

На правах рукописи

МЕЛКОНЯН КАРИНА ИГОРЕВНА

Патогенетическое обоснование применения децеллюляризированных и рецеллюляризированных материалов на основе дермы свиньи для лечения ожогов и соединительнотканых дефектов

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Быков Илья Михайлович

Официальные оппоненты:

Власов Тимур Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-образовательный институт биомедицины, кафедра патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, заведующий кафедрой

Рогова Людмила Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, клинической патофизиологии, профессор кафедры

Вавилова Татьяна Павловна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», г. Москва

Защита состоится «__» _____ 2026 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», по адресу: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://www.tnimc.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Минакова Мария Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последнее время в клинических ситуациях, характеризующихся выраженным тканевым дефицитом, всё большую значимость приобретают материалы на основе биополимеров, 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 V., 2018; Verdi J. et al., 2022]. Потенциальным источником природоподобного комплекса биополимеров, сходного с нативным внеклеточным матриксом (ВКМ), являются децеллюляризованные соединительнотканые каркасы. Децеллюляризация нативных органов и тканей способствует сохранению биохимического состава, тканевой структуры, а также механических свойств ВКМ 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 заживлении кожных ран, являются постнатальные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [Елифанов 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* и 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 регулировать 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 матриксов дермы свиньи в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств и внедрение новых медицинских технологий с использованием данных материалов 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 матриксов [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, возникшая в результате использования агрессивных детергентов, также может влиять на адгезию, распределение и дифференцировку клеток [Tiemann T. et al., 2020]. Более того, длительное хранение децеллюляризованных матриксов, а также тип используемого стерилизующего агента существенно влияют на выживаемость засеянных МСК. Известно, что сохранение нативных механических и биохимических свойств матриксов 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 матриксов. Деминерализованный костный матрикс применяется в качестве остеогенного материала благодаря способности индуцировать костную регенерацию, что связывают с присутствием в его составе костных морфогенетических белков, инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF1) 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 значительно 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* [Ventura R.D. 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 и других биоактивных факторов [Jiang S. et al., 2023]. 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 децеллюляризованных и рецеллюляризованных 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 децеллюляризованного 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 децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриксов дермы свиньи на процессы заживления, как при раннем, так и при этапном хирургическом лечении.

4. Определить целесообразность использования децеллюляризованных и рецеллюляризованных 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 децеллюляризованного 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 заживление кожи 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 децеллюляризованных несшитых матриксов дермы свиньи в качестве тканезамещающих средств, приводящих к формированию нормальной соединительной ткани на месте дефекта, содержащей основной компонент ВКМ – 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 децеллюляризованного 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 децеллюляризованных и рецеллюляризованных материалов на основн 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 децеллюляризованных матриксов дермы в качестве хирургических имплантов для маммопластики и герниопластики) и регенеративной медицине (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 ($TNF\alpha$, 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 биодеградации децеллюляризованных матриц дермы *in vivo* (подкожная имплантация).

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

10. Статистическая обработка данных 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 – децеллюляризованный дермальный матрикс с сохранением компонентов внеклеточного матрикса.

2. Патогенетическим обоснованием использования рецеллюляризованного дермального матрикса для лечения ожоговых ран 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. Децеллюляризованный 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).

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.

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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение содержит обоснование актуальности темы исследования, в нём также сформулированы цель, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В первой главе обобщены основные современные данные, изложенные в отечественных и зарубежных научных источниках, о разнообразии биоматериалов и их воздействии на репаративные процессы кожи и соединительной ткани и описаны известные особенности биоинтеграции и тканезамещения при применении различных биопластических материалов.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования.

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», Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Основой для создания ксенодермальных биоматериалов была нативная дермы поросят Ландрас возрастом 3,5 – 5,5 месяца ($n = 4$), полученная с помощью электродерматома. Для проведения децеллюляризации и химической обработки образцов дермы использовались следующие реагенты: детергенты: тритон X-100 («Sigma-Aldrich», США), дезоксихолат натрия («Sigma-Aldrich», США); химические агенты: NaOH («Вектон», Россия), ЭДТА («ThermoFisher Scientific», США), фосфатный буфер («Gibco», Великобритания); ферменты: Трипсин-Версен («Биолот», Россия), свиная панкреатическая ДНК-аза I 2000 ЕД («Sigma-Aldrich», США).

После децеллюляризации дермы в образцах определяли содержание 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). Для определения наличия интактных ядер к образцам добавляли 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) («Sigma-Aldrich», США), разведение 1 : 1000, и инкубировали в темноте в течение 5 минут. В образцах децеллюляризованных материалов проводили количественное определение содержания коллагена (набором реагентов «ELISA Kit for Collagen Type I (COL1)» («Usen Life Science & Technology Co.», USA)); гликозаминогликанов («Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay» («Biocolor Ltd.», U.K.)); гиалуроновой кислоты («Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay» («Biocolor Ltd.», U.K.)) по протоколам фирмы производителя.

При проведении теста на цитотоксичность использовали линию человеческих дермальных фибробластов DF-1. Клетки инкубировали в среде DMEM («Gibco», Англия) 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. Визуализация флуоресцентного свечения проводилась на флуоресцентном микроскопе Olympus IX 51 («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 ПО ImageJ (National Institution of Health, США).

