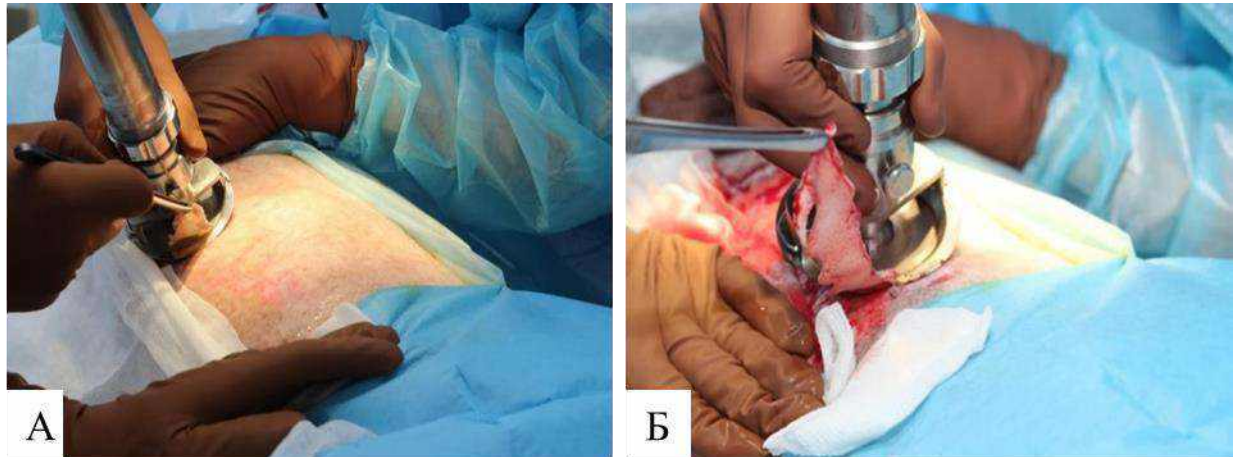
При изучении клинической эффективности раневых покрытий следует выбирать наиболее схожие системы, в частности, кожа свиньи структурно аналогична коже человека по толщине и расстоянию между волосяными фолликулами, что делает её адекватной моделью для исследований лекарственных средств, используемых для заживления ран и ожоговых повреждений.

В литературе описано множество способов создания ожоговых ран в условиях эксперимента, однако чаще всего используются мелкие лабораторные животные (грызуны, кролики). Наиболее простым из известных способов моделирования ожоговой раны является применение контактного воздействия нагретых металлических пластин, что и легло в основу использованного в исследовании способа моделирования ожоговой раны на крупных лабораторных животных (свиньи породы Ландрас).

Осуществление моделирования ран у свиньи производили в условиях операционной под наркозом в положении на боку по следующему алгоритму:

- 1) стандартная обработка операционного поля;
- 2) разметка будущего раневого дефекта с помощью сантиметровой линейки;
- 3) нанесение раскалённой металлической контактной площадкой ожоговой раны необходимых размеров и необходимой глубины (III и IV ст. по классификации Вишневского);
- 4) некрэктомия с помощью электродерматома с формированием двух ран: а) рана, у которой дном является нижние слои дермы и мозаично обнажённые участки

подкожно-жировой клетчатки (III степень); б) рана, у которой дном является поверхностная фасция и мышечная ткань (IV степень) (Рисунок 10, Рисунок 11).



А – IIIБ степень; Б – IV степень

Рисунок 10 – Моделирование раневой поверхности различной глубины с помощью электродерматома



Рисунок 11 – Внешний вид смоделированной раневой поверхности различной глубины

На смоделированную рану, у которой дном являлись нижние слои дермы, отступив от краев раны по 1-2 см для предотвращения краевой эпителизации с условием расстояния между раневыми покрытиями 1-2 см фиксировались раневые покрытия и выполнялась аутопластика, затем накладывали асептическую повязку. Каждые 3 дня после операции под общим обезболиванием, также в положении на боку, как и в ходе операции с участков раны, раневых покрытий и аутопластики выполнялась биопсия.

Через 7-9 дней ожоговая рана на поверхностной фасции и мышечной ткани начинала гранулировать, и на неё также было выполнено наложение раневых покрытий и аутопластики, что дало возможность оценить эффективность исследуемых раневых покрытий на одном животном, как на чистой хирургической ране, так и на гранулирующей ране. В дальнейшем при перевязках через 3 дня также производилась биопсия для изучения в динамике приживления раневых покрытий и аутопластики на ранах различной глубины. После эксперимента, через 2-3 недели от первой операции, на оставшиеся раны у животного выполняли свободную кожную аутопластику расщеплёнными трансплантатами толщиной 0,3-0,5 мм, взятыми на этом же боку. Через 5-7 дней после последней аутопластики повязки снимали и наблюдали полную эпителизацию раневой поверхности.

Таким образом, данный способ позволяет:

- провести сравнительную оценку эффективности приживления аутопластики и раневых покрытий на раневой поверхности;
- полностью предотвратить краевую эпителизацию, которая может исказить результаты;
- выполнять серии биопсий из раны в течение 2–3-х недель;
- обеспечивать удобство проведения наркоза и пробуждения животного вследствие формирования раны на одном боку;
- в конце эксперимента выполнять аутопластику, тем самым сохранять жизнь животного.

4.2 Результаты сравнительной оценки эффективности применения децеллюляризованного и рецеллюляризованного дермального матрикса для лечения ожоговых ран в эксперименте

Несмотря на значительный прогресс в лечении ожоговых повреждений кожи, достигнутый за последние десятилетия, сильные ожоги остаются опасным для жизни состоянием, часто с серьезными последствиями. Вызванное некрозом ткани

выделение медиаторов воспаления и образование *in situ* токсических липидно-белковых комплексов приводит к местному воспалению. Помимо интенсивной поддерживающей терапии лечение ожогов требует быстрого удаления токсического струпа и восстановления структуры и функции разрушенной кожи. Это достигается путем хирургического иссечения струпа (некрэктомия) и последующей трансплантации аутологичных расщепленных лоскутов со здоровых участков кожи [Chua A.W.C. et al., 2016; Семиглазов А.В. и соавт., 2023; Зиновьев Е.В. и соавт., 2024].

В настоящее время не существует искусственных кожных конструкций, которые бы полностью воспроизводили нормальную кожу [Tavakoli S. et al., 2021]. Но вместе с тем, продолжаются исследования в области разработки раневых покрытий, содержащих клеточный компонент [Seavey J. G. et al., 2016; Lykov A. et al., 2021], в связи с этим на данном этапе исследования была проведена сравнительная оценка эффективности применения ДДМ, засеянного аллогенными фибробластами свиньи, для лечения ожоговых ран в качестве раневого покрытия, для чего предварительно была смоделирована кожная раны у свиньи в эксперименте *in vivo* (см. раздел 4.1).

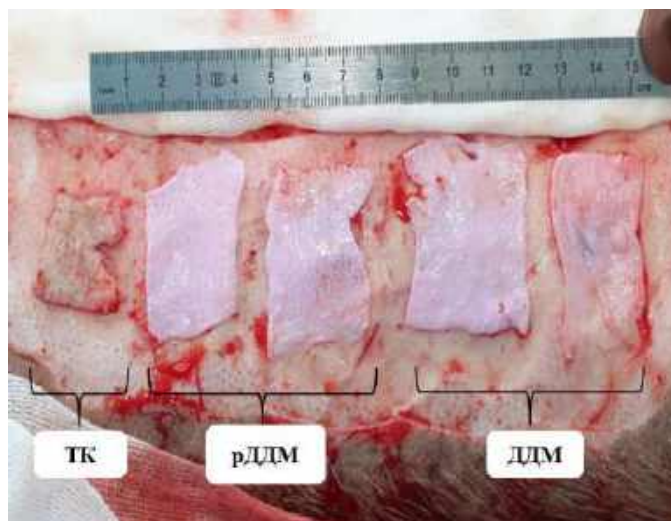
Эксперимент проводили на поросенке породы Ландрас (возраст 15 недель, масса 25,5 кг), были сформированы раны двух типов:

1) рана размером 15×5 см, у которой дном являлись нижние слои дермы и мозаично обнажённые участки подкожно-жировой клетчатки (проксимальнее – ближе к позвоночнику). Данная рана по глубине поражения соответствовала III степени по классификации Вишневого;

2) рана, у которой дном служили поверхностная фасция и мышечная ткань (IV степень) для получения гранулирующей раны через 7–8 дней.

Раны первого типа были сразу закрыты 5 образцами раневых покрытий (размерами $2,5 \pm 0,7$ см × $4 \pm 0,9$ см × $0,03 \pm 0,01$ см каждое), расстояния между раневыми покрытиями составило 1–2 см: 2 образца были представлены ДДМ, полученными по алгоритму № 1; 2 образца – рецеллюляризованными дермальными аллофибробластами матриксами (рДДМ) и 1 образец – аутокожей в

качестве контроля (Рисунок 12).



ТК – толстая кожа; ДДМ – децеллюляризованный дермальный матрикс;
рДДМ – рецеллюляризованный дермальный матрикс

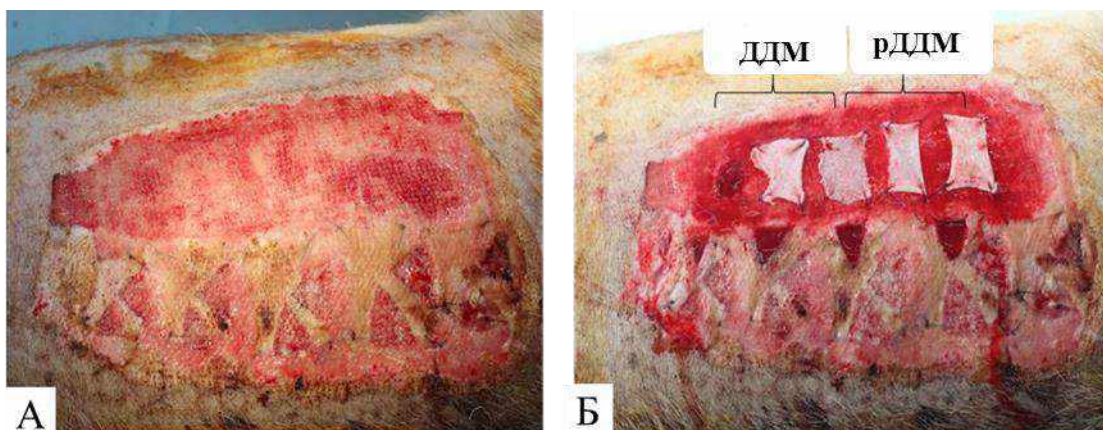
Рисунок 12 – Фиксация исследуемых биоматериалов на основе дермы свиньи

На 2-е, 5-е, 8-е, 16-е, 20-е сутки эксперимента в условиях операционной под общим обезболиванием в положении на боку выполнялась перевязки раны и биопсии имплантов для морфологической оценки результатов.

Через 8 дней эксперимента сформировалась гранулирующая рана на месте ожоговой раны второго типа (Рисунок 13, А), которая также была закрыта фрагментами рДДМ и ДДМ размерами $2,5 \pm 0,7 \times 4 \pm 0,9 \times 0,03 \pm 0,01$ см каждый (Рисунок 13, Б), что позволило оценить эффективность исследуемых раневых покрытий на одном животном, как на чистой хирургической ране, так и на гранулирующей ране. В дальнейшем при перевязках также производились биопсии для изучения приживления раневых покрытий на ранах различной глубины в динамике.

При наблюдении за ранами отмечалась различная динамика их заживления в зависимости от применяемого экспериментального матрикса и типа раны. В частности, в чистой ране к 12-ым суткам, раневое покрытие, представленное ДДМ, становилось сухим и уплотнялось, свободно открепляясь от поверхности раны, что потребовало иссечения сформированной под ним рубцовой ткани и последующей свободной кожной аутопластики расщеплёнными трансплантатами толщиной

0,3-0,5 мм, взятыми на этом же боку на 20-е сутки после начала эксперимента для закрытия раневого дефекта, так как кожный покров не восстанавливался. На гранулирующей ране матриксы лизировались и не приживались, что также потребовало проведения аутопластики расщепленным свободным лоскутом. Через 10 дней после аутопластики наблюдалась полная ячеичная эпителизация раневой поверхности (Рисунок 14).



А – рост грануляционной ткани через 8 дней; Б – фиксация исследуемых раневых покрытий; ДДМ – децеллюляризированный дермальный матрикс, рДДМ – рецеллюляризированный дермальный матрикс
Рисунок 13 – Вид заживления ожоговой раны в динамике

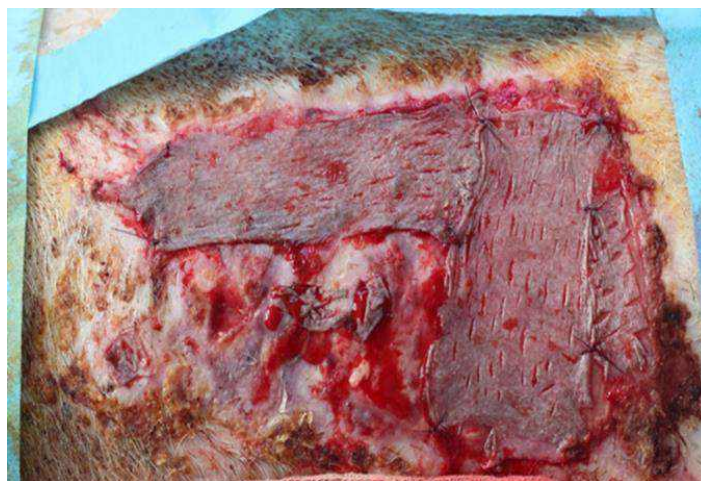
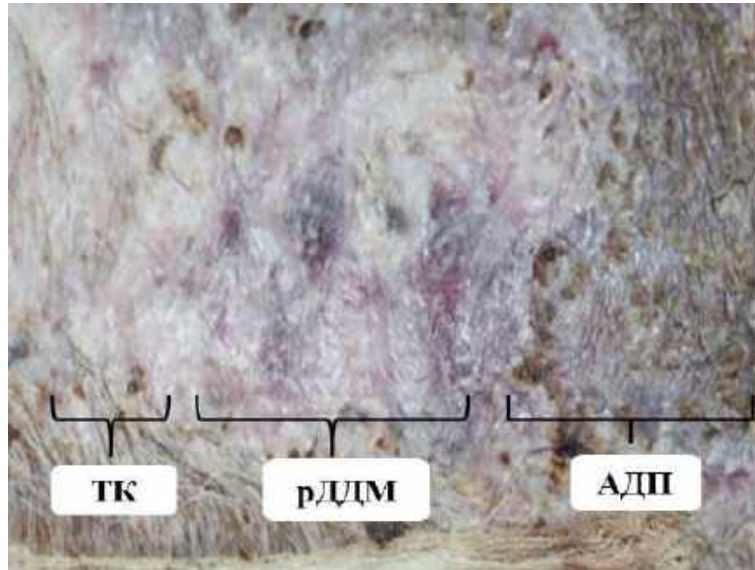


Рисунок 14 – Закрытие раневой поверхности свободной кожной аутопластикой на 20-е сутки эксперимента

В отличие от ДДМ, рецеллюляризированные аллогенными фибробластами образцы рДДМ, продемонстрировали адгезию к раневой поверхности. К 30-м суткам рецеллюляризированные матриксы свободно откреплялись, но под ними

был восстановлен полностью кожный покров, что не требовало дальнейшей аутодермопластики (Рисунок 15).



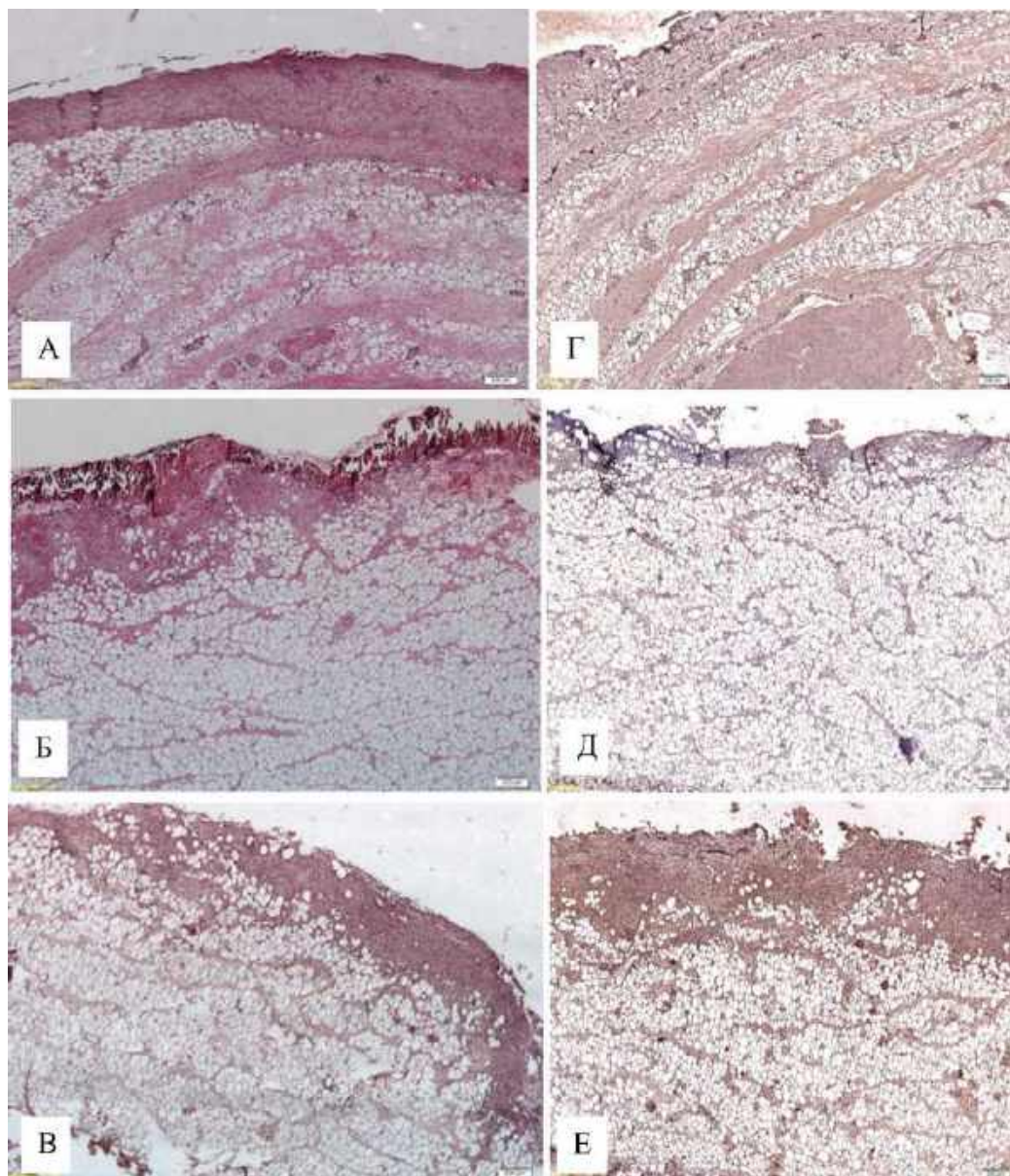
ТК – толстая кожа; рДДМ – ретеллюляризованный дермальный матрикс,
АДП – аутодермопластика

Рисунок 15 – Вид раны на 30-е сутки после начала эксперимента

Гистологический анализ исследуемых раневых покрытий на чистой ране выявил отличия в участках раны, закрытых ДДМ и рДДМ. На вторые сутки после экспериментального лечения с помощью ДДМ в подлежащих тканях развивалась слабовыраженная воспалительная реакция с лимфомакрофагальной инфильтрацией и пропитыванием матрикса фибрином и эритроцитами. К 8-ым суткам послеоперационного периода в ране наблюдалась значительная пролиферация фибробластов в прилегающем к матриксу участке дна раны, их количество достигало 125 ± 37 в поле зрения при увеличении $\times 200$, что привело к формированию рубцовой ткани. Новый дермальный слой под покрытием не формировался (Рисунок 16, А-В).

Морфологический результат применения рДДМ как раневого покрытия существенно отличался от ДДМ. На 2-е–5-е сутки после операции наблюдалась плотная адгезия имплантата к ране. Морфологическое исследование биоптатов показало, что на 2-е–5-е сутки также развивалась слабовыраженная воспалительная реакция, однако она происходила только в верхних участках раны, граничащих с матриксом, также было отмечено появление дермального слоя толщиной до 200

мкм на 5-е сутки эксперимента. Исследование динамики содержания виментина – белка промежуточных филаментов соединительных тканей при закрытии ожоговой раны децеллюляризированным матриксом показало его накопление на 8-е сутки эксперимента – КПО составил $10,69 \pm 2,17$ % по сравнению со 2-ми сутками (Рисунок 16, Г-Е).



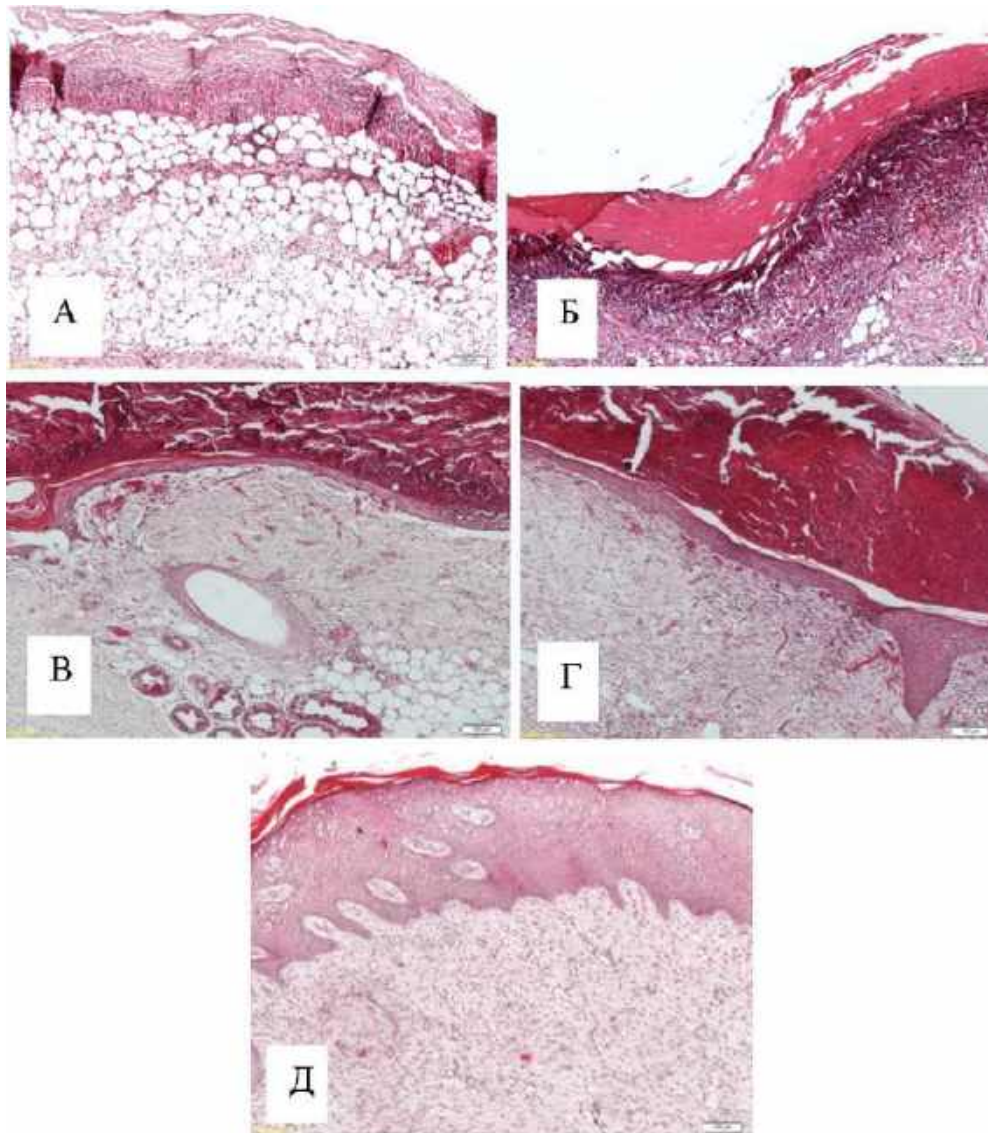
А, Г – 2-е сутки; Б, Д – 5-е сутки; В, Е – 8-е сутки послеоперационного периода.

А–В – окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$;

Г–Е – иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину – белку промежуточных филаментов соединительных тканей. Ув. $\times 100$

Рисунок 16 – Морфологический анализ результатов имплантации ДДМ

В последующие сутки под рДДМ толщина новообразованного дермального слоя продолжала увеличиваться, в формирующейся дерме выявляли вновь образованные сосуды, формировался плоский неороговевающий эпителий с выраженными признаками пролиферации базального слоя. На 20-е сутки после трансплантации толщина новообразованной дермы возросла до 2,5 мм, увеличилось количество интрадермальных придатков кожи. К этому сроку имплантированный матрикс самопроизвольно открепился от поверхности новообразованного под ним эпидермиса (Рисунок 17).

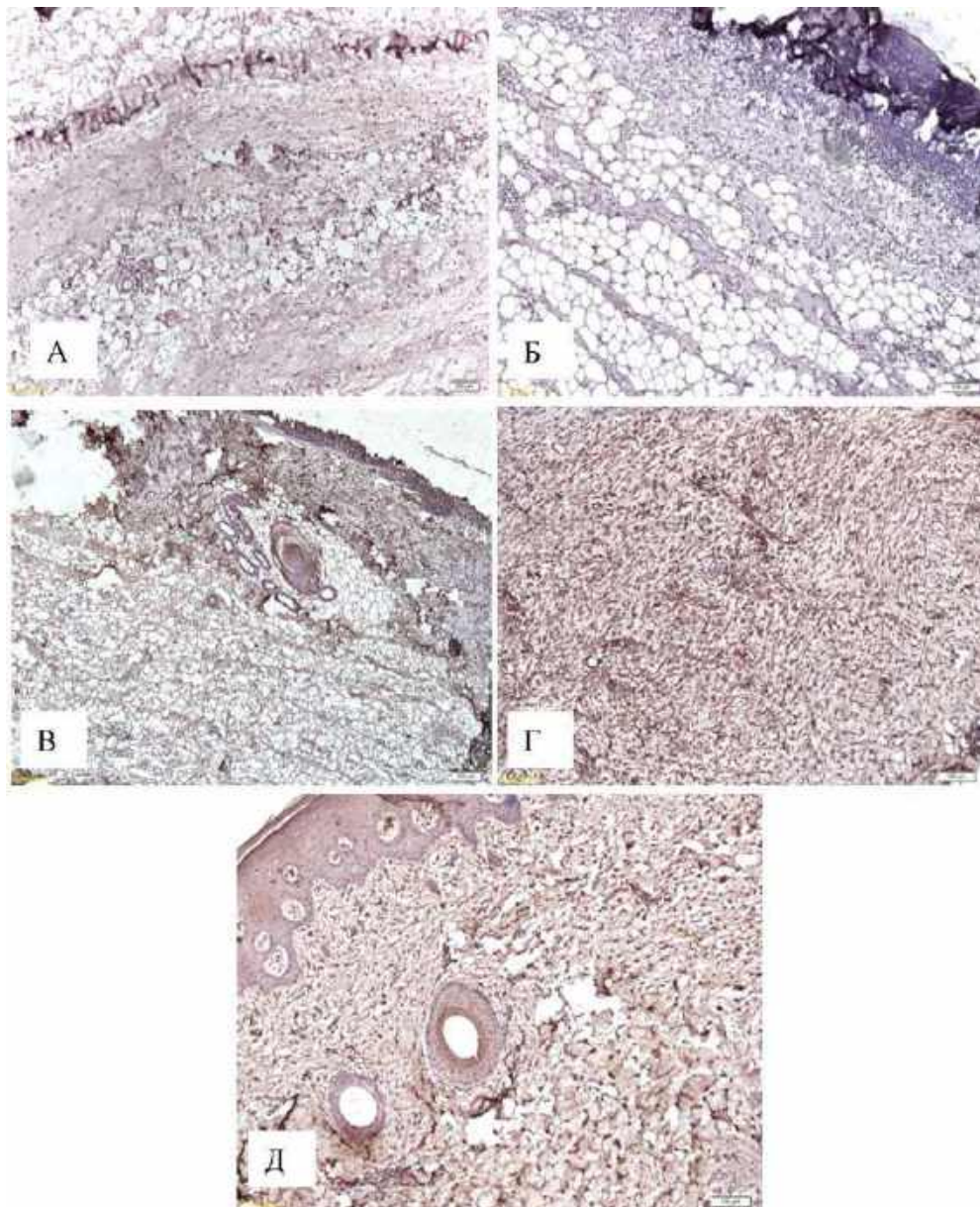


А – 2-е сутки; Б – 5-е сутки; В – 8-е сутки; Г – 16-е сутки; Д – 20-е сутки.

Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. х40

Рисунок 17 – Морфологический анализ результатов имплантации рДДМ

Экспериментальное лечение ожоговой раны рецеллюляризированным матриксом показало накопление виментина на 16-е сутки – КПО составил $26,79 \pm 5,41$ % против $10,08 \pm 3,12$ % на 5-е сутки после нанесения раны (Рисунок 18). Увеличение количества виментина в процессе заживления свидетельствовало о способности внесенных и резидентных фибробластов к миграции за счет регуляции образования различных клеточных контактов и транспорта различных сигнальных белков, участвующих в регуляции клеточной подвижности [Ostrowska-Podhorodecka Z. et al., 2022].



А – 2-е сутки; Б – 5-е сутки; В – 8-е сутки; Г – 16-е сутки; Д – 20-е сутки.

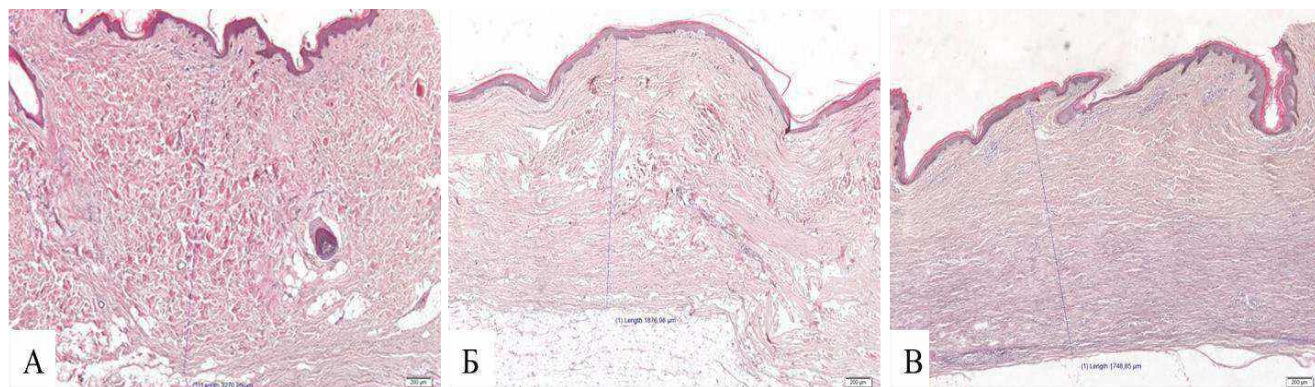
Иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину. Ув. $\times 100$

Рисунок 18 – Морфологический анализ результатов имплантации рДДМ

Полученные результаты позволили охарактеризовать исследуемые матриксы. С одной стороны, оба матрикса, как децеллюляризированный, так и рецеллюляризированный обладали биосовместимостью на тканевом уровне, вызывали слабую воспалительную реакцию, при этом не образовывалась соединительнотканная капсула, отграничивающая матрикс от окружающих тканей. С другой стороны, была отмечена принципиальная разница между двумя типами матрикса, которая заключалась в формировании разного типа ткани под ними. В отличие от децеллюляризированного матрикса, под которым формировалась соединительная ткань, под рДДМ образовалась полнослойная кожа.

Через 5 месяцев после поведения экспериментального лечения было также выполнено гистологическое исследование участков кожи свиньи, на которых моделировалась ожоговая рана.

Толщина вновь сформированной дермы была сопоставима в участках, закрытых рДДМ и аутодермопластикой – $1962,1 \pm 56,3$ мкм и $1738 \pm 67,9$ мкм соответственно ($p > 0,05$), но не достигала значений на участках, закрытых аутокожей – $2596,2 \pm 69,1$ мкм ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно) (Рисунок 19).



А – толстая кожа; Б – рДДМ; В – расщеплённый кожный лоскут. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 40$

Рисунок 19 – Морфологический анализ участка раны, закрытого различными способами, 5 месяцев после лечения

Таким образом, под рДДМ в чистой ране произошло полное восстановление всех слоев кожного покрова с формированием полноценных дермального и

эпидермального слоев.

Резюме

Результаты экспериментальной работы показали, что ДДМ вне зависимости от типа раны сыграл роль временного покрытия, что потребовало проведения дополнительных методов закрытия раневых поверхностей, а именно аутодермопластики. Анализ результатов показал, что предпочтительным является рДДМ, который обеспечил эпителизацию, миграцию фибробластов, так как происходило более эффективное образование промежуточных филаментов в клетках кожи, а также полноценный коллагено- и ангиогенез. В отдаленные сроки после имплантации произошло открепление рДДМ, не потребовавшее дополнительных методов закрытия раны из-за наличия полнослойной кожи.

ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ В КАЧЕСТВЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ТКАНЕЗАМЕЩЕНИЯ

Для проведения реконструктивной пластической хирургии в большинстве случаев необходимый размер матрикса составляет примерно 10 × 20 см, поэтому в хирургической практике приходится сшивать имеющиеся в продаже матриксы, что снижает их механическую прочность и, соответственно, клиническую эффективность их применения [Petrie K. et al., 2022]. Кроме того, длительная предоперационная подготовка материала требуемого размера может привести к бактериальной контаминации материалов.

Одними из оптимальных источников для получения биологических материалов на основе соединительной ткани являются дерма свиньи и КРС, бычий перикард и подслизистая кишечника животных. Материалы, полученные из органов и тканей КРС, могут являться источником трансмиссивной губчатой энцефалопатии (прионной болезни), поэтому используются в биомедицинских целях с осторожностью [Vlajcic Z. et al., 2020].

Таким образом, для дальнейших исследований в качестве источника нативной ткани была выбрана дерма свиньи, так как она содержит меньше эластиновых волокон по сравнению с ВКМ перикарда свиньи, которые имеют продольную ориентацию и, соответственно, меньшую прочность на разрыв в продольном направлении.

В комбустиологии для забора кожи и дермы человека обычно используют дерматомы с широкими лезвиями, а большей площади добиваются благодаря расщеплению лоскута перфоратором кожных трансплантатов, что значительно уменьшает биомеханическую прочность. Для реализации поставленных задач было необходимо:

- исключить использование кожи человека;

- исключить наличие эпидермиса в получаемом образце дермы;
- повысить качество образца для эксперимента за счет равномерной толщины образца (0,7 мм) на всем протяжении;
- получить образец дермы свиньи размерами не менее чем 10 × 20 см без использования технологии расщепления лоскута.

5.1 Разработка способа подготовки больших лоскутов дермы свиньи для создания децеллюляризованного дермального матрикса в качестве тканезамещающего материала

С помощью электродерматома в лабораторных условиях были получены образцы дермы свиньи породы Ландрас, не содержащие эпидермиса, с равномерной толщиной образца 0,7 мм на всем протяжении, размерами не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см.

Методика представляла собой следующий алгоритм:

1) в условиях операционной животное в состоянии наркоза укладывали на бок, производили разметку донорского участка размером 20–25 × 60–70 см, включающего области ягодиц, спины, боковой поверхности живота и шеи;

2) выполняли инъекционное пропитывание подкожной жировой клетчатки физиологическим раствором при помощи шприца;

3) производили одномоментный разрез кожи по намеченному контуру и равномерными пилящими движениями скальпеля по плоскости получали полнослойный кожный лоскут на всей площади забора единым образцом, включающим эпидермис, дерму и мозаичные участки жировой ткани;

4) забранный кожный лоскут помещали на валик, обрабатывали вазелиновым маслом и срезали с донорского участка дисковым электродерматомом эпидермис, на котором предварительно установлена величина зазора 0,7 мм, подготавливая лоскут к забору дермы;

5) полученный лоскут растягивали зажимами Кохера, создавая равномерное

натяжение на всей площади, далее электродерматомом с диаметром дискового ножа 100 мм производили забор образцов дермы толщиной 0,7 мм в направлении, перпендикулярном направлению лоскута (Рисунок 20, Рисунок 21).

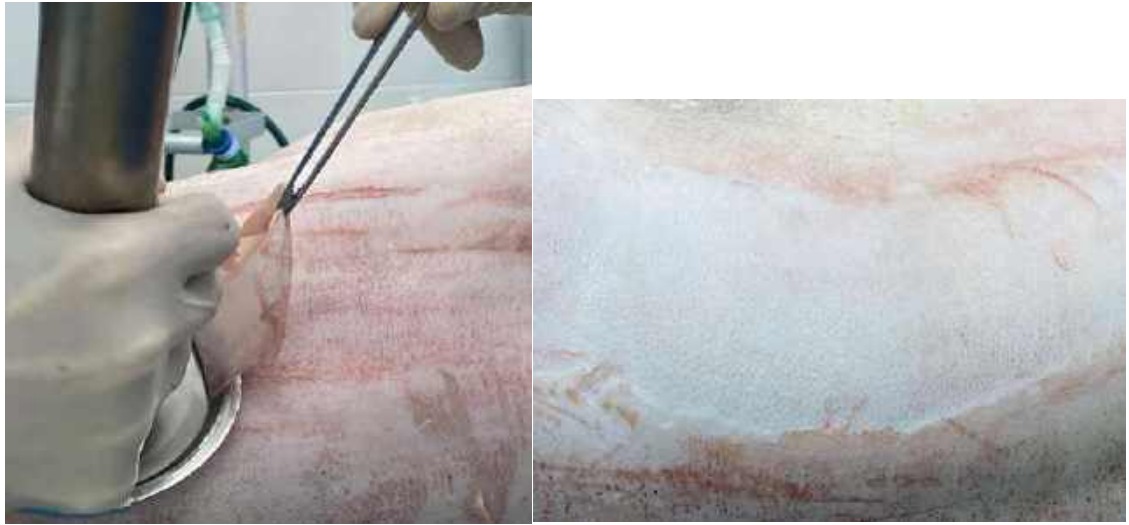


Рисунок 20 – Этапы забора эпидермального слоя с донорского участка дисковым электродерматомом

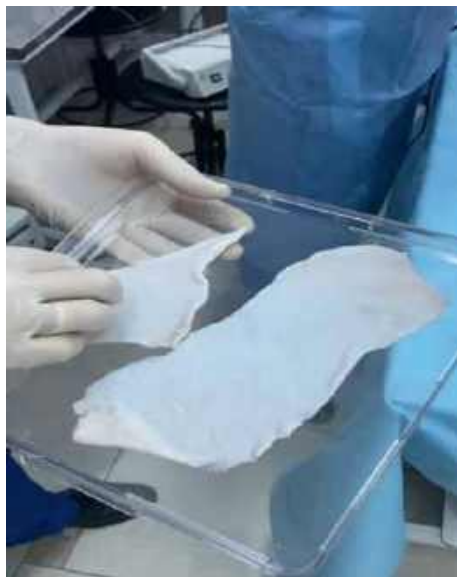


Рисунок 21 – Полученные образцы дермы свиньи размерами не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см толщиной 0,7 мм

В результате применения данной методики были получены 8 образцов дермы свиньи размерами не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см, которые были использованы для получения тканезамещающего биоматериала – децеллюляризированного дермального матрикса.

Таким образом, использование предварительно снятого кожного лоскута

вместо забора образцов дермы непосредственно с боковой поверхности тела животного позволяет получать образцы точно заданной толщины и размера, так как нивелируется влияние подлежащих участков тела на качество забираемой дермы (неравномерный забор по толщине образца с реберных участков животного, а также отсутствие достаточного упора в области живота), что позволяет использовать дисковый нож большого диаметра на всей поверхности предварительно забранного лоскута.

5.2 Способ децеллюляризации дермы свиньи для создания децеллюляризованного дермального матрикса в качестве тканезамещающего материала

ДДМ, который показал свою эффективность при использовании в качестве раневого покрытия (см. главу 3), не мог быть эффективно использован в реконструктивной хирургии, так как не имел достаточной механической прочности, а также обладал небольшими линейными размерами, кроме того, процесс децеллюляризации занимал 48 часов. Вышесказанное послужило основанием для модификации и оптимизации алгоритма децеллюляризации образцов дермы свиньи размерами $10 \pm 0,5 \times 20 \pm 1 \text{ см} \times 0,07 \pm 0,01 \text{ см}$. Необходимо было решить следующие задачи:

- сократить продолжительность этапов процессов децеллюляризации образцов свиной дермы;
- расширить возможности обработки дермы с различной массой с максимальным сохранением его гистологической структуры и отсутствием клеточных компонентов;
- получить образцы децеллюляризованной дермы с минимальным содержанием остаточной ДНК;
- экономить реагенты, за счет предварительного расчета соотношения массы образца дермы и необходимого объема растворов;

– оценить показатели, значимо влияющие на биосовместимость децеллюляризованного образца дермы.

Модифицированная методика представляла собой следующий алгоритм детергентно-энзиматической обработки дермы свиньи, приводящий к получению модифицированного децеллюляризованного дермального матрикса (мДДМ):

1. взвешивали дерму свиньи размерами $10 \pm 0,5 \times 20 \pm 1 \times 0,07 \pm 0,01$ см (примерная масса 23 г);

2. замораживали при температуре -80 °С на 72 часа, затем образец размораживали;

3. рассчитывали объёмы всех необходимых растворов при соотношении массы образца к объёму раствора – 1 : 10;

4. заливали образцы раствором трипсин-Версена (230 мл) и помещали на шейкер-инкубатор в режиме 100 об/мин при $+37$ °С на 6 часов, меняя раствор через каждые 2 часа;

5. помещали образцы на вращающуюся платформу в режиме 170 об/мин и подвергали последовательному циклическому воздействию растворов детергентов: 1 % раствора Тритона Х-100 (230 мл) в течение 3 часов и 4 % раствора дезоксихолата натрия (230 мл) в течение 3 часов, затем цикл повторяли, после воздействия каждого детергента образец промывали в деионизированной воде;

6. обрабатывали образец раствором свиной панкреатической ДНКазы I 2000 ЕД /230 мл в фосфатном буфере с кальцием и магнием (230 мл) на шейкере-инкубаторе в режиме 100 об/мин при $+37$ °С в течение 4 часов.

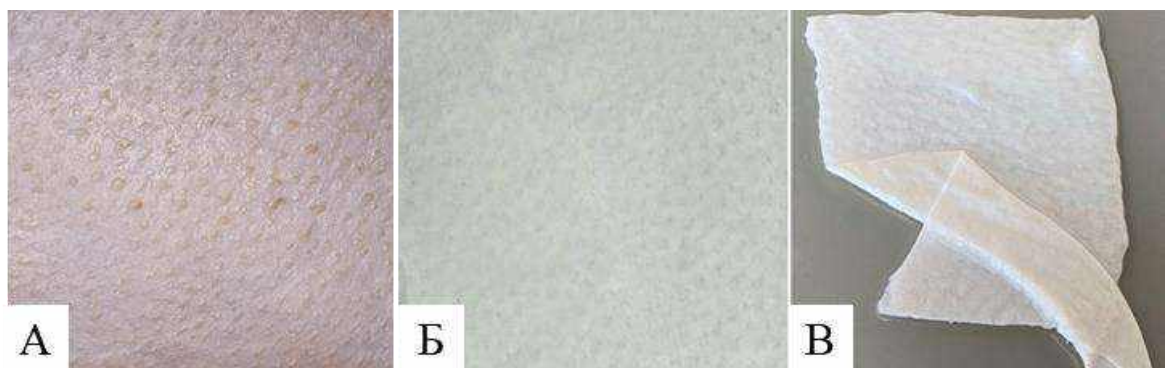
Кратко алгоритм обработки дермы свиньи представлен в Таблице 6.

В результате модификации алгоритма время обработки составило 22 часа, а также появилась возможность учитывать размеры образцов дермы без потери эффективности удаления клеток и с целью экономии реагентов.

Таблица 6 – Краткий алгоритм детергентно-энзиматической обработки больших лоскутов дермы свиньи для получения мДДМ

	Реагент/воздействие	Время, ч.	Температура, °С	Режим, об/мин.
Алгоритм (n = 8)	замораживание	72	-80	-
	Трипсин-Версен 1:1	6	+37	100
1 цикл	тритон Х-100 1 %	3	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	3	+20–25	170
2 цикл	тритон Х-100 1 %	3	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 %+ Na ₂ -ЭДТА 0,002М	3	+20–25	170
	панкреатическая ДНКаза I, 2000 ЕД	4	+37	100

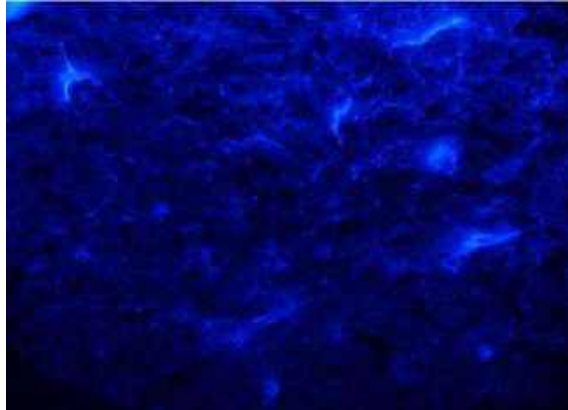
После обработки нативного образца детергентно-энзиматическим методом мДДМ приобрел белый цвет, имел характерный рисунок поверхности (мерею) в виде сорочьих лапок. Гладкая микропористая поверхность мДДМ обеспечивала удобство размещения импланта в непосредственном контакте с органами брюшной полости, а также образцы матрикса обладали оптимальной пластичностью для реконструктивной хирургии. Благодаря мягкости и эластичности матрикс было возможно моделировать по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки (Рисунок 22).



А – внешний вид дермы свиньи до обработки; Б – внешний вид дермы после обработки; В – пластичность мДДМ (способность моделироваться по форме)

Рисунок 22 – Децеллюляризированный дермальный матрикс, использующийся для закрытия дефектов соединительной ткани

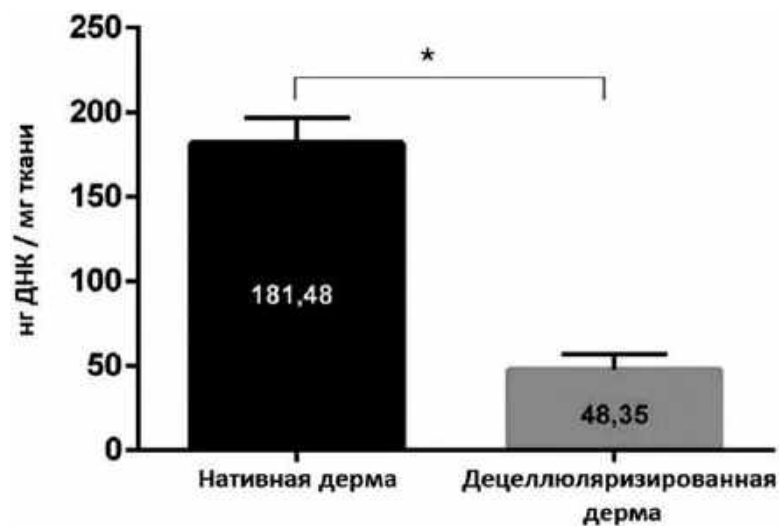
В децеллюляризированные образцы дермы обнаружили лишь незначительную аутофлуоресценцию волокон внеклеточного матрикса (Рисунок 23).



Окрашивание DAPI. Ув. $\times 200$

Рисунок 23 – Результаты определения содержания клеточных ядер в образцах дермы свиньи после детергентно-энзиматической обработки

Качество децеллюляризации определяли с помощью контроля остаточного содержания ДНК в трех повторностях (Рисунок 24).



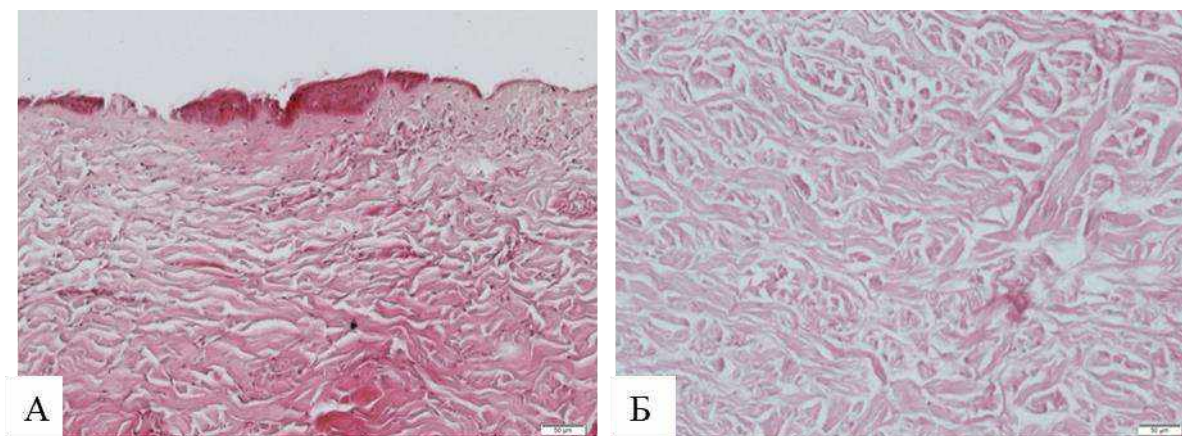
* – $p < 0,05$

Рисунок 24 – Результаты количественного анализа ДНК в образце нативной и децеллюляризированной дермы свиньи

Полученные образцы соответствовали требованиям к качеству имплантируемых биологических материалов в отношении количества ДНК – менее

50 нг/мг ткани, которое составляло 26,7 % от содержания ДНК в нативной ткани. Относительно низкое содержание остаточных нуклеиновых кислот в мДДМ говорит в пользу малого иммуногенного потенциала полученной конструкции.

Результаты анализа показали отсутствие клеточных структур и частичную сохранность гистоархитектуры в дермальном матриксе по сравнению с нативной дермой свиньи (Рисунок 25).



Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

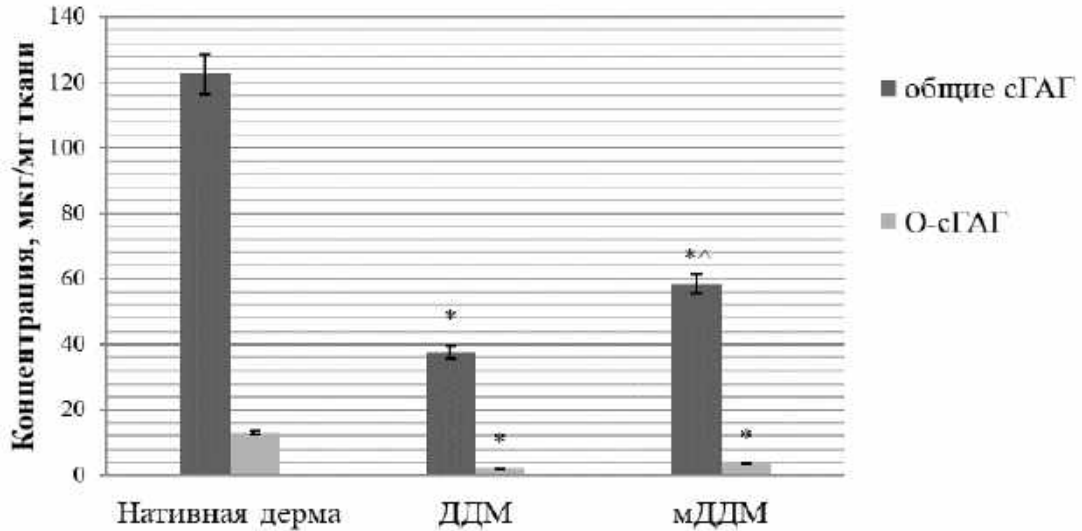
Рисунок 25 – Гистологический анализ образцов дермы свиньи до (А) и после (Б) детергентно-энзиматической обработки

Коллагеновые пучки дермального матрикса и нативной дермы достоверно не отличались друг от друга по толщине ($12,06 \pm 0,03$ против $12,02 \pm 0,02$ мкм, $p > 0,05$) и упорядоченности. Площадь коллагеновых пучков в образцах мДДМ была ниже значений данного показателя в нативной дерме вследствие набухания коллагеновых волокон в ходе обработки дермы ($78,2 \pm 2,4$ против $89,2 \pm 1,9$ %; $p < 0,05$).

Гомогенаты образцов мДДМ, полученные по модифицированному алгоритму, подвергались биохимическому анализу на содержание сульфатированных общих и О-гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, для оценки сохранности небелковых компонентов ВКМ. Гомогенаты нативной дермы свиньи также подвергались данному исследованию и служили группой сравнения.

Концентрация сульфатированных ГАГ уменьшилась в ходе обработки относительно нативной дермы на 52,18 % для мДДМ и на 69,32 % для ДДМ

(Рисунок 26). Детергентно-энзиматическая обработка привела к потере (вымыванию) ГК 65,31 % относительно нативной дермы для алгоритма получения мДДМ – хирургического импланта и 73,47 % относительно нативной дермы свињи для алгоритма получения ДДМ – раневого покрытия (Рисунок 27).

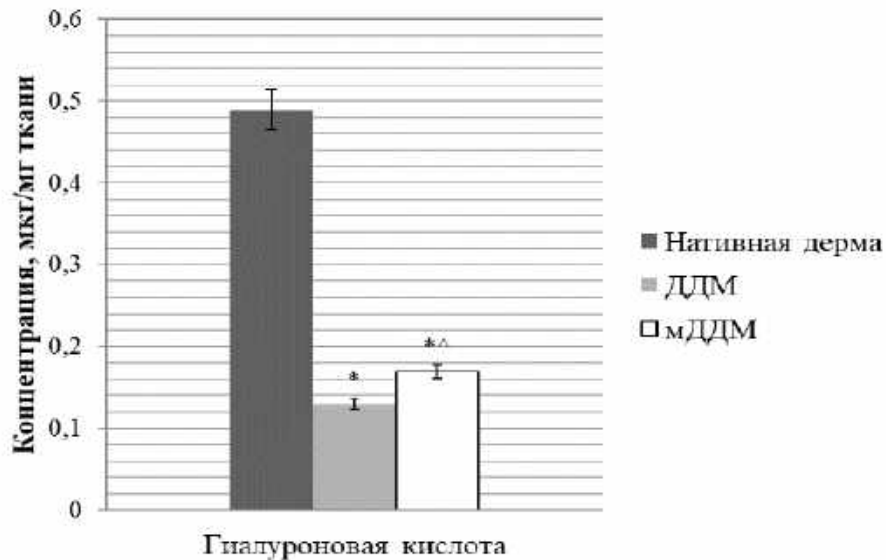


* – различия значимы относительно значений в нативной дерме свињи;

^ – различия значимы относительно значений в ДДМ ($p < 0,05$);

сГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

Рисунок 26 – Анализ содержания сульфатированных гликозаминогликанов в ДДМ и нативной дерме свињи

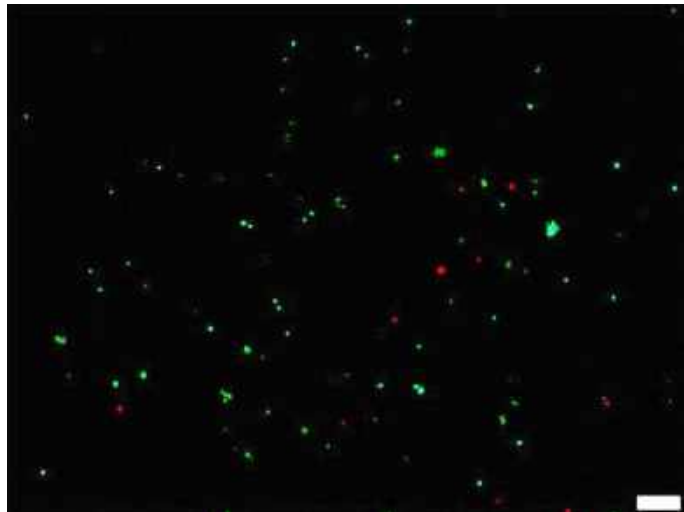


* – различия значимы относительно нативной дермы свињи; ^ – различия

значимы относительно значений в ДДМ ($p < 0,05$)

Рисунок 27 – Анализ содержания гиалуроновой кислоты в ДДМ и в нативной дерме свињи

Анализ данных, полученных по методике Live/Dead продемонстрировал, что 80 ± 10 % клеток DF-1 оставались жизнеспособными на исследуемых образцах дермы. Данный результат свидетельствовал об отсутствии цитотоксического действия образцов исследуемых матриксов (Рисунок 28).



зеленое окрашивание – живые клетки, красное окрашивание – мертвые клетки. Ув. $\times 40$

Рисунок 28 – Оценка цитотоксичности ДДМ методом Live/Dead

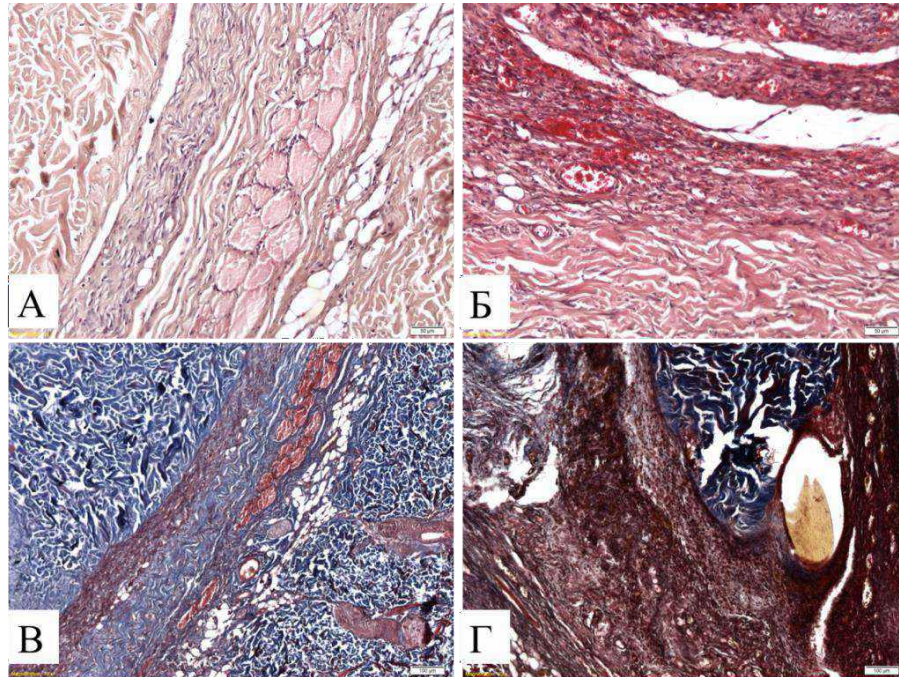
Таким образом, преимуществом модифицированного алгоритма децеллюляризации, с помощью которого возможно сохранение структуры ВКМ, является получение материалов с наиболее оптимальными биологическими и биохимическими свойствами, в наибольшей степени приближенных к характеристикам нативной ткани, что является важным критерием для применения хирургических материалов.

5.3 Морфологический анализ тканевой реакции на подкожную имплантацию фрагментов децеллюляризованного дермального матрикса

Нами был проведен сравнительный морфологический анализ результатов подкожной имплантации крысам разработанного мДДМ и нативной дермы свиньи.

На 7-е сутки после имплантации мДДМ в образцах тканей отмечалось

умеренно выраженное асептическое воспаление. При окрашивании трихромом по Массону были хорошо заметны неповрежденные коллагеновые волокна имплантированного мДДМ толщиной 12,88 [11,87; 13,60] мкм (Рисунок 29, А, В). В образцах из контрольной группы (нативная кожа свиньи) в те же сроки наблюдалось выраженное асептическое воспаление с примесью эозинофилов в воспалительном инфильтрате, а также хорошо заметное полнокровие сосудов кожи и мышц спины (Рисунок 29, Б, Г).

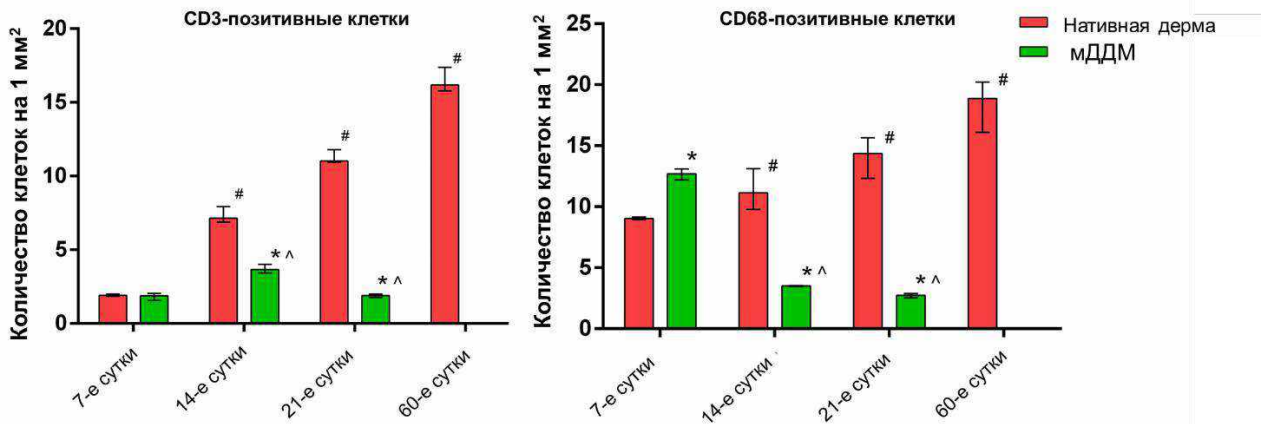


А – мДДМ, гематоксилин-эозин; Б – нативная кожа свиньи, гематоксилин-эозин; В – мДДМ, трихром по Массону; Г – нативная кожа свиньи, трихром по Массону. Ув. х200

Рисунок 29 – Гистологическая оценка мДДМ и нативной кожи свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 7-е сутки

В клеточном инфильтрате по данным иммуногистохимического исследования и компьютерной морфометрии было выявлено 12,70 [12,19; 13,09] макрофагов и 1,87 [1,56; 2,04] лимфоцитов на 1 мм² площади среза, а также незначительное количество нейтрофилов. Было отмечено пропитывание имплантата кровью и инфильтрация воспалительными клетками – 9,03 [8,94; 9,16] макрофагов и 1,91 [1,84; 1,99] лимфоцитов на 1 мм². Следует отметить, что количество лимфоцитов в экспериментальной группе не отличалось от

контрольной группы ($p = 0,062$), а число макрофагов было статистически значимо выше ($p = 0,043$) (Рисунок 30).



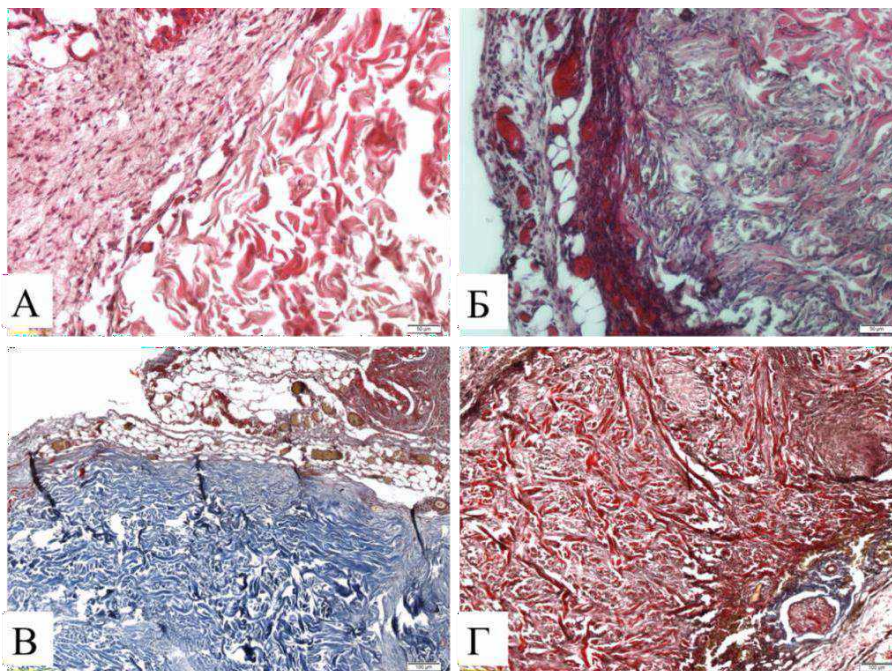
* – значимость отличий между контрольной и экспериментальной группой, $p < 0,05$; # – значимость отличий для значений контрольной группы на разные сроки, $p < 0,05$; ^ – значимость отличий для значений экспериментальной группы в разные сроки, $p < 0,05$

Рисунок 30 – Содержание CD3⁺ – Т-лимфоцитов и CD68⁺-макрофагов в области имплантации мДДМ и нативной дермы свиньи в различные сроки эксперимента

На 14-е сутки в образцах имплантации мДДМ было отмечено образование тонкой соединительнотканной капсулы вокруг имплантированной конструкции, толщина капсулы составляла 18,17 [14,73; 20,32] мкм. Кнаружи от неё имелся тонкий слой грануляционной ткани. Отмечалось слабо выраженное полнокровие сосудов в месте имплантации, средний диаметр сосудов составил 30,97 [29,71; 31,82] мкм (Рисунок 31, А, В). Не было выявлено деградации коллагеновых волокон мДДМ и его инфильтрации воспалительными клетками. В стенках соединительнотканной капсулы были отмечены единичные макрофаги – 3,50 [3,44; 3,54] CD68⁺ клеток на 1 мм² среза (по данным компьютерной морфометрии) (Рисунок 30).

В образцах эксплантированной нативной дермы свиньи была отмечена картина воспаления вокруг инородного тела с преобладанием относительно большого числа макрофагов (11,13 [9,79; 13,11] CD68⁺ клеток по данным

компьютерной морфометрии) по сравнению с этим показателем в экспериментальной группе на 14-е сутки ($p = 0,007$) и с контрольной группой на 7-е сутки ($p = 0,033$). Кроме того, наблюдалось большее число CD3-позитивных клеток в двух группах животных относительно предыдущего срока эксплантации образцов – 3,66 [3,42; 4,01] клеток на 1 мм^2 для экспериментальной группы ($p = 0,039$) и 7,14 [6,87; 7,93] клеток на 1 мм^2 для контрольной группы ($p = 0,041$) (Рисунок 30). Вокруг имплантата сформировалась более плотная толстостенная капсула со средней толщиной 165,2 [152,90; 188,80] мкм по сравнению с экспериментальной группой ($p = 0,003$). Коллагеновые волокна имплантата были фрагментированы, отёчны, имели выраженную оксифильную реакцию среды и были пропитаны кровью с примесью нейтрофилов и макрофагов. Было выявлено значительное количество тонких полнокровных сосудов непосредственно вблизи капсулы (средний диаметр 20,81 [19,41; 21,61] мкм) (Рисунок 31, Б, Г).



А – мДДМ, гематоксилин-эозин; Б – нативная кожа свиньи, гематоксилин-эозин;

В – мДДМ, трихром по Массону; Г – нативная кожа свиньи, трихром по Массону. Ув. $\times 200$

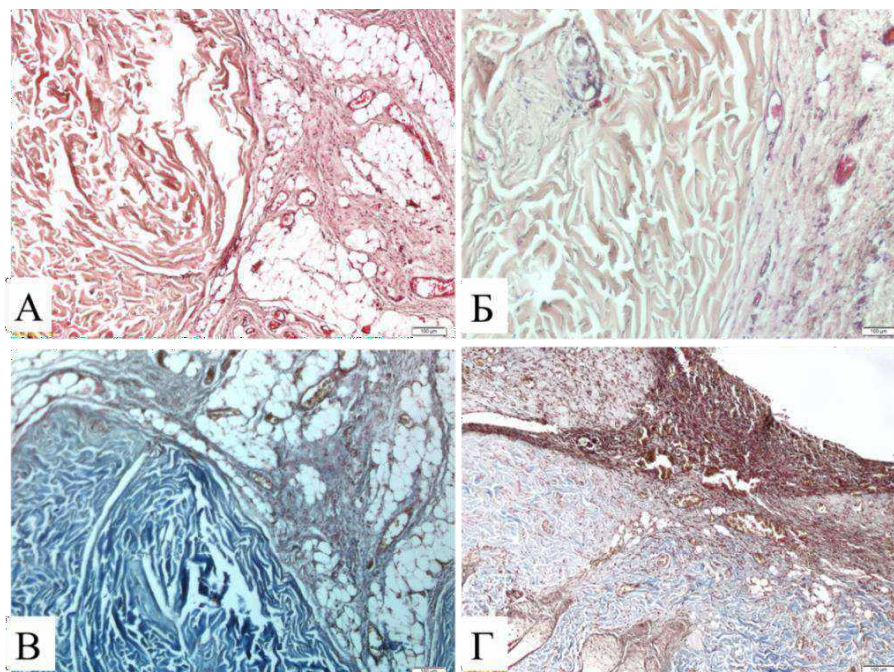
Рисунок 31 – Гистологическая оценка препаратов мДДМ и нативной кожи свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 14-е сутки

Спустя 21-е сутки после имплантации мДДМ в образцах толщина капсулы вокруг имплантата составляла 10,02 [9,95; 10,10] мкм и наблюдалось небольшое количество клеток воспаления: на 1 мм² среза 2,73 [2,54; 2,89] CD68⁺ макрофагов и 1,90 [1,76; 1,99] CD3⁺ лимфоцитов, что было значительно ниже чем в контрольной группе ($p = 0,012$ и $p = 0,009$, соответственно). Средний диаметр капилляров составлял 26,61 [19,48; 31,52] мкм, полнокровия кровеносных сосудов не наблюдалось. Коллагеновые волокна инкапсулированного мДДМ были полностью сохранены и имели диаметр 11,67 [10,02; 14,50] мкм. Кроме того, не было обнаружено скопления лейкоцитов в мДДМ или пропитывание его кровью. У животных контрольной группы в те же сроки наблюдалось формирование плотной соединительнотканной капсулы толщиной 66,53 [61,24; 7,59] мкм; были отмечены многочисленные небольшие скопления Т-лимфоцитов, CD68-позитивных макрофагов (содержание составило 14,37 [12,33; 15,65] клетки на 1 мм² среза) и клеток инородных тел. Интересно, что наряду с выраженной инкапсуляцией было отмечено появление полнокровных сосудов диаметром 23,80 [19,24; 27,76] мкм внутри образца, что свидетельствовало об активной его биодеградации. Коллагеновые волокна были набухшими и частично разрушенными – толщина их варьировала от 5 до 37 мкм. В толще имплантата присутствовали макрофаги и Т-лимфоциты, что также подтверждало иммунное отторжение (Рисунок 30).

На 60-е сутки после подкожной имплантации мДДМ был окружен соединительнотканной капсулой (толщина 13,83 [12,03; 15,54] мкм), воспалительные явления полностью отсутствовали. Атрофия окружающих тканей отсутствовала, отмечался очаговый реактивный липоматоз. Коллагеновые волокна имплантата диаметром 15,06 [12,45; 15,99] мкм были полностью сохранены, явления биодеградации в нем минимальны (Рисунок 32, А, В). Иммуногистохимическая реакция не выявила наличия макрофагов и Т-лимфоцитов в месте имплантации (Рисунок 30).

В образцах контрольной группы отмечалась значительная деградация имплантата за счет его лизиса макрофагами, а также сохраняющееся

перифокальное воспаление. Вокруг фрагмента нативной дермы свиньи сформировалась многослойная капсула толщиной 107,20 [91,32; 117,50] мкм, окружающие её сосуды были полнокровны и имели диаметр 28,50 [26,32; 31,45] мкм (Рисунок 32, Б, Г).



А – мДДМ, гематоксилин- эозин; Б – нативная дерма свиньи, гематоксилин-эозин;
В – мДДМ, трихром по Массону; Г – нативная дерма свиньи, трихром по
Массону. Ув. $\times 200$

Рисунок 32 – Гистологическая оценка препаратов мДДМ и нативной дермы свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 60-е сутки

Количественная оценка показала присутствие 15,79 [14,50; 17,67] Т-лимфоцитов и 18,86 [16,09; 20,22] макрофагов на 1 мм² среза ткани, что было значительно выше относительно предыдущего срока исследования ($p = 0,008$ и $p = 0,048$ соответственно) (Рисунок 30).

Таким образом, результаты ИГХ окрашивания воспалительного инфильтрата вокруг и непосредственно внутри имплантата на различных сроках эксперимента позволяют утверждать, что мДДМ, по сравнению с нативной дермой свиньи, обладает минимальной иммуногенностью. В пользу низких антигенных свойств

мДДМ говорит также небольшое содержание CD3 и CD68-позитивных клеток по сравнению с нативной дермой и тонкая соединительнотканная капсула вокруг имплантированного фрагмента, отмеченная в срезах на поздних этапах эксперимента. При этом на всём протяжении исследования коллагеновые волокна мДДМ, представляющие собой основную составляющую организованного внеклеточного матрикса дермы и обуславливающие её механические свойства, оставались практически интактными. В то же самое время вследствие выраженного воспалительного ответа имплантированная нативная дерма свиньи подверглась значительной биодegradации, о чем свидетельствовала фрагментация коллагеновых волокон, наличие полнокровных капилляров, а также плотная фиброзная капсула, окружающая имплантированный фрагмент.

5.4 Исследования биомеханической прочности децеллюляризованного дермального матрикса

Устранение обширных дефектов брюшной стенки и объемных грыж представляет трудности из-за больших размеров грыжевых ворот [Warren J.A. et al., 2017; Buenafe A.A. et al., 2019]. При этом наложение тугих швов для сближения и закрытия дефекта в натяжной герниопластике может привести к расхождению раны, рецидиву или деформации области грыжи [Hajibandeh S. et al., 2017]. На сегодняшний день данные проблемы можно преодолеть благодаря методу ненатяжной герниопластики с применением поддерживающих материалов [Cho J.E. et al., 2019; Miller B.T. et al., 2022].

Одной из основных функций биоматериалов для герниопластики является способность выдерживать нагрузки при движениях пациента и при повышенном внутрибрюшинном давлении [Ibrahim M.M. et al., 2018]. Прочность биоматериала при растяжении должна быть не ниже показателей прочности самой брюшной стенки, показатель прочности 32 Н/см является достаточным для большинства случаев в герниопластике [He W. et al., 2021]. При этом жесткость биоматериала не

должна быть слишком низкой, так как это может привести к недостаточной опорной функции, или чрезмерно высокой, что будет провоцировать сильные послеоперационные боли [Olavarria O.A. et al., 2021].

Данные, полученные при растяжении имеющихся образцов, приведены в Таблице 7. На основании этих данных построены диаграммы растяжения образцов биоматериалов и определены их основные физические свойства (Рисунок 33).

Таблица 7 – Механические показатели, полученные при растяжении образцов

мДДМ		Нативная дерма свиньи		«Permacol» (продольный)		«Permacol» (поперечный)	
ε, %	σ, МПа	ε, %	σ, МПа	ε, %	σ, МПа	ε, %	σ, МПа
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,33	0,69	2,33	1,67	2,00	1,00	1,17	0,50
2,66	1,39	4,83	3,33	4,00	2,00	2,33	1,00
4,00	2,08	7,33	5,00	5,99	3,00	3,66	1,50
5,33	2,78	9,66	6,67	8,33	4,00	5,16	2,00
6,66	3,47	12,15	8,33	10,32	5,00	6,49	2,50
7,99	4,17	14,65	10,00	11,99	6,00	7,66	3,00
9,66	4,86	17,32	11,67	13,99	7,00	8,99	3,50
10,66	5,56	20,31	12,00	15,65	8,00	9,99	4,00
11,99	6,25	24,31	12,67	17,32	9,00	10,99	4,50
13,65	6,94	–	–	19,31	10,00	12,32	5,00
14,65	7,64	–	–	22,98	11,00	13,65	5,50
16,32	8,33	–	–	28,97	12,00	16,48	6,10
17,98	9,03	–	–	29,64	12,00	–	–
19,98	9,31	–	–	–	–	–	–

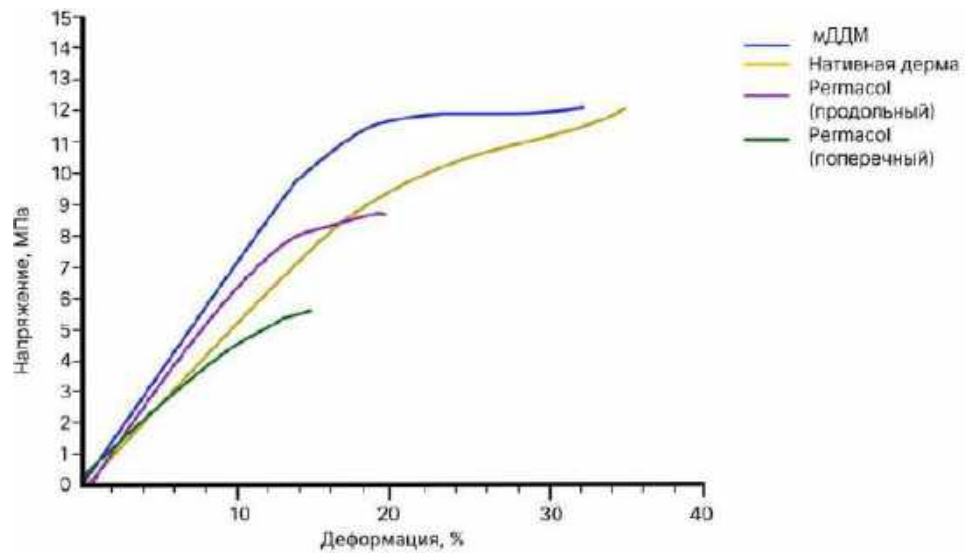
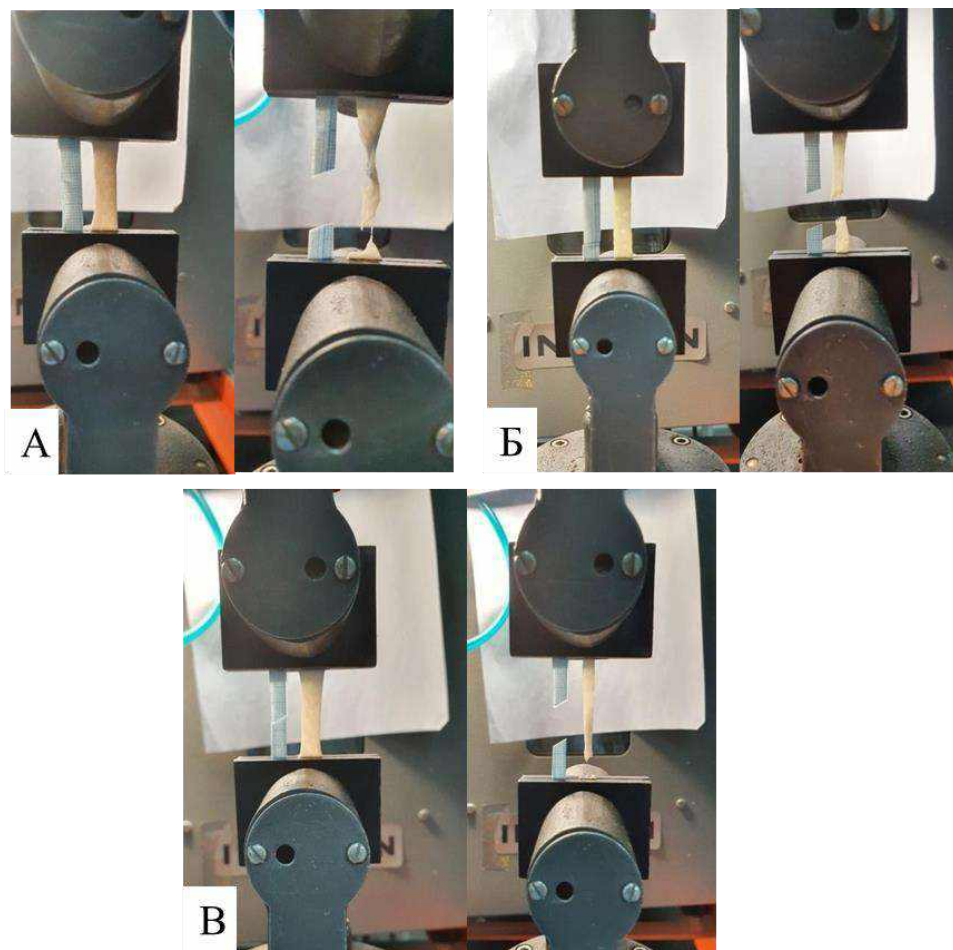


Рисунок 33 – Диаграммы растяжения образцов биоматериалов

Фотографии образцов во время и после испытаний представлены на Рисунке

34.



А – мДДМ; Б – Permacol™; В – нативная кожа свиньи

Рисунок 34 – Результаты испытаний образцов биоматериалов с помощью разрывной машины Instron 1122

Как видно из представленных данных нативная дерма свиньи обладала прочностью $11,6 \pm 2,8$ МПа, удлинение при разрыве составило $25,4 \pm 4,2$ %, а модуль упругости – $56,1 \pm 9,2$ МПа. Дерма свиньи, обработанная детергентно-энзиматическим способом (образцы группы №1), с учетом погрешности измерений имела механические свойства, близкие к нативному образцу: $\sigma_p = 9,1 \pm 0,6$ МПа, $\epsilon_p = 21,1 \pm 2,3$ %, $E_o = 50,0 \pm 1,6$ МПа.

Образцы «Permacol» были испытаны в двух направлениях (продольном и поперечном). В продольном направлении образцы имели более высокие механические характеристики: прочность – $12,0 \pm 1,7$ МПа, удлинение при разрыве – $29,7 \pm 2,4$ %, модуль жесткости – $47,2 \pm 6,5$ МПа. В поперечном направлении все показатели были в 1,5–2 раза ниже, чем в продольном направлении.

Образцы группы №2 по механическим характеристикам наиболее близки к образцу Permacol™ в продольном направлении, а образцы группы № 1 – к образцу Permacol™ в поперечном направлении (Таблица 8).

Таблица 8 – Основные механические свойства биоматериалов, $M \pm SD$

Группа	ϵ_p , %	σ_p , МПа	E_o , МПа
№ 1 мДДМ	$21,1 \pm 2,3$	$9,1 \pm 0,6$	$50,0 \pm 1,6$
№ 2 Нативная дерма свиньи	$25,4 \pm 4,2$	$11,6 \pm 2,8$	$56,1 \pm 9,2$
№ 3 «Permacol™» (продольный)	$29,7 \pm 2,4$	$12,0 \pm 1,7$	$47,2 \pm 6,5$
№ 3 «Permacol™» (поперечный)	$17,5 \pm 2,6$	$6,2 \pm 0,6$	$28,4 \pm 6,1$

В настоящем исследовании установлено что, ксеногенный мДДМ, планируемый к применению в качестве эндопротеза для реконструктивной хирургии, обладает высокими прочностными характеристиками, которые сопоставимы с показателями нативной свиной дермы и намного превышают физиологически необходимые параметры, которые нужно учитывать при герниопластике.

Контрольный образец «Permacol™» также показал очень высокие прочностные свойства, однако эти свойства значительно различались при продольной и поперечной нагрузке на образец. При поперечной нагрузке они

снижались в 1,5–2 раза, что диктует необходимость выбора правильного положения эндопротеза во время выполнения операции. Кроме того, мДДМ обладает значительно более выраженными пластическими свойствами по сравнению с «Permasol™», что дает ему преимущество при закрытии сложных по форме грыжевых дефектов, а также минимизирует образования грубой соединительнотканной капсулы вокруг эндопротеза.

Резюме

В децеллюляризованных дермальных матриксах было выявлено достаточно низкое содержание ДНК, что указывает на их невысокую иммуногенность и позволяет рекомендовать детергентно-энзиматическую и химическую обработку свиной дермы как перспективные методики децеллюляризации тканей. По результатам работы было определено, что оптимальными материалами в отношении механических свойств при использовании в герниопластике являются мДДМ, структурная организация которого максимально соответствовала структуре свиной дермы, и коммерческий имплант Permasol™. Разработанный мДДМ обладает необходимыми физическими характеристиками для использования его в качестве хирургического импланта при лечении дефектов плотной соединительной ткани.

ГЛАВА 6 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

В настоящее время активно исследуются и внедряются в клиническую практику хирургические материалы, являющиеся аналогами внеклеточного матрикса и имитирующие клеточное микроокружение, – синтетические каркасы, полученные из полимерных субстратов (например, поликапролактон, полиэтиленгликоль и полигликолевая кислота); гидрогели, синтезированные из сшитых гидрофильных полимеров (например, полиакриловой кислоты, полиэтиленгликоля и поливинилового спирта), каркасы на керамической основе, изготовленные из гидроксиапатита или трикальцийфосфата; материалы на основе природных биополимеров из животного и растительного сырья – альгинаты, хитозан, хондроитинсульфаты, целлюлоза, желатин, декстрин, фиброин шёлка и коллаген [Hussey G.S., 2018; Zheng M. et al., 2023]. Недостатком синтетических материалов является неспособность к биодеградации и частые послеоперационные осложнения (инфильтраты, абсцессы, свищи, гнойно-воспалительные процессы). Биологические материалы на основе ВКМ соединительной ткани вызывают минимальную местную воспалительную реакцию и обеспечивают естественную среду для функционального восстановления ткани [Keane T.J. et al., 2015; Cramer M.C. et al., 2020].

Стоит отметить, что биосовместимость и структурное сходство биологических материалов с нативным ВКМ делают их желательными для использования в качестве поддерживающих и замещающих имплантатов, а также для ускорения регенерации тканей. Таким образом, целесообразным является разработка биологических хирургических материалов с тканеспецифичной совместимой основой, обладающих способностью к биоинтеграции.

6.1 Результаты экспериментального хирургического лечения грыжи передней брюшной стенки с использованием децеллюляризованного дермального матрикса

Задача хирургического лечения грыжевых дефектов – это укрепление передней брюшной стенки, позволяющее снизить натяжение тканей в зоне операции, избегая при этом повышения внутрибрюшного давления [Tahir F. et al., 2021]. На данный момент поиск материалов, которые бы обеспечивали прочность, одномоментную пластику грыжевого дефекта и не снижали функциональность передней брюшной стенки, сфокусирован на изучении использования имплантатов биологического происхождения. Опираясь на эти важные функции, имплантаты на основе внеклеточного матрикса находят широкое применение в регенеративной медицине для реконструкции тканей [Бадыров Р.М. и соавт., 2018; Максяткина Л.В. и соавт., 2019; Costa A. et al., 2019; Титова Е.В. и соавт., 2021; Басок Ю.Б. и соавт., 2023].

Основные вопросы лечения больших послеоперационных вентральных грыж до конца не разрешены, несмотря на значительный прогресс, поэтому в ходе проведения данного этапа исследования была проведена оценка эффективности разработанного мДДМ при экспериментальном применении в лечении вентральной грыжи [Nisiewicz M. et al., 2019].

Экспериментальная герниопластика проводилась на 2 свиньях породы Ландрас (возрастом 4–6 месяцев, массой $27 \pm 6,1$ кг). Ненатяжную герниопластику грыжевого дефекта (13×5 см) выполняли с помощью мДДМ ($15 \times 7 \times 0,07$ см) – опытная группа и грыжевого дефекта (11×7 см) с помощью коммерческого импланта Permacol™ ($15 \times 10 \times 1$ см) – группа сравнения.

Закрытие грыжевого дефекта осуществлялось методом ненатяжной предбрюшинной герниопластики передней брюшной стенки (методом sublay) (Рисунок 35).

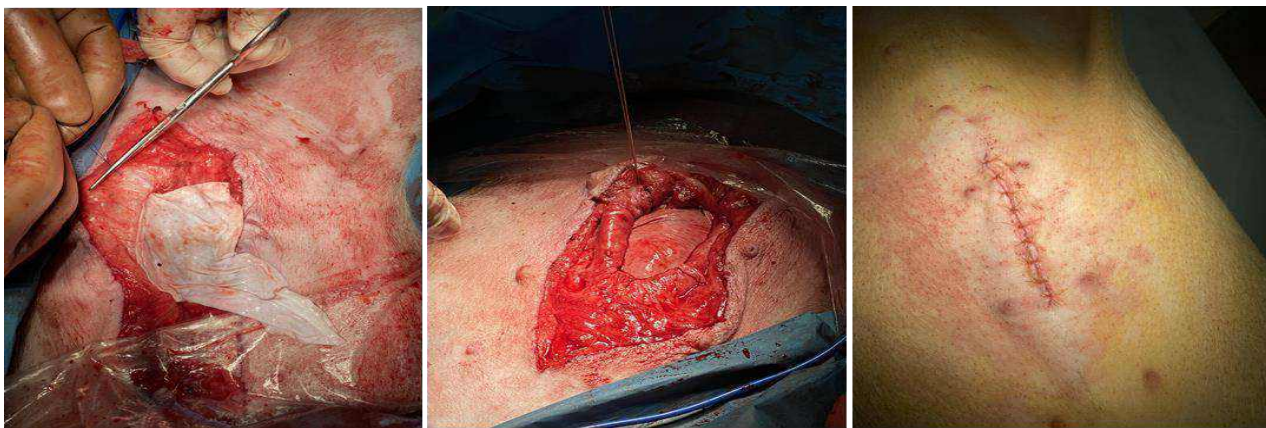
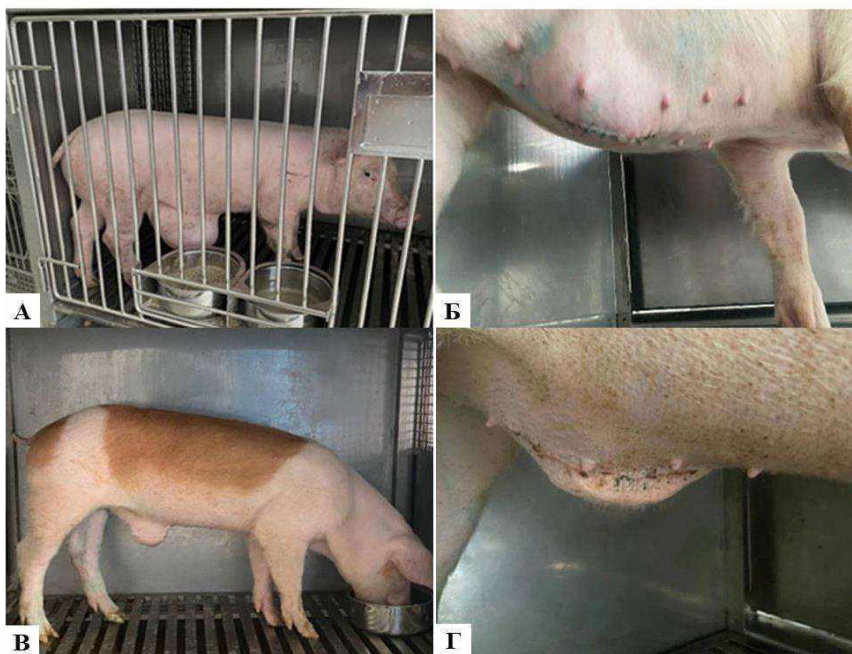


Рисунок 35 – Этапы экспериментальной герниопластики с использованием мДДМ

Хирургические импланты были закреплены несколькими узловыми швами полипропиленовыми монофиламентными нитями ($1/2$, 36 мм, USP 4, «Волоть», Россия). В ходе операции биопластические материалы выкраивались и располагались соответственно размерам грыжевых ворот.

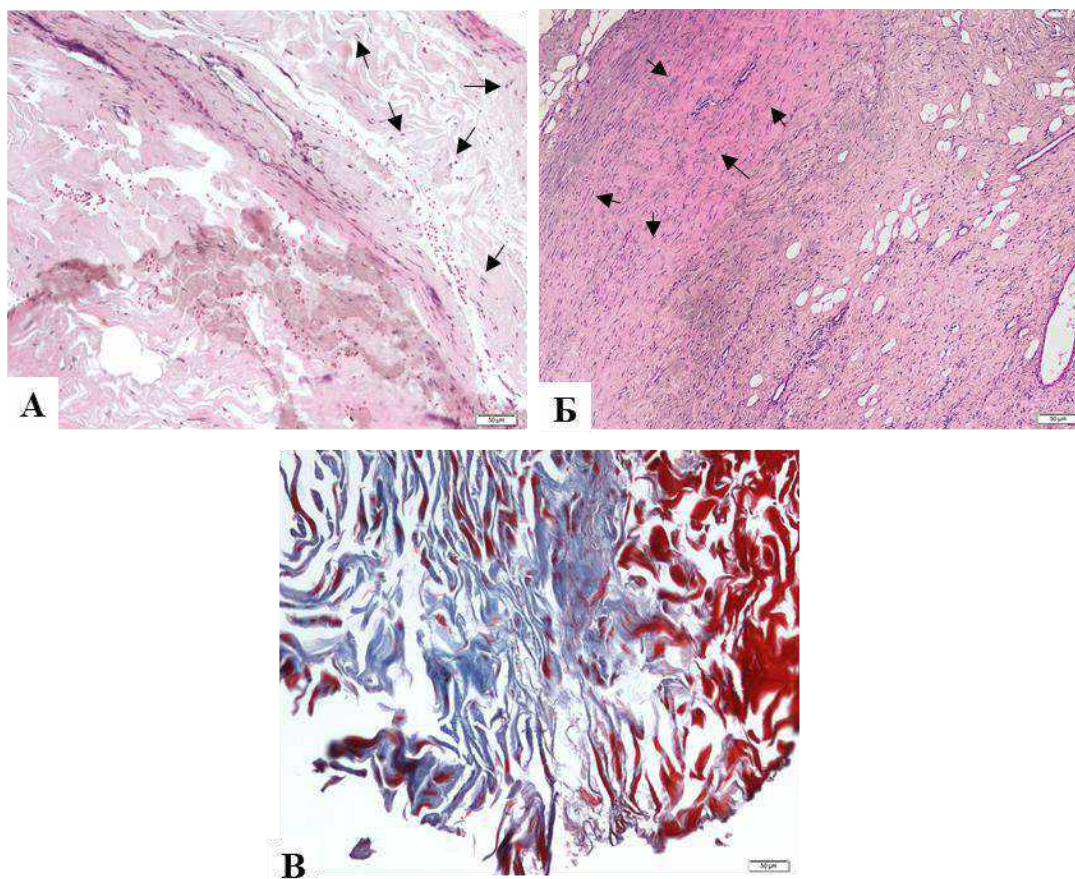
В течение всего эксперимента не отмечалось опущения внутренних органов, что подтверждает прочностные характеристики мДДМ и коммерческого импланта Permacol™ (Рисунок 36).



А – до герниопластики с помощью мДДМ; В – до герниопластики с помощью Permacol™; Б, Г – после экспериментального лечения (21-е сутки)

Рисунок 36 – Динамика экспериментального лечения свиньи-грыженосителя исследуемыми биоматериалами

Через 60 дней после экспериментальной герниопластики с использованием мДДМ была проведена биопсия, при этом проводился визуальный контроль и было отмечено отсутствие таких осложнений, как адгезия матрикса к внутренним органам, образование свищей и сером. Фрагменты тканей послеоперационного шва и области примыкания белой линии живота к имплантированному мДДМ были подвергнуты гистологическому исследованию. Послеоперационный рубец характеризовался выраженным развитием плотной волокнистой соединительной ткани. Ткани из области имплантации мДДМ демонстрировали развитие зрелого состоятельного рубца с большим количеством коллагеновых и эластических волокон на фоне полного отсутствия гистологических признаков воспаления (Рисунок 37).



А – послеоперационный рубец, гематоксилин-эозин; ув. $\times 200$; Б – место имплантации мДДМ, гематоксилин-эозин; ув. $\times 100$; В – плотная волокнистая соединительная ткань в месте имплантации, трихром по Массону; ув. $\times 200$;
стрелками показаны фибробластоподобные клетки

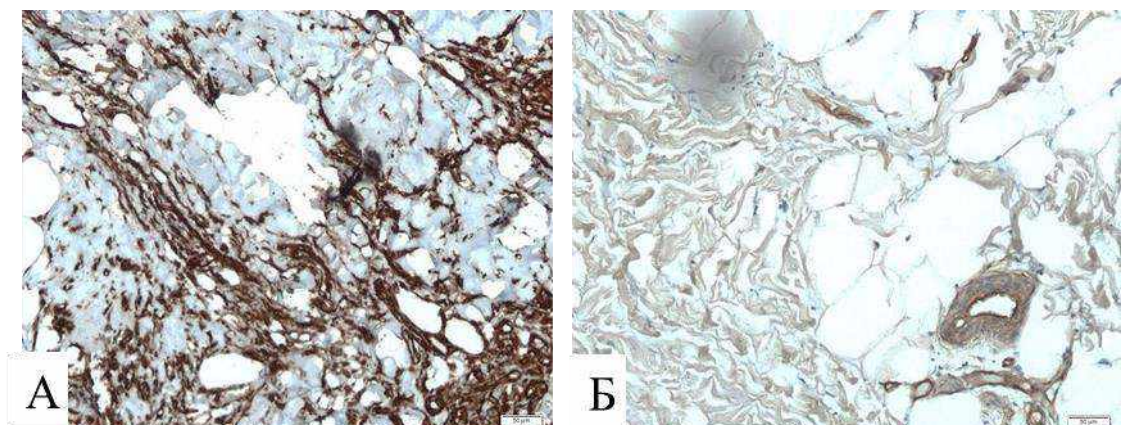
Рисунок 37 – Гистологическое исследование области имплантации мДДМ

Иммуногистохимический анализ установил присутствие большого количества коллагена I типа, а также положительное окрашивание на белок промежуточных филаментов- виментин, что говорило о миграции в имплантированный материал клеток мезенхимного происхождения – в частности, фибробластов и эндотелиоцитов (Таблица 9, Рисунок 38).

Таблица 9 – Морфологическая характеристика соединительной ткани в области экспериментальной герниопластики

Маркер	мДДМ	Permacol™
коллаген I типа, КПО, %	56,2 [38,7; 65,3] *	44,2 [33,2; 51,5]
виментин, КПО, %	28,3 [19,2; 37,1] *	14,2 [9,3; 17,7]
фибробластоподобные клетки, кол-во в ПЗ	86,4 [53,8; 96,3] *	68,1 [49,7; 73,9]
CD31, КПО, %	26,3 [22,2; 29,7]	22,2 [18,3; 25,9]
CD3, КПО, %	0,0	0,0
CD68, КПО, %	0,0	0,0

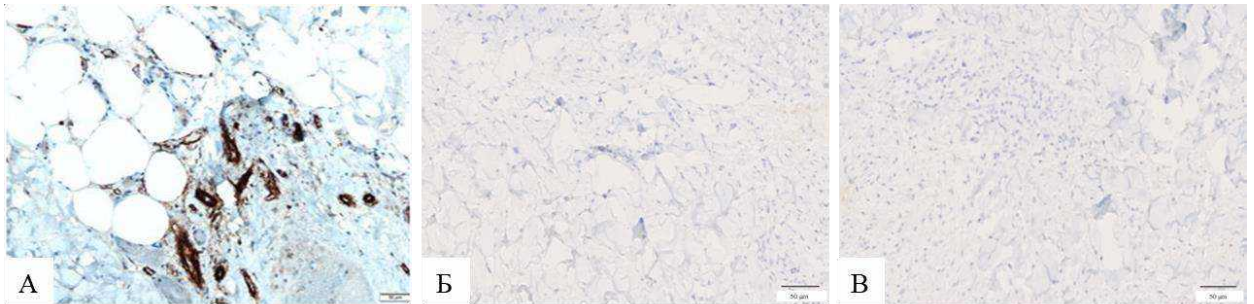
Примечание: КПО – коэффициент площади окрашивания; ПЗ – поле зрения;
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к группе сравнения



А – коллаген I типа; Б – виментин-позитивные клетки. Ув. $\times 200$

Рисунок 38 – ИГХ окрашивание соединительной ткани послеоперационного рубца при имплантации мДДМ

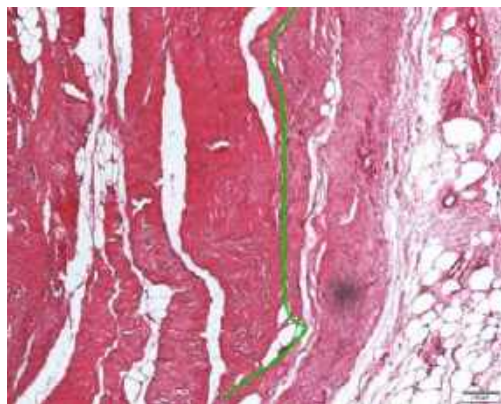
Имплант прорастал крупными и мелкими сосудами без воспалительных изменений в тканях по данным ИГХ-окрашивания на маркеры CD31, CD3 и CD68 (Рисунок 39, Таблица 9).



А – иммуногистохимическая реакция с CD31; Б – иммуногистохимическая реакция с CD3; В – иммуногистохимическая реакция с CD68. Ув. $\times 200$

Рисунок 39 – Соединительная ткань в области послеоперационного рубца при имплантации мДДМ

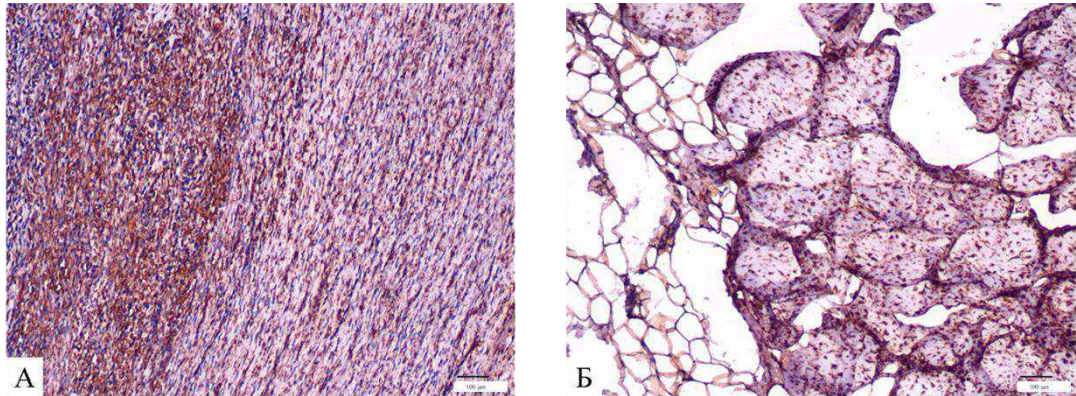
Анализ образцов животного, которому был имплантирован PermacolTM, показал, что через 60 дней имплант не полностью интегрировался в соединительные ткани животного. Клеточный компонент имплантата был выражен незначительно и представлял собой преимущественно фибробласты. На границе между апоневрозом и материалом PermacolTM формировались небольшие очаги липоматоза и мелкие серомы. При этом из-за достаточной жесткости, обуславливающей натяжение имплантата, сформировалось незначительное расслоение коллагеновых волокон в апоневрозе (Рисунок 40).



Линия указывает на границу между тканями животного (слева) и имплантированным материалом (справа). Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$

Рисунок 40 – Область имплантации материала PermacolTM

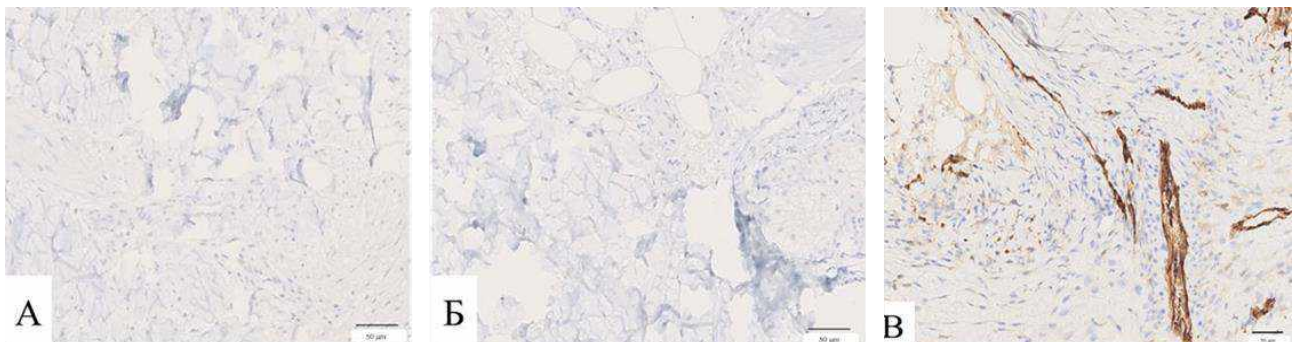
На месте закрытия грыжевого дефекта сформировалась плотная соединительная ткань с полноценным волокнистым компонентом (коллаген I типа), в которой также присутствовали промежуточные микрофиламенты (виментин), указывающие на активную миграцию и заселение клетками, но не превышающие значения, полученные для мДДМ (Таблица 9, Рисунок 41)



А – коллаген I типа; Б – виментин. Иммуногистохимическая реакция. Ув. $\times 100$

Рисунок 41 – Граница PermacolTM – ткани животного

Отдалённые результаты имплантации PermacolTM не продемонстрировали воспалительных изменений в области послеоперационного шва, в новообразованной соединительной ткани были выявлены сосуды в незначительном количестве (Рисунок 42).



А – CD3-позитивные Т-лимфоциты; Б – CD68-позитивные макрофаги; В – CD31-позитивные клетки в стенках капилляров. Иммуногистохимическая реакция. Ув. $\times 200$

Рисунок 42 – Область имплантации материала PermacolTM

Исходя из результатов гистологического исследования, можно сделать вывод об эффективности PermacolTM и мДДМ, использованных для закрытия грыжевого

дефекта, что подтверждалось состоятельностью рубцов. При этом не наблюдалось визуальной и морфологической границы между мДДМ и апоневрозом, в отличие от Permacol™, что демонстрирует способность матрикса к полной биоинтеграции.

Таким образом, разработанный мДДМ хорошо моделировался по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки, что существенно оптимизировало хирургические манипуляции при герниопластике. Благодаря отсутствию сшивающих химических агентов в мДДМ, тканевые и клеточные реакции в области его расположения протекали более физиологично, и наблюдалось постепенное замещение материала вновь образованной соединительной тканью с более высоким содержанием коллагена, виментина и фибробластноподобных клеток. мДДМ и Permacol™ показали высокие прочностные характеристики, надежно укрепляя дефект передней брюшной стенки и были устойчивы к прорезыванию шовным материалом, прорастали мелкими сосудами, при этом отмечалось отсутствие спаечного процесса и формирования грубой фиброзной капсулы вокруг имплантов.

6.2 Результаты экспериментального применения децеллюляризованного дермального матрикса в качестве тканезамещающего материала при мастэктомии

Наиболее часто применяемым методом реконструкции груди после мастэктомии является установка тканевого экспандера или имплантата. Плюсом использования данного метода является снижение травматизации окружающих тканей. Кроме того, реабилитация пациентов проходит быстрее, с меньшим нарушением функционирования, чем при реконструкции с переносом аутологичных тканей [Ермощенко М.В. и соавт., 2017; Зикирходжаев А.Д. и соавт., 2018]. Но использование экспандера или имплантата имеет свои ограничения, связанные с состоянием мягких тканей, окружающих и поддерживающих грудной протез. Создание лоскутов *m. serratus*, *m. pectoralis*

minor и фасциальные вытягивания мышц передней брюшной стенки, которые выполняются для оптимизации укрытия мягкими тканями, приводят к усилению послеоперационных болей, ослаблению мышечной функции и отсроченной реабилитации [Petrie K. et al., 2022; Glynou S.P. et al., 2024].

Для обеспечения полного укрытия протеза без задействования дополнительных мышечных лоскутов в последнее время используется хирургический материал – ацеллюлярный дермальный матрикс, который, близок по структуре к собственным тканям человека и обладает биологической инертностью [Приходько К.А. и соавт., 2017; Gierек M. et al., 2022; Dueñas-Rodríguez V. et al., 2023].

Хирургическая техника включает выделение нижнего края *m. pectoralis major* с внедрением листка мДДМ между нижней инфрамаммарной складкой и нижней границей *m. pectoralis major*. Данная техника позволяет обеспечивать дополнительный покровный слой для реконструируемой груди. Преимущества децеллюляризованных матриксов, такие как создание определенной формы реконструируемой груди, минимизация экспозиции грудного протеза, интраоперационно больший объем тканевого экспандера, одномоментная реконструкция без необходимости последующих процедур, описаны в многочисленных работах [Susini P. et al., 2023; Dilek Ö.F. et al., 2024].

Методика реконструктивной пластической хирургии молочной железы с помощью ацеллюлярного дермального матрикса на основе дермы свиньи может быть одной из операций выбора в арсенале реконструктивной хирургии. Преимущество данной методики заключается в ее технической простоте, снижении травматичности вмешательства, уменьшении времени операции, высоком уровне эстетической удовлетворенности.

В связи с этим было проведено экспериментальное обоснование медицинской технологии применения бесклеточного биоматрикса при реконструктивной пластической хирургии в экспериментальной модели.

Моделирование субпекторального кармана проводилось на 2 свиньях породы Ландрас (возраст 4 месяца, самки, вес $33 \pm 1,7$ кг) (Рисунок 43).

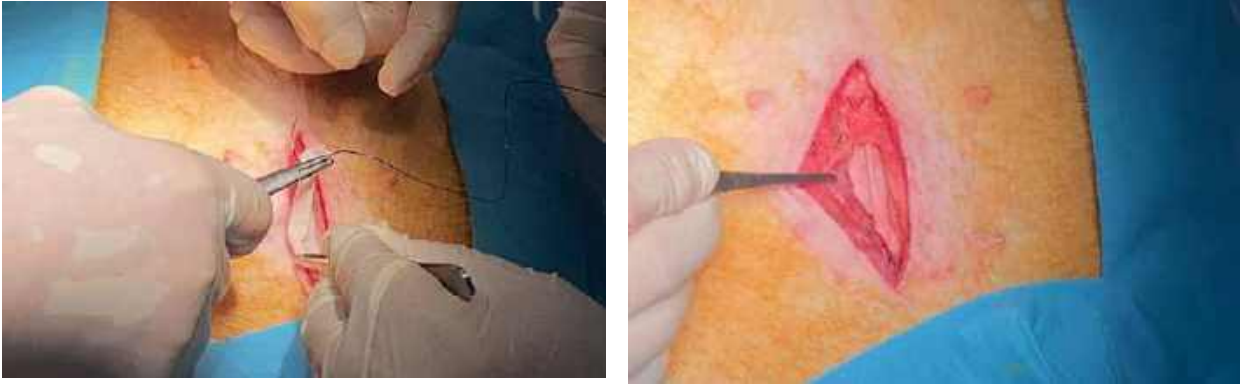


Рисунок 43 – Этапы имплантации мДДМ без помещения грудного эндопротеза в сформированный карман

В области передней грудной стенки с помощью мДДМ (опытная группа) и коммерческого импланта Permascoll™ (группа сравнения) формировали карман для эндопротеза (без вложения). Его границами являлись: внутри – место прикрепления большой грудной мышцы к грудице, снаружи – брюшная порция большой грудной мышцы и грудная фасция, переходящая на пучки передней зубчатой мышцы и наружной косой мышцы живота, вверху – грудноакромиальный сосудистый пучок, внизу – ребро и сохранённая дистальная точка крепления брюшной порции большой грудной мышцы. После подшивания мДДМ или Permascoll™ приступали к ушиванию раны.

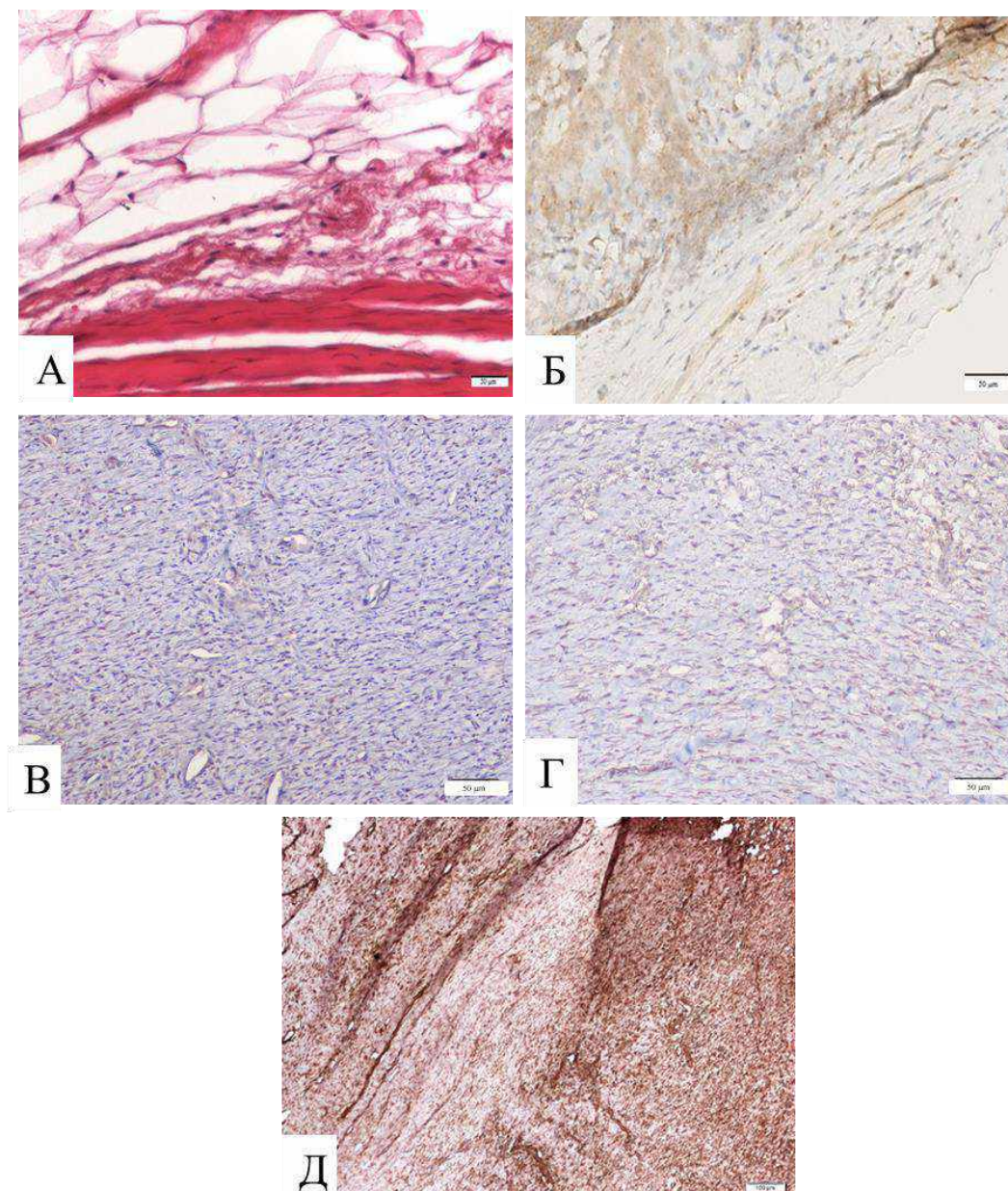
Для оценки степени биоинтеграции на 60-е сутки в области подшивания эксплантировался биопсийный материал мДДМ или Permascoll™ вместе с прилежащими тканями.

Материал животного, которому был имплантирован мДДМ, характеризовался хорошей интеграцией матрикса в собственные ткани свиньи, о чём говорило отсутствие соединительно-тканной капсулы на границе между имплантом и мышечной тканью. Воспалительных изменений, в том числе затухших, выявлено не было. В мДДМ появился клеточный компонент, представленный фибробластоподобными клетками. Хорошо заметная граница между мДДМ и апоневрозом обусловлена тем, что в апоневрозе все коллагеновые волокна ориентированы параллельно друг другу, а в имплантированном мДДМ их расположение разнонаправленное. Для оценки особенностей биоинтеграции

имплантируемых материалов было проведено исследование коллагена I типа ИГХ методом, продемонстрировавшее его равномерное распределение, волокна располагались диффузно или в виде пучков относительно равномерно в поле зрения, что говорит о нормальном формировании соединительной ткани, в частности, её оформленного межклеточного вещества. ИГХ окрашивание лейкоцитов в месте имплантации мДДМ не позволило обнаружить экспрессию CD3- и CD68-рецепторов, что коррелировало с авоспалительной гистологической картиной. Экспрессия PECAM-1 (CD31) была положительной в большей части капилляров в поле зрения, что можно расценивать как отсутствие феномена эндотелиальной дисфункции и адекватную работу микроциркуляторного русла в области имплантации (Таблица 10, Рисунок 44).

Таблица 10 – Морфологическая характеристика соединительной ткани в области экспериментальной маммопластики

Маркер	мДДМ	Permacol™
коллаген I типа, КПО, %	48,8 [41,1; 52,5] *	42,7 [37,1; 49,5]
фибробластоподобные клетки, кол-во в ПЗ	22,4 [13,3; 24,2] *	18,1 [9,9; 23,4]
CD31, КПО, %	16,1 [12,8; 22,9]	23,9 [15,5; 29,1]
CD3, КПО, %	0,0	0,0
CD68, КПО, %	0,0	0,0
Примечание: КПО – коэффициент площади окрашивания; ПЗ – поле зрения; * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к группе сравнения		



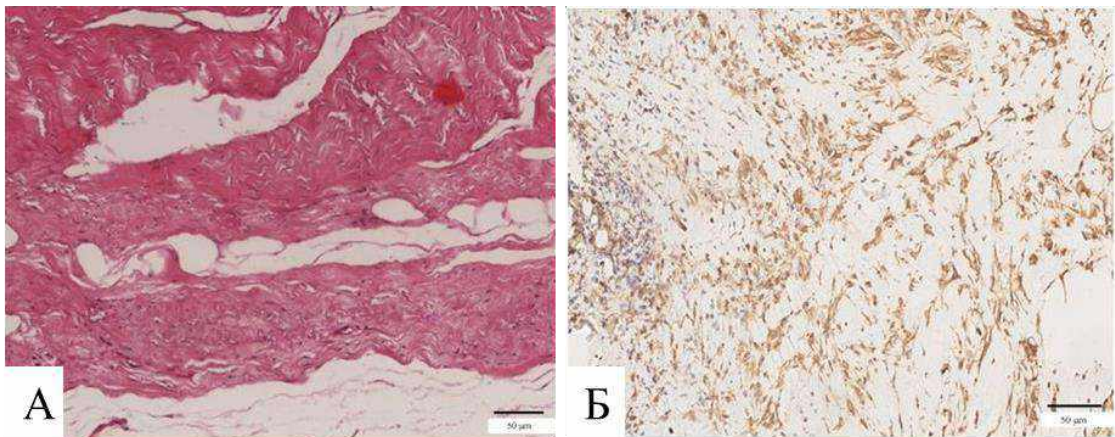
А – гематоксилин-эозин. Ув. x200; Б – коллаген I типа, ИГХ окрашивание. Ув. x200; В – CD3-позитивные клетки, ИГХ окрашивание. Ув. x200; Г – CD68-позитивные клетки, ИГХ окрашивание. Ув. x200; Д – CD31-позитивные клетки (эндотелиоциты), ИГХ окрашивание. Ув. x100

Рисунок 44 – Граница между мДДМ и грудной фасцией животного

Известно, что коллагеновые имплантаты вызывают легкий воспалительный процесс, характеризующийся в основном присутствием макрофагов и разрешающийся отложением компонентов внеклеточного матрикса по мере деградации коллагена, с очень незначительной васкуляризацией имплантата или без нее. Имплантаты из сшитого коллагена вызывают более интенсивный и устойчивый

ответ с повышенным отложением компонентов ВКМ [Morris A.H. et al., 2017]. В связи с этим было интересно провести сравнительную оценку иммунного ответа на разработанный мДДМ и сшитый гексаметилендиизоцианатом Permacol™.

В препаратах животного, у которого для герниопластики использовали Permacol™, отмечалась хорошая интеграция импланта в собственные ткани. На границе апоневроза и имплантированного материала не сформировалось соединительно-тканной капсулы. Активное или разрешившееся воспаление отсутствовало. Лоскут Permacol™ характеризовался сформировавшимся клеточным компонентом, представленным в основном фибробластоподобными элементами. Визуально собственные ткани отличались от импланта более упорядоченным расположением коллагеновых волокон и отсутствием промежутков между ними. Кроме того, в отдельных полях зрения отмечалась выраженная фрагментация имплантированного биоматериала и очаговая гиперплазия адипоцитов (Рисунок 45, А). Равномерное распределение коллагена во всех полях зрения свидетельствует о полноценной регенерации с формированием зрелой соединительной ткани (Рисунок 45, Б).

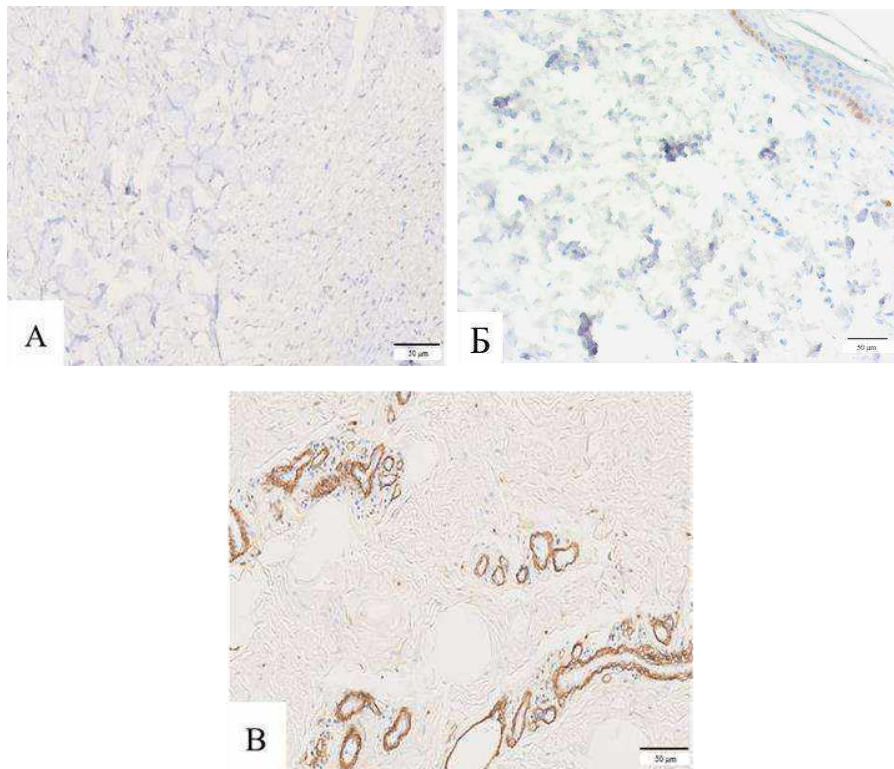


А – гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$; Б – коллаген I типа, ИГХ реакция. Ув. $\times 200$

Рисунок 45 – Граница между Permacol™ и грудной фасцией

Об отсутствии иммуногенности имплантированного материала свидетельствовало отсутствие Т-лимфоцитов (CD3+) и макрофагов (CD68+) в тканевых срезах (Рисунок 46, А, Б). Более того, отсутствие макрофагов можно

расценивать как прогностически благоприятный признак биоинтеграции. Иммуногистохимическое выявление молекул клеточной адгезии PECAM показало положительную реакцию в большинстве эндотелиальных клеток в срезе ткани, что говорит об адекватной регенерации в зоне операционной раны (Рисунок 46, В).



А – CD3-позитивные Т-лимфоциты; Б – CD68-позитивные макрофаги; В – CD31-позитивные клетки (эндотелиоциты). ИГХ реакция, ув. x200

Рисунок 46 – Иммуногистохимическое окрашивание в месте имплантации Permacol™

Таким образом, сравнительные морфологические результаты, полученные через 60 дней после проведения модельной маммопластики, позволили утверждать, что иммуногенность, уровень интеграции в ткани животного и темпы биodeградации у коммерческого препарата Permacol™ и мДДМ сопоставимы.

Резюме

Сравнительные морфологические отдаленные результаты после проведения модельной гернио- и маммопластики, позволили утверждать, что использование децеллюляризованного по модифицированному алгоритму матрикса дермы свиньи приводит к формированию нормальной соединительной ткани на месте

дефекта, содержащей основной компонент внеклеточного матрикса – коллаген I типа, фибробластоподобные клетки и эндотелиоциты, не проявляет иммуногенных свойств, при этом уровень интеграции в ткани животного и темпы биodeградации у коммерческого препарата сшитого гексаметилендиизоцианатом Permacol™ и мДДМ сопоставимы, что обуславливает перспективность его дальнейшего применения.

ГЛАВА 7 ОЦЕНКА СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ГИДРОГЕЛЕВОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ

Коллагеновые гидрогели в настоящее время являются перспективными биоматериалами, применяемыми в различных направлениях биомедицины, клеточных технологиях и тканевой инженерии [Sharifzadeh G. et al., 2017]. Особенно актуально их применение в качестве ранозаживляющих материалов, основы для отверждаемых и активированных костно-пластических материалов, для 3D культивирования клеток, а также в качестве чернил для 3D-биопринтинга соединительнотканых конструкций, так как коллаген является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса [Annabi N. et al., 2017; Фатхудинова Н.Л. и соавт., 2018; Zheng M. et al., 2023].

Для получения гидрогелевых биологических материалов на основе дермы свиньи может быть использована её химическая обработка, при этом важно: удалить клеточные элементы, что может быть оценено с помощью количественного определения остаточного ДНК; подобрать методику обработки, позволяющую сохранить коллагены, с-ГАГ, гиалуроновую кислоту и другие компоненты ВКМ; обеспечить отсутствие цитотоксического воздействия биологического материала на клеточные культуры.

7.1 Подбор оптимальной методики обработки дермы свиньи для получения децеллюляризованного гидрогелевого материала

Образцы дермы свиньи размерами $3 \pm 0,1 \times 3 \pm 0,1 \times 0,03$ см ($n = 25$) обрабатывали щелочным раствором с различными концентрациями гидроксида натрия: 3,5 % раствор (группа 1); 4 % раствор (группа 2); 4,5 % раствор (группа 3); 5 % раствор (группа 4); 5,5 % раствор (группа 5), при гидромодуле 1 : 5 при

комнатной температуре, после чего отмывали в деионизированной воде до нейтрального значения pH.

Критериями отбора для разработки оптимальной методики получения гидрогелевого материала служили: время образования прозрачного материала, время образования гелеобразной структуры, время, необходимое на нейтрализацию образца.

В результате проведенного эксперимента оптимальные характеристики имели образцы группы 4, которые обладали меньшим временем гелеобразования по сравнению с образцами группы 2 и 3, и значительно меньшим временем нейтрализации по сравнению с образцами в группе 5 (Таблица 11).

Таблица 11 – Результаты подбора оптимальной концентрации щелочного раствора для обработки дермы свиньи

Группа	1 (n = 5)	2 (n = 5)	3 (n = 5)	4 (n = 5)	5 (n = 5)
Концентрация NaOH, %	3,5	4	4,5	5	5,5
Положительный тест на прозрачность материала, кол-во часов обработки	–	–	10, ± 1,14	6,6 ± 1,52	6
Образование гелеобразной структуры, кол-во часов	–	96,8 ± 1,3	47,6 ± 1,14	20 ± 0,7	21,6 ± 1,34
Время нейтрализации, ч	–	15,4 ± 1,14	20,2 ± 1,48	24,4 ± 1,14	35,72 ± 1,09
Общее время обработки, ч	–	112,2 ± 0,44	67,8 ± 1,92	44,4 ± 0,89	57,32 ± 1,55

Образцы в группе 1 не соответствовали критериям отбора, так как они не приобрели прозрачность и гелеобразную структуру в течение 113 часов, дальнейшая обработка была признана нецелесообразной. Следует отметить, что внешний вид образцов в этой группе соответствовал материалам, полученным при обработке дермы свиньи детергентно-энзиматическим методом.

Полученные децеллюляризованные гидрогелевые материалы в группах 2–5 обладали прозрачностью, однако общее время обработки и нейтрализации было различным.

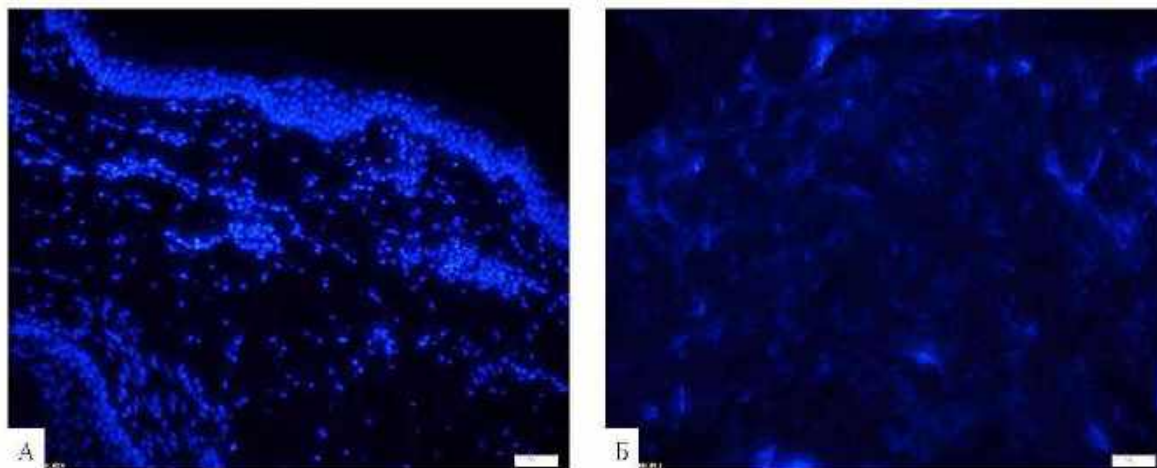
Образцы дермы группы 4, полученные после воздействия 5 % щелочного раствора в течение $6,6 \pm 1,52$ часов, приобрели упругую структуру, сохраняли форму при деформации и не продавливались пинцетом (Рисунок 47).



Рисунок 47 – Внешний вид образца дермы свиньи до обработки щелочным раствором (А), после 6 ч обработки 5 % NaOH (Б), после 20 ч обработки 5 % NaOH (В)

Через $20 \pm 0,7$ часов после начала обработки образцы группы 4 приобрели структуру гидрогелевого коллагенсодержащего материала, что вероятно связано с набуханием коллагеновых волокон и объясняется нарушением структуры коллагена, а именно расщеплением коллагеновых фибрилл и разрушением невосстанавливаемых коллагеновых сшивок (Рисунок 47, В). Образцы данной группы соответствовали всем критериям отбора, следовательно, установленные параметры обработки были признаны оптимальными для получения гидрогеля на основе дермы свиньи в лабораторных условиях.

С целью оценки качества децеллюляризации проводился анализ DAPI, показывающий степень деструкции клеточных ядер. По результатам исследования, в образцах децеллюляризованного гидрогелевого материала не было обнаружено клеточных ядер, показывающих интенсивное свечение в нативной дерме (Рисунок 48).



Окрашивание DAPI. Ув. x200

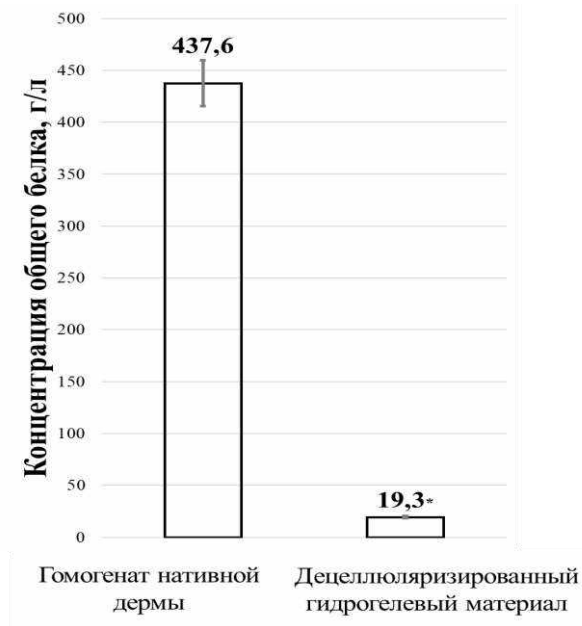
Рисунок 48 – Наличие интактных ядер и ДНК в образцах нативной дермы свиньи до (А) и после (Б) химической децеллюляризации

Полученный децеллюляризованный гидрогелевый материал был прозрачным, плотным и гомогенным. В полученный гидрогель добавляли 1 % раствор антибиотика-антимикотика (Gibco (Thermo Scientific), США) в соотношении 10 : 1 (гидрогель : раствор антибиотика) и хранили в стерильных условиях при температуре +4 °С.

7.2 Биохимический анализ децеллюляризованного гидрогелевого материала

Образцы децеллюляризованного гидрогелевого материала, полученные химической децеллюляризацией дермы свиньи подвергались биохимическому анализу на содержание общего белка, нативного коллагена, гиалуроновой кислоты, сульфатированных общих и О-гликозаминогликанов и ДНК для оценки сохранности компонентов ВКМ. Гомогенаты нативной дермы свиньи также подвергались данному исследованию и служили группой сравнения.

Количественный анализ содержания общего белка в полученном гидрогеле показал, что его концентрация составила $19,3 \pm 6,2$ г/л (Рисунок 49).

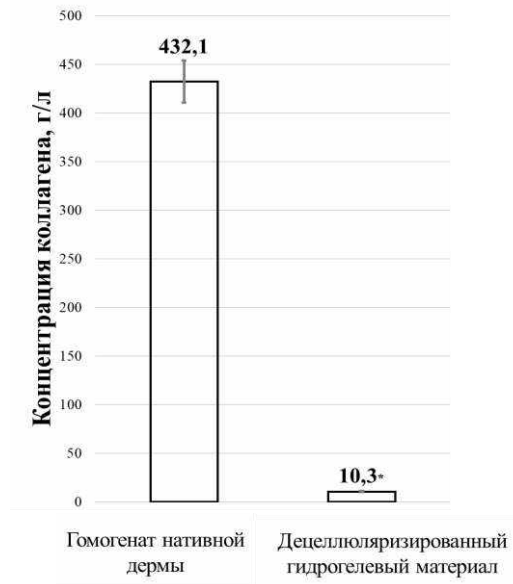


* – значимость различий по сравнению с нативной дермой, $p < 0,001$

Рисунок 49 – Результаты анализа содержания общего белка в децеллюляризованном гидрогелевом материале

Данный анализ был проведен для определения степени его вымывания из нативного образца, таким образом, в результате обработки свиной дермы 5 % раствором NaOH произошло удаление 96,7 % белка (в сравнении с содержанием в образце дермы до обработки, $p < 0,001$).

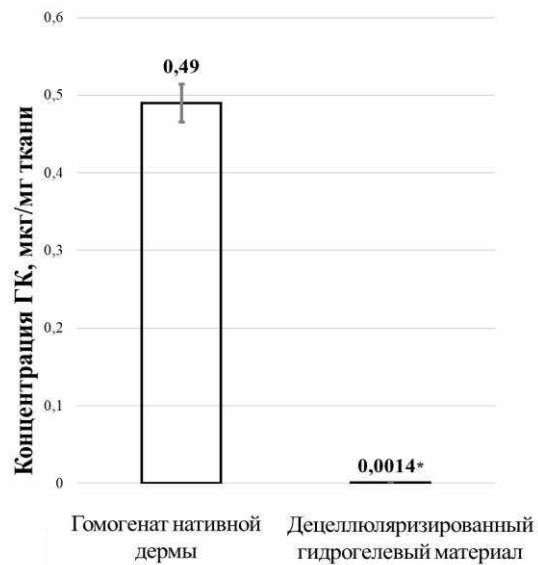
Количественный анализ содержания нативного коллагена в полученном гидрогеле для определения степени его вымывания из нативного образца представлен на Рисунке 50. В результате обработки дермы 5 % раствором NaOH произошло удаление 97% коллагена (10,3 г/л в децеллюляризованном гидрогелевом материале по сравнению с 432,1 г/л – в гомогенате нативной дермы свиньи, $p < 0,001$), что объясняется его возможным разрушением и вымыванием.



* – значимость различий по сравнению с нативной кожей свиньи, $p < 0,001$

Рисунок 50 – Результаты анализа содержания нативного коллагена в децеллюляризованном гидрогелевом материале

Был произведен количественный анализ содержания гиалуроновой кислоты в полученном гидрогеле для определения степени вымывания углеводов из нативного образца (Рисунок 51).

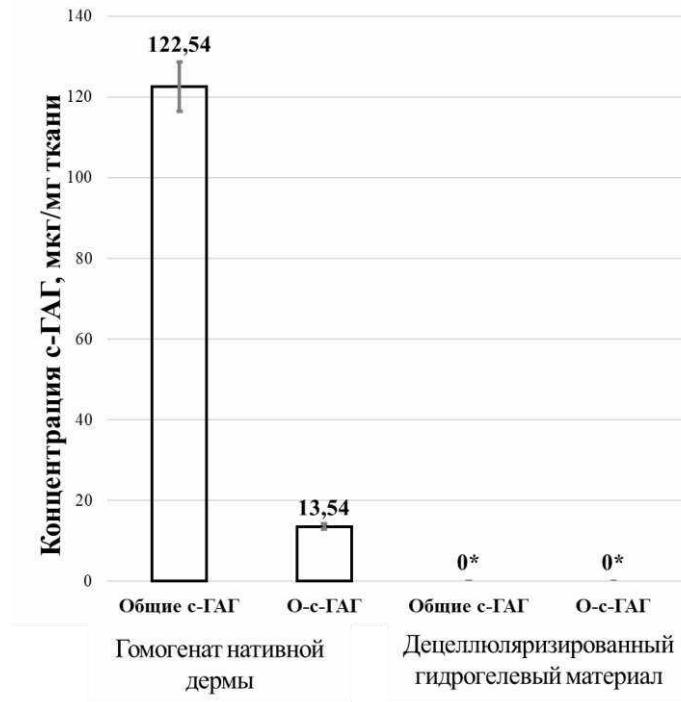


* – значимость различий по сравнению с нативной кожей, $p < 0,001$, ГК – гиалуроновая кислота

Рисунок 51 – Результаты анализа содержания гиалуроновой кислоты в децеллюляризованном гидрогелевом материале

В результате обработки свиной дермы 5 % раствором NaOH произошла полная потеря (вымывание) гиалуроновой кислоты в децеллюляризованном гидрогелевом материале ($p < 0,001$, в сравнении с содержанием в образце дермы до обработки).

Кроме того, были получены данные о количественном содержании с-ГАГ в децеллюляризованном гидрогелевом материале, которые способствовали определению степени вымывания углеводов из нативного образца (Рисунок 52).



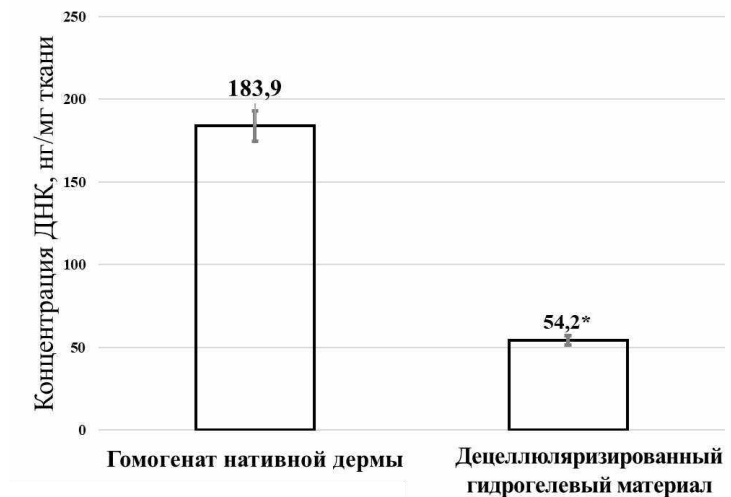
* – значимость различий по сравнению с содержанием общих с-ГАГ в нативной дерме свиньи, $p < 0,001$, с-ГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

Рисунок 52 – Результаты анализа содержания сульфатированных гликозаминогликанов в децеллюляризованном гидрогелевом материале

Установлено, что в результате обработки свиной дермы 5 % раствором NaOH произошла полная потеря (вымывание) О- и N-сульфатированных гликозаминогликанов ($p < 0,001$ в сравнении с содержанием в образце дермы до обработки).

Определение остаточного содержания ДНК после процедуры щелочной обработки образцов дермы проводилось для оценки возможной иммуногенной реакции на ксеногенную ДНК в децеллюляризованном гидрогелевом материале

(Рисунок 53).



* – значимость различий по сравнению с нативной дермой свиньи, $p < 0,001$

Рисунок 53 – Количественное содержание ДНК в децеллюляризованном гидрогелевом материале

Количественный анализ показал, что в процессе обработки нативной дермы было удалено около 71 % ДНК ($54,2 \pm 17,2$ нг/мг в децеллюляризованном гидрогелевом материале по сравнению с $183,9 \pm 12,3$ нг/мг – в нативной дерме, $p < 0,001$), это свидетельствовало о том, что полученный гидрогель был в значительной степени очищен от ДНК.

7.3 Результаты рецеллюляризации децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи фибробластами человека *in vitro*

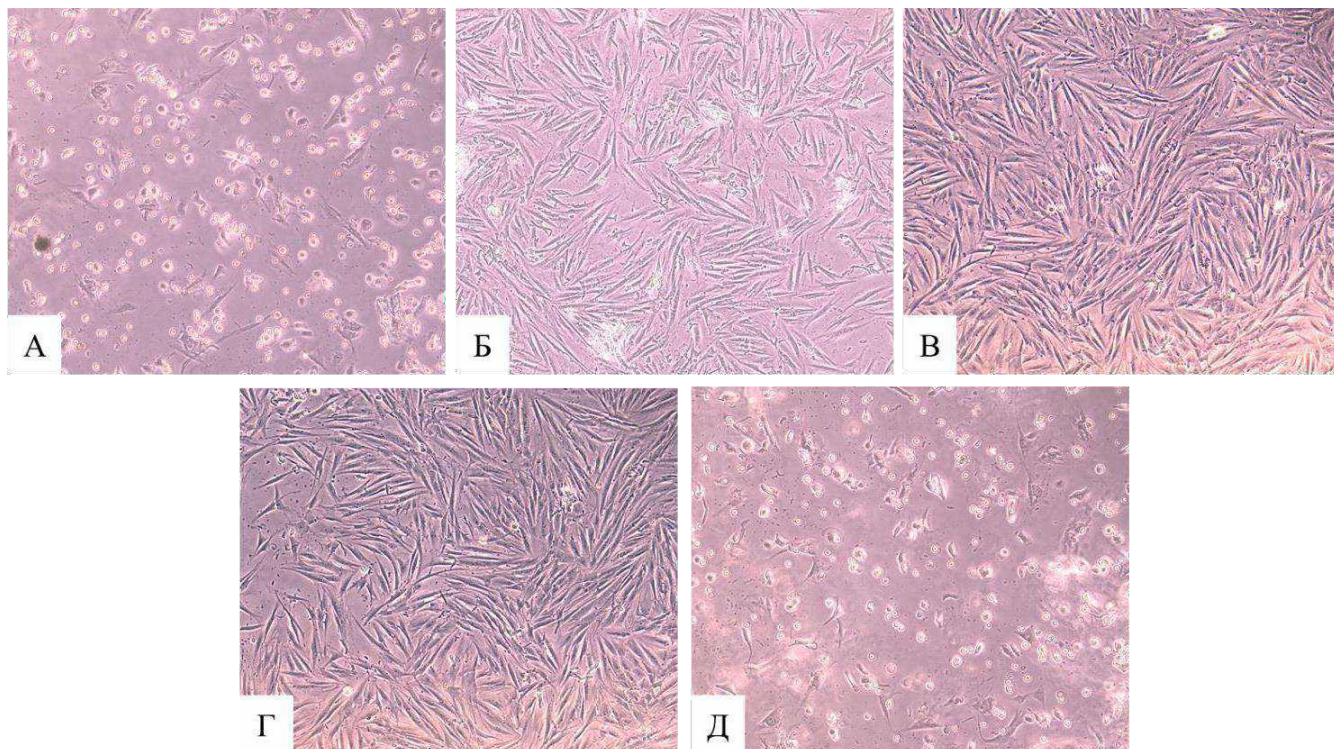
Перед проведением анализа на метаболическую активность (МТТ-тест) проводился дозоподбор оптимального объема децеллюляризованного гидрогелевого материала для рецеллюляризации. С этой целью в 96-луночный планшет помещались образцы гидрогеля с последующим засеиванием дермальными фибробластами DF-1 (в соотношениях питательная среда : децеллюляризованный гидрогелевый материал – 9 : 1; 5 : 1; 3 : 1 и 1,8 : 1) и контрольные образцы - питательная среда с DF-1 (Таблица 12).

Таблица 12 – Степень жизнеспособности и пролиферативной активности дермальных фибробластов при инкубации с децеллюляризированным гидрогелевым материалом

Соотношение объёмов ППС и децеллюляризированного гидрогелевого материала	Общее количество клеток, тыс.	% живых клеток
24 часа инкубации		
9 : 1	83,34 ± 5,51*	92,32*
5 : 1	62,33 ± 6,09*	82,42*
3 : 1	45,67 ± 3,78*	85,89*
1,8 : 1	46,33 ± 6,56*	85,07*
Контроль	262,83 ± 10,80	72,87
72 часа инкубации		
9 : 1	86,17 ± 2,04*	85,37*
5 : 1	79,50 ± 6,83*	89,36*
3 : 1	167 ± 11,47*	92,05*
1,8 : 1	231,33 ± 9,48	96,27*
Контроль	226 ± 31,08	66,58
Примечание: * - $p < 0,05$, различия значимы относительно контроля		

Рецеллюляризация образцов с высоким содержанием децеллюляризированного гидрогелевого материала показала, что общее количество клеток в лунках было ниже, чем в контрольных лунках, при этом их жизнеспособность не снижалась и была значимо выше контрольных значений, что может быть связано с адгезией и/или миграцией дермальных фибробластов в гидрогель и невозможностью их количественного учёта. На третьи сутки инкубации в лунках, содержащих гидрогель и среду в соотношении 1,8:1, не наблюдалось отличий от контрольных лунок в отношении количества клеток, их жизнеспособность была выше. Кроме того, через 24 часа инкубации в контрольных лунках клетки сохраняли сферическую форму, что говорило о худшем прикреплении клеток к пластику в отличие от клеток с гидрогелем, где клетки приобрели характерную веретенообразную форму с множественными межклеточными контактами (Рисунок 54). Веретенообразная морфология клеток

указывает на то, что клетки прикреплялись ко дну лунки и росли на нём [Ji S. et al., 2017].



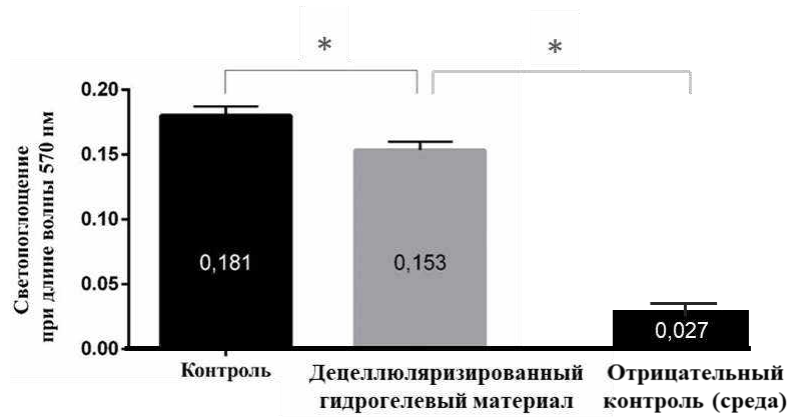
А – 9 : 1; Б – 5 : 1; В – 3 : 1; Г – 1,8 : 1; Д – контроль. Ув. $\times 100$

Рисунок 54 – Морфология клеток DF-1 на дне лунок планшета при различных соотношениях питательной среды и децеллюляризованного гидрогелевого материала

Полученные данные демонстрируют достаточную клеточную совместимость разработанного гидрогеля для дермальных фибробластов. Таким образом, оптимальные результаты были получены при соотношении питательной среды и децеллюляризованного гидрогелевого материала 1,8 : 1, поэтому данное соотношение было выбрано для дальнейшего МТТ- анализа.

МТТ-тест, проведенный после засеивания децеллюляризованного гидрогелевого материала клетками в описанном выше соотношении, показал наличие живых, метаболически активных клеток после 24 часов инкубирования, так как значения были выше, чем в отрицательном контроле, при этом жизнеспособность клеток оказалась значимо ниже, чем в контрольных лунках (Рисунок 55). Тем не менее, данный показатель был принят как приемлемый в

отношении цитотоксичности децеллюляризованного гидрогелевого материала, так как на результаты теста могло повлиять меньшее количество клеток, оставшихся в среде (см. Таблицу 12).



* - различия значимы, $p < 0,05$

Рисунок 55 – Данные МТТ-анализа жизнеспособности дермальных фибробластов при инкубации в присутствии децеллюляризованного гидрогелевого материала

При проведении теста на миграционную активность в условиях экспозиции децеллюляризованного гидрогелевого материала и ППС 1,8 : 1 наблюдалось более активное продвижение фибробластов в зону дефекта, сопровождаемое формированием выраженных ламеллоподий – структур, характерных для клеток с высоким уровнем миграционной активности, в контрольной группе сохранялось значительное незакрытое пространство в зоне повреждения. Сокращение площади «царапины» при миграционном тесте было на 25,2% быстрее, чем в условиях контроля (Рисунок 56).

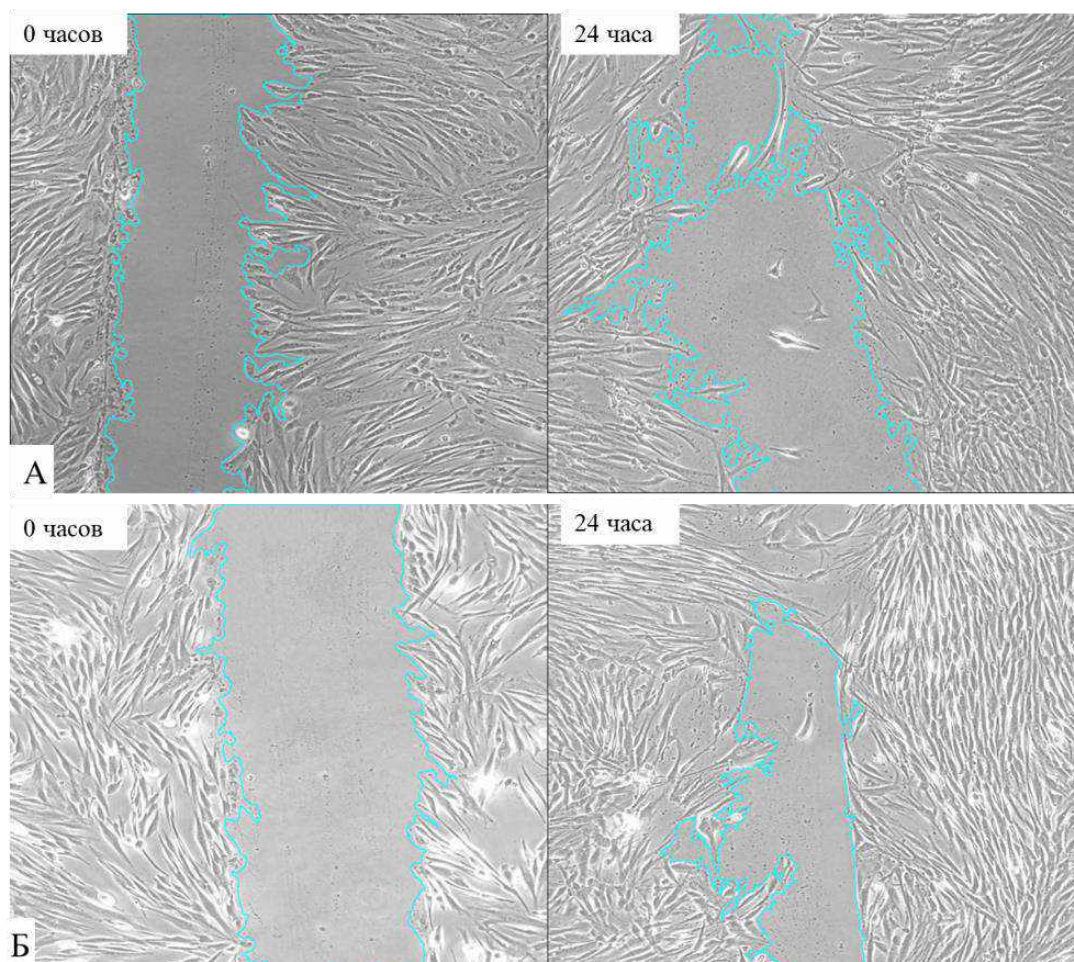
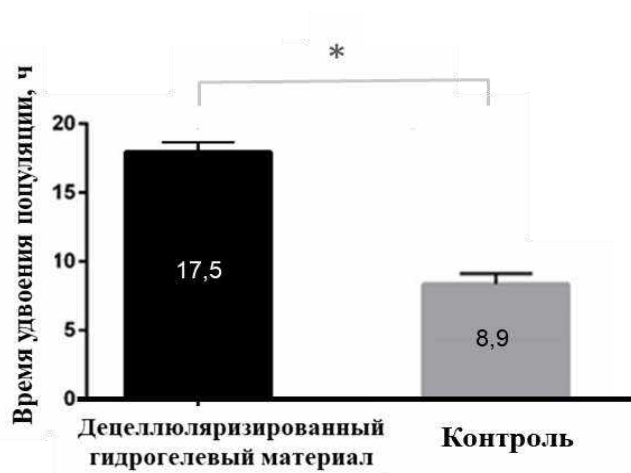


Рисунок 56 – Миграционная активность по данным теста «царапины» при инкубации в контрольных условиях (А) и в присутствии децеллюляризованного гидрогелевого материала (Б)

Полученные данные соответствуют известным механизмам регуляции фенотипа фибробластов в процессе заживления ран, так как в условиях повреждения и под воздействием сигналов матриксного происхождения, фибробласты могут демонстрировать фенотипическую пластичность, переходя от миграционно-активного к секреторному состоянию и наоборот [Wynn T.A. et al., 2012].

Добавление децеллюляризованного гидрогелевого материала к среде для культивирования способствовало значимому снижению времени удвоения популяции по сравнению с контролем на $51,1 \pm 12,4\%$, что отражало ускорение пролиферации клеток DF-1 (Рисунок 57).



* – значимость различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$

Рисунок 57 – Результаты учёта времени удвоения популяции клеток дермальных фибробластов при инкубации в присутствии децеллюляризованного гидрогелевого материала

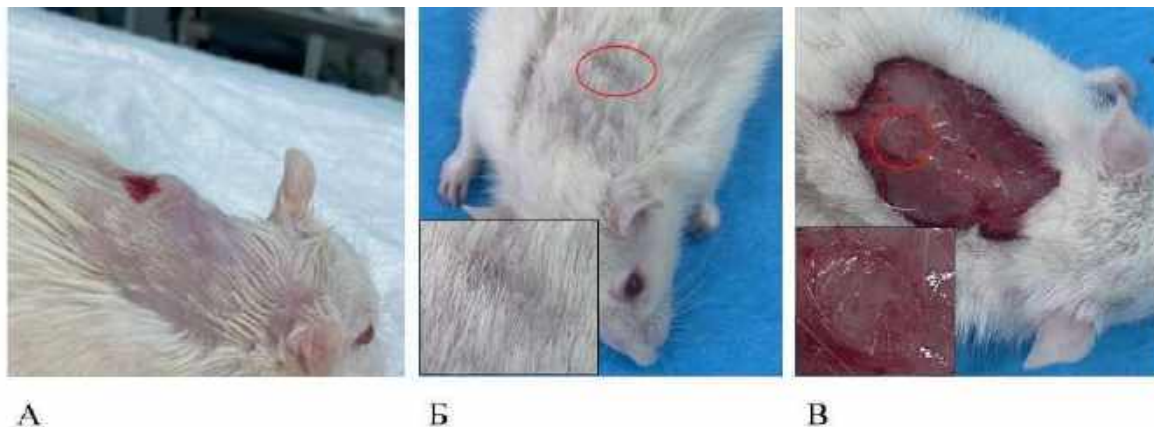
Отмечены статистически значимо большие уровни коллагена I типа в супернатантах, полученных при инкубации исследуемого гидрогеля с дермальными фибробластами по сравнению с контрольной группой ($78,3 \pm 4,7$ нг/мл против $17,1 \pm 1,8$ нг/мл, $p < 0,05$).

Таким образом, полученный децеллюляризированный гидрогелевый материал можно признать биосовместимым, а рецеллюляризацию *in vitro* успешной, так как он соответствует общепринятым критериям тканевой инженерии: наличие минимальной токсичности; способность поддерживать прикрепление, миграцию и пролиферацию клеток за счет адгезии [Brown M. et al., 2022; Golebiowska A.A. et al., 2024].

7.4 Оценка местной токсичности децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи

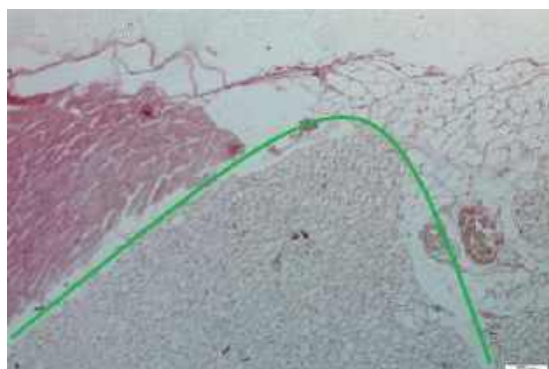
Оценка местной токсичности образцов показала, что уже на 3-и сутки в месте инъекции децеллюляризованного гидрогелевого материала на кожных покровах

и в подлежащих тканях не наблюдалось признаков воспаления (Рисунок 58).



А – внешняя оценка места инъекции, 1-е сутки; Б – внешняя оценка места инъекции, 3-и сутки; В – внешний вид тканей в месте инъекции, 3-и сутки
Рисунок 58 – Подкожная инъекция децеллюляризованного гидрогелевого материала лабораторным животными

При гистологическом анализе образцов на 3-и сутки не наблюдалось некроза тканей, выраженного воспалительного ответа и неоангиогенеза. Срезы биопсийного материала, взятые из места инъекции децеллюляризованного гидрогелевого материала характеризовались частичной биодеградацией, были незначительно пропитаны фибринозным экссудатом, что свидетельствует о возможности применения полученного гидрогелевого материала как основы для формирования соединительной ткани при поверхностных ранениях кожи (Рисунок 59).



Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 100$

Рисунок 59 – Гистологический анализ образцов в месте инъекции децеллюляризованного гидрогелевого материала на 3-и сутки (линией показана граница гидрогеля и окружающих тканей)

Таким образом, децеллюляризированный гидрогелевый материал показал отсутствие токсичности и хорошую биодegradацию и, в результате проведенного эксперимента, были получены образцы децеллюляризованного гидрогелевого материала, которые могут быть использованы для дальнейших исследований и также могут послужить основой для создания раневых покрытий при лечении раневых и ожоговых повреждений.

Резюме

Оптимальная методика получения коллагенсодержащего децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи основывается на обработке 5 % раствором гидроксида натрия в течение 20 часов при гидромодуле 1 : 5.

Содержание общего белка составило 19,3 г/л, концентрация коллагена – 10,3 г/л, гиалуроновая кислота и с-ГАГ были вымыты из децеллюляризованного гидрогелевого материала, количество ДНК в децеллюляризованном гидрогелевом материале составило 54,2 нг/мг. В результате эксперимента было показано, что исследуемый материал не был цитотоксичен (жизнеспособность дермальных фибробластов составила 96,27 %), обладал биосовместимостью, не усиливал метаболическую активность клеток, а также положительно влиял на миграционную способность клеток.

ГЛАВА 8 РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ГИДРОГЕЛЕВОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВЫХ РАН

Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения, ежегодно регистрируется около 300 000 летальных случаев в результате термических ожогов, что делает лечение таких ран острой социальной проблемой [Zamani S. et al., 2025]. На сегодняшний день в лечении ожоговых ран произошёл значительный прогресс, а способы обработки ран усовершенствованы, однако существующие методы лечения ожоговых ран требуют доработки с целью оптимизации процессов регенерации поражённых поверхностей [Ross J.A. et al., 2020; Harma V. et al., 2020; Diller R.V. et al., 2022].

Существует большое количество раневых покрытий, которые отличаются структурно-функциональными особенностями. Наибольший интерес вызывают биополимерные раневые покрытия благодаря их биосовместимости, биодеградации и сходству с внеклеточным матриксом тканей [Farokhi M. et al., 2018]. Кроме того, известно, что биополимеры способны стимулировать процессы заживления ран и участвовать в восстановлении повреждённых тканей и, следовательно, в регенерации кожи [Zamani S. et al., 2025].

Также стоит отметить, что в последнее время широко используются так называемые «влажные повязки», или гидрогели [Stern D. et al., 2019; Abilova G.K. et al., 2020; Vigata M. et al., 2020; Bermudez N.M. et al., 2024]. Влажная среда подавляет образование рубцов, обеспечивает эффективную миграцию кератиноцитов и реэпителизацию. Более того, гелеобразная структура способна восполнять объём поражённой ткани, оказывая тем самым косметический эффект. За последние несколько лет было создано большое количество новых биоразлагаемых гидрогелей для лечения ожоговых ран. Одним из перспективных материалов для их создания является коллаген, обладающий способностью к адгезии и организации в раневом ложе [Lin K. et al., 2018]. Кроме того, известно,

что молекулы коллагена в составе гидрогелей могут расщепляться ММП, имеющимися в раневом экссудате, и использоваться клетками в качестве альтернативного источника природного коллагена, необходимого для заживления ран. Стоит отметить, что биологически активные вещества ВКМ участвуют в процессах регенерации, что говорит о преимуществе поликомпонентных гидрогелей, наиболее полно отражающих состав ВКМ [Egorikhina M.N. et al., 2019]. Однако технологии получения таких биоматериалов достаточно трудоёмкие и дорогостоящие, что обуславливает поиск технологий создания поликомпонентных ранозаживляющих гидрогелей.

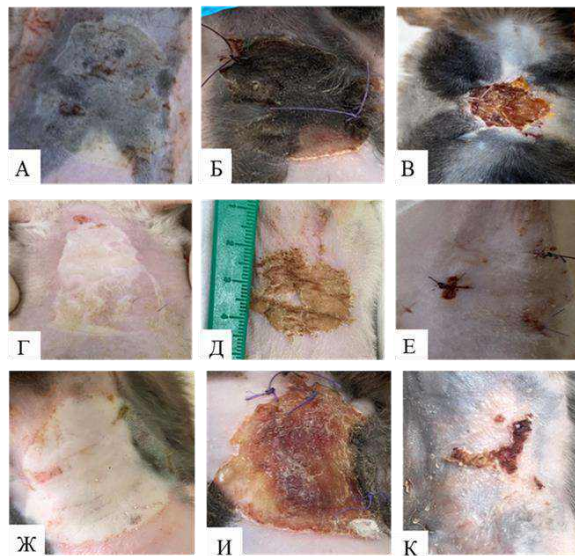
8.1 Оценка эффективности заживления ожоговых ран при экспериментальном применении децеллюляризованного гидрогелевого материала

Экспериментальное лечение с применением децеллюляризованного гидрогелевого материала было проведено на 60 половозрелых самцах крыс Сфинкс массой 160–200 г. Крысы были разделены на три группы: группа 1 – крысы без лечения, или контрольная группа ($n = 20$), группа 2 – крысы с лечением комбинированной противомикробной мазью «Левомеколь®» (диоксометилтетрагидропиримидин + хлорамфеникол) (ООО «НИЖФАРМ», Россия), или группа сравнения ($n = 20$), и группа 3 – крысы с лечением децеллюляризованным гидрогелевым материалом, или опытная группа ($n = 20$).

Результаты исследования децеллюляризованного гидрогелевого материала показали, что данный материал имеет достаточно высокий противовоспалительный потенциал по количественным данным ИГХ окрашивания на нейтрофилы и макрофаги в области заживления ожоговых ран (Таблица 13) и скорость заживления в сравнении с животными контрольной группы, так как на 9-е сутки исследования у крыс группы 2 не было отмечено визуальных признаков воспаления, некроза тканей или рубцевания (Рисунок 60).

Таблица 13 – Морфологический анализ заживления тканей в области ожоговых ран

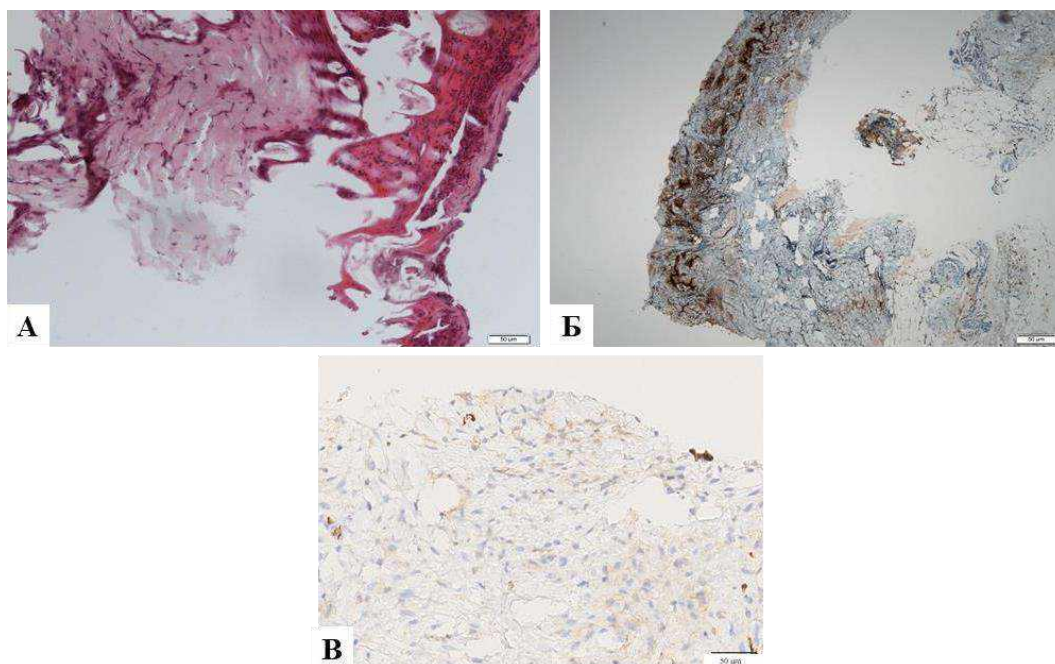
Группа/сутки	Контрольная группа группа 1	Группа сравнения группа 2	Опытная группа группа 3
CD16b (КПО, %, Ме [Q1; Q3])			
3-и сутки	28,3 [22,6; 31,4]	17,4 [15,6; 20,9]*	16,6 [14,4; 19,2]*
7-е сутки	2,1 [1,8; 2,6] ^	2,6 [2,5; 3,1] ^	3,0 [2,4; 3,6] ^
14-е сутки	0^	0^	0^
21-е сутки	0	0	0
CD68 (КПО, %, Ме [Q1; Q3])			
3-и сутки	15,9 [12,0; 19,4]	16,8 [13,8; 22,2]	11,3 [8,9; 15,0] **
7-е сутки	8,4 [6,6; 10,9] ^	5,1 [3,9; 7,7] ^	2,9 [1,1; 4,0] ^#
14-е сутки	3,4 [2,9; 3,9] ^	2,3 [2,0; 2,7] ^	1,1 [0,7; 1,6] **
21-е сутки	0^	0^	0^
Фибробластоподобные клетки (кол-во в поле зрения, Ме [Q1; Q3])			
3-и сутки	12,8 [8,2; 19,3]	10,5 [7,2; 13,4] ^	13,2 [10,3; 15,9]
7-е сутки	18,4 [16,6; 20,5] ^	28,2 [23,6; 40,1] ^*#	20,2 [13,5; 28,2] ^
14-е сутки	23,4 [22,9; 33,6]	38,2 [31,0; 43,2] ^*#	28,2 [21,3; 33,3]
21-е сутки	36,9 [32,2; 39,4] ^	36,5 [30,5; 45,3]	38,0 [30,3; 44,0] ^
Примечание: * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы, # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения, ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе.			



А, Б, В – контрольная группа; Г, Д, Е – опытная группа; Ж, И, К – группа сравнения; А, Г, Ж – день операции; Б, Д, И – 3 день эксперимента; В, Е, К – 9 день эксперимента

Рисунок 60 – Внешний вид животных после нанесения ожоговой раны

На третьи сутки после нанесения ожоговой раны в образцах кожи крыс, не получавших раневого покрытия, обнаруживались признаки острого воспаления и выраженного гистолиза. В тканях наблюдали большое количество нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов, на поверхности присутствовал фибринозно-гнойный экссудат (Таблица 13, Рисунок 61).

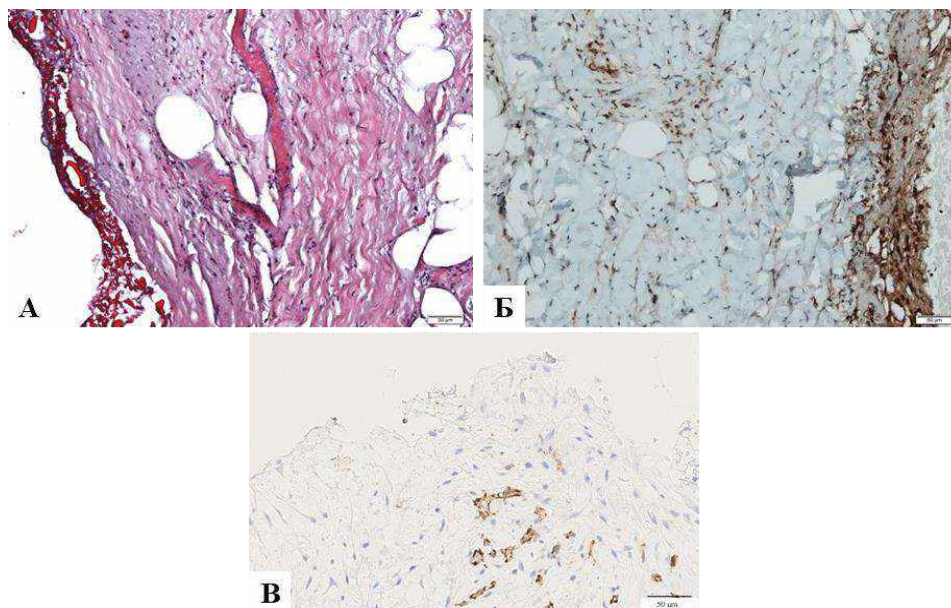


А – выраженная воспалительная инфильтрация дермы, на поверхности толстый слой фибринозно-гнойного экссудата, гематоксилин-эозин; Б – CD16b-позитивные клетки; В – CD68-позитивные клетки;

А – гематоксилин-эозин; Ув. $\times 200$; Б, В – ИГХ реакция. Ув. $\times 200$

Рисунок 61 – Гистологическая картина ожоговой раны без лечения на 3-и сутки

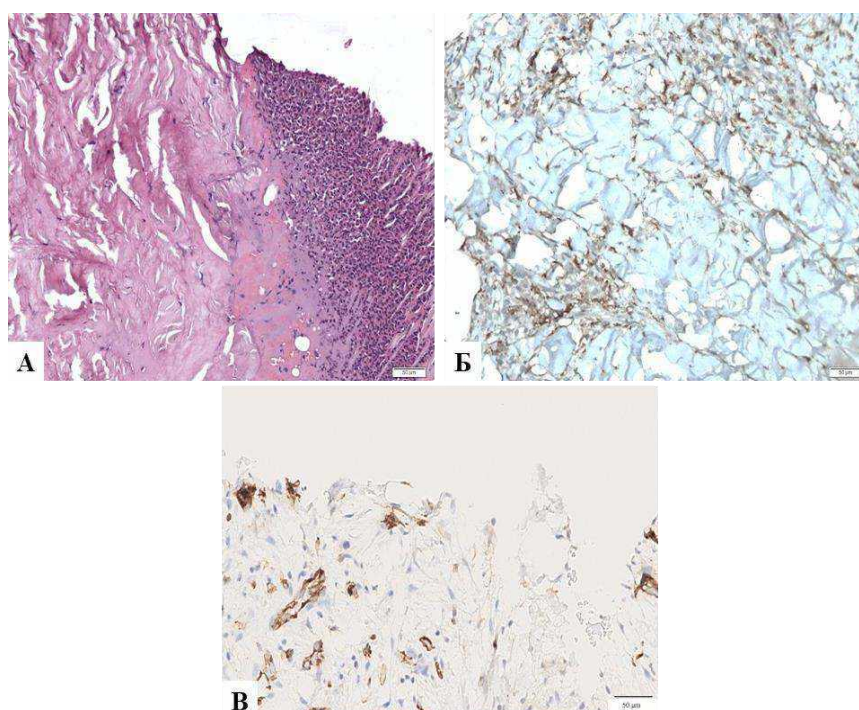
В препаратах животных, у которых в качестве раневого покрытия использовали мазь «Левомеколь», на 3-и сутки были обнаружены умеренно выраженные воспалительные явления, полнокровие сосудов, а также диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация нейтрофилами. Некротические и дистрофические изменения были выражены умеренно (Рисунок 62). В образцах ран, покрытых децеллюляризированным гидрогелевым материалом, на третьи сутки отмечалось умеренно выраженное диффузное воспаление, незначительные некротические и дистрофические изменения и полнокровие сосудов (Рисунок 63).



А – раневое покрытие пропитано фибринозно-гнойным отделяемым, сосуды полнокровны, в дерме – мелкие очаги инфильтрации; Б – CD16b-позитивные клетки; В – CD68-позитивные клетки; А – гематоксилин-эозин; Б, В – ИГХ

Рисунок 62 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой мазью

«Левомеколь», на 3-и сутки. Ув. $\times 200$



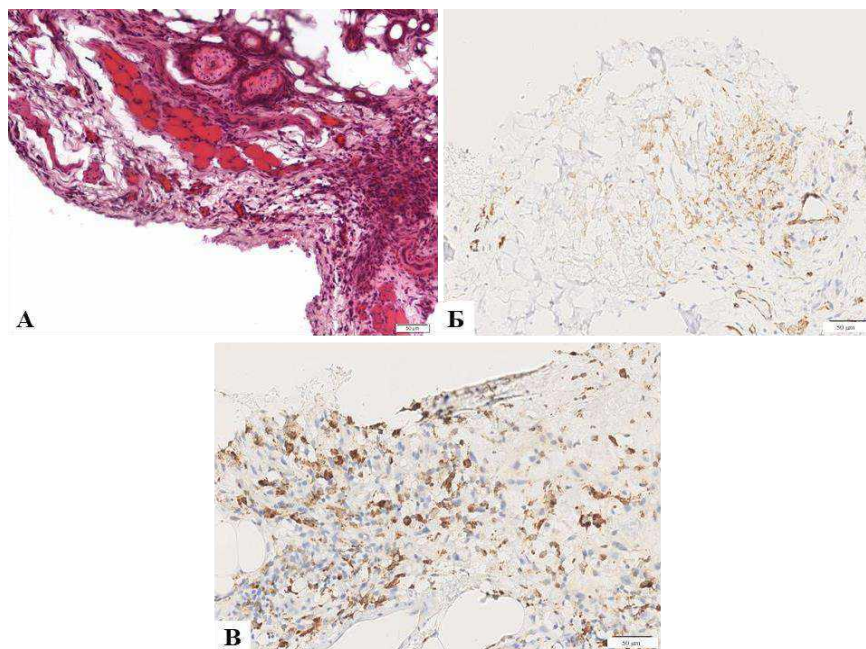
А – раневое покрытие пропитано гнойным экссудатом, мелкие очаги воспалительной инфильтрации в подлежащих слоях, гематоксилин-эозин;

Б – CD16b-позитивные клетки, ИГХ; В – CD68-позитивные клетки, ИГХ

Рисунок 63 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой децеллюляризированным гидрогелевым материалом, на 3-и сутки. Ув. $\times 200$

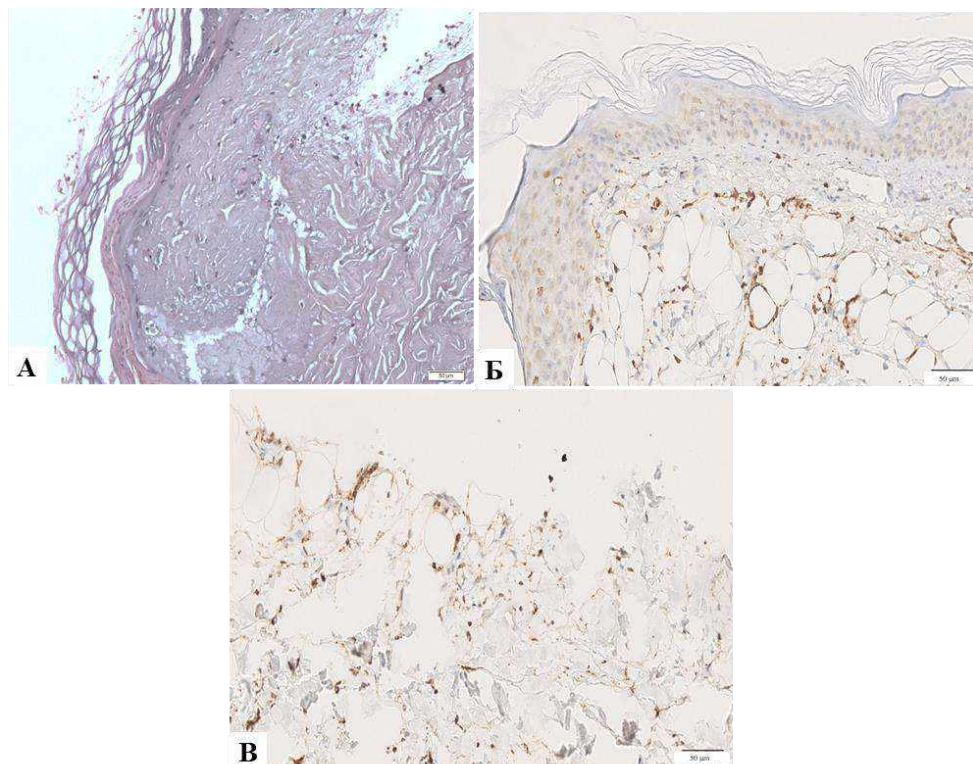
Патологоанатомический анализ биоптатов, полученных на седьмые сутки от не имевших раневого покрытия животных, показал умеренно выраженное слабо выраженное воспаление с незначительной макрофагальной инфильтрацией, а также активные процессы репаративной регенерации – формирование грануляционной ткани и мелкие гнёзда пролиферирующего эпидермиса, дающего положительную реакцию на эпидермальный цитокератин (Рисунок 64).

Образцы от животных, в те же сроки получавших лечение препаратом сравнения, демонстрируют слабо выраженное воспаление с небольшими очагами лимфомакрофагальной инфильтрации, выраженный отёк коллагеновых волокон и незначительное полнокровие капилляров в грануляционной ткани. Пролиферирующий эпидермис в данном случае формирует тонкий однородный пласт (Рисунок 65).



А – грануляционная ткань с многочисленными полнокровными сосудами и выраженным клеточным компонентом, небольшие скопления клеток многослойного эпителия, гематоксилин-эозин; Б – CD16b-позитивные клетки, ИГХ; В – CD68-позитивные клетки, ИГХ

Рисунок 64 – Гистология ожоговой раны без лечения на 7-е сутки. Ув. ×200

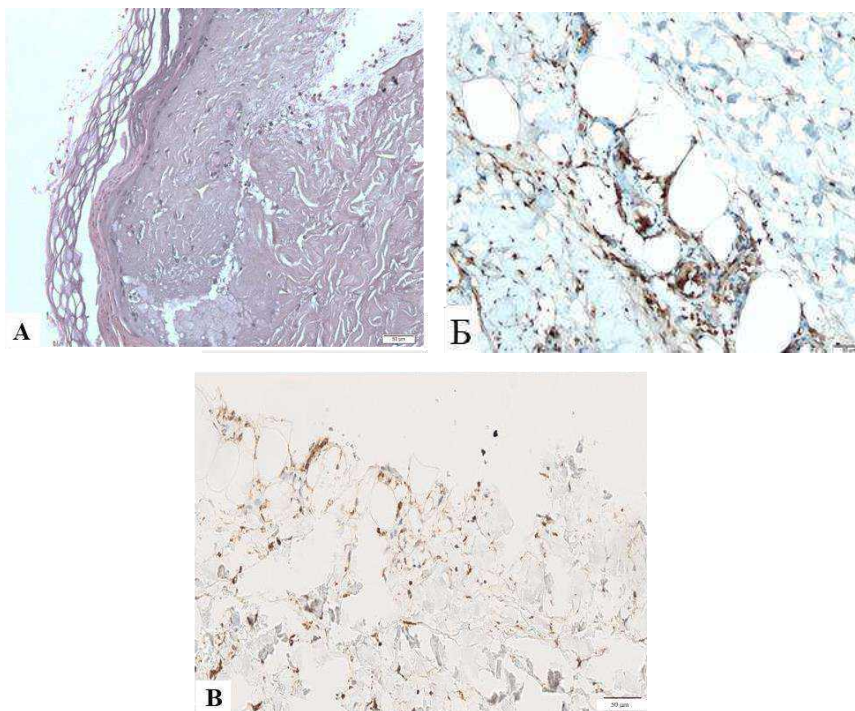


А – отёк коллагеновых волокон, слабо выраженная воспалительная инфильтрация, полнокровие капилляров, формирование эпидермального пласта на поверхности раны, гематоксилин-эозин; Б – CD16b-позитивные клетки, ИГХ;
 В – CD68-позитивные клетки, ИГХ

Рисунок 65 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой мазью «Левомеколь», на 7-е сутки. Ув. $\times 200$

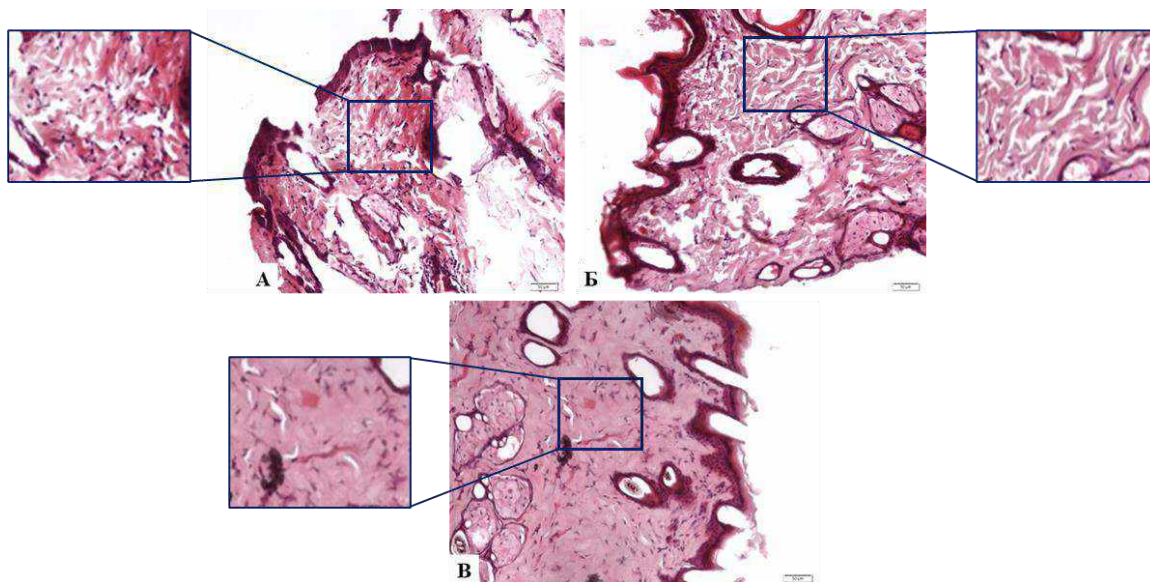
На седьмые сутки эксперимента в препаратах животных, ожоговая рана которых была покрыта децеллюляризированным гидрогелевым материалом, наблюдалось слабо выраженное воспаление, при котором лейкоциты формировали мелкие скопления (Рисунок 66). На 14-е сутки после нанесения ожоговой раны в образцах всех трёх групп животных наблюдались статистически незначимые различия в количественном составе резидуальных воспалительных клеток в дерме (по данным ИГХ), а также в плотности микроциркуляторного русла и толщине эпидермального пласта.

Гистологическая картина на 14-е сутки показывает, что в группе сравнения и контрольной группе по сравнению с опытной группой более рыхлый внеклеточный матрикс дермы с воспалительными клетками и меньшим количеством фибробластов (Рисунок 67).



А – немногочисленные лейкоциты в дерме, формирование эпидермального пласта на поверхности раны, гематоксилин-эозин; Б – CD16b-позитивные клетки, ИГХ;
В – CD68-позитивные клетки, ИГХ

Рисунок 66 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой децеллюляризированным гидрогелевым материалом, на 7-е сутки. Ув. $\times 200$



А – контрольная группа, без лечения; Б – группа сравнения, мазь «Левомеколь»;
В – опытная группа, децеллюляризированный гидрогелевый материал;
квадратами указаны области внеклеточного матрикса дермы

Рисунок 67 – Гистологическая картина ожоговых ран на 14-е сутки.

Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$

Макроскопический визуальный результат репаративной регенерации на 14-е сутки после нанесения раны в группах с лечением животных был морфологически неотличим друг от друга вне зависимости от используемого экспериментального лечения.

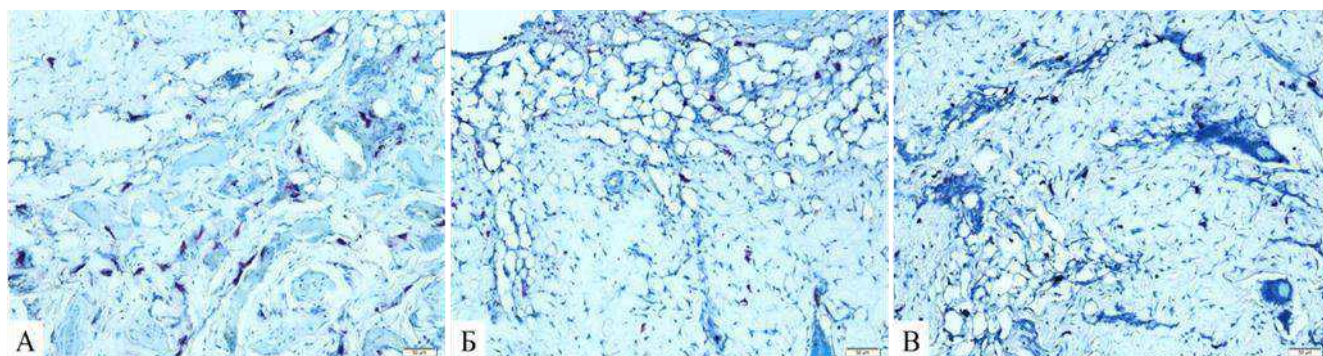
Особенности заживления ожоговой раны под разными покрытиями на более ранних этапах, позволяют сделать вывод о том, что применение децеллюляризованного гидрогелевого материала было наиболее эффективно по сравнению с применением мази «Левомеколь», так как в образцах, покрытых децеллюляризованным гидрогелевым материалом уже на 9-е сутки происходило открепление струпа, на 7-е сутки затухало воспаление и были минимально выражены некробиотические изменения, что привело к формированию относительно более плотного соединительнотканного матрикса дермы на 14 сутки после нанесения ожога.

При восстановлении кожи тучные клетки способны выделять различные медиаторы, протеазы, цитокины и факторы роста, что ведет к подавлению активного воспаления и переходу процесса в стадию пролиферации за счет усиления ангиогенеза и привлечения фибробластов. При заживлении ран наблюдается постепенная дегрануляция тучных клеток с выделением биологически активных веществ [Черданцева Т.М. и соавт., 2022]. Поэтому для оценки влияния децеллюляризованного гидрогелевого материала на процесс восстановления кожных покровов были исследованы морфофункциональные особенности тучных клеток в раневом ожоговом регенерате у крыс трех экспериментальных групп (Таблица 14, Рисунок 68).

Таблица 14 – Степень дегрануляции и количество тучных клеток в образцах тканей экспериментальных групп

Группа	Контрольная группа		Опытная группа		Группа сравнения	
	СД, %	ТК, шт	СД, %	ТК, шт	СД, %	ТК, шт
3-е сутки	69,7 ± 26,8	7,2 ± 0,6	38,7 ± 18,5*	5,8 ± 0,8*#	45,7 ± 9,6*	6,2 ± 0,3
7-е сутки	48,2 ± 24,6 [^]	6,7 ± 0,3	17,7 ± 5,5*# [^]	3,2 ± 0,9*# [^]	28,7 ± 3,3* [^]	5,7 ± 0,6
14-е сутки	26,8 ± 13,3 [^]	4,8 ± 1,1 [^]	12,7 ± 8,5*#	3,5 ± 0,6*#	20,7 ± 4,8	4,5 ± 0,8 [^]

Примечание: СД – степень дегрануляции; ТК – тучные клетки: * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы, # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения, [^] – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе.



А – контрольная группа, без лечения; Б – группа сравнения, мазь «Левомеколь»;

В – опытная группа, децеллюляризированный гидрогелевый материал.

Толуидиновый синий. Ув. ×200

Рисунок 68 – Тучные клетки в образцах тканей экспериментальных групп на 7-е сутки

Исследование показало, что во всех исследуемых группах наблюдалось уменьшение числа тучных клеток при одновременном снижении степени их дегрануляции на 7-е и 14-е сутки. При этом при обработке ожоговых ран децеллюляризированным гидрогелевым материалом к 7-м суткам экспериментального лечения степень дегрануляции снизилась на 63,2 % и 38,3 % относительно контрольной группы и группы сравнения соответственно ($p < 0,05$).

Известно, что при использовании коллагенсодержащих раневых покрытий коллаген способен обратимо связывать факторы роста, защищая их от протеолиза

[Черданцева Т.М. и соавт., 2022], с этим фактом возможно связать уменьшение функциональной активности тучных клеток в опытной группе в результате лечения децеллюляризированным гидрогелевым материалом.

Проведение ИГХ анализа позволило выявить—особенности динамики восстановления компонентов ВКМ кожи в различных группах (Таблица 15).

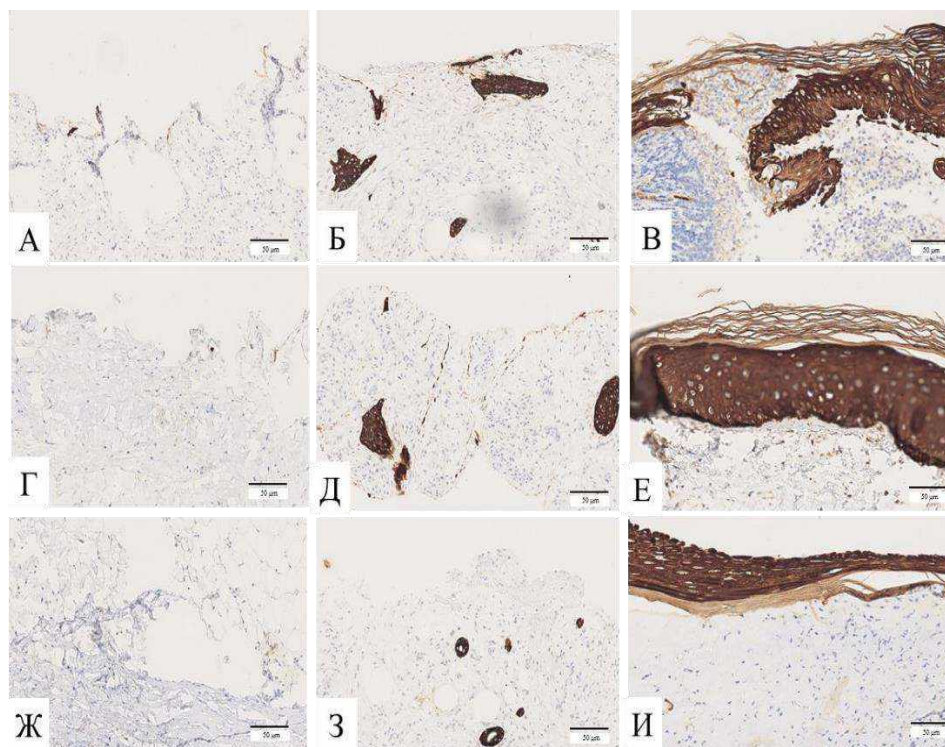
Таблица 15 – Динамика восстановления компонентов ВКМ кожи в образцах тканей экспериментальных групп

Группа	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Коллаген I типа, КПО, %			
Контрольная группа	15,2 ± 2,2	28,0 ± 2,4 [^]	45,5 ± 3,1 [^]
Опытная группа	13,4 ± 1,9	24,9 ± 2,4 [^]	36,2 ± 2,4*# [^]
Группа сравнения	14,1 ± 1,5	26,7 ± 1,8 [^]	41,7 ± 1,1* [^]
Коллаген IV типа, КПО, %			
Контрольная группа	0	3,2 ± 0,2 [^]	4,3 ± 1,5 [^]
Опытная группа	0	3,8 ± 0,8* [^]	4,5 ± 0,9 [^]
Группа сравнения	0	2,8 ± 1,2 [^]	3,9 ± 0,6 [^]
Фибронектин, КПО, %			
Контрольная группа	0,5 ± 0,03	2,5 ± 0,04 [^]	5,2 ± 0,5 [^]
Опытная группа	0,3 ± 0,01	2,8 ± 0,03* [^]	4,8 ± 1,2 [^]
Группа сравнения	0,4 ± 0,01	2,6 ± 1,1 [^]	5,0 ± 0,8 [^]
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы, # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения, [^] – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе.			

В восстановлении основного белка ВКМ – коллагена I типа наблюдалась положительная динамика во всех исследуемых группах, при этом на 14-е сутки в опытной группе КПО был ниже, чем в контрольной группе и группе сравнения, что может негативно влиять на биомеханические свойства кожи, но также способствовать ингибированию образования келоидных рубцов в области нанесения раны. Оценка содержания нефибриллярного белка базальных мембран коллагена IV типа показала, что во всех группах произошло восстановление данного параметра до нормальных значений. Следует отметить сходную картину в

увеличении КПО фибронектина во всех группах, который является адгезионным белком к коллагенам ВКМ и эпителиальными клетками.

В группе без лечения к 7-м суткам на фоне стихающего воспаления отмечалась регенерация эпидермиса в виде мелких кластеров, дающих положительную реакцию с антителами к эпидермальному цитокератину (Рисунок 69).



А–В – образцы из области раны на 3-е, 7-е, 14-е сутки в контрольной группе; Г–Е – образцы из области раны на 3-е, 7-е, 14-е сутки в опытной группе (лечение децеллюляризированным гидрогелевым материалом); Ж–И – образцы из области раны на 3-е, 7-е, 14-е сутки в группе сравнения. ИГХ реакция. Ув. ×200

Рисунок 69 – Динамика содержания цитокератина после нанесения ожоговой раны у экспериментальных животных

В группе лечения децеллюляризированным гидрогелевым материалом эпидермис также формировал ровный однородный пласт, дающий хороший сигнал с антителами к эпидермальному цитокератину. К этому же сроку в группе сравнения пролиферирующий эпителий формировал сплошные пласты на поверхности раны с незначительными явлениями паракератоза.

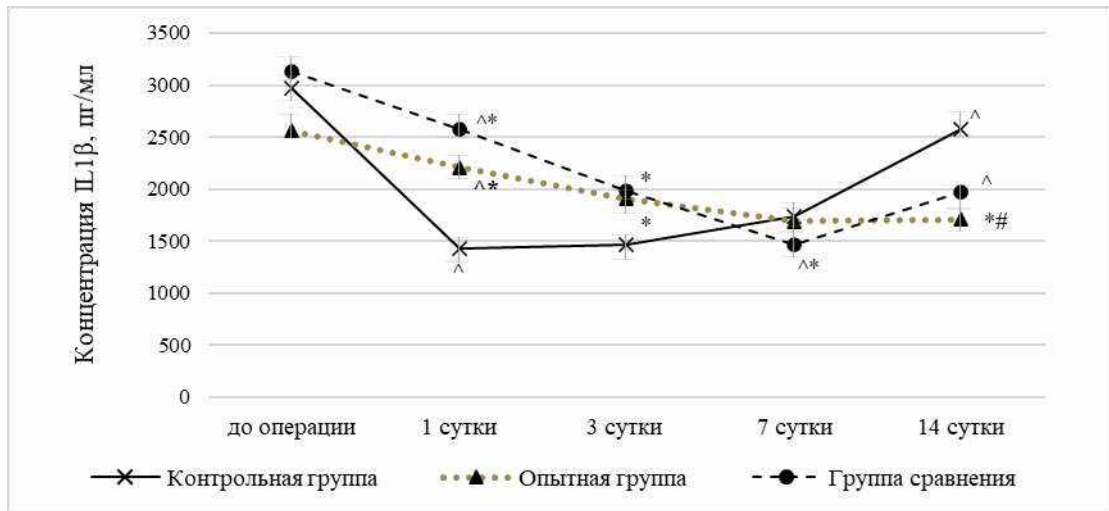
Особенностью опытной группы была ранняя эпителизация по сравнению с

контрольной группой, т.к. КПО цитокератина на 7-й день после лечения был выше (1,4 [1,3; 1,6] против 0,7 [0,4; 1,2]; $p < 0,05$), однако к 14-м суткам количество цитокератина в образцах кожи крыс сравниваемых групп не отличалось (6,0 [5,1; 7,0] против 7,2 [6,8; 7,7]; $p > 0,05$).

Таким образом, благодаря своим биоактивным свойствам, децеллюляризированный гидрогелевый материал способствовал ускоренному заживлению ожоговых ран, что коррелирует с данными исследователей при изучении коллагенсодержащих ранозаживляющих покрытий. Простота и низкая себестоимость технологии получения децеллюляризированного гидрогелевого материала делают его потенциально перспективным и конкурентоспособным отечественным биологическим материалом для заживления ран.

8.2 Динамика изменения содержания про- и противовоспалительных факторов в сыворотке при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс

Одним из основных медиаторов воспаления, вырабатываемых инфильтрирующими фагоцитами и резидентными клетками, способствующим дальнейшему хемотаксису и активации других элементов воспаления в области раны, является IL1. В ходе сравнительного анализа уровней провоспалительного цитокина IL1 β было выявлено, что после нанесения ожоговой раны значение данного параметра было выше в экспериментальных группах относительно контрольной группы (Рисунок 70). Через три дня лечения в опытной группе и группе сравнения наблюдалось снижение уровня данного цитокина по отношению к предыдущему сроку исследования ($p > 0,05$), при этом не были достигнуты значения контрольной группы, которые также были ниже, чем данные показатели до эксперимента (Таблица 16).



* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 70 – Уровни IL1β при лечении ожоговых ран крыс в динамике

Таблица 16 – Значения концентраций про- и противовоспалительных цитокинов в динамике при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс (Me [Q₁; Q₃])

Сроки	До операции	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки
IL1β, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	2976 [2967; 3000,5]	1435 [^] [1428,75; 1498,25]	1467 [1450,75; 1491,5]	1733 [1708; 1750,5]	2577 [^] [2569,05; 2626]
Опытная группа (n = 20)	2559 [2552,5; 2601,75]	2210,5 ^{^*} [2200,75; 2226,25]	1909 [*] [1895; 1924,25]	1696 [1690; 1755,75]	1709 ^{*#} [1695,75; 1739,25]
Группа сравнения (n = 20)	3137 [3126,75; 3157,25]	2581,1 ^{^*} [2574,75; 2592]	1998 [*] [1981,5; 2046,75]	1468 ^{^*} [1464,5; 1504]	1973 [^] [1962; 2012,25]
IL6, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	1312 [1288,5; 1320,75]	1346 [1318,75; 1355,75]	1022,6 [1000,5; 1044,5]	873,55 [858,25; 888,75]	594 [586,75; 601,75]

Опытная группа (n = 20)	458* [449,75; 475,25]	530* [526,75; 545,25]	961 ^ [942,75; 970,75]	1185 ^* [1159,25; 1197,25]	973^* [960; 981]
Группа сравнения (n = 20)	403,25 [382,5; 431]	378 [362,25; 398,75]	988 ^ [978; 1002,25]	1162,35 ^* [1154; 1171,5]	756,2^* [740,25; 770,25]
IL8, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	52,0 [40,5; 67,1]	255,7^ [229,0; 283,5]	0,0^ [0,0; 0,0]	47,0 [29,5; 69,0]	60,7 [35,8; 84,0]
Опытная группа (n = 20)	27 [14,5; 31]	12^* [6,75; 17]	0,0^ [0,0; 0,0]	0,0*# [0,0; 0,0]	74 ^ [47,5; 96,25]
Группа сравнения (n = 20)	10 [6; 13]	15* [9,75; 16]	0,0^ [0,0; 0,0]	65^* [57,5; 77,75]	60 [53,75; 71,5]
TNFα, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	38 [29,5; 49]	36 [16,5; 44,5]	9^ [6,5; 11,25]	33 [27; 40,5]	9^ [6,25; 10]
Опытная группа (n = 20)	12 [8,5; 13]	31^* [19,5; 45,25]	32*# [28,75; 40]	10^*# [7,5; 10,25]	40^*# [39,75; 41]
Группа сравнения (n = 20)	35 [32; 42]	111* [104; 124,75]	9^ [5,75; 10,25]	208^* [206; 217,5]	185^* [177,25; 192]
IL4, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	100 [95; 112,75]	492^ [474,75; 501]	222,5^ [212,75; 236,5]	216,5 [197,5; 221,75]	206,5 [202,2; 211,5]
Опытная группа (n = 20)	102 [95; 114,25]	156,5* [141,5; 166]	524,5^*# [519; 531,25]	406,4^* [397,25; 412]	191,2^ [187,1; 201,4]

Группа сравнения (n = 20)	131 [121,25; 138,75]	135* [120,75; 143,5]	184,5 ^{^*} [177,5; 198,25]	421 ^{^*} [411; 429,25]	187,2 ^{^*} [186; 201,25]
IL10, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	2317 [2231; 2393,25]	667 [^] [584,75; 686]	1041,5 [942,25; 1105,75]	875 [783; 970,5]	696,5 [700; 709,5]
Опытная группа (n = 20)	1717,5 [1599; 1751,5]	246,5 ^{^*} [138,25; 344,5]	798 [^] [666,25; 857,75]	1151,5 ^{^*#} [1071,75; 1219,25]	1928 ^{^*#} [1930; 1944]
Группа сравнения (n = 20)	1314 [1217,75; 1359,75]	253,2 ^{^*} [176; 327,75]	605,5 [^] [541,5; 698,75]	2203,8 ^{^*} [2101,75; 2244,5]	992,5 ^{^*} [985; 992,8]
Примечание: [^] – p < 0,05, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе; * – p < 0,05, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – p < 0,05, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения.					

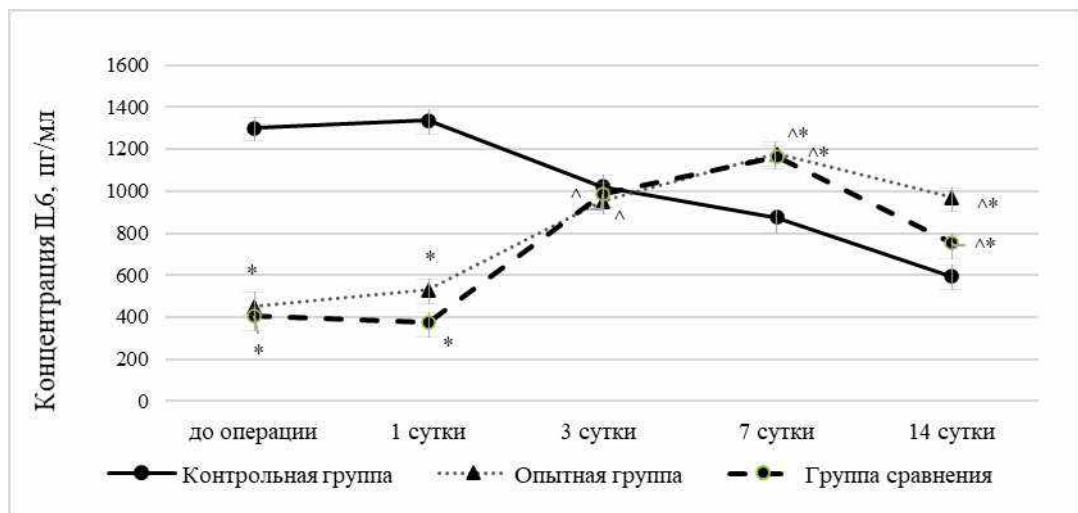
Необходимо отметить, что уровень IL1 β с 1-ых по 3-и сутки в контрольной группе был ниже по отношению к группам с лечением децеллюляризированным гидрогелевым материалом и мазью «Левомеколь». Высокие уровни IL1 β в группах животных с лечением могут быть обусловлены распознаванием компонентов ВКМ или гидрофобной мазевой основы (подсолнечное масло и вазелин) как аларминов, что вызывает аутокринную гиперпродукцию локально IL1 α , а затем системно IL1 β [G. Cavalli et al., 2021]. К 7-м суткам относительные показатели IL1 α в опытной группе не отличались от контрольной группы (p > 0,05), а к 14-ым суткам были ниже (p < 0,05), что может говорить об отсроченном и пролонгированном противовоспалительном действии гидролизатов коллагена и компонентов ВКМ, являющихся основой децеллюляризированного гидрогелевого материала, так как после прекращения лечения на 14-е сутки эксперимента не наблюдалось повышения уровня IL1 β по отношению к группе сравнения и контроля.

Следующим провоспалительным цитокином, для которого был проведён

сравнительный анализ динамики в ходе эксперимента, был IL6 (Рисунок 71). Известно, что при повреждении тканей в ранние сроки индуцируется синтез IL6, которые способствует активации острофазовых иммунных реакций, кроме того, известно, что IL-6 способствует пролиферации кератиноцитов и образованию коллагена в дермальных фибробластах [Т. Tanaka et al., 2014]. В ходе исследования были выявлены значительные повышения уровней данного цитокина на 3-и – 7-е сутки эксперимента в опытной группе и группе сравнения относительно предыдущих сроков эксперимента ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно), при этом на 1-е сутки по отношению наблюдались более низкие концентрации IL6 в группе животных подвергавшихся лечению, чем в контрольной группе.

Характер изменения концентраций IL6 может быть обусловлен его хемотаксическими свойствами по отношению к нейтрофилам на ранних сроках репарации и к макрофагам на более поздних стадиях заживления ожоговой раны.

При сравнении групп с лечением децеллюляризированным гидрогелевым материалом, а также в группе сравнения не было выявлено значимой разницы на всех сроках эксперимента у крыс.

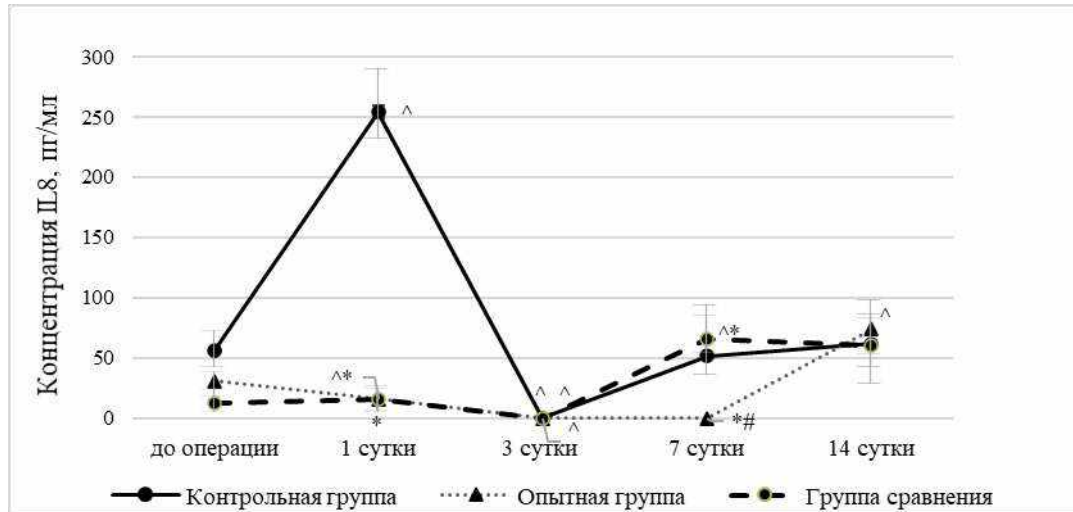


* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 71 – Динамика уровней IL6 при лечении ожоговых ран крыс

Типичный провоспалительный цитокин и хемоаттрактант для первых

участников воспалительного процесса – нейтрофилов – IL8 значительно повышался на 1-е сутки после нанесения экспериментальной раны только в контрольной группе (Рисунок 72). Внесение традиционной и экспериментальной лечебной терапии оказало значимое влияние на уровень данного цитокина в течение 1-х суток репарационного процесса.



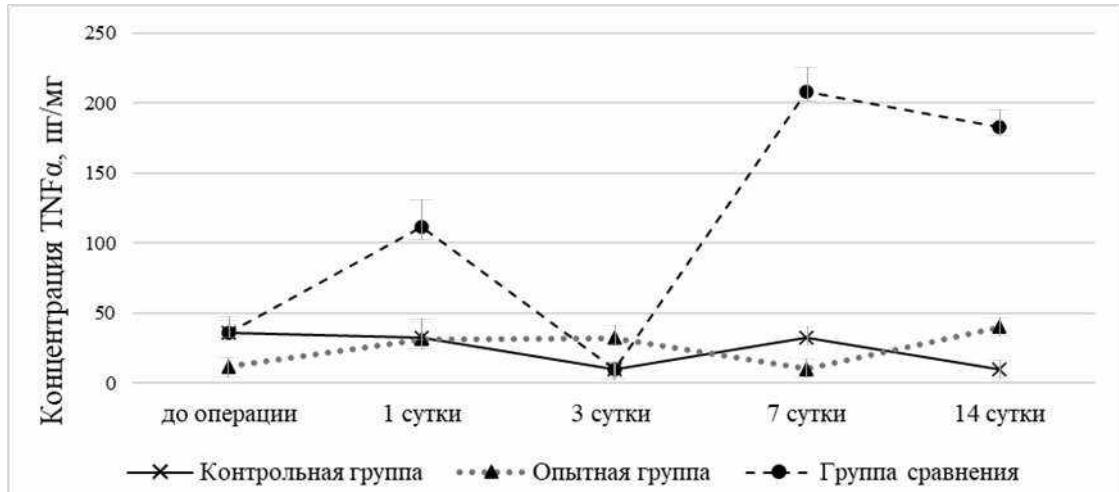
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 72 – Динамика уровней IL8 при лечении ожоговых ран крыс

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о разнице во влиянии децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе гидролизатов коллагена на поздние сроки заживления, так как динамика изменения уровня IL8 в группе сравнения значимо отличалась по отношению к опытной группе на 7-е сутки после нанесения ожоговой раны. Таким образом, внесение компонентов ВКМ способствовало негативной регуляции в отношении роста концентрации хемоаттрактанта IL8 на более поздних сроках заживления и обеспечивало затухание воспаления.

TNF α регулирует активность фибробластов, эндотелиальных клеток сосудов и кератиноцитов, а также синтез белков внеклеточного матрикса и ММП, которые принимают непосредственное участие в заживлении поврежденных тканей. Анализ данных, полученных при определении содержания TNF α , показал, что профили

данного провоспалительного фактора в группах с лечением мазью «Левомеколь» и децеллюляризированным гидрогелевым материалом значительно отличались по отношению к контрольной группе, а также отличались друг от друга, что и демонстрируют способность вносимых препаратов влиять на регуляцию воспалительного ответа, тем самым оптимизируя сроки эпителизации (Рисунок 73).



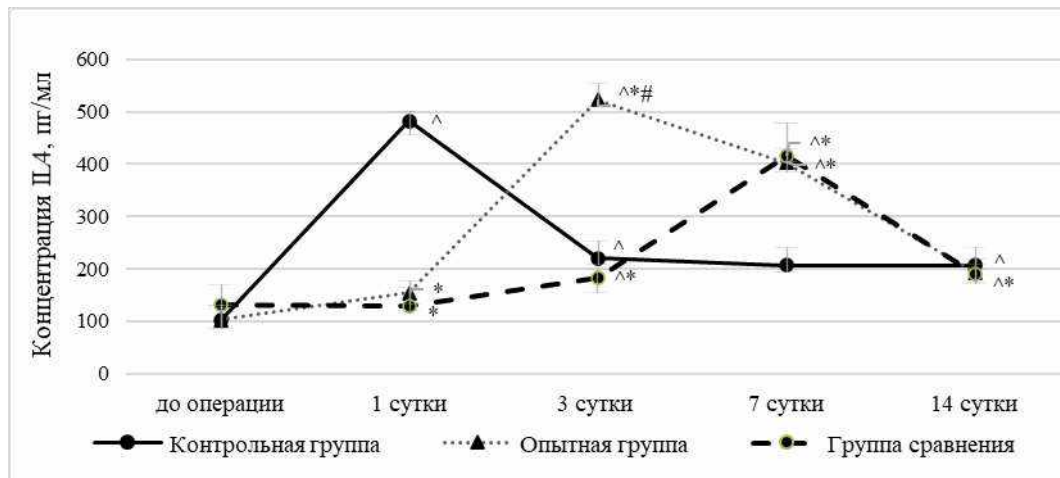
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 73 – Динамика уровней TNF α при лечении ожоговых ран крыс

В группе сравнения уровень TNF α отличался резкими колебаниями, что могло оказать влияние на увеличение сроков формирования всех слоев эпителия, при этом на 1-е сутки после нанесения ожоговой раны относительное содержание TNF α в сыворотке крови животных этой группы было выше по отношению к контрольной группе. В опытной группе на 7-е сутки наблюдалось снижение концентрации TNF α в отличие от предыдущего срока исследования и контрольной группы ($p < 0,05$), а также его повышение к 14-му дню эксперимента. Общая динамика данного цитокина свидетельствует о том, что лечение биополимерами ингибирует синтез TNF α , снижает интенсивность воспалительного процесса, так как его значения в группе сравнения были значительно выше, выявленная тенденция также может иметь регуляторное значение.

Следующим этапом исследования была сравнительная оценка уровней

противовоспалительных цитокинов на различных сроках экспериментального лечения ожоговой раны. Для изучения процесса восстановления кожи необходимо учитывать вклад типичного противовоспалительного цитокина IL4, т.к. изменения его уровня влияют как на ранние, так и на поздние стадии восстановления. Изменение уровней противовоспалительного фактора IL4 продемонстрировало его положительное влияние на динамику заживления раны, так как он был значительно выше с 3-их по 7-е сутки эксперимента, чем в контрольной группе, а затем к 14-м суткам не отличался от группы крыс, не получавших лечения (Рисунок 74).



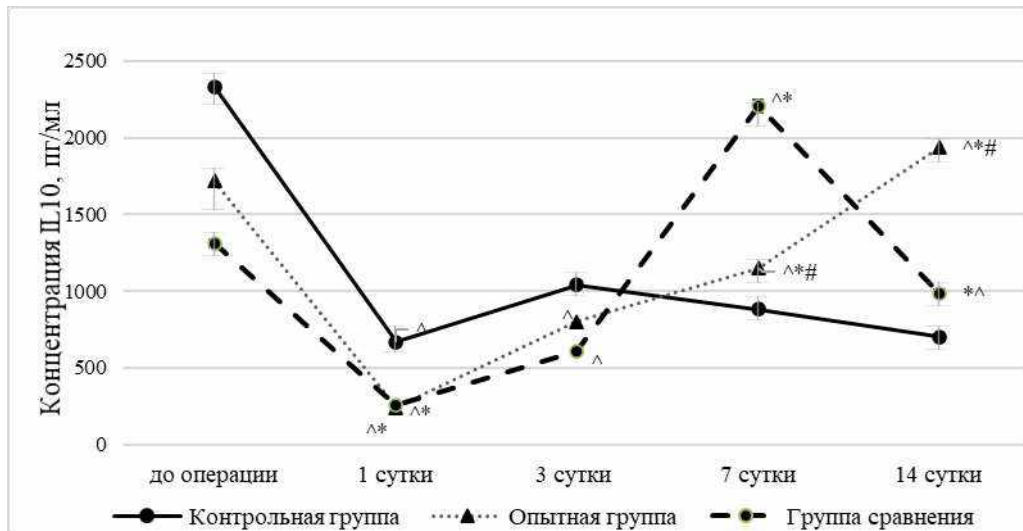
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 74 – Динамика уровней IL4 при лечении ожоговых ран крыс

В группе сравнения наблюдалось самое позднее повышение уровня IL4, он был значимо выше контрольной группы только на 7-е сутки эксперимента. На стадии ремоделирования и активного коллагеногенеза (вторая неделя после нанесения раны) IL4 активно синтезировался в опытной группе, но к 14-ым суткам его концентрация снизилась почти до исходных значений. Внесение децеллюляризованного гидрогелевого материала позволило значимо улучшить количество синтеза IL4 на 3-и сутки, но не способствовало процессам заживления на 14-е сутки, так как наблюдалась отрицательная динамика изменения его концентрации, как и в группе сравнения, при этом значения не отличались от

контрольной группы на 14-е сутки эксперимента.

Основным противовоспалительным маркером для сравнительной оценки процессов заживления ожоговой раны был IL10. Анализ полученных данных о концентрациях IL10 показал, что группа лечения децеллюляризированным гидрогелевым материалом и группа лечения мазью «Левомеколь» не имели значимых различий на 1-е и 3-и сутки исследования (Рисунок 75).



* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 75 – Динамика уровней IL10 при лечении ожоговых ран крыс

В группе без лечения не наблюдалось пиков повышения уровня данного цитокина на 7-е сутки в отличие от группы сравнения ($p < 0,05$) и опытной группы ($p < 0,05$), что может быть обусловлено участием противовоспалительных макрофагов на данном этапе заживления ожоговой раны, на которые препараты оказывают положительное влияние. В группе сравнения, так же, как и в опытной, было значительное повышение уровня IL10 на 7-е и 14-е сутки по сравнению с первым днем лечения. При лечении децеллюляризированным гидрогелевым материалом наблюдалось сначала снижение концентрации IL10, затем к 7-м суткам её увеличение.

Таким образом, в ходе сравнительного анализа уровней про- и противовоспалительных цитокинов были показаны различные эффекты

компонентов децеллюляризованного гидрогелевого материала. Внесение экзогенных биологических компонентов ВКМ и его гидролизатов, как и мази «Левомеколь», оказало стимулирующее влияние на синтез IL1 β и IL6 на ранних сроках заживления ожоговой раны, но ингибировали накопление в крови провоспалительного IL8, что может быть обусловлено способностью исследуемых препаратов регулировать деятельность нейтрофилов, но не макрофагов. Разнонаправленные эффекты с группой сравнения были обнаружены в отношении TNF α , противовоспалительных IL4 и IL10, что, вероятно, связано с природой вносимых компонентов препаратов, в частности, децеллюляризованный гидрогелевый материал вызывал более раннее образование IL4 и более длительное выделение IL10, что приводило к сокращению сроков успешной эпителизации и заживления раны.

8.3 Динамика изменения содержания факторов роста в сыворотке при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс

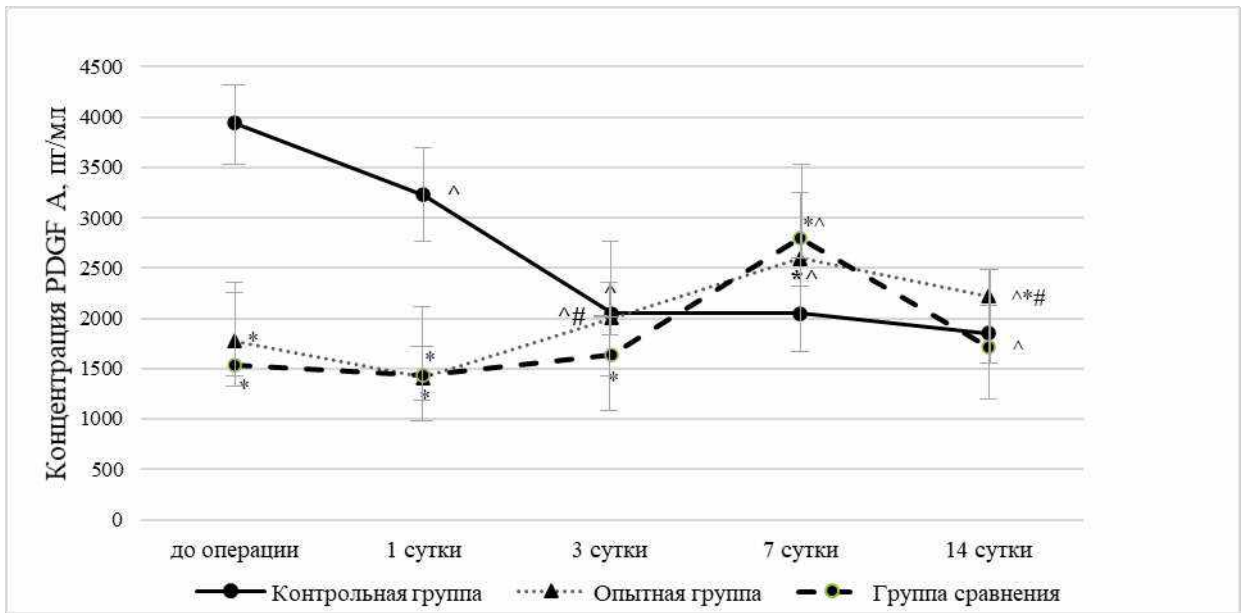
В области повреждения важную роль играют факторы роста, такие как PDGF A, TGF β 1, IGF и VEGF A, которые взаимодействуют с эндотелиальными клетками, нейтрофильными гранулоцитами, дендритными клетками, В- и Т-клетками и естественными клетками-киллерами, способствуя обнаружению патогенов, захвату и модуляции врожденных и адаптивных иммунных механизмов, а также непосредственно участвуя в процессах эпителизации, коллагено- и неоангиогенеза [Cañedo-Dorantes L., 2019].

PDGF активируют многие клеточные процессы во время воспаления и репарации, включая рекрутирование воспалительных клеток, пролиферацию и миграцию фибробластов, интраэпителиальное отложение коллагена и образование грануляционной ткани [Jian K. et al., 2022].

При проведении сравнительного анализа изменения уровня PDGF A было выявлено, что под действием провоспалительных цитокинов его концентрация в

контрольной группе снижалась на 1-е и 3-е сутки эксперимента (Рисунок 76).

Напротив, начиная с третьих суток после нанесения раны, происходил рост уровня PDGF в группах с экспериментальным лечением, что, по-видимому, обусловлено началом процессов фибринолиза, коллагеногенеза и неоангиогенеза под действием децеллюляризованного гидрогелевого материала и мази «Левомеколь».



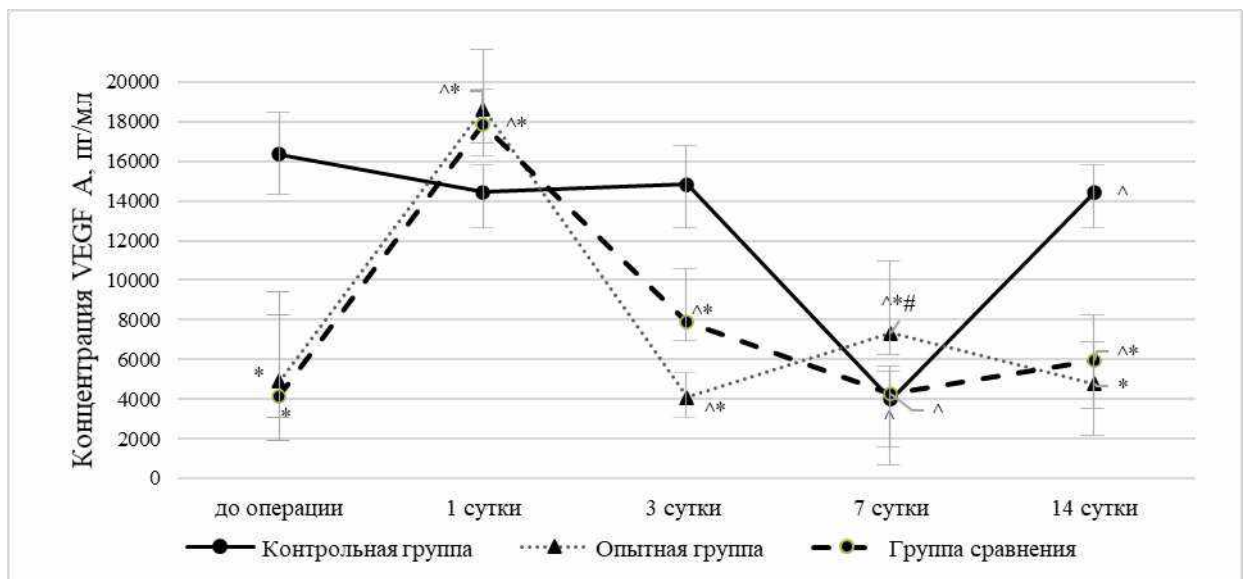
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 76 – Динамика уровней PDGF A при лечении ожоговых ран крыс

На 7-е сутки в группе сравнения и в опытной группе уровень данного фактора роста был максимальным на фоне значительного снижения концентрации PDGF A в контрольной группе (на 51,95 % по отношению к дооперационному уровню; $p < 0,05$), что может быть обусловлено ранней эпителизацией под действием препаратов, а также отсутствием процессов выраженного гемостаза и неоангиогенеза, характерного для ожоговых ран. На 14-е сутки уровни PDGF A соответствовали значениям интактных животных (до операции) – 2219,9 [1869,1; 2362,7] пг/мл против 1774,7 [1358,7; 2417,8] пг/мл в опытной группе, $p > 0,05$; 1719,8 [1632,9; 2108,8] пг/мл против 1559,5 [1428,1; 1964,5] пг/мл в группе

сравнения, $p > 0,05$. В контрольной группе значения остались достаточно низкими (меньше на 46,99 % по отношению к дооперационному уровню; $p < 0,05$). Рост уровня PDGF с третьих суток лечения гидрогелем рассматривается как благоприятный фактор, так как M2 макрофаги, способствующие заживлению тканей посредством стабилизации ангиогенеза и ремоделирования ВКМ, характеризуются секрецией не только противовоспалительных медиаторов, но и факторов роста, в частности PDGF [Martin K.E. et al., 2021].

При определении уровня VEGF A наблюдался пик его повышения в группе лечения децеллюляризированным гидрогелевым материалом и мазью «Левомеколь» на 1-е сутки эксперимента в отличие от контрольной группы ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно) (Рисунок 77). Повышение уровня VEGF A ассоциировано с активным ангиогенезом и согласуется с динамикой увеличения уровня PDGF на 3-и сутки экспериментального лечения. Кроме того, наблюдалась схожая тенденция в контрольной группе, где не было выявлено периодов активного синтеза VEGF A, как и PDGF.



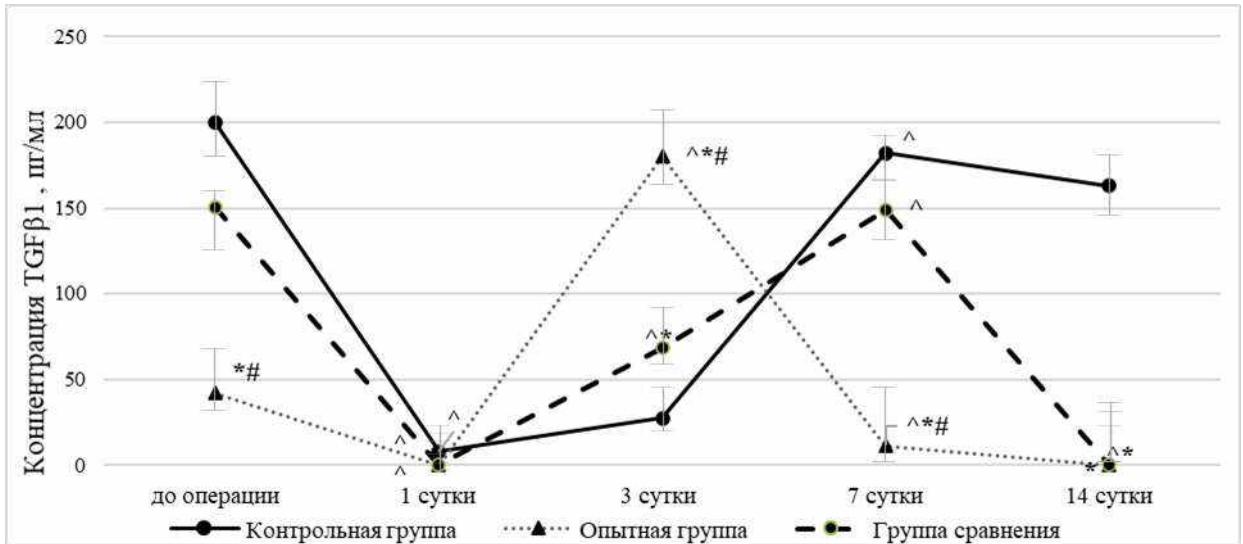
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 77 – Динамика уровней VEGF A при лечении ожоговых ран крыс

На 14-е сутки уровни VEGF A в опытной и контрольной группе не

отличались от значений, полученных до начала эксперимента, а в группе сравнения были незначительно выше (на 44 %; $p < 0,05$) своего исходного значения.

Анализ профилей TGF β 1 продемонстрировал значительное влияние внесения экзогенных биополимеров на процесс репарации (Рисунок 78).



* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

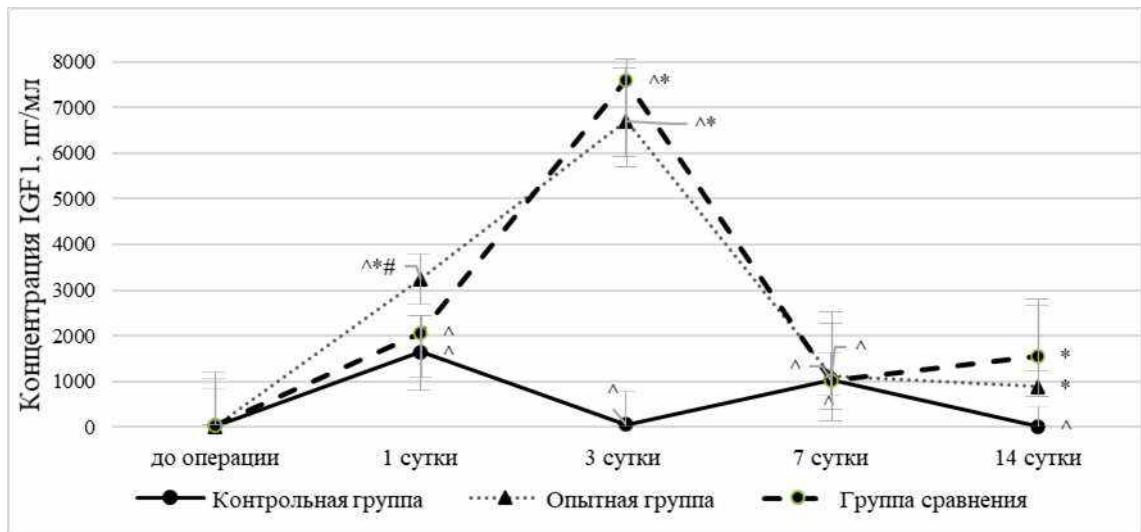
Рисунок 78 – Динамика уровней TGF β 1 при лечении ожоговых ран крыс

Наблюдалось значительное снижение его уровня на 1-е сутки раневого процесса во всех группах в связи со значительным повреждением и отсутствием процессов коллагеногенеза. Необходимо отметить, что в группе сравнения только к 7-м сутки происходило накопление TGF β 1 по сравнению с опытной группой, где пик синтеза наблюдался через трое суток экспериментального лечения, однако отличий с контрольной группой не наблюдалось, что может свидетельствовать о положительном влиянии внесения продуктов частичного гидролиза коллагена на процесс заживления раны, так как известно что поляризация макрофагов в M2a фенотип сопровождается синтезом TGF β 1, что обуславливает процессы ремоделирования тканей и неоангиогенеза [Witherel C.E. et al., 2019].

Для демонстрации регуляции процессов синтеза и созревания коллагена в области ожоговой раны в ходе репарации был проведён сравнительный анализ

изменения содержания уровней IGF1 (Рисунок 79).

В группах с лечением происходил значительный рост его синтеза с 1-х по 3-и сутки, в отличие от группы без лечения. Данная тенденция может отражать потенциальное положительное влияние коллагенов на процессы эпителизации и их негативное влияние на формирование келоидных рубцов, так как к седьмым суткам в опытной группе стимуляция коллагеногенеза прекратилась, а значения концентрации IGF1 не отличались от состояния до операции, хотя были выше контрольных значений.



* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 79 – Динамика уровней IGF1 при лечении ожоговых ран крыс

Повышение концентрации IGF1 в группах с лечением также может быть связано с переходом макрофагов из провоспалительного фенотипа M1 в M2, который характеризуется репарационной активностью, так как в те же сроки происходит выделение IL4, способного поляризовать макрофаги, которые секретируют более высокие уровни IGF1 [Spadaro O. et al., 2017]. Следует отметить, что применение децеллюляризованного гидрогелевого материала приводит к более раннему синтезу и росту концентрации IL4, что сопровождается более высокими уровнями IGF1 уже в первые сутки эксперимента по отношению к

группе сравнения и контрольной группе.

Резюме

В проведенном исследовании была продемонстрирована эффективность использования децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи при экспериментальном лечении ожоговых ран. При использовании децеллюляризованного гидрогелевого материала на ожоговых ранах животных в более краткие сроки наблюдалось полное восстановление кожи в поражённой области, было зарегистрировано большее количество фибробластов, меньшее количество нейтрофилов, а отложение цитокератина более эффективно относительно группы без лечения, количество и степень дегрануляции тучных клеток, а также накопление коллагена I типа были ниже. В отношении сывороточных цитокинов внесение экзогенных биологических компонентов ВКМ и его гидролизатов, как и мази «Левомеколь», оказало стимулирующее влияние на синтез IL1 β и IL6 на ранних сроках заживления ожоговой раны, но ингибирование накопления в крови провоспалительного IL8, что может быть обусловлено способностью исследуемых препаратов регулировать деятельность нейтрофилов, но не макрофагов. Разнонаправленные эффекты с группой сравнения были обнаружены в отношении TNF α , противовоспалительных IL4 и IL10, что, вероятно, связано с природой вносимых компонентов препаратов, в частности, децеллюляризованный гидрогелевый материал вызывал более раннее образование IL4 и более длительное выделение IL10. Было выявлено потенциальное положительное влияние децеллюляризованного гидрогелевого материала на процессы эпителизации и их негативное влияние на формирование келлоидных рубцов по динамике изменения уровней факторов роста, контролирующихся процессы синтеза и созревания коллагена в области ожоговой раны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подготовка материалов биологических каркасов, состоящих из ВКМ млекопитающих, требует децеллюляризации исходных тканей. Такая децеллюляризация обычно включает воздействие выбранных нефизиологических химических и биологических агентов, таких как детергенты и ферменты, а также физическое воздействие, которые неизбежно вызывают разрушение ВКМ. Поскольку исходные ткани для биологических каркасов обычно имеют аллогенное или ксеногенное происхождение, желательна максимальная децеллюляризация. Реакция ткани хозяина после *in vivo* имплантации этих каркасных материалов зависит от эффективности децеллюляризации и удаления остатков клеток. В настоящее время установлены стандарты децеллюляризации на основе легко определяемых количественных критериев оставшихся клеток. В связи с этим при разработке новых методов децеллюляризации необходимо сохранить баланс между наличием потенциальных полезных эффектов биологических компонентов ВКМ и отсутствием антигенных детерминант.

Стоит отметить, что децеллюляризация может осуществляться по различным технологиям – с помощью физических, биологических и химических методов. К физическим относятся методики с применением экстремальных температур (замораживание/оттаивание), механического давления, критических концентраций CO₂ и механического воздействия (перемешивания, измельчения). Эти методы в основном используются в качестве дополнительных методов для первичной обработки клеток, улучшения проникновения в ткань химических агентов децеллюляризации и облегчения удаления остаточных клеточных компонентов. К биологическим методам относится использование ферментов: дезоксирибонуклеаз, эндонуклеаз или трипсина. К химическим – обработка тканей различными химическими агентами: ионными (додецилсульфатом натрия (ДСН)), неионными (тритоном X100) и цвиттер-ионными (CHAPS (сульфонатом 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-пропана)) детергентами, кислотами (перуксусная кислота) и/или щелочами (гидроксид аммония, сульфид натрия,

гидроксид натрия), хелатирующими агентами (ЭДТА), гипотоническими или гипертоническими растворами, спиртами (этанол, метанол) и растворителями]. При этом все эти вещества по-разному влияют на ткани – кислоты разрушают нуклеиновые кислоты и солибилизируют компоненты цитоплазмы, спирты дегидратируют клетки и удаляют остаточные нуклеиновые кислоты и липиды, щёлочи денатурируют ДНК, хелатирующие агенты нарушают взаимодействие ВКМ с интегринами, а детергенты – липидно-липидные и липидно-белковые взаимодействия в клеточных мембранах (ионные детергенты могут удалять ГАГ и факторы роста из ВКМ и оставлять в тканях остаточные ПАВ, поэтому предпочтение отдается неионным детергентам) [Zahmati A.H.A. et al., 2017; Choudhury D. et al., 2020; Rabbani M. et al., 2021; Neishabouri A. et al., 2022; Yang J. et al., 2022].

Тем не менее, не существует единой теоретической основы, позволяющей разработать оптимальную методику децеллюляризации тканей. Поэтому протоколы децеллюляризации варьируют в широком диапазоне в зависимости от типа тканей. Также нет единых критериев качества децеллюляризации. Crapo P.M. и др. установили следующие минимальные критерии для децеллюляризованной ткани: допустимое количество ДНК – менее 50 нг двухцепочечных ДНК / мг сухого ВКМ; допустимая длина фрагментов ДНК – менее 200 пар оснований; отсутствие видимого ядерного материала в срезах тканей, окрашенных 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), гематоксилином-эозином [Crapo P.M. et al., 2011]. Дополнительными критериями являются также окраска по Массону [Aamodt J. M. et al., 2016] и Oil Red O, ИФА и масс-спектрометрия. Кроме того, помимо тщательного удаления клеток необходимо учитывать, что различные методы децеллюляризации могут оказывать в той или иной мере нежелательное влияние на ВКМ, получаемый в результате обработки. Например, ферментативная обработка может разрушать компоненты ВКМ; при обработке химическими детергентами возможна денатурация, молекулярная сшивка или селективное удаление некоторых компонентов ВКМ; физические методы децеллюляризации могут повреждать ультраструктуру ВКМ и нарушать его биомеханические свойства

[Aamodt J.M. et. al., 2016].

В зависимости от характеристик ткани процесс децеллюляризации может быть модифицирован за счёт варьирования агентов и времени обработки. Чем больше размер ткани, тем больше длительность его обработки. Однако увеличение времени действия детергентов повышает вероятность повреждения компонентов ВКМ. Поэтому для оценки целостности структурной организации ВКМ используют гистологический анализ.

В ходе сравнительной оценки алгоритмов децеллюляризации ксеногенных биологических материалов был выбран метод обработки с использованием ферментов и химических детергентов. В частности, модифицированная методика представляла собой следующий алгоритм:

- 1) замораживание образцов при температуре -80°C на 72 часа, затем образец размораживали;
- 2) обработка раствором трипсин-Версена (в отношении масса образца к массе раствора 1 : 10) при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 6-8 часов;
- 3) последовательное циклическое воздействие растворами детергентов: 1 % раствора Тритона X-100 в течение 2-3 часов и 4 % раствора дезоксихолата натрия в течение 2-3 часов (количество и продолжительность циклов зависели от конечного применения ДДМ);
- 4) обработка раствором свиной панкреатической ДНКазы I 2000 ЕД в фосфатном буфере с кальцием и при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 4 часов.

Количественный анализ показал, что содержание ДНК в децеллюляризированной дерме после обработки по модифицированной методике снижалось в соответствии с требуемыми критериями, гистологический анализ и окрашивание DAPI подтвердили отсутствие ядерного материала и сохранность гистоархитектуры ВКМ дермы. Полученные материалы были протестированы на цитотоксичность и местную токсичность (подкожные имплантации), что позволило выполнить экспериментальное исследование их клинической эффективности при различных патологических процессах.

Заживление ран представляет собой сложный динамический процесс, в

котором взаимодействие между клетками, секреторными факторами и компонентами ВКМ определяет судьбу процесса восстановления. В связи с этим разрабатываемые материалы для ухода за ранами обязательно должны обладать множеством функций и обеспечивать подходящую среду, обладая противомикробными, кровоостанавливающими, биореактивными и биомиметическими свойствами. Существует несколько подходов к решению данной проблемы. Традиционно используются биополимеры различного происхождения из-за их превосходной биосовместимости и биоактивности. Целлюлоза, альгинат, гиалуронат, коллаген и хитозан являются наиболее часто используемыми биополимерами, которые доминируют в современной индустрии ухода за ранами. Современные подходы включают разработки в области регенеративной медицины, которые предполагают использование каркасов на основе биополимеров, трехмерной искусственной кожи или эквивалентных заменителей, перевязочных материалов, содержащих лекарственные препараты или факторы роста и т.д. Кроме того, достижения в области нанотехнологий и биоинженерных методов, такие как биопечать и трехмерный электроспиннинг, позволяют создавать трехмерные каркасы или матрицы, имитирующие кожу с желаемым размером пор и пределом прочности [Zhang Y. et al., 2019; Zhang W. et al., 2023; Mirsky N.A. et al., 2024]. Это обеспечивает быстрое прикрепление и вращение клеток, адекватный обмен питательными веществами и факторами роста.

Использование аутогенного материала имеет одно преимущество – полное иммунное и генетическое соответствие тканям реципиента. Но, собственные ткани, взятые с отдаленных участков тела, не всегда имеют достаточные механические свойства и способны быстро резорбироваться после операции. При этом для взятия аутооттрансплантатов (апоневротический, фасциальный или кожный лоскут) требуются дополнительные разрезы и манипуляции. Это увеличивает время как самой операции, так и послеоперационной реабилитации, а также ухудшает косметический эффект вмешательства.

Недостатком применения синтетических материалов является их

микропористость и связанная с этим опасность инфицирования. В них легко попадают микроорганизмы (диаметр стафилококка порядка 1 мкм) и не могут попасть макрофаги (диаметр 18-35 мкм) и лейкоциты (15-20 мкм). Поэтому фагоцитоз внутри таких эксплантатов затруднен, что создает опасность их нагноения и отторжения. Также использование синтетических материалов может приводить к значительному увеличению интенсивности и продолжительности болевого синдрома, чувства дискомфорта и ограничению двигательной активности пациента в отдаленном послеоперационном периоде.

Конвергенция существующих технологических подходов формирует будущее разумное применение продуктов из биополимеров для ухода за ранами, в частности альтернативой используемых имплантов может выступать децеллюляризованный ксеногенный материал. Во многих тканях животных основным компонентом с точки зрения объема являются не клетки, а секретируемая клетками трехмерная структура, известная как внеклеточный матрикс. Необходимость децеллюляризации связана с возможностью иммунологической реакции отторжения при использовании алло- и ксеногенных трансплантатов, которую могут вызывать клеточные компоненты. Децеллюляризация удаляет большую часть клеточных компонентов, сохраняя ВКМ в состоянии, максимально приближенном к нативной ткани. Структурные белки, гликопротеины и протеогликаны являются макромолекулярными компонентами ВКМ, и они поддерживают структурную целостность тканей и обеспечивают гистоархитектуру органов. Параллельно с этим в ВКМ происходит обмен питательных веществ, воды и метаболитов.

Полученные результаты позволили дать характеристику исследуемому ДДМ. Децеллюляризованный матрикс обладал биосовместимостью на тканевом уровне, вызывал слабую воспалительную реакцию, при этом не образовывалась соединительнотканная капсула, отграничивающая матрикс от окружающих тканей. Полученные данные продемонстрировали, что толщина вновь сформированной дермы была сопоставима в участках, закрытых исследуемым раневым покрытием (рДДМ) и аутодермопластикой – $1962,1 \pm 56,3$ мкм и $1738 \pm 67,9$ мкм

соответственно ($p > 0,05$). Результаты проведенного исследования эффективности применения ДДМ, засеянного аллогенными фибробластами свиньи, соответствуют литературным данным о том, что клеточная терапия с использованием аллогенных клеток имеет высокую терапевтическую ценность при заживлении ожоговых ран. Первоначально существовала некоторая путаница в отношении того, как проявляются ранозаживляющие эффекты аллогенных клеток. Стало ясно, что аллогенные клетки не прикрепляются и не покрывают рану постоянно, а вскоре замещаются собственными клетками реципиента. В частности, аллогенные клетки способствуют миграции и пролиферации клеток из ложа и краев раны, где они высвобождают факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса и базальной мембраны. В конечном счете, роль аллогенных клеток в процессе заживления раны заключается в ускорении эпителизации краев раны и содействии образованию грануляций из раневого ложа [Kosaric N. et al., 2019; Храмова Н.В. и соавт., 2021; Kasravi M. et al., 2023; Xiang J.Y. et al., 2024].

Реконструктивная и пластическая хирургия направлены на восстановление формы и функций отдельных органов, что играет важную роль при таких патологических состояниях как грыжи передней брюшной стенки, паховые грыжи, рак молочной железы (после маммопластики), рак прямой кишки (экстирпация и цилиндрическая резекция прямой кишки) и др. В качестве поддерживающих имплантов в настоящее время используются собственные ткани пациента, синтетические или природные материалы отличающиеся высокой биосовместимостью, обладающие оптимальными физико-механическими свойствами (прочностью, жесткостью, деформационными характеристиками), хорошими манипуляционными качествами, устойчивостью к инфицированию, атравматичностью. Разработка новых материалов для герниопластики, обладающих достаточной механической прочностью и биосовместимостью может значительно улучшить качество жизни пациентов, имеющих первичные и вторичные вентральные грыжи [Kamarajah S.K. et al., 2018; Gómez-Gil V. et al., 2019]. Одним из перспективных подходов в создании подобных хирургических материалов является децеллюляризация тканей, содержащих большое количество

коллагеновых волокон [Poornejad N. et al., 2016; Li N. et al., 2018; Махуаткина L.V. et al., 2021; Chen Y. et al., 2022]. В процессе децеллюляризации тканей получают лишенные антигенов каркасы, состоящие из внеклеточного матрикса (ВКМ), основу которого составляют коллагены, эластин, сульфатированные и несulfатированные гликозаминогликаны [Poornejad N. et al., 2016]. Коллаген содержится во всех соединительных тканях организма более чем в 27 идентифицируемых типах [Senadheera T.R.L. et al., 2020]. Типы I, II, III, V и XI образуют фибриллы и обнаруживаются в тканях, которые должны выдерживать механические нагрузки, таких как сухожилия, дерма, хрящи и кости [Robben E. et al., 2020; Zheng M. et al., 2023]. Стоит отметить, что молекулы коллагенов очень эластичны и прочны (предел прочности порядка 1×10^9 Н/м²), а их волокна принимают на себя основную нагрузку, и, как следствие, существенно влияют на механические характеристики децеллюляризованных тканей [Joyce K. et al., 2021]. Изменение диаметра волокон, длины и молекулярной упаковки позволяет максимально использовать прочность коллагена, при этом изменять общие свойства ткани в соответствии с требованиями применения [Naomi R. et al., 2021; Zhao C. et al., 2021]. Соединительным тканям свойственно изменять биомеханические характеристики в зависимости от стадии и исхода процесса заживления: рубцовая ткань, представляющая собой толстые коллагеновые волокна, сложенные в оформленные тяжи, обладает худшими прочностными характеристиками по сравнению со здоровой тканью [Петрова И.М. и соавт., 2022; Hosseini M. et al., 2022]. Таким образом, различные методы обработки дермы могут привести к различным изменениям биомеханических свойств, что было показано в данном исследовании.

Схожесть гистологической структуры полученного ДДМ со структурой нативной дермы можно объяснить мягким воздействием при детергентно-энзиматической обработке и отсутствием химической сшивки [Olga M. et al., 2021]. Это же объясняет и близкие показатели напряжения, относительной деформации при разрыве и начального модуля упругости в ДДМ и нативной дерме. Вполне вероятно, что, волокна коллагена в структуре ДДМ выравниваются и обеспечивают

дополнительную прочность при растяжении [Naomi R. et al., 2012]. Тем не менее, вследствие разрыхления коллагеновых пучков и, тем самым, нарушения их структурированности, значения всех биомеханических характеристик снижались, так как известно, что, пока площадь поперечного сечения волокна будет практически неизменной, предел прочности при растяжении будет постоянным [Joyce K. et al., 2021]. Полученные в ходе исследования данные о биомеханических характеристиках дермы соответствуют литературным данным о прочностных характеристиках ткани белой линии живота у человека, при этом значения параметра деформация на разрыв были выше, чем установлено для передней брюшной стенки *ex vivo* (~16 %) [Deeken C.R. et al., 2017]. Гистологический анализ образцов Permacol™ показал, что они имели более плотную упаковку коллагеновых волокон, чем в нативной дерме, и меньшую площадь коллагеновых пучков, что делало его менее упругим, однако более устойчивым к применяемым в его отношении биомеханическим тестам, вследствие химической сшивки гексаметилендиизоцианатом [Mulier K.E. et al., 2011]. Таким образом, невозможно сделать однозначный вывод о позитивном влиянии использования сшивающего агента при создании дермальных материалов.

Результаты экспериментальной герниопластики методом ненатяжной предбрюшинной герниопластики передней брюшной стенки на свиньях-грыженосителях позволили сделать вывод о прочности мДДМ, использованного для закрытия грыжевого дефекта, что подтверждается состоятельностью рубца. Кроме того, по данным гистологических исследований не наблюдалось визуальной и морфологической границы между мДДМ и апоневрозом, что демонстрирует способность мДДМ к полной биоинтеграции. Разработанный биопластический материал продемонстрировал отсутствие адгезии к внутренним органам, образования свищей и сером. В результате гистологического и иммуногистохимического исследования было установлено, что имплантированный мДДМ не имел соединительнотканной капсулы в отличие от шовного материала, который провоцировал формирование типичной гранулёмы инородного тела. Вокруг области имплантации материала наблюдалось развитие

зрелой соединительной ткани, особенностью которой являлось наличие большого количества коллагеновых и эластических волокон и пролиферирующих фибробластоподобных клеток, при этом отсутствовали признаки воспаления. Гистологические данные границы ткань-имплантат коррелировали с морфологическими показателями прочности в группе с мДДМ и с использованием хирургического материала PermacolTM. Однако химически сшитый коммерческий материал продемонстрировал значительно большую жесткость по сравнению с мДДМ через 120 дней после имплантации. В клинической практике это может приводить к усилению болевого синдрома и ощущению инородного материала у пациентов. мДДМ продемонстрировал наилучший баланс между биоинтеграцией и ремоделированием соединительной ткани, вызывая при этом минимальную реакцию на инородное тело в отдаленные сроки после имплантации.

Сопоставимые результаты были получены при моделировании субпекторального кармана для экспериментального обоснования эффективности медицинской технологии применения мДДМ при маммопластике. Для оценки сохранности внеклеточного матрикса было проведено исследование коллагена I типа иммуногистохимическим методом, продемонстрировавшее его достаточно равномерное распределение, что говорит о нормальном формировании соединительной ткани, в частности, оформленного межклеточного вещества. ИГХ окрашивание лейкоцитов не позволило обнаружить экспрессию CD3- и CD68-рецепторов, что коррелировало с авоспалительной гистологической картиной. Экспрессия PECAM-1 (CD31) была положительной в большей части капилляров в поле зрения. Это можно расценивать как отсутствие феномена эндотелиальной дисфункции и адекватную работу микроциркуляторного русла в области имплантации. Необходимо отметить, что сравнительные морфологические результаты образцов тканей полученные в группе сравнения (использование коммерческого хирургического материала PermacolTM) через 60 дней после проведения модельной маммопластики позволили утверждать, что иммуногенность, уровень интеграции в ткани животного и темпы биодеградации у коммерческого препарата PermacolTM и у мДДМ были сопоставимы.

Таким образом, благодаря биологической природе мДДМ и отсутствию сшивающих агентов, тканевые и клеточные реакции в области его расположения протекали более физиологично, и наблюдалось постепенное замещение материала вновь образованной соединительной тканью при его использовании в качестве хирургического биопластического материала в экспериментальной реконструктивной хирургии.

Наиболее перспективным материалом для лечения ран являются раневые повязки на основе гидрогелей, чья высокая терапевтическая эффективность в качестве ранозаживляющих средств доказывается положительными результатами многих исследований. Известно, что гидрогели играют ключевую роль в доставке биоактивных молекул и клеточных продуктов в зону повреждения в отличие от других типов современных раневых покрытий, способствуют аутолизу некротических тканей, а их главное свойство заключается в их высокой степени гидратации, способствующей своевременному введению раны во влажную среду для обеспечения бактерицидного действия и создания оптимального микроклимата для ее заживления [Gainz G. et al., 2015; Bourke C.D. et al., 2015; Das A. et al., 2019; Ebhodaghe S.O. et al., 2022; Tanneberger A.E. et al., 2023].

В настоящее время ведётся активный поиск наиболее «совершенного» коллагенсодержащего гидрогелевого покрытия, в связи с чем проводятся многочисленные исследования и разработки методик получения гидрогелей из различных типов тканей. Наиболее близким к разработанному децеллюляризованному гидрогелевому материалу являлось исследование Калмыковой и соавт. [Калмыкова Н.В. и соавт., 2016], в котором получали внеклеточный матрикс из дермы крупного рогатого скота по нескольким методикам – обработкой с помощью 1М раствора NaOH и с помощью NaOH в меньшей концентрации с добавлением растворов Na_2SO_4 и H_3BO_3 с последующей лиофилизацией полученного материала. В результате обработки дермы получали лиофилизированный внеклеточный матрикс с высоким содержанием коллагена, однако для получения его гидрогелевой формы была необходима дополнительная стадия обработки. В другом исследовании Rodrigues F.T. et al. [Rodrigues F.T. et al.,

2010] разрабатывали ранозаживляющий материал на основе дермы свиньи, обрабатываемой растворами концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов. Получаемый материал в дальнейшем обрабатывался сшивающим агентом глутаральдегидом. Тем не менее, добавление сшивающих веществ может влиять на токсичность и иммуногенность получаемого материала. В работе Tan Q.W. et al. [Tan Q.W. et al., 2019] гидрогель получали из жировой ткани свиньи, которую обрабатывали с помощью растворов додецилсульфата натрия, пепсина и соляной кислоты, которые имеют достаточно высокую себестоимость. Децеллюляризованный гидрогелевый материал получали на основе свиной дермы, являющейся менее иммуногенным биологическим материалом, при отсутствии дополнительной стадии лиофилизации.

Исследования выявили несколько клеточных событий и медиаторов, связанных с заживлением ран, которые могут служить биомаркерами. Макрофаги, нейтрофилы, фибробласты и тромбоциты высвобождают молекулы цитокинов, включая TNF- α , интерлейкины (IL) и факторы роста, из которых наибольшее значение имеет тромбоцитарный фактор роста (PDGF). В результате различные лейкоциты и клетки соединительной ткани выделяют как ММП, так и тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП). Исследования показали, что уровни IL-1, IL-6 и ММП выше нормы, и аномально высокое соотношение ММП/ТИМП часто присутствует в незаживающих ранах. Клиническое исследование ран на наличие этих медиаторов может предсказать, какие раны заживут, а какие нет, что предполагает использование этих химических веществ в качестве биомаркеров заживления ран [Patel S. et al., 2015].

В проведенном исследовании при использовании децеллюляризованного гидрогелевого материала при лечении ожоговых ран на 14-е сутки наблюдалось полное восстановление кожи в поражённой области, было зарегистрировано большое количество фибробластов, а эпидермис был заметно утолщён относительно группы без лечения. Известно, коллаген оказывает положительное влияние на ранние этапы заживления ран, так как способствует агрегации тромбоцитов, стимулирует образование грануляционной ткани на месте раны,

поскольку является матрицей для ее образования [Васакова М. et al., 2019]. Лизис коллагена способствует обогащению раны аминокислотами, что приводит к увеличению биосинтеза пластических веществ. Так, в исследовании Черданцевой Т.М. и др. [Черданцева Т.М. и соавт., 2022] в опытной группе отмечались такие морфологические особенности, как отставание увеличения площади грануляционной ткани, меньшее количество тучных клеток, снижение их площади и коэффициент дегрануляции по сравнению с контрольной группой без лечения. Автор отмечал, что в других исследованиях влияния коллагенсодержащих раневых покрытий была выявлена способность коллагена обратимо связывать факторы роста, защищая их от протеолиза, в связи с чем объясняется отставание формирования грануляционной ткани в опытной группе.

В проведенном исследовании была продемонстрирована эффективность использования децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе внеклеточного матрикса дермы свиньи. Разработанный децеллюляризованный гидрогелевый материал позволяет эффективно ускорить заживление раны, а также создать оптимальные условия для активной регенерации в поражённой области.

На Рисунке 80 представлена общая схема процессов воспаления и репарации на ранних сроках заживления ожогового повреждения при использовании разработанного децеллюляризованного гидрогелевого материала (синими стрелками отмечены установленные эффекты, красными стрелками показаны направления процессов при заживлении ожогового повреждения без лечения, описанные в литературе).

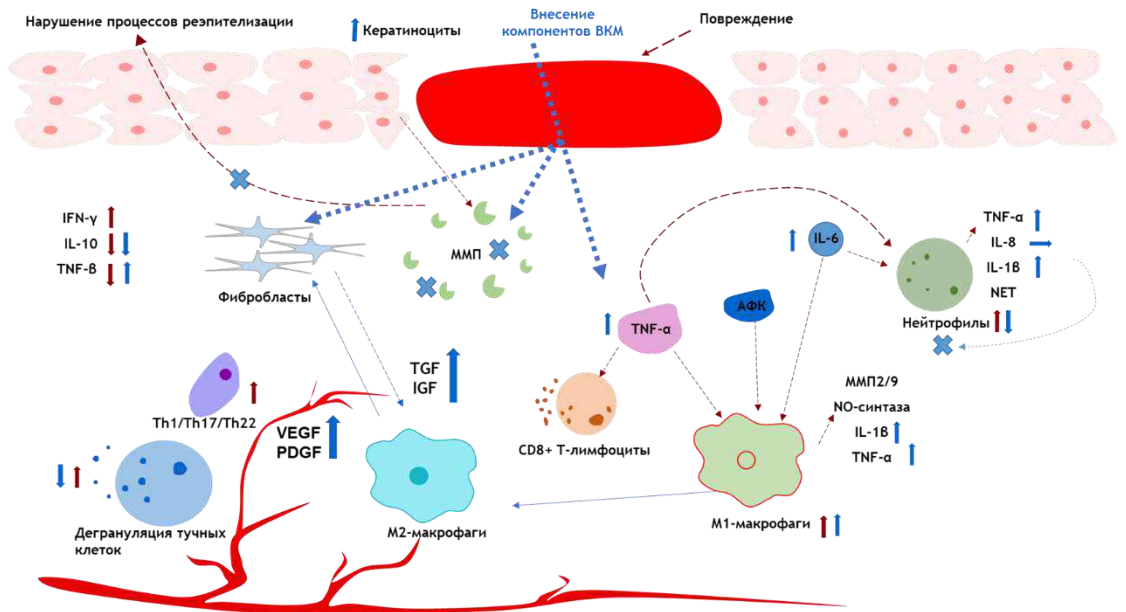


Рисунок 80 – Схема процессов воспаления и репарации на ранних сроках заживления ожогового повреждения при использовании децеллюляризованного гидрогелевого материала

Нами было отмечено возрастание концентраций классических провоспалительных цитокинов – IL1 и TNF α , которые соответственно вовлекают в процесс воспаления нейтрофилы и CD68-позитивные макрофаги, но интересно отметить отсутствие роста IL8 и количества CD16-позитивных клеток, что предположительно было обусловлено влиянием экзогенного коллагена и ингибированием работы матриксных металлопротеиназ. Также противовоспалительный эффект внесения геля подтверждался снижением степени дегрануляции тучных клеток, которые при ожоговой ране имеют важное значение в повреждении тканей. Также предположительно фрагменты внеклеточного матрикса оказывали активирующее влияние на фибробласты дермы, что было установлено по данным роста концентраций факторов роста TGF β 1 и IGF1.

Дальнейшие исследования применения децеллюляризованного гидрогелевого материала в качестве терапевтического препарата для ран различной типологии позволит создать высокоэффективное ранозаживляющее средство, обладающее значительными преимуществами среди раневых покрытий.

Таким образом, по классическим представлениям ВКМ рассматривался как

поддерживающая структура для стабилизации расположения клеток в тканях и сохранения архитектуры тканей. Эта концепция резко изменилась за последние несколько десятилетий с открытием того, что протеолитические фрагменты ВКМ оказывают глубокое влияние на структуру, жизнеспособность и функции клеток. Классические примеры взаимодействия ВКМ с клетками включают семейство рецепторов клеточной поверхности интегринов [Adorno-Cruz V. et al., 2019; L.E. de Castro Bras et al., 2020]. Однако существуют также взаимодействия, не основанные на интегринах, так как домен лиганда в компоненте ВКМ может становиться биологически активным только после модификации ВКМ. Эти биоактивные домены получили название «матрикриптины», при этом протеолитически высвобожденные фрагменты ВКМ с биологической активностью называются «матрикинами» [Ricard-Blum S. et al., 2019; Karsdal M. et al., 2025]. Считается, что многие свойства биологических матриц на основе ВКМ обусловлены небольшими остатками скрытых пептидов в молекулах коллагена, которые вступают в действие после биодеградации или биосорбции исходной молекулы. Эти пептидные области называются криптическими пептидами, или криптидами. Протеолитический гидролиз белка ВКМ высвобождает криптические пептиды, которые включают ангиогенные, антимикробные, митогенные и хемотаксические свойства [Салихова Т.И. и соавт., 2017; Kumai J. et al., 2019; de Castro Brás L.E. et al., 2020].

Матрикины и криптические пептиды могут быть получены в процессе децеллюляризации ВКМ соединительных тканей и оказывать влияние на клеточную адгезию, форму, миграцию, пролиферацию/выживание и дифференцировку клеток при применении децеллюляризованных материалов дермы в лечении ожоговых ран.

Таким образом, биоимплантаты, получаемые из донорского материала животного (свиной ксенографт), представляют собой внеклеточный матрикс, включающий комплекс структурных и функциональных белков, объединенных в уникальную тканеспецифичную архитектуру. Помимо его ведущей роли в поддержании «каркаса» ткани он участвует в процессах передачи сигнала,

регуляции роста клеток и их дифференцировки [Новоселецкая Е.С. и соавт., 2019]. При этом биопластические материалы на основе внеклеточного матрикса дермы способны индуцировать процесс, называемый «конструктивное ремоделирование» – формирование функциональной ткани соответственно в зоне имплантации. Однако, способность активизировать конструктивное ремоделирование во многом зависит от методов, применяемых для получения внеклеточного матрикса. Полученные результаты позволяют утверждать, что детергентно-энзиматическая обработка материала является универсальной, экономически целесообразной и доступной техникой децеллюляризации. Полученные децеллюляризованные и рещеллюляризованные материалы соответствуют таким характеристикам как биологическая совместимость, стимулирование коллагеногенеза и ангиогенеза, возможность прорасти окружающими тканями, быть гистологически инертными, сохранять мягкость и эластичность и не деформироваться в процессе заживления.

ВЫВОДЫ

1. Обработка дермы свиньи последовательным воздействием растворов детергентов (дезоксихолат натрия, тритон-Х100) и ферментов (трипсин, ДНКаза) позволяет достаточно полно удалить клеточные и ядерные структуры и сохранить гистоархитектонику внеклеточного матрикса плотной соединительной ткани, так как коллагеновые пучки децеллюляризированной и нативной дермы не отличаются по толщине и упорядоченности, площадь коллагеновых пучков ниже значений нативной дермы; при этом происходит потеря биохимических компонентов: гиалуроновой кислоты на 65,31 – 73,47 %; сульфатированных гликозаминогликанов на 52,18 – 69,32 % относительно нативной дермы.

2. Децеллюляризированный пластический материал на основе внеклеточного матрикса дермы свиньи является биосовместимым, не влияет на жизнеспособность фибробластов дермы, оказывает минимальную токсичность и не вызывает воспалительной тканевой реакции при имплантации. Биомеханические параметры полученного материала соответствуют нативной дерме, что делает целесообразным его использование для закрытия дефектов соединительной ткани.

3. Разработан способ моделирования ожоговой раны III и IV степени на крупном лабораторном животном, включающий нанесение ожоговой раны, её иссечение, выполнение аутопластики и/или наложение раневых покрытий, который позволяет оценить эффективность применения децеллюляризированных и рецеллюляризированных материалов, как при раннем, так и при этапном хирургическом лечении.

4. Оценка патоморфологической картины заживления ожоговой раны показывает, что использование рецеллюляризированного аллогенными фибробластами матрикса дермы приводит к полному восстановлению всех слоев кожи; обеспечивает эпителизацию, миграцию фибробластов, так как происходит более эффективное образование промежуточных филаментов в клетках кожи, морфологическая картина соответствует полноценному коллагено- и ангиогенезу. Закрытие ожоговой раны децеллюляризированным матриксом дермы требует

последующей аутодермопластики на 8-е сутки эксперимента, то есть он выступает временным раневым покрытием.

5. Реконструктивная пластика децеллюляризованным матриксом дермы свиньи приводит к формированию нормальной соединительной ткани на месте дефекта, содержащей основной компонент внеклеточного матрикса – коллаген I типа, фибробластоподобные клетки и эндотелиоциты.

6. Обработка дермы свиньи щелочным раствором оказывает значительное гидролитическое воздействие на биополимеры внеклеточного матрикса и позволяет получить децеллюляризованный гидрогелевый материал, содержащий не обладающие видовой специфичностью и антигенной активностью высокомолекулярные компоненты.

7. Децеллюляризованный гидрогелевый материал на основе дермы способствует адгезии и миграции фибробластов (сокращение площади «царапины» при миграционном тесте на 25,2% быстрее, чем в условиях контроля), усилению пролиферации (время удвоения популяции сокращается на 51,1% по сравнению с контролем), сохранению их жизнеспособности и синтетической активности (концентрация коллагена I типа в кондиционной среде в 4,58 раз выше) при рецеллюляризации *in vitro*.

8. Морфологическими и биохимическими особенностями динамики восстановления компонентов внеклеточного матрикса кожи при нанесении децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи на ожоговую рану являются: ранняя эпителизация (накопление цитокератина на 7-е сутки после нанесения раны в 2 раза выше, чем в контрольной группе), предупреждение образования келоидных рубцов за счет снижения темпов ресинтеза коллагена I типа и формирование полноценного внеклеточного матрикса и базальных мембран (раннее накопление регуляторных и репарационных факторов – фибронектина и коллагена IV типа).

9. При нанесении гидрогелевого материала на основе внеклеточного матрикса дермы свиньи в ожоговую рану отмечается рост концентраций факторов острого воспалительного ответа в крови на 1-е сутки – IL1 β и TNF α , на 3-и и 7-е

сутки – IL6, что обуславливает активацию макрофагальной деградации внесенных биополимеров, но при этом не происходит активации и хемотаксиса нейтрофилов (уровни IL8 значимо не повышаются на протяжении всего эксперимента), что указывает на отсутствие распознавания компонентов гидрогеля как патогенассоциированных молекулярных паттернов. В отношении противовоспалительных факторов наблюдается рост количества M2-опосредованных цитокинов IL4 и IL10 на 3-и и 7-е сутки соответственно по сравнению с группой без лечения, что активирует ремоделирование тканей и ангиогенез.

10. Внесение гидрогелевого материала на основе внеклеточного матрикса дермы свиньи в зону ожоговой раны активирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, так как наблюдается рост уровня VEGF A в крови с 1-х суток после нанесения раны, и предотвращает формирование гипертрофических рубцов за счет снижения уровня TGF β 1 на 1-е сутки раневого процесса; рост уровня PDGF A на 3-и сутки связан со стимуляцией восстановительных процессов и формированием новых кровеносных сосудов для улучшения трофики тканей, что является ответом организма на развивающуюся гипоксию тканей, вызванную нарушением газообмена в области струпа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшей разработки методологических подходов к замене поврежденных, либо утраченных тканей, а также для научно обоснованного поиска и рационального отбора новых средств для решения проблем трансплантологии.

Разработанный ксеногенный мДДМ обладает необходимыми физическими характеристиками для использования его в качестве хирургического импланта при лечении грыж передней брюшной стенки.

Методика реконструктивной пластической хирургии молочной железы с помощью мДДМ на основе дермы свиньи может быть одной из операций выбора в арсенале реконструктивной хирургии. Преимущество данной методики заключается в ее технической простоте, снижении травматичности вмешательства, уменьшении времени операции, высоком уровне эстетической удовлетворенности.

Дальнейшие исследования применения децеллюляризованного гидрогелевого материала в качестве терапевтического препарата для ран различной типологии позволят создать высокоэффективное ранозаживляющее средство, обладающее значительными преимуществами среди раневых покрытий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БАВ** – биологически активные вещества
- ВКМ** – внеклеточный матрикс
- ГАГ** – гликозаминогликаны
- ГК/GA** – гиалуроновая кислота
- ДДМ** – децеллюляризированный дермальный матрикс
- ДМСО** – диметилсульфоксид
- ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДСН** – додецилсульфат натрия
- ИГХ** – иммуногистохимический
- ИФА** – иммуноферментный анализ
- КПО** – коэффициент площади окрашивания
- КРС** – крупный рогатый скот
- мДДМ** – модифицированный децеллюляризированный дермальный матрикс
- ММП** – матриксная металлопротеиназа
- ППС** – полная питательная среда
- ПЭГ** – полиэтиленгликоль
- рДДМ** – рецеллюляризированный дермальный матрикс
- С-ГАГ** – сульфатированные гликозаминогликаны
- СД** – степень дегрануляции;
- ТИК** – тканеинженерная конструкция
- ТИМП/TIMP** – тканевой ингибитор металлопротеиназ
- ТК** – тучные клетки
- ЭДТА** – этилендиаминтетраацетат
- 2D** – двумерный
- 3D** – трехмерный
- DAPI** – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindol)
- FDA** – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

IGF – инсулиноподобный фактор роста (insulinlike growth factor)

NTIRE – нетермическая необратимая электропорация

PCL – поликапролактон

PDGF – фактор роста тромбоцитов (platelet derived growth factor)

TGF β – трансформирующий фактора роста β (transforming growth factor β)

TNF α – фактор некроза опухоли α (tumor necrosis factor α)

VEGF – фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаева, Ж. Д. Регенеративная активность кожного покрова и заживление ожоговой раны у взрослых и детей при ожогах второй степени / Ж. Д. Абдуллаева, Д. К. Абдуллаев, Р. К. Калматов // Бюллетень науки и практики. – 2024. – Т. 10, № 2. – С. 266–72.
2. Аутогенные фибриновые матриксы: перспективы использования в хирургии / С.А. Епифанов, С.А. Матвеев, П.Е. Крайнюков [и др.] // Гены и клетки. – 2021 – Т. 16 (2). – С. 71–4.
3. Внеклеточный матрикс в регуляции дифференцировки стволовых клеток / Е.С. Новоселецкая, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко [и др.] // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 3. – С. 343–353.
4. Возможности применения дермальных эквивалентов в клинической практике / Н.В. Храмова, О.С. Чарышникова, Р.А. Амануллаев, Ю.Б. Хусанова // Медицина и инновации. – 2021. – № 3. – С. 178–82.
5. Децеллюляризованная строма пуповины в тканевой инженерии и регенеративной медицине: систематический обзор / Ю.Б. Басок, А. А. Кондратенко, Л. И. Калюжная [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25 – № 2. – С. 82–98.
6. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс для тканевой инженерии (обзор) / Е.В. Исаева, Е.Е. Бекетов, Н.В. Аргучинская [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2022. – Т. 14 (3). – С. 57–69.
7. Дремина Н.Н. Клеточные технологии в регенерации сухожилий: от клетки до тканевой инженерии / Н.Н. Дремина, И.С. Трухан, И.А. Шурыгина // Acta Biomedica Scientifica. – 2021. – Т. 6. – № 2 – С. 166–75.
8. Жуковский, В.А. Полимерные имплантаты для реконструктивной хирургии / В.А. Жуковский // Innova. – 2016. – Т. 3. – № 2. – С. 51–9.
9. Иванова, В.П. Фибронектины: структурно-функциональные связи / В.П. Иванова // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2017. – Т. 53. – № 6. – С. 398–410.

10. Инъекционное применение обогащенной тромбоцитами плазмы при лечении пограничных ожогов кожи / Е.В. Зиновьев, Э.К. Дерий, Д.В. Костяков [и др.] // Российские биомедицинские исследования. – 2024. – Т. 9. – № 4. – С. 30–7.

11. Использование биологических и синтетических материалов в реконструктивной хирургии при раке молочной железы (обзор литературы) / А.Д. Зикиряходжаев, И.М. Широких, Н.В. Аблицова [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2018. – Т. 14. – № 1. – С. 28–37.

12. Использование раневых покрытий на основе хитозана «ХитоПран» в лечении больных с ожоговой травмой / А.В. Поляков, С.Б. Богданов, И.М. Афанасов [и др.] // Инновационная медицина Кубани. – 2019. – № 3. – С. 25–31.

13. Использование современных раневых покрытий в местном лечении ран различной этиологии / А.М. Морозов, А.Н. Сергеев, Н.А. Сергеев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 2. – С. 167.

14. Использование трупной кожи в лечении ран / А.В. Сачков, Н.В. Боровкова, Е.А. Жиркова [и др.] // Трансплантология. – 2018. – Т. 4. – № 10. – С. 327–35.

15. Клиническая эффективность биопластического коллагенового материала «Коллост» у детей с термической травмой (многоцентровое исследование) / Л.И. Будкевич, В.И. Ковальчук, А.В. Глуткин [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 34–44.

16. 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. – № 3(63). – С. 93–109.

17. Новое раневое покрытие для лечения ран / Е.О. Медушева, Ю.С. Фидоровская, М.А. Щедрина [и др.] // Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка. – 2023. – Т.10 (2). – С. 24–31.

18. Образцова, А.Е. Морфофункциональные особенности репаративного процесса при заживлении кожных ран с учетом возможных рубцовых деформаций: обзор литературы / А.Е. Образцова, А.А. Ноздреватых // Вестник новых

медицинских технологий – 2021. – № 1. – С. 98–107.

19. Оптимизация протокола децеллюляризации с целью сохранения ангиогенных свойств биологического каркаса пищевода / Е.А. Губарева, Е.В. Куевда, М.И. Быков [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14 (1.2). – С. 186–191.

20. Опыт применения покрытия «Хитокол» в лечении инфицированных ран различной этиологии / О.В. Владимирова, П.М. Лаврешин, С.В. Минаев [и др.] // Главный врач Юга России. – 2021. – № 5 (80). – С. 38–40.

21. Оразов, М.Р. Патогенетические механизмы регенерации дермы после имплантации нитей на основе полидиоксанона / М.Р. Оразов, О.Н. Сулаева, Е.Ю. Старкова // Московский хирургический журнал. – 2017. – № 4. – С. 13–27.

22. Особенности патогенеза и современные методы лечения хронических ран (обзор литературы) / Д.А. Ермолова, В.Н. Оболенский, В.Б. Скопинцев, Л.А. Лаберко // Хирург. – 2017. – № 7. – С. 23–36.

23. Оценка влияния производного 1,2,3-триазоло-[5,1-b]-1,3,4-тиадиазина на восстановление волокнистого компонента кожи в условиях заживления ожоговой раны / И.М. Петрова, Д.В. Зайцев, А.В. Жданова [и др.] // Российский журнал биомеханики. – 2022. – Т. 26. – № 2. – С. 31–41.

24. Патогенетическое обоснование оптимальной тактики ведения пограничных ожоговых ран / А.В. Семиглазов, Е.В. Зиновьев, Д.В. Костяков [и др.] // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2023. – Т. 24. – № 2. – С. 1296–1307.

25. Перспективы использования коллагенового гидрогеля в качестве основы для отверждаемых и активированных костно-пластических материалов / Н.Л. Фатхудинова, А.В. Васильев, Т. Б. Бухарова [и др.] // Стоматология. – 2018. – Т. 97. – № 6. – С. 78–83.

26. Полимеры в лечении ран: реалии и горизонты / О.А. Легонькова, М.С. Белова, Л.Ю. Асанова [и др.] // Раны и раневые инфекции. Журнал имени профессора Б.М. Костюченка. – 2016. – № 1. – С. 12–8.

27. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных

конструкций / Д.С. Барановский, А.Г. Демченко, Р.В. Оганесян [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72. – № 4. – С. 254–260.

28. Преимущества и недостатки гелевых покрытий в терапии ожоговых ран и ожогов (обзор литературы) / И.П. Дуданов, В.В. Виноградов, В.В. Криштоп, В.Г. Никонорова // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2022. – Т. 16, № 2. – С. 13-22.

29. Применение биоимплантов при пластике дефектов передней брюшной стенки / Л.В. Максяткина, Н.Т. Абаатов, Л.Л. Ахмалтдинова [и др.] // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2019. – №. 1. – С. 307–12.

30. Применение биологических и синтетических материалов при реконструктивно-пластических операциях у больных раком молочной железы / М.В. Ермощенко, В.И. Чиссов, А.В. Усов [и др.] // Research'n Practical Medicine Journal. – 2017. – Т. 4. – № 1. – С. 23–32.

31. Приходько, К.А. Одномоментная реконструкция молочной железы с использованием имплантатов и ацеллюлярного дермального матрикса / К.А. Приходько, Е.Я. Птух, К.В. Стегний // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2017. – № 1. – С. 93–95.

32. Разработка раневых покрытий для регенеративной медицины / И.С. Кудряшова, П.А. Марков, Е.Ю. Костромина [и др.] // Вестник восстановительной медицины. – 2021. – Т. 20. – № 6. – С. 84–95.

33. Раневое покрытие на основе коллагенламинаковой матрицы / В.П. Саганов, Ю.С. Балханов, Е.Б. Эрдынеева [и др.] // Вестник Бурятского государственного университета. Медицина и фармация. – 2022. – №1. – С. 15–24

34. Ранозаживляющая активность гелевой формы криптического пептида из коллагена / Т.И. Салихова, З.Ю. Сираева, А.А. Ергешов [и др.] // Гены и Клетки. – 2017. – Т. 12. – № 3. – С. 215.

35. Результаты применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для реконструкции передней брюшной стенки в отдаленные сроки эксперимента / Р.М. Бадыров, Н.Т. Абаатов, М.М. Тусупбекова [и др.] // Наука и здравоохранение. – 2018.

– № 1. – С. 24–35.

36. Рогова, Л.Н. Роль матричных металлопротеиназ в патогенезе остеоартроза (обзор литературы) / Л.Н. Рогова, Д.С. Липов // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2018. – № 1(57). – С. 12–6.

37. 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.

38. Титова, Е.В. Характер морфологических процессов в зоне имплантации биологического герниопротеза / Е.В. Титова, О.В. Калмин // Известия вузов. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2021. – № 2. – С. 132–6.

39. Черданцева, Т.М. Морфофункциональные особенности тучных клеток в ожоговой ране при применении коллагеновой матрицы / Т.М. Черданцева, И.П. Чернов, Т.М. Громова // Наука молодых – Eruditio Juvenium. – 2022. – Т. 10. – № 1. – Р. 5–14.

40. Чупрынин, Г.П. Системы доставки факторов роста и цитокинов при лечении хронической кожной раны / Г.П. Чупрынин, Н.В. Колесникова, К.И. Мелконян // Цитокины и воспаление. – 2023. – Т. 20, № 4. – С. 5–15.

41. Шевлюк, Н.Н. Особенности репаративных гистогенезов при использовании биопластических материалов / Н.Н. Шевлюк, И.З. Гатиатуллин, А.А. Стадников // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – Т. 9. – № 1. – С. 86–93.

42. Экспериментальная модель тендинопатии пяточного сухожилия на фоне локального введения аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы / Д.А. Маланин, Л.Н. Рогова, Н.В. Григорьева [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2020. – № 4. – С. 14–9.

43. 3D Bioprinting phototunable hydrogels to study fibroblast activation / A.E. Tanneberger, L. Blair, D. Davis-Hall [et al.] // Journal of Visualized Experiments. – 2023. – № 196. – Р. e65639.

44. A biologic surgical implant in complex abdominal wall repair: 3-year follow-up results of a multicentric prospective study / F. Gossetti, N. Zuegel, P. Giordano [et al.] // *Medical Devices: Evidence and Research*. – 2021. – Vol. 14. – P. 257–64.

45. A bioreactor system for interfacial culture and physiological perfusion of vascularized tissue equivalents/ F. Groeber, A. Kahlig, S. Loff [et al.] // *Biotechnol J*. – 2013. – Vol. 8(3). – P. 308–16.

46. A comparison of acellular dermal matrices (ADM) efficacy and complication profile in women undergoing implant-based breast reconstruction: a systematic review and network meta-analysis / S.P. Glynou, S. Sousi, H. Cook [et al.] // *BMC cancer*. – 2024. – Vol. 24(1). – P. 1598

47. A first vascularized skin equivalent as an alternative to animal experimentation / F. Groeber, L. Engelhardt, J. Lange [et al.] // *J. ALTEX*. – 2016. – Vol. 33(4). – P.415–22.

48. A modified collagen dressing induces transition of inflammatory to reparative phenotype of wound macrophages / A. Das, M. Abas, N. Biswas [et al.] // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9(1). – P. 1–10.

49. A review of recent progress on collagen-based biomaterials / M. Zheng, X. Wang, Y. Chen [et al.] // *Advanced Healthcare Materials*. – 2023. – Vol. 12(16). – P. 2202042.

50. A two-layer skin construct consisting of a collagen hydrogel reinforced by a fibrin-coated polylactide nanofibrous membrane / M. Bacakova, J. Pajorova, A. Broz [et al.] // *International journal of nanomedicine*. – 2019. – P. 5033–50.

51. Aamodt, J.M. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response / J.M. Aamodt, D.W. Grainger // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 86. – P. 68–82.

52. Abdominal wall reconstruction with large polypropylene mesh: is bigger better? / M. Nisiewicz, T. Hughes, M.A. Plymale [et al.] // *Hernia*. – 2019. – Vol. 23(5). – P. 1003–08.

53. Acellular human lung scaffolds to model lung disease and tissue regeneration / S.E. Gilpin, D.E. Wagner // *Eur Respir Rev*. – 2018. – Vol. 27(148). – P.180021.

54. Aderibigbe, B.A. Alginate in wound dressings / B.A. Aderibigbe, Buyana //

Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 10(2). – P. 42.

55. Adorno-Cruz, V. Regulation and functions of integrin $\alpha 2$ in cell adhesion and disease / V. Adorno-Cruz, H. Liu // *Genes & diseases*. – 2019. – Vol. 6(1). – P. 16–24.

56. Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine / K. Lin, D. Zhang, M.H. Macedo [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2018. – Vol. 29. – P. 1–16.

57. Advanced function, design and application of skin substitutes for skin regeneration / M. Zhang, J. Xing, Y. Zhong [et al.] // *Mater Today Bio*. – 2023. – Vol. 24. – P.100918.

58. Advances in electrospinning of natural biomaterials for wound dressing / F. Wang, S. Hu, Q. Jia [et al.] // *Journal of Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1–14.

59. Advances in extracellular matrix-associated diagnostics and therapeutics / M. Karsdal, T.R. Cox, A.L. Parker [et al.] // *J. Clin. Med*. – 2025. – Vol. 4. – P. 1856.

60. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care / B. Ter Horst, G. Chouhan, N.S. Moiemmen [et al.] // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2018. – Vol 123. – P.18–32.

61. Advances on capsular contracture-prevention and management strategies: a narrative review of the literature / P. Susini, G. Nisi, D.M. Pierazzi [et al.] // *Plast Reconstr Surg Glob Open*. – 2023. – Vol. 11(6). – P. e5034.

62. Advances on the modification and biomedical applications of acellular dermal matrices / Y. Chen, X. Liu, X. Zheng [et al.] // *Journal of Leather Science and Engineering*. – 2022. – Vol. 4(1). – P. 19.

63. Akasaka, Y. The role of mesenchymal stromal cells in tissue repair and fibrosis / Y. Akasaka // *Adv Wound Care*. – 2022. – Vol. 11. – P.561–74.

64. Alginate-pluronic topical gels loaded with thymol, norfloxacin and ZnO nanoparticles as potential wound dressings / B. Buyana, B.A. Aderibigbe, D.T. Ndinteh [et al.] // *Journal of drug delivery science and technology*. – 2020. – Vol. 60. – P. 101960.

65. Angiogenesis and re-endothelialization in decellularized scaffolds: recent advances and current challenges in tissue engineering / R. Mazloomnejad, A. Babajani, M. Kasravi [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – Vol. 11.

– P. 1103727.

66. Angiogenesis in tissue engineering: as nature intended? / V. Mastrullo, W. Cathery, E. Velliou [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2020. – Vol. 8. – P. 188.

67. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer / Z.L. Liu, H.H. Chen, L.L. Zheng [et al.] // *Sig Transduct Target Ther.* – 2023. – Vol. 8. – P. 198.

68. Are agricultural and natural sources of bio-products important for modern regenerative medicine? A review / M. Nowacki, K. Nowacka, T. Kloskowski [et al.] // *Ann Agric Environ Med.* – 2017. – Vol. 11(24). – P. 207–12.

69. Aumailley, M. Laminins and interaction partners in the architecture of the basement membrane at the dermal-epidermal junction / M. Aumailley // *Experimental dermatology.* – 2021. – Vol. 30(1). – P. 17–24.

70. Avishai, E. Impaired wound healing: facts and hypotheses for multi-professional considerations in predictive, preventive and personalised medicine / E. Avishai, K. Yeghiazaryan, O. Golubnitschaja // *EPMA Journal.* – 2017. – Vol. 8. – P. 23–33.

71. Barbalinardo, M. Sustainable 3D scaffolds based on β -chitin and collagen I for wound dressing applications / M. Barbalinardo, G. Falini, D. Montroni // *Polymers.* – 2025. – Vol. 17(2). – P.140.

72. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis updated / G. Eelen, L. Treps, X. Li [et al.] // *Circulation research.* – 2020. – Vol. 127(2). – P. 310–29.

73. Bioactive potential of natural biomaterials: Identification, retention and assessment of biological properties / K. Joyce, G.T. Fabra, Y. Bozkurt [et al.] // *Signal transduction and targeted therapy.* – 2021. – Vol. 6(1). – P. 122.

74. Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing / J.C. Rodríguez-Cabello, I.G. De Torre, A. Ibañez-Fonseca [et al.] // *Advanced drug delivery reviews.* – 2018. – Vol. 129. – P. 118–33.

75. Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations / J. Liu, Q. Song, W. Yin [et al.] // *Exploration (Beijing).* – 2024. – Vol. 5(1). – P.20230078.

76. Biocompatible and thermoresistant hydrogels based on collagen and chitosan / P. Sanchez-Cid, M. Jimenez-Rosado, J.F. Rubio-Valle [et al.] // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14(2). – P. 272.

77. Bioengineered uterine tissue supports pregnancy in a rat model / M. Hellström, J.M. Moreno-Moya, S. Bandstein [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2016. – Vol. 106. – P.487–96.

78. Biological scaffold as potential platforms for stem cells: Current development and applications in wound healing / J.Y. Xiang, L. Kang, Z.M. Li [et al.] // *World Journal of Stem Cells*. – 2024. – Vol. 16. – №. 4. – P. 334.

79. Biological scaffolds for abdominal wall repair: future in clinical application? / A. Costa, S. Adamo, F. Gossetti [et al.] // *Materials*. – 2019. – Vol. 12(15). – P. 2375.

80. Biomaterials based on marine resources for 3D bioprinting applications / Y. Zhang, D. Zhou, J. Chen [et al.] // *Marine drugs*. – 2019. – Vol. 17. – № 10. – P. 555–9.

81. Biomaterials to enhance stem cell transplantation / B.N. Kharbikar, P. Mohindra, T.A. Desai // *Cell Stem Cell*. – 2022. – Vol. 29(5). – P. 692–721.

82. Biomimetic hydrogel derived from decellularized dermal matrix facilitates skin wounds healing / Y. Yu, H. Xiao, G. Tang // *Mater Today Bio*. – 2023. – 21. – P.100725.

83. Biomimetic scaffolds loaded with mesenchymal stem cells (MSCs) or MSC-derived exosomes for enhanced wound healing / A. Ghasempour, H. Dehghan, M. Mahmoudi [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2024. – Vol.15. – P. 406.

84. Biopolymers: an inclusive review / G.I. Edo, W. Ndudi, A. M. Ali [et al.] // *Hybrid Advances*. – 2025. – Vol. 9. – P. 100418.

85. Bioprinting of cartilage with bioink based on high-concentration collagen and chondrocytes / E.E. Beketov, E.V. Isaeva, N.D. Yakovleva [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22(21). – P. 11–51.

86. Bonato, P. Replace or regenerate? Diverse approaches to biomaterials for treating corneal lesions / P. Bonato, A. Bagno // *Biomimetics*. – 2024. – Vol. 9(4). – P. 202.

87. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives

for large bone defects management / G. Fernandez de Grado, L. Keller, Y. Idoux-Gillet [et al.] // *J. Tissue Eng.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2041731418776819.

88. Buenafe A.A. Lateral release in the repair of large ventral hernia / A.A. Buenafe, A. Lee-Ong // *Annals of laparoscopic and endoscopic surgery.* – 2019. – Vol. 4. – P. 24–33.

89. Cady, E. Micropatterning decellularized ECM as a bioactive surface to guide cell alignment, proliferation, and migration / E. Cady, J.A. Orkwis, R. Weaver // *Bioengineering.* – 2020. – Vol. 79(3). – P. 102.

90. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment / H. Harjunpää, M. Lloret Asens, C. Guenther [et al.] // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1078.

91. Chemical decellularization methods and its effects on extracellular matrix / A.H.A. Zahmati, R. Alipoor, A.R. Shahmirzadi [at al.] // *Internal Medicine and Medical Investigation Journal.* – 2017. – Vol. 2(3). – P. 76–83.

92. Chitosan based hydrogels and their use in medicine / G.K. Abilova, D.N. Makhayeva, G.S. Irmukhametova [et al.] // *Chemical Bulletin of Kazakh National University.* – 2020. – Vol. 97(2). – P. 16–28.

93. Chitosan immunomodulation: insights into mechanisms of action on immune cells and signaling pathways / M.Ghattas, G.Dwivedi, A. Chevrier [et al.] // *RSC Adv.* – 2025. – Vol. 15(2). – P. 896–909.

94. Clinical applications of acellular dermal matrices: a review / K. Petrie, C.T. Cox, B.C. Becker [et al.] // *Scars, burns & healing.* – 2022. – Vol. 8. – P. 20595131211038313.

95. Cloning, expression and purification of human PDGF-BB gene in *Escherichia coli*: New approach in PDGF-BB protein production / Y. Ghasemi, M.B. Ghoshoon, M. Taheri [et al.] // *Gene Reports.* – 2020. – Vol. 19. – P. 100653.

96. Collagen extraction process / M.M. Schmidt, R.C. Dornelles, R.O. Mello [et al.] // *International Food Research Journal.* – 2016. – Vol. 23. – P. 913–22.

97. Collagen matricryptin promotes cardiac function by mediating scar formation / G.A. Grilo, S.N. Cakir, P.R. Shaver [et al.] // *Life Sci.* 2023. – Vol. 321. – P.121598.

98. Collagen-based nanoparticles as drug delivery system in wound healing applications / K. Kusnadi, Y. Herdiana, E. Rochima [et al.] // *Int J Nanomedicine*. – 2024. – Vol. 19. – P. 11321–341.

99. Collagen-based wound dressings: innovations, mechanisms, and clinical applications / A. Alberts, A.G. Bratu, A.G. Niculescu [et al.] // *Gels*. – 2025. – Vol. 11(4). – P. 271.

100. Comparative analysis of the skin decellularization methods / M. Olga, R. Doina, C. Adrian [et al.] // *The Moldovan Medical Journal*. – 2021. – Vol. 64(2). – P. 79–86.

101. Comparison of extracellular matrix enrichment protocols for the improved characterization of the skin matrisome by mass spectrometry / M. Dussoyer, A. Page, F. Delolme [et al.] // *Journal of Proteomics*. – 2022. – Vol. 251. – P. 104–97.

102. Comparison of Permacol™ and Strattice™ for the repair of abdominal wall defects / K.E. Mulier, A.H. Nguyen, J.P. Delaney [et al.] // *Hernia*. – 2011. – Vol. 15. – P. 315–19.

103. Comparison of the efficacy of silver-based antimicrobial burn dressings in a porcine model of burn wounds / J.A. Ross, N. Allan, M. Olson [et al.] // *Burns*. – 2020. – Vol. 46(7). – P. 1632–40.

104. Comprehensive review of hydrogel synthesis, characterization, and emerging applications / A.S. Priya, R. Premanand, I. Ragupathi [et al.] // *Journal of Composites Science*. – 2024. – Vol. 8(11). – P. 457.

105. Comprehensive review on the role of collagen in health and disease / N. S. Pillai, A. K. Khan, N. Mehrotra [et al.] // *Biotech Res Asia*. – 2024. – Vol.21(4). – P. 1329–47

106. Corr, D.T. Biomechanics of scar tissue and uninjured skin / D.T. Corr, D.A. Hart // *Advances in Wound Care*. – 2013. – Vol. 2(2). – P. 37–43.

107. Costa, F. Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair / F. Costa, R. Silva, A. Boccaccini // *Peptides and proteins as biomaterials for tissue regeneration and repair*. – 2018. – P. 175–204.

108. Cramer, M.C. Extracellular matrix-based biomaterials and their influence

upon cell behavior / M.C. Cramer, S.F. Badylak // *Annals of biomedical engineering*. – 2020. – Vol. 48(7). – P. 2132–53.

109. 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. 3233–43.

110. Cui, H. Progress in developing decellularized bioscaffolds for enhancing skin construction / H. Cui, Y. Chai, Y. Yu // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2019. – Vol. 107(8). – P. 1849–59.

111. Current Modalities in Soft-Tissue Reconstruction and Vascularized Adipose Engineering / J.C. El-Mallah, C. Wen, O. Waldron [et al.] // *Biomolecules*. – 2025. – Vol. 15(6). – P.780.

112. Davies, M.J. Protein oxidation and peroxidation / M.J. Davies // *Biochemical Journal*. – 2016. – Vol. 473(7). – P. 805–25.

113. De Castro Brás, L.E. Extracellular matrix-derived peptides in tissue remodeling and fibrosis / L.E. de Castro Brás, N.G. Frangogiannis // *Matrix Biol*. – 2020. – Vol. 91–92. – P. 176–87.

114. Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery / P.B. Milan, A. Pazouki, M.T. Joghataei [et al.] // *Methods*. – 2020. – Vol. 171. – P. 62–7.

115. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering / R.H. Fu, Y.C. Wang, S.P. Liu [et al.] // *Cell transplantation*. – 2014. – Vol. 23(4-5). – P. 621–30.

116. Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: evaluation, modification, and application methods / A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh [et al.] // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 805299.

117. Decellularization of the mouse ovary: comparison of different scaffold generation protocols for future ovarian bioengineering / A.B. Alshaikh, A.M. Padma, M. Dehlin [et al.] // *J. Ovarian Res*. – 2019. – Vol. 12(1). – P. 58–9.

118. Decellularization of various tissues and organs through chemical methods /

T.S. Tabatabai , M. Salehi , L. Rezakhani [et al.] // *Tissue and Cell*. – 2024. – Vol. 91. – P. 102573.

119. Decellularization systems and devices: state-of-the-art / D. Choudhury, M. Yee, Z.L.J. Sheng [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2020. – Vol. 15. – P. 51–9.

120. Decellularization techniques pave the way for tissue engineering and regenerative medicine: a narrative review / J. Zhao, T. Chao, M. Zhou [et al.] // *Regenerative Medicine Reports*. – 2024. – Vol. 1(2). – P. 117–30.

121. Decellularized brain matrix enhances macrophage polarization and functional improvements in rat spinal cord injury / J.Y. Hong, Y. Seo, G. Davaa [et al.] // *Acta Biomater*. – 2020. – Vol.101. – P.357-71.

122. Decellularized diaphragmatic muscle drives a constructive angiogenic response *in vivo* / M.E. Alvarèz Fallas, M. Piccoli [et al.] // *Franzin Int J Mol Sci*. – 2018. – Vol. 19(5). – P. 1319.

123. Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: advances, challenges and clinical prospects / A.A. Golebiowska, J.T. Intravaia, V.M. Sathe [et al.] // *Bioactive Materials*. – 2024. – Vol. 32. – P. 98–123.

124. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration / C. Liu, M. Pei, Q. Li [et al.] // *Frontiers of Medicine*. – 2022. – Vol. 16(1). – P. 56–82.

125. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering / X. Zhang, X. Chen, H. Hong [et al.] // *Bioact Mater*. – 2021. – Vol. 10. – P. 15–31.

126. Decellularized extracellular matrix: new promising and challenging biomaterials for regenerative medicine / M.Brown, J. Li, C. Moraes [et al.] // *Biomaterials*. – 2022. – Vol. 289. – P. 121786.

127. Decellularized human amniotic membrane: more is needed for an efficient dressing for protection of burns against antibiotic-resistant bacteria isolated from burn patients / M. Gholipourmalekabadi, M. Bandehpour, M. Mozafari [et al.] // *Burns*. – 2015. – Vol. 41(7). – P. 1488–97.

128. Decellularized skin/adipose tissue flap matrix for engineering vascularized

composite soft tissue flaps / Q. Zhang, J.A. Johnson, L.W. Dunne [et al.] // *Acta Biomater.* – 2016. – Vol. 35. – P.166–84

129. Deeken C.R., Lake S.P. Mechanical properties of the abdominal wall and biomaterials utilized for hernia repair / C.R. Deeken, S.P. Lake // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* – 2017. – Vol. 74. – P. 411–27.

130. Degradation of intracellular TGF- β 1 by PROTACs efficiently reverses M2 macrophage induced malignant pathological events / Y. Feng, H. Su, Y. Li [et al.] // *Chemical Communications.* – 2020. – Vol. 56(19). – P. 2881–4.

131. Demineralized bone matrix for repair and regeneration of maxillofacial defects: A narrative review / J. Ren, Z. Li, W. Liu [et al.] // *J Dent.* – 2024. – Vol.143. – P.104899.

132. Development of 3D printable gelatin methacryloyl/chondroitin sulfate/hyaluronic acid hydrogels as implantable scaffolds / C.A. Murphy, A. Serafin, M.N. Collins [et al.] // *Polymers.* – 2024. – Vol. 16(14). – P. 1958.

133. Development of hydrogels for regenerative engineering / X. Guan, M. Avci-Adali, E Alarçin [et al.] // *Biotechnology journal.* – 2017. – Vol. 12(5). – P. 1600394.

134. Dilek, Ö.F. Acellular dermal matrices in reconstructive surgery; history, current implications and future perspectives for surgeons / Ö.F. Dilek, K.Z. Sevim, O.N. Dilek // *World J Clin Cases.* – 2024. – Vol. 12(35). – P. 6791–807.

135. Diller, R.B. The role of the extracellular matrix (ECM) in wound healing: a review / R.B. Diller, A.J. Tabor // *Biomimetics.* – 2022. – Vol. 7(3). – P. 87.

136. Diniz-Fernandes, T. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and (MMP-8) gene polymorphisms promote increase and remodeling of the collagen III and V in posterior tibial tendinopathy / T. Diniz-Fernandes, A.L. Godoy-Santos, M.C. Santos // *Histol Histopathol.* – 2018. – Vol. 33(9). – P. 929–36.

137. Directed evolution of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 for selective inhibition of MMP-9 exploits catalytic and fibronectin domain interactions / A. Shoari, M.A. Coban, A. Hockla [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2025. – Vol. 301(6). – P.110258.

138. Discovering design principles of collagen molecular stability using a genetic algorithm, deep learning, and experimental validation / E. Khare, C. Yu, C. Gonzalez

Obeso [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2022. – Vol.119. – № 40. – P. e2209524119.

139. Ebhodaghe, S.O. Hydrogel-based biopolymers for regenerative medicine applications: a critical review / S.O. Ebhodaghe // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. – 2022. – Vol. 71(3). – P. 155–72.

140. Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility / N. Li, Y. Li, D. Gong [et al.] // Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery. – 2018. – Vol. 26(5). – P. 768–76.

141. Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers / A.M. Coenen, K.V. Bernaerts, J.A. Harings [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2018. – Vol. 79. – P. 60–82.

142. Endogenous modulation of extracellular matrix collagen during scar formation after myocardial infarction / D. Schumacher, A. Curaj, M. Staudt [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23(23). – P. 14571.

143. Endostatin in renal and cardiovascular diseases / M. Li, Z. Popovic, C. Chu [et al.] // Kidney Dis (Basel). – 2021. – Vol. 7(6). – P. 468–81.

144. Endothelial response to pathophysiological stress / Z. Peng, B. Shu, Y. Zhang [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2019. – Vol. 39(11). – P. e233–e43.

145. Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing / N. Annabi, D. Rana, E.S. Sani [et al.] // Biomaterials. – 2017. – Vol. 139. – P. 229–43.

146. Engineering bioactive self-healing antibacterial exosomes hydrogel for promoting chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration / C. Wang, M. Wang, T. Xu [et al.] // Theranostics. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 65–85.

147. Enhanced decellularization technique of porcine dermal ECM for tissue engineering applications / R.D. Ventura, A.R. Padalhin, C.M. Park, B.T. Lee // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – Vol. 104. – P. 109841.

148. Enhanced wound healing in diabetic rats by nanofibrous scaffolds mimicking the basket weave pattern of collagen fibrils in native skin / L. Sun, W. Gao, X. Fu [et al.]

// Biomater Sci. – 2018 – Vol. 6. – P. 340–49.

149. Epidermal keratinocytes initiate wound healing and pro-inflammatory immune responses following percutaneous schistosome infection / C.D. Bourke, C.T. Prendergast, D.E. Sanin [et al.] // International journal for parasitology. – 2015. – Vol. 45(4). – P. 215–24.

150. Evaluation methods for mechanical biocompatibility of hernia repair meshes: respective characteristics, application scope and future perspectives / W. He, G. Cao, X. Gan [et al.] // Journal of materials research and technology. – 2021. – Vol. 13. – P. 1826–40.

151. Evaluation of bone regeneration potential of injectable extracellular matrix (ECM) from porcine dermis loaded with biphasic calcium phosphate (BCP) powder / R.D. Ventura, A.R. Padalhin, B. Kim [et al.] // Materials Science and Engineering. – 2020. – Vol. 110. – P. 110663.

152. Eweida, A.M. Naturally occurring extracellular matrix scaffolds for dermal regeneration: do they really need cells? / A.M. Eweida, M.K. Marei // Biomed Res Int. 2015. -Vol.2015. – P.839694

153. Experimental extracellular matrix of the xenoperitoneum: comprehensive assessment of a new biological material for plastic surgery of anterior abdominal wall defects / L.V. Maxyatkina, R.M. Badyrov, N.T. Abatov [et al.] // Bulletin of experimental biology and medicine. – 2021. – Vol. 170(3). – P. 364–67.

154. Fabrication and *in vitro* characterization of electrochemically compacted collagen/sulfated xylorhamnoglycuronan matrix for wound healing applications / L. Kang, X. Liu, Z. Yue [et al.] // Polymers. – 2018 – Vol. 10. – P. 1–13.

155. Farag, M. M. Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications / M. M. Farag // Journal of Materials Science. – 2023. – Vol. 58(2). – P. 527–558.

156. Farahani, M. Wound healing: from passive to smart dressings / M. Farahani, A. Shafiee // Advanced Healthcare Materials. – 2021. – Vol. 10(16). – P. 2100477.

157. Feng, W. Tailoring the swelling-shrinkable behavior of hydrogels for biomedical applications / W. Feng, Z. Wang // Advanced Science. – 2023. – Vol. 10(28).

– P. 2303326.

158. Fibronectin deposition participates in extracellular matrix assembly and vascular morphogenesis / A. Hielscher, K. Ellis, C. Qiu [et al.] // *PloS one*. – 2016. – Vol. 11(1). – P. e0147600.

159. Fish scale collagen preparation, characterization and its application in wound healing / M. Shalaby, M. Agwa, H. Saeed [et al.] // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2020. – Vol. 28(1). – P. 166–78.

160. Functional and morphological comparison of extracellular matrices derived from porcine small intestinal submucosa and porcine dermis to support rabbit uterus regeneration / P. Niespielak, K. Pazdzior-Czapula, A. Czerski [et al.] // *J Physiol Pharmacol*. – 2021. – Vol. 72(2). – P. e10.26402.

161. Gahlawat, S. Designing collagens to shed light on the multi-scale structure–function mapping of matrix disorders / S. Gahlawat, V. Nanda, D. I. Shreiber // *Matrix Biology Plus*. – 2024. – Vol. 21. – P. 100139.

162. Gardeazabal, L. Elastin and collagen fibres in cutaneous wound healing / L. Gardeazabal, A. Izeta // *Exp Dermatol*. – 2024. – Vol. 33. – P. e15052.

163. Gaspar-Pintiliescu, A. Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review / A. Gaspar- Pintiliescu, A.M. Stanciuc, O. Craciunescu // *International journal of biological macromolecules*. – 2019. – Vol. 138. – P. 854–65.

164. Gelatin-based biomaterials and gelatin as an additive for chronic wound repair / H. Cao, J. Wang, Z. Hao [et al.] // *Front Pharmacol*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1398939.

165. Gelatin-based hybrid scaffolds: promising wound dressings / S.P. Ndlovu, K. Ngece, S. Alven [et al.] // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13(17). – P. 2959.

166. Gelatin-based hydrogels blended with gellan as an injectable wound dressing / Y. Zheng, Y. Liang, D. Zhang [et al.] // *ACS omega*. – 2018. – Vol. 3. – № 5. – P. 4766–75.

167. Gilpin, A. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications / A. Gilpin, Y. Yang // *Biomed. Res. Int*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 9831534.

168. Gómez-Gil, V. Biomaterial implants in abdominal wall hernia repair: a review on the importance of the peritoneal interface / V. Gómez-Gil, G. Pascual, J.M. Bellón // *Processes*. – 2019. – Vol. 7(2). – P. 105.

169. Gun'ko, V.M. Properties of water bound in hydrogels / V.M. Gun'ko, I.N. Savina, S.V. Mikhalovsky // *Gels*. – 2017. – Vol. 3(4) – P. 37.

170. Halper, J. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Elastin, Fibrillins, Fibulins, Matrilins, Tenascins and Thrombospondins / J. Halper // *Adv Exp Med Biol*. – 2021. – Vol. 1348. – P. 105–26.

171. Harma, B. The efficacy of five different wound dressings on some histological parameters in children with partial-thickness burns/ B. Harma, M. Gül, M. Demircan // *Journal of Burn Care & Research*. – 2020. – Vol. 41(6). – P.1179–87.

172. Heath, D.E. A review of decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative engineering applications / D.E. Heath // *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 5(2). – P. 155–66.

173. Hinderer, S. ECM and ECM-like materials – biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy / S. Hinderer, S.L. Layland, K. Schenke-Layland // *Advanced drug delivery reviews*. – 2016. – Vol. 97. – P. 260–69.

174. 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 // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2023. – Vol. 111(1). – P. 85–94.

175. Human acellular dermal matrix in reconstructive surgery – a review / M. Gierak, W. Labus, D. Kitala [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10(11). – P. 2870.

176. Human epidermal keratinocytes and human dermal fibroblasts interactions seeded on gelatin hydrogel for future application in skin *in vitro* 3- dimensional model / S. Tahri, M. Maarof, S. Masri [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol*. – 2023. – Vol. 11. – P. 200618.

177. Human-scale lung regeneration based on decellularized matrix scaffolds as a biologic platform / K.Ohata, H.C. Ott. // *Surg Today*. – 2020. – Vol.50(7). – P.633–43.

178. Hussey, G.S. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine

/ G.S. Hussey, J.L. Dziki, S.F. Badylak // *Nature Reviews Materials*. – 2018. – Vol. 3(7). – P. 159–73.

179. Hyaluronic acid – based wound dressings: A review / M. F. Graça, S.P. Miguel, C.S. Cabral [et al.] // *Carbohydrate polymers*. – 2020. – Vol. 241. – P. 116364.

180. Hyaluronic acid: redefining its role / G. Abatangelo, V. Vindigni, G. Avruscio [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9(7). – P. 1743.

181. Hydrogel from acellular porcine adipose tissue accelerates wound healing by inducing intradermal adipocyte regeneration / Q.W. Tan, S.L. Tang, Y. Zhang [et al.] // *J Invest Dermatol*. – 2019. – Vol. 139 (2). – P. 455–63.

182. Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: structural, mechanical and biological characteristics / M.N. Egorikhina, D.Y. Aleynik, Y.P. Rubtsova [et al.] // *Bioactive Materials*. – 2019. – Vol. 29. – P. 334–45.

183. Hydrogels as antibacterial biomaterials / W. Xu, S. Dong, Y. Han [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – Vol. 24. – № 8. – P. 843–54.

184. Hydrogels as drug delivery systems: a review of current characterization and evaluation techniques / M. Vigata, C. Meinert, D.W. Hutmacher [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12(12). – P. 1188.

185. Identification of active sequences in human laminin $\alpha 5$ G domain / J. Kumai, Y. Yamada, K. Hamada [et al.] // *Journal of Peptide Science*. – 2019. – Vol. 25(12). – P. e3218.

186. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine / M. Kasravi, A. Ahmadi, A. Babajani [et al.] // *Biomaterials research*. – 2023. – Vol. 27(1). – P. 10.

187. Impact of vimentin on regulation of cell signaling and matrix remodeling / Z. Ostrowska-Podhorodecka, I. Ding, M. Norouzi [et al.] // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 869069.

188. Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions / B. Struecker, A. Butter, K. Hillebrandt [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2017. – Vol. 11(2). – P. 531–41.

189. Inflammation after ischemic stroke: the role of leukocytes and glial cells / J.Y. Kim, J. Park, J.Y. Chang [et al.] // *Experimental neurobiology*. – 2016. – Vol. 25(5). – P. 241.

190. Inflammation in wound healing and pathological scarring / Y.-K. Hong, Y.-H. Chang, Y.-C. Lin [et al.] // *Adv. Wound Care*. – 2023. – Vol.12. – P. 288–300.

191. Influence of pH on extracellular matrix preservation during lung decellularization / T. Tsuchiya, J.L. Balestrini, J. Mendez [et al.] // *Tissue Eng. Part C: Methods*. – 2014. – Vol. 20(12). – P. 1028–36.

192. Injectable hybrid poly (ϵ -caprolactone)-b-poly (ethylene glycol)-b-poly (ϵ -caprolactone) porous microspheres/alginate hydrogel cross-linked by calcium gluconate crystals deposited in the pores of microspheres improved skin wound healing / J. Liao, Y. Jia, B. Wang, K. Shi [et al.] // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. – 2018. – Vol. 4. – № 3. – P. 1029–36.

193. Injectable methylcellulose hydrogel containing silver oxide nanoparticles for burn wound healing / M.H. Kim, H. Park, H.C. Nam [et al.] // *Carbohydr Polym*. – 2018. – Vol. 181. – P. 579–86.

194. Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: trajectory and recent advancements / P. Kolimi, S. Narala, D. Nyavanandi [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11(15). – P. 2439.

195. Integrin and dystroglycan compensate each other to mediate laminin-dependent basement membrane assembly and epiblast polarization / S. Li, Y. Qi, K. McKee [et al.] // *Matrix Biology*. – 2017. – Vol. 57. – P. 272–84.

196. Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases / G. Cavalli, S. Colafrancesco, G. Emmi [et al.] // *Autoimmun Rev*. – 2021. – Vol.20(3). – P.102763.

197. Interleukin 6 function in the skin and isolated keratinocytes is modulated by hyperglycemia / E.G. Lee, L.R. Lockett-Chastain, K.N. Calhoun [et al.] // *Journal of immunology research*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 5087847.

198. Ishii, M. Imaging of inflammation and regeneration: a novel trend dissecting dynamic features of biological phenomena *in vivo* / M. Ishii // *Inflamm Regen*. – 2017. –

Vol. 37. – P. 26.

199. Jabłońska-Trypuć, A. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs / A. Jabłońska-Trypuć, M. Matejczyk, S. Rosochacki // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. – 2016. – Vol. 31(s1). – P. 177–83.

200. Jadhav, K. Peptide–drug conjugates as next-generation therapeutics: exploring the potential and clinical progress / K. Jadhav, A. Abhang, E.B. Kole // *Bioengineering*. – 2025. – Vol. 12 (5). – P. 481.

201. Ji, S. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs / S. Ji, M. Guvendiren // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2017. – Vol. 5. – P. 23–36.

202. Keane, T.J. The host response to allogeneic and xenogeneic biological scaffold materials / T.J. Keane, S.F. Badylak // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2015. – Vol. 9(5). – P. 504–11.

203. Kechagia, J.Z. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment / J.Z. Kechagia, J. Ivaska, P. Roca-Cusachs // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. – Vol. 20(8). – P. 457–73.

204. Kim, J.I. Harnessing nanotopography of PCL / collagen nanocomposite membrane and changes in cell morphology coordinated with wound healing activity / J.I. Kim, C.S. Kim // *Mater Sci Eng C*. – 2018. – Vol. 91. – P. 824–37.

205. Kosaric, N. Stem cell therapies for wound healing / N. Kosaric, H. Kiwanuka, G.C. Gurtner // *Expert opinion on biological therapy*. – 2019. – Vol. 19(6). – P. 575–585.

206. Laparoscopic versus open umbilical or paraumbilical hernia repair: a systematic review and meta-analysis / S. Hajibandeh, S. Hajibandeh, A. Sreh [et al.] // *Hernia*. – 2017. – Vol. 21(6). – P. 905–16.

207. Liver bioengineering: recent trends/advances in decellularization and cell sheet technologies towards translation into the clinic / M. Asadi, M. Khalili, H. Lotfi [et al.] // *Life Sci*. – 2021. – Vol. 276. – P. 119373.

208. Lohrasbi, S. Collagen/cellulose nanofiber hydrogel scaffold: physical, mechanical and cell biocompatibility properties / S. Lohrasbi // *Cellulose*. – 2020. – Vol.

27(2). – P. 927–40.

209. Long-term outcomes of seromas after ventral hernia repair: a propensity score-matched analysis of the Abdominal Core Health Quality Collaborative / B.T. Miller, K.F. Baier, S.J. Zolin [et al.] // *Hernia*. – 2022. – P. 1–6.

210. Macrophage and fibroblast interactions in biomaterial-mediated fibrosis / C.E. Witherel, D. Ababayehu, T.H. Barker [et al.] // *Adv Healthc Mater*. – 2019. – Vol. 8(4). – P. 1801451

211. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials / Z. Sheikh, P.J. Brooks, O. Barzilay [et al.] // *Materials*. – 2015. – V. 8(9). – P. 5671–701.

212. Mak, K.M. Basement membrane type IV collagen and laminin: an overview of their biology and value as fibrosis biomarkers of liver disease / K.M. Mak, R. Mei // *The Anatomical Record*. – 2017. – Vol. 300(8). – P. 1371–90.

213. Manka, S.W. Structural studies of the MMP-3 interaction with triple-helical collagen introduce new roles for the enzyme in tissue remodelling/ S.W. Manka, D. Bihan, R.W. Farndale // *Sci Rep*. – 2019. – Vol. 9. – P. 18785.

214. Manon-Jensen, T. Collagen-mediated hemostasis / T. Manon-Jensen, N.G. Kjeld, M.A. Karsdal // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2016. – Vol. 14(3). – P. 438–48.

215. Marinho, A. Hyaluronic acid: a key ingredient in the therapy of inflammation / A. Marinho, C.Nunes, S. Reis // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – P. 1518.

216. Martin, K.E. Macrophage phenotypes in tissue repair and the foreign body response: Implications for biomaterial-based regenerative medicine strategies / K.E. Martin, A.J. García // *Acta Biomater*. – 2021. – Vol. 133. – P.4–16.

217. Marzec, E. Efficacy evaluation of electric field frequency and temperature on dielectric properties of collagen cross-linked by glutaraldehyde / E. Marzec, K. Pietrucha // *Colloids Surf B*. – 2018. – Vol. 162. – P. 345–50.

218. Mechanically active small intestinal submucosa hydrogel for accelerating chronic wound healing / X.Y. Chen, Y. Wang, S.Q. Ma [et al.] // *J. Mater. Chem. B*. – 2022. – Vol. 10. – P. 6279–86.

219. Mechanisms of action of molecules with anti-TNF-alpha activity on intestinal barrier inflammation: A systematic review protocol / M.S.R. Lima, V.C.O. de Lima, G. Piuvezam [et al.] // *Medicine*. – 2019. – Vol. 98(39). – P. e17285.

220. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease / T. A. Wynn, T.R. Ramalingam // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol.18(7). – P.1028–40.

221. Mechanisms underlying heterologous skin scaffold-mediated tissue remodeling / K. Mimura, A. Moraes, A. Miranda [et al.] // *Sci Rep*. – 2016. – Vol. 6. – P. 35074.

222. Mesenchymal stem cells regenerate diabetic foot ulcers: a review article / J. Verdi, S. Shirian, M. Saleh [et al.] // *World J Plast Surg*. – 2022. Vol. 11. – P.12–22.

223. Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes / A.R. Gillies, L.R. Smith, R.L. Lieber [et al.] // *Tissue engineering. Part C, Methods*. – 2011. – Vol. 17(4). – P. 383–9.

224. Miller, E.J. Collagen types: structure, distribution, and functions / J. Miller // *In Collagen*. – 2018. – P. 139–56.

225. Mimicking the hierarchical organization of natural collagen: toward the development of ideal scaffolding material for tissue regeneration / L. Salvatore, N. Gallo, M.L. Natali [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2021. – Vol. 9. – P. 644595.

226. Mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications / K. Varaprasad, G.M. Raghavendra, T. Jayaramudu [et al.] // *Materials Science and Engineering*. – 2017. – Vol. 79. – P. 958–71.

227. Mitura, S. Biopolymers for hydrogels in cosmetics / S. Mitura, A. Sionkowska, A. Jaiswal // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2020. – Vol. 31(6). – P. 1–14.

228. Modification of collagen for biomedical applications: a review of physical and chemical methods / X. Yu, C. Tang, S. Xiong [et al.] // *Current Organic Chemistry*. – 2016. – Vol. 20. – № 17. – P. 1797–812.

229. Modifying hernia mesh design to improve device mechanical performance and promote tension-free repair / M.M. Ibrahim, L.P. Poveromo, R.R. Glisson [et al.] // *Journal of Biomechanics*. – 2018. – Vol. 71. – P. 43–51.

230. Moffat, D. Decellularization for the retention of tissue niches / D. Moffat, K. Ye, S. Jin // *J Tissue Eng.* – 2022. – Vol. 13. – P. 20417314221101151.

231. Morris, A.H. The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials / A.H. Morris, D.K. Stamer, T.R. Kyriakides // *In Seminars in immunology.* – 2017. – Vol. 29. – P. 72–91.

232. Nandhini, J. Nanomaterials for wound healing: Current status and futuristic frontier / J. Nandhini, E. Karthikeyan, S. Rajeshkumar // *Biomedical Technology.* – 2024. – Vol. 6. – P. 26–45.

233. Natural and synthetic polymers in burn wound healing / S. Zamani, A. Ehterami, A. Vaez [et al.] // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* – 2025. – P. 1–66.

234. Natural biopolymer scaffold for meniscus tissue engineering / Y. Peng, M. Lu, Z. Zhou [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* – 2022. – Vol. 10. – P. 1003484.

235. Natural-based biomaterial for skin wound healing (gelatin vs. collagen): expert review / R. Naomi, H. Bahari, P.M. Ridzuan [et al.] // *Polymers.* – 2021. – Vol. 13. – P. 2319.

236. Nerve repair using decellularized nerve grafts in rat models. A review of the literature / A.B. Lovati, D. D'Arrigo, S. Odella [et al.] // *Front Cell Neurosci.* – 2018. – Vol. 12. – P. 427.

237. Novel decellularization method for tissue slices / M. Narciso, A. Ulldemolins, C. Júnior [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2022. – Vol. 10. – P.832178.

238. Omranifard, M. Combined alloplastic implant and autologous dermis graft for nasal augmentation rhinoplasty in Asians / M. Omranifard // *Aesthetic Plastic Surgery.* – 2014. – Vol. 38(5). – P. 876–77.

239. Orchestration of mesenchymal stem/stromal cells and inflammation during wound healing. / M. Zhu, L. Cao, S. Melino [et al.] // *Stem Cells Transl. Med.* – 2023. – Vol.12. – P. 576–87.

240. Overview of silk fibroin use in wound dressings / M. Farokhi, F. Mottaghtalab, Y. Fatahi [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2018. – Vol. 36(9). – P. 907–22.

241. Patel, S. Biomarkers for wound healing and their evaluation / S. Patel, A. Maheshwari, A. Chandra // *Journal of Wound Care*. – 2016. – Vol. 25(1). – P. 46–55.

242. Patterns of recurrence and mechanisms of failure after open ventral hernia repair with mesh / J.A. Warren, S.P. McGrath, A.L. Hale [et al.] // *The American Surgeon*. – 2017. – Vol. 83(11). – P. 1275–82.

243. PEGylated graphene oxide-mediated quercetin-modified collagen hybrid scaffold for enhancement of MSCs differentiation potential and diabetic wound healing / J. Chu, P. Shi, W. Yan [et al.] // *Nanoscale*. – 2018 – Vol. 10. – P. 9547–60.

244. Pei, Y.A. The essential anti-angiogenic strategies in cartilage engineering and osteoarthritic cartilage repair / Y.A. Pei, S. Chen, M. Pei // *Cell Mol Life Sci*. – 2022. – Vol. 79(1). – P. 71.

245. Peluzzo, A.M. Challenging the paradigm: anti-inflammatory interleukins and angiogenesis / A.M. Peluzzo, M.V. Autieri // *Cells*. – 2022. – Vol. 11(3). – P. 587.

246. Peptide-based nanoparticles mimic fibrillogenesis of laminin in tumor vessels for precise embolization / K. Zhang, P.P. Yang, P.P. He [et al.] // *ACS nano*. – 2020. – Vol. 14(6). – P. 7170–80.

247. Photo-inspired antibacterial activity and wound healing acceleration by hydrogel embedded with Ag/Ag@ AgCl/ZnO nanostructures / C. Mao, Y. Xiang, X. Liu [et al.] // *ACS nano*. – 2017. – Vol. 11. – № 9. – P. 9010–21.

248. Platelet lysate and non-healing ulcers/ A. Lykov, M. Surovtseva, N. Bondarenko // *Biointerface Res. Appl. Chem*. – 2021. – Vol. 11. – P. 12267–74.

249. Preparation and use of decellularized extracellular matrix for tissue engineering / A.D. McInnes, M.A.J. Moser, X. Chen // *Journal of functional biomaterials*. – 2022. – Vol. 13(4). – P. 240.

250. Preparation, physico-biochemical characterization, and proteomic analysis of highly transparent corneal extracellular matrices for lamellar keratoplasty and tissue-engineered cornea construction / Y. Hashimoto, J. Negishi, S. Funamoto [et al.] // *Materials Today Bio*. – 2024. – Vol. 28. – P. 101241.

251. Probing the effect of glycosaminoglycan depletion on integrin interactions with collagen I fibrils in the native extracellular matrix environment / J. Roth,

C.L. Hoop, J.K. Williams [et al.] // *Protein Sci.* – 2023. – Vol. 32(1). – P. e4508.

252. Qiao, S. Crosslinking strategies of decellularized extracellular matrix in tissue regeneration / S.Qiao, T.Peijie, J.Nan // *J Biomed Mater Res A.* – 2024. Vol.112(5). – P.640–71.

253. Rabbani, M. Contribution of physical methods in decellularization of animal tissues / M. Rabbani, N. Zakian, N. Alimoradi // *Journal of Medical Signals and Sensors.* – 2021. – Vol. 11(1). – P. 1–11.

254. Rahimnejad, M. Biomaterials and tissue engineering for scar management in wound care / M. Rahimnejad, S. Derakhshanfar, W. Zhong // *Burns & trauma.* – 2017. – Vol. 5(1). – P. 1–9.

255. Rathna, R.P. Advancements in wound healing: integrating biomolecules, drug delivery carriers, and targeted therapeutics for enhanced tissue repair / R.P. Rathna, M. Kulandhaivel // *Archives of Microbiology.* – 2024. – Vol. 206(4). – P. 199.

256. Recellularization of native tissue derived acellular scaffolds with mesenchymal stem cells / E. Ahmed, T. Saleh, M. Xu // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – P. 1787.

257. Recent advances in cellulose-based structures as the wound-healing biomaterials: a clinically oriented review / M.F. Abazari, S. Gholizadeh, S.Z. Karizi [et al.] // *Applied Sciences.* – 2021. – Vol. 11(17). – P. 7769.

258. Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications / W. Peng, D. Li, K. Dai [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2022. – Vol. 208. – P. 400–8.

259. Regeneration of partially decellularized tracheal scaffolds in a mouse model of orthotopic tracheal replacement / L. Liu, S. Dharmadhikari, K.M. Shontz [et al.] // *J Tissue Eng.* – 2021. – Vol. 12. – P.20417314211017417.

260. Regenerative immunology: the immunological reaction to biomaterials / P. Cravedi, S. Farouk, A. Angeletti [et al.] // *Transplant International.* – 2017. – Vol. 30(12). – P. 1199–208.

261. Regenerative medicine technologies applied to transplant medicine. An update / A. Petrosyan, F. Montali, A. Peloso [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2022.

– Vol. 10 – P. 1015628.

262. Retro-rectus placement of bioabsorbable mesh improves patient outcomes / J.E. Cho, M.C. Helm, J.H. Helm [et al.] // *Surgical endoscopy*. – 2019. – Vol. 33(8). – P. 2629–34.

263. Ricard-Blum, S. Fragments generated upon extracellular matrix remodeling: biological regulators and potential drugs / S. Ricard-Blum, S.D. Vallet // *Matrix Biol.* – 2019. – Vol. 75-76. – P. 170-89.

264. Rodrigues, F.T. Porcine skin as a source of biodegradable matrices: alkaline treatment and glutaraldehyde crosslinking / F.T. Rodrigues, V.C.A. Martins, A.M.G. Plepis // *Polimeros*. – 2010. – Vol. 20. – P. 25–68.

265. Role of matrix metalloproteinase in wound healing / M. Kandhwal, T. Behl, S. Singh [et al.] // *American journal of translational research*. – 2022. – Vol. 14(7). – P. 4391.

266. Role of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in cardiovascular diseases (Review) / K. Zhang, M. Li, L. Yin [et al.] // *Int J Mol Med*. – 2020. – Vol. 45(5). – P. 1275–93.

267. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in metabolism: insights into health and disease / S. Molière, A. Jaulin, C. L. Tomasetto, N. Dali-Youcef // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, No. 13. – P. 10649.

268. Russell, D.G. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens / D.G. Russell, L. Huang, B.C. Vander Ven // *Nat. Rev. Immunol.* – 2019. – Vol. 19. – P. 291–304.

269. Sack, K.D. The angiotensin-Tie2 pathway in critical illness / K.D. Sack, J.A. Kellum, S.M. Parikh // *Crit Care Clin*. – 2020. – Vol. 36(2). – P. 201–16.

270. Sahana, T.G. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering / T.G. Sahana, P. Rekha // *Molecular biology reports*. – 2018. – Vol. 45(6). – P. 2857–67.

271. Sajith, S. Comparative study of two decellularization protocols on a biomaterial for tissue engineering / S. Sajith // *J Clin Exp Cardiol.* – 2017. – Vol. 08. – P. 1000523.

272. Scaffolds loaded with Dialdehyde chitosan and collagen—their physico-chemical properties and biological assessment / S. Grabska-Zielińska, J.M. Pin, B. Kaczmarek-Szczepańska [et al.] // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14(9). – P. 1818.

273. Senadheera, T.R.L. Sea cucumber derived type I collagen: A Comprehensive Review / T.R.L. Senadheera, D. Dave, F. Shahidi // *Mar Drugs*. – 2020. – Vol. 18(9). – P. 471.

274. Sharifzadeh, G. Biomolecule-responsive hydrogels in medicine / G. Sharifzadeh, H. Hosseinkhani // *Advanced healthcare materials*. – 2017. – Vol. 6(24). – P. 170–7.

275. Shekhter, A.B. Medical applications of collagen and collagen-based materials / A.B. Shekhter, A.L. Fayzullin, M.N. Vukolova [et al.] // *Current medicinal chemistry*. – 2019. – Vol. 26 (3). – P. 506–16.

276. Singh, D. Regulation of collagen I and collagen III in tissue injury and regeneration / D. Singh, V. Rai, D.K. Agrawal // *Cardiol Cardiovasc Med*. – 2023. – Vol. 7(1). – P. 5–16.

277. Single-stage immediate breast reconstruction with acellular dermal matrix after breast cancer: comparative study and evaluation of breast reconstruction outcomes / B. Dueñas-Rodríguez, J. Navarro-Cecilia, C. Luque-López [et al.] // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15(22). – P. 5349.

278. Sionkowska, A. Collagen blended with natural polymers: Recent advances and trends / A. Sionkowska // *Progress in Polymer Science*. – 2021. – Vol. 122. – P. 101452.

279. Skin biomechanics: a potential therapeutic intervention target to reduce scarring / M. Hosseini, J. Brown, K. Khosrotehrani [et al.] // *Burns & trauma*. – 2022. – Vol. 10. – P. tkac036.

280. Skin grafting for dermatologists: past, present, and future / N.M. Bermudez, B.C. Sa, A. Hargis [et al.] // *Current Dermatology Reports*. – 2024. – Vol. 13(2). – P. 47–54.

281. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications / A.W.C. Chua, Y.C. Khoo, B.K. Tan [et al.] // *Burns & trauma*. – 2016. –

Vol. 4. – № 1. – P. 3.

282. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration / E.M. Tottoli, R. Dorati, I. Genta [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12(8). – P.735.

283. Smandri, A. Natural 3D-printed bioinks for skin regeneration and wound healing: A systematic review / A. Smandri, A. Nordin, N.M. Hwei // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – № 8. – P. 17–42.

284. Song, Y. Nonthermal irreversible electroporation to the esophagus: evaluation of acute and long-term pathological effects in a rabbit model / Y. Song, J. Zheng, L. Fan // *Journal of the American Heart Association*. – 2021. – Vol. 10(22). – P. e020731.

285. Spang, M.T. Extracellular matrix hydrogel therapies: *in vivo* applications and development / M.T. Spang, K.L. Christman // *Acta biomaterialia*. – 2018. – Vol. 68. – P. 1–14.

286. Stern, D. Crafting polymeric and peptidic hydrogels for improved wound healing / D. Stern, H. Cui // *Advanced Healthcare Materials*. – 2019. – Vol. 8(9). – P. 1900104.

287. Structure of collagen / C. Zhao, Y. Xiao, S. Ling [et al.] // *Fibrous Proteins: Design, Synthesis, and Assembly*. – 2021. – P. 17–25.

288. Structure-activity relationships of RGD-containing peptides in integrin $\alpha\beta 5$ -mediated cell adhesion / Y.Yamada, T. Onda, Y.Wada [et al.] // *ACS Omega*. – 2023. – Vol. 8(5). – P. 4687–93.

289. Sublay hernioplasty versus onlay hernioplasty in incisional hernia: A comparative study / F. Tahir, A.R. Alvi, A. Warraich [et al.] // *Pak J Surg*. – 2021. – Vol. 37(3). – P. 167–72.

290. Subsynovial connective tissue thickness in carpal tunnel syndrome: A systematic review / E. Robben, J. Dever, An De Groef [et al.] // *Clinical Biomechanics*. – 2020. – Vol. 75. – P. 105002.

291. Supramolecular polymer hydrogels for drug-induced tissue regeneration / J. Cheng, D. Amin, J. Latona [et al.] // *ACS nano*. – 2019. – Vol. 13(5). – P. 5493–501.

292. Syed, O. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular

small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering / O. Syed, N.J. Walters, R.M. Day // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10(12). – P. 5043–54.

293. Synthetic versus biologic mesh for complex open ventral hernia repair: a pilot randomized controlled trial / O.A. Olavarria, K. Bernardi, N.H. Dhanani [et al.] // *Surgical Infections*. – 2021. – Vol. 22(5). – P. 496–503.

294. Systematic review of the stage of innovation of biological mesh for complex or contaminated abdominal wall closure / S.K. Kamarajah, S.J. Chapman, J. Glasbey [et al.] // *BJS open*. – 2018. – Vol. 2(6). – P. 371–80.

295. Tanaka, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease / T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2014. – Vol. 6(10). – P.1–17.

296. Tavakoli, S. Bioengineered skin substitutes: advances and future trends / S. Tavakoli, A.S. Klar // *Applied Sciences*. – 2021. – Vol. 11(4). – P. 1493.

297. The «dermal cage»: Inferiorly based dermal flap technique for breast reconstruction after mastectomy / Z. Vlajcic, K. Martic, S. Budi [et al.] // *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. – 2020. – Vol. 73(3). – P. 486–93.

298. The complex interplay between extracellular matrix and cells in tissues / D. Manou, I. Caon, P. Bouris [et al.] // *The Extracellular Matrix*. – 2019. – Vol. 1952. – P. 1–20.

299. 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. 8626–33.

300. The granulation tissue preservation technique in regenerative therapy of peri-implantitis—a treatment concept with case reports / H. Günay, I. Staufenbiel, W. Geurtsen [et al.] // *Dtsch Zahnärztl Z Int*. – 2019. – Vol. 1. – P. 4–15.

301. The impact of biomaterial characteristics on macrophage phenotypes in tissue engineering: a review / J. Jackson, H. Samarah, W. Palmer [et al.] // *Plast Aesthet Res*. – 2025. – Vol. 12. – P. 12.

302. The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix / N. Poornejad, L.B. Schaumann, E.M. Buckmiller [et al.] // *Journal of Biomaterials*

Applications. – 2016. – Vol. 31(4). – P. 521–33.

303. The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective / K. Ousey, K.F. Cutting, A.A. Rogers [et al.] // *Journal of wound care.* – 2016. – Vol. 25(3). – P. 122–30.

304. The influence of different crosslinking agents onto the physical properties, integration behavior and immune response of collagen-based barrier membranes / Y. Ren, S. Alkildani, K. Burckhardt [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* – 2025. – Vol. 12. – P. 1506433.

305. The metabolic microenvironment steers bone tissue regeneration / J. Loeffler, G.N. Duda, F.A. Sass [et al.] // *Trends in Endocrinology & Metabolism.* – 2018. – Vol. 29(2). – P. 99–110.

306. The plasminogen-activator plasmin system in physiological and pathophysiological angiogenesis / A.A. Ismail, B.T. Shaker, K. Bajou // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 23(1). – P. 337.

307. The role of human immortal skin keratinocytes-acellular dermal matrix scaffold in skin repair and regeneration / C. Zhu, J. Liu, B. He [et al.] // *J Cell Biochem.* – 2019. – Vol.120(8). – P. 12182–191.

308. Thermosensitive injectable decellularized nucleus pulposus hydrogel as an ideal biomaterial for nucleus pulposus regeneration / L. Yu, Z.J. Sun, Q.C. Tan [et al.] // *Journal of biomaterials applications.* – 2020. – Vol. 35. – № 2. – P. 45–55.

309. Three-dimensional bioprinting: a comprehensive review for applications in tissue engineering and regenerative medicine / N.A. Mirsky, Q.T. Ehlen, J.A. Greenfield [et al.] // *Bioengineering.* – 2024. – Vol. 11(8). – P. 777.

310. Tissue-engineered skin constructs and application of stem cells for creation of skin equivalents (review) / A. Meleshina, A. Bystrova, O. Rogovaya [et al.] // *Sovremennye tehnologii v medicine.* – 2017. – Vol. 9(1). – P. 198–218.

311. Towards uterus tissue engineering: a comparative study of sheep uterus decellularization / T. Tiemann, A.Padma, E.Sehic [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2020. – Vol. 26. – P.167–78.

312. Use of a bioartificial dermal regeneration template for skin restoration in

combat casualty injuries / J.G. Seavey, Z.A. Masters, G.S. Balazs [et al.] // Regenerative medicine. – 2016. – Vol. 11(1). – P. 81–90.

313. Varma, S. Nanomechanics of type I collagen / S. Varma, J.P. Orgel, J.D. Schieber // Biophysical journal. – 2016. – Vol. 111(1). – P. 50–6.

314. Vascular endothelial growth factor signaling in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic perspectives / C. Lee, M.J. Kim, A. Kumar [et al.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2025. – Vol. 10. – №. 1. – P. 170.

315. Vascularization strategies for human skin tissue engineering via 3D bioprinting / A.K. Shukla, D. Lee, S. Yoon // International Journal of Bioprinting. – 2024. – Vol.10(3). – P.1727.

316. VEGF - supplemented extracellular matrix is sufficient to induce endothelial differentiation of human iPSC / I. Ullah, R. Abu-Dawud, J.F. Busch [et al.] // Biomaterials. – 2019. – Vol. 216. – P.119283.

140. Wang, Y. Collagen-based biomaterials for tissue engineering. / Y. Wang, Z. Wang, Y. Dong // ACS Biomater Sci Eng. – 2023. – Vol.9(3). – P.1132–50.

317. Wen, Q. Elastin biomaterials in dermal repair / Q. Wen, S.M. Mithieux, A.S. Weiss // Trends in biotechnology. – 2020. – Vol. 38(3). – P. 280–91.

318. Williams, D.F. Challenges with the development of biomaterials for sustainable tissue engineering / D.F. Williams // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2019. – Vol. 7. – P. 127.

319. Xenogeneic mesenchymal stem cell biocurative improves skin wounds healing in diabetic mice by increasing mast cells and the regenerative profile / G.M. da Costa Manso, J. Elias-Oliveira, J.B. Guimarães [et al.] // Regen Ther. – 2023. – Vol. 22. – P.79–89.

320. Xu, J. Advances in the research of bioinks based on natural collagen, polysaccharide and their derivatives for skin 3D bioprinting / J. Xu, S. Zheng, X. Hu // Polymers. – 2020. – Vol. 12. – № 6. – P. 12–37.

321. Yang, J. Recent advancement of decellularization extracellular matrix for tissue engineering and biomedical application / J. Yang, H. Dang, Y. Xu // Artificial organs. – 2022. – Vol. 46(4). – P. 549–67.

322. Zeng, H.Y. Basic fibroblast growth factor released from fucoidan-modified chitosan/alginate scaffolds for promoting fibroblasts migration / H.Y. Zeng, Y.C. Huang // *J Polym Res.* – 2018. – Vol. 25. – P. 83.

323. Zhang, W. Stem cell-based drug delivery strategy for skin regeneration and wound healing: potential clinical applications / W. Zhang, X. Huang // *Inflammation and Regeneration.* – 2023. – Vol. 43(1). – P. 33.

324. Zhu, D. Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration / D. Zhu, H. Wang, P. Trinh // *Biomaterials.* – 2017. – Vol. 127. – P. 132–40.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Патенты на изобретения



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2717088

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО
ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА

Патентообладатели: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Научно-исследовательский институт - Краевая клиническая больница N 1 имени профессора С.В. Очаповского" Министерства здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ "НИИ-ККБ N 1 им. проф. С.В. Очаповского" Минздрава Краснодарского края) (RU), Гилевич Ирина Валериевна (RU), Сотниченко Александр Сергеевич (RU), Мелконян Карина Игоревна (RU), Юцкевич Яна Андреевна (RU), Богданов Сергей Борисович (RU), Каракулев Антон Владимирович (RU), Порханов Владимир Алексеевич (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019133278

Приоритет изобретения **18 октября 2019 г.**

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **18 марта 2020 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **18 октября 2039 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2768156

СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ДЕРМЫ СВИНЬИ ДЛЯ
СОЗДАНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО
МАТРИКСА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Патентообладатели: *Мелконян Карина Игоревна (RU), Сотниченко Александр Сергеевич (RU), Русинова Татьяна Викторовна (RU), Козмай Яна Андреевна (RU)*

Авторы: *Мелконян Карина Игоревна (RU), Сотниченко Александр Сергеевич (RU), Веревкин Александр Александрович (RU), Русинова Татьяна Викторовна (RU), Асякина Алевтина Сергеевна (RU), Козмай Яна Андреевна (RU)*

Заявка № 2021115743

Приоритет изобретения 31 мая 2021 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 23 марта 2022 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 31 мая 2041 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2791987

СПОСОБ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ДЕРМЫ СВИНЬИ
ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ПЛАСТИЧЕСКОЙ
ХИРУРГИИ

Патентообладатели: *Мелконян Карина Игоревна (RU), Русинова
Татьяна Викторовна (RU), Козмай Яна Андреевна (RU),
Асякина Алевтина Сергеевна (RU)*

Авторы: *Мелконян Карина Игоревна (RU), Вережкин Александр
Александрович (RU), Русинова Татьяна Викторовна (RU),
Асякина Алевтина Сергеевна (RU), Козмай Яна Андреевна
(RU)*

Заявка № 2022109499

Приоритет изобретения 08 апреля 2022 г.

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

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 08 апреля 2042 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



Акты об использовании предложений



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4 тел. (861)268-36-84 факс (861)268-32-84
e-mail: corpus@ksma.ru

ИНН 2309023448

КПП 230901001

БИК 040349001

№ _____ от "___" _____ 2023 г. на № _____ от "___" _____ 2023 г.



АКТ

об использовании предложения

1. **Наименование предложения:** Способ децеллюляризации дермы свиньи для реконструктивной пластической хирургии
2. **Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение:** докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств»
3. **Автор предложения:** зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелкоян К.И.
4. **Предложение используется в хирургическом отделении №2 с 29 мая 2023 года.**
5. **Эффективность предложения:** разработанный ацеллюлярный дермальный матрикс хорошо моделируется по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки, что существенно оптимизирует хирургические манипуляции при герниопластике. Благодаря биологической природе АДМ, тканевые и клеточные реакции в области его расположения протекают более физиологично, и происходит постепенное замещение материала вновь образованной соединительной тканью. Биоматериал обладает высокими прочностными характеристиками, позволяет надежно укреплять дефект передней брюшной стенки и устойчив к прорезыванию шовным материалом.

Зав. кафедрой факультетской и
госпитальной хирургии
ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России,
д.м.н.

/К.И. Попандопуло/

Автор предложения:
к.м.н., доцент

/К.И. Мелкоян/

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница скорой медицинской помощи» министерства здравоохранения Краснодарского края
 ОГРН 1032305609217 ИНН 2310017921
 Россия, Краснодарский край, 350042, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 14
 тел.: 257-04-26, факс: 252-24-7

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач
 ГБУЗ «Краевая клиническая больница скорой медицинской помощи» г. Краснодара МЗ КК
 Н.В. Босак
 «31» 2023г.



АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: Способ децеллюляризации дермы для реконструктивной пластической хирургии
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств»
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется в хирургическом отделении №2 ГБУЗ ККБ СМП МЗ КК с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: разработанный ацеллюлярный дермальный матрикс хорошо моделируется по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки, что существенно оптимизирует хирургические манипуляции при герниопластике. Благодаря биологической природе АДМ, тканевые и клеточные реакции в области его расположения протекают более физиологично, и происходит постепенное замещение материала вновь образованной соединительной тканью. Биоматериал обладает высокими прочностными характеристиками, позволяет надежно укреплять дефект передней брюшной стенки и устойчив к прорезыванию шовным материалом.

Зав. хирургическим отделением №2
 ГБУЗ ККБ СМП
 г. Краснодара МЗ КК



/М.Т. Дидигов/

Автор предложения:
 к.м.н., доцент




/К.И. Мелконян/

ООО «АБ МЕДИКАЛ»

Юр. адрес: 115478 г.Москва, Каширское ш., д.24, стр. 4, 2 эт.
ИНН 7724513948/КПП 772401001; р/с 40702810100000047079;
к/с 30101810145250000411; БИК 044525411; ОКПО 73518584

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель учреждения

 /Б.В. Шмелькин/
(подпись) (расшифровка подписи)
«29» _____ 2023 г.

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: Способ подготовки дермы свиньи для создания ацеллюлярного дермального матрикса в эксперименте (патент на изобретение RU 2768156 C1).
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств»
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется: в покрытии биологическом «Ксенодерм» с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: использование предварительно снятого кожного лоскута вместо забора образцов дермы непосредственно с боковой поверхности тела животного позволяет получать образцы точно заданной толщины и размера, так как нивелируется влияние подлежащих участков тела на качество забираемой дермы (неравномерный забор по толщине образца с реберных участков животного, а также отсутствие достаточного упора в области живота), что позволяет использовать дисковый нож большого диаметра на всей поверхности предварительно забранного лоскута.

Руководитель подразделения

Автор предложения:
к.м.н., доцент

/Б.В. Шмелькин /

/К.И. Мелконян /



ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
**«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ - КРАЕВАЯ
КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА №1
ИМЕНИ ПРОФЕССОРА
С.В. ОЧАПОВСКОГО»**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
1 Мая ул., д. 167, г. Краснодар, 350086
тел: (861) 252-85-91, 252-73-02
факс: (861) 252-82-17, 215-35-12
e-mail:kkb1@mail.ru
ИНН 2311040088

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель учреждения
В.А. Порханов/
(подпись)
« 2023 г.

от _____ № _____

на № _____ от _____

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: методические рекомендации по применению ацеллюлярного дермального матрикса для лечения ожоговых ран в эксперименте
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств»
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется в ожоговом отделении с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: разработанный ацеллюлярный дермальный матрикс может быть использован в качестве временного покрытия ожоговой раны, он хорошо моделируется по размерам и форме дефекта, что существенно оптимизирует хирургические манипуляции. Благодаря биологической природе ацеллюлярный дермальный матрикс обладает биосовместимостью на тканевом уровне, не вызывает воспалительную реакцию и образование соединительнотканной капсулы, отграничивающей матрикс от окружающих тканей.

Заведующий ожоговым
отделением, д.м.н.

Автор предложения:
к.м.н., доцент




/С.Б. Богданов/

/К.И. Мелконян/

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
**«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ - КРАЕВАЯ
КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА №1
ИМЕНИ ПРОФЕССОРА
С.В. ОЧАПОВСКОГО»**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
1 Мая ул., д. 167, г. Краснодар, 350086
тел: (861) 252-85-91, 252-73-02
факс: (861) 252-82-17, 215-35-12
e-mail: kkb1@mail.ru
ИНН 2311040088

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель учреждения

В.А. Порханов/

(подпись)  (подпись)

2023 г.




от _____ № _____

на № _____ от _____


АКТ**об использовании предложения**

1. Наименование предложения: методические рекомендации по применению коллагенсодержащего гидрогеля на основе биополимеров дермы свиньи в эксперименте.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств».
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется: в лаборатории разработки и изучения новых технологий лечения заболеваний с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: разработанный гидрогель на основе ВКМ дермы является удобной формой коллагенсодержащего биоматериала, полностью биосовместим и может быть использован в разных направлениях работы лаборатории, например, для создания природоподобных условий при культивировании дермальных фибробластов, в качестве основы для ранозаживляющих препаратов, биочернил для 3D-принтинга, среды для 3D-культивирования клеточных культур.

Зав. лабораторией разработки
и изучения новых технологий
лечения заболеваний, к.м.н.

 / И.В. Гилевич /

Автор предложения:
к.м.н., доцент

 / К.И. Мелконян /

Паспорт коллекционной клеточной линии

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(Минобрнауки России)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИИЦ РАН)

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,
э-л. адрес: cellbio@icras.ru; http://www.cytspb.issl.ru/

19.06.2021 № 1-1-599

На № _____ от _____

Паспорт коллекционной клеточной линии DF-1

Происхождение: человек, дермальные фибробласты (мезенхимные стволовые клетки) из кожи век 37-летнего донора женского пола.

Цитология. 2016. 57 (11): 850-864.

Морфология: фибробластоподобная

Способ культивирования: монослойный

Условия культивирования: среда - DMEM/F12

сыворотка - эмбриональная бычья 10%

процедура посева - снятие клеток, используя трипсин 0.25%: версен 0.02% (1:3), кратность посева 1:3, оптимальная плотность $4.0 - 5.0 \times 10^4$ клеток/см²

криоконсервация - ростовая среда, 10 % DMSO, $1.0 - 1.5 \times 10^6$ клеток/мл в ампуле



Жизнеспособность после криоконсервации: 85 % (окраска трипановым синим на нулевом пассаже)

Контроль контаминации: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены

Контроль видовой идентичности: кариологический анализ.

Кариология: 2n= 46, модальное число хромосом 46 (98.0 %), нормальный кариотип человека (46, XX), обнаружены неклональные структурные хромосомные перестройки (13.3 %), количество полиплоидов 0.8 %.

ДНК профиль (STR):

Amelogenin:	X,	X
CSF1PO:	11,	11
D13S317:	11,	11
D16S539:	10,	12
D5S818:	9,	13
D7S820:	10,	12
THO1:	9.3,	9.3
TPOX:	8,	9
vWA:	15,	19

Эффективность клонирования: 34.5 %

Другие характеристики: среднее время одного удвоения клеточной популяции 40.0 ч; время активной (логарифмической) фазы роста на 6-м пассаже составляет 72 ч.

Линия с ограниченным сроком жизни; фаза активного репликативного старения наступает на 25 пассаже, что соответствует более 50 удвоениям клеточной популяции.

Экспрессия поверхностных антигенов, характерных для мезенхимных стволовых клеток: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC; отсутствие экспрессии антигенов CD34, CD45 и HLA-DR.

Направленная дифференцировка в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.

Область применения: клеточная биология, биотехнология

Коллекции: КККП ИИЦ РАН.

Рук. Биоресурсной коллекции культур клеток позвоночных ИИЦ РАН

Д.Б.Н



Г.Г. Полянская