Для анализа жизнеспособности клеток образцы ДДМ инкубировали с клетками в течение 3 часов в темноте в присутствии желтой соли тетразолия (МТТ), затем добавляли раствор 10 % додецилсульфата натрия в 0,01 М HCl и инкубировали 1 час. Интенсивность протекания реакции восстановления МТТ оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 («ThermoFisher Scientific Inc.», США) при длине волны 560 нм согласно инструкции производителя. Миграционную активность клеток оценивали с использованием метода «царапины» (scratch assay) в условиях *in vitro*. Для количественной оценки пролиферативной активности использовали метод расчёта времени удвоения популяции клеток – PDT-тест (population doubling time).

Для сравнительной оценки механических свойств ДДМ все биологические образцы были разделены на 3 группы по 15 образцов в каждой. В первую вошли образцы ДДМ, во вторую группу – образцы разрешенного к применению в РФ ксенотрансплантата для герниопластики «Permacol Surgical Implant®», «Covidien» (Франция). Контрольную группу составили нативные образцы свиной дермы, не прошедшие обработку. 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.

Для засеивания ДДМ использовали аллогенные фибробласты, рецеллюляризацию проводили статическим методом в 6-луночной планшете клеточной суспензией из расчета 25000 кл/см² в течение 48 часов в СО₂-инкубаторе.

Подкожная имплантация образцов биоматериалов была выполнена самцам крыс Wistar (n = 30), 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 исследуемых материалов помещались в подкожный карман на холке крысы. На 7-е, 14-е, 21-е и 60-е сутки после подкожного введения биоматериалов выполняли эксплантацию образцов, проводили их гистологический анализ.

Эксперимент по закрытию модели ожоговой раны проводили на поросятах Ландрас (возраст 15 недель, масса 25,5 кг). Закрытие грыжевого дефекта было выполнено на двух свиных-грыженосителях Ландрас возрастом 4 – 6 месяцев массой 27 ± 6,1 кг. Моделирование субпекторального кармана проводилось на двух свиных Ландрас (возраст 4 месяца, самки, вес 33 ± 1,7 кг).

Экспериментальное применение децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиной 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 мазью «Левомеколь», или группа сравнения (n = 20), и группа 3 – крысы с лечением децеллюляризованным гидрогелевым материалом на основе дермы свиной, или опытная группа (n = 20). Всем животным под общим ингаляционным наркозом «Изофлуран» 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 групп 2 обрабатывали комбинированной противомикробной мазью «Левомеколь®» (диоксометилтетрагидропиримидин + хлорамфеникол) (ООО «НИЖФАРМ», Россия), а крыс группы 3 децеллюляризованным гидрогелевым материалом на основе дермы свиной, в объеме 0,3 г каждый день до 7-го дня эксперимента включительно. 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 и 14-е сутки с прилежащими тканями для гистологического исследования.

Для гистологической оценки образцов (окраска гематоксилином/эозином, трихромом по Массону, толуидиновым синим) при помощи ротационного микротомы RM2235 («Leica», Германия) получали парафиновые срезы толщиной 4 мкм на высоко адгезивных стеклах с последующей

депарафинизацией, гидратацией, окрашиванием. Все образцы исследовали с помощью микроскопа Olympus CX 41 («Olympus», Япония) при различном увеличении, использовали компьютерную морфометрию с помощью программного обеспечения Image J (National Institution of Health, США) и плагина ИНС metrics».

При ИГХ исследовании использовали поликлональные антитела к CD3, CD16b, CD68, виментину, цитокератину, фибронектину, коллагену I и IV типа согласно инструкции производителя. При количественном подсчёте результатов иммуногистохимического исследования использовали программное обеспечение Image J (National Institution of Health, США) и плагин ИНС metrics. Рассчитывали КПО – коэффициент площади окрашивания (отношение площади, занимаемой иммунореактивным продуктом, к общей площади среза).

Содержание интерлейкина-1 бета (IL1 β), интерлейкина-4 (IL4), интерлейкина-6 (IL6), интерлейкина-8 (IL8), интерлейкина-10 (IL10), фактора некроза опухоли альфа (TNF α), фактора роста тромбоцитов (PDGF A), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF A), трансформирующего фактора роста бета (TGF β 1) и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) определяли в сыворотке крови животных методом твердофазного ИФА на анализаторе Filter Max F5 («Molecular Devices», США) с использованием наборов реагентов ELISA («Cloud-Clone Corp.», Китай) согласно протоколу производителя.

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 ($Me [Q_1; Q_3]$). Достоверность различий между показателями оценивали в зависимости от характера распределения данных в выборках, с помощью стандартных критериев значимости: χ^2 Пирсона, F-критерия Фишера, для сравнения независимых групп использовали критерий Манна-Уитни, для сравнения зависимых групп использовали критерий Вилкоксона. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Третья, четвертая, пятая, шестая, седьмая и восьмая главы диссертации посвящены результатам исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценка структурных и функциональных особенностей децеллюляризованных матриц на основе дермы свиньи

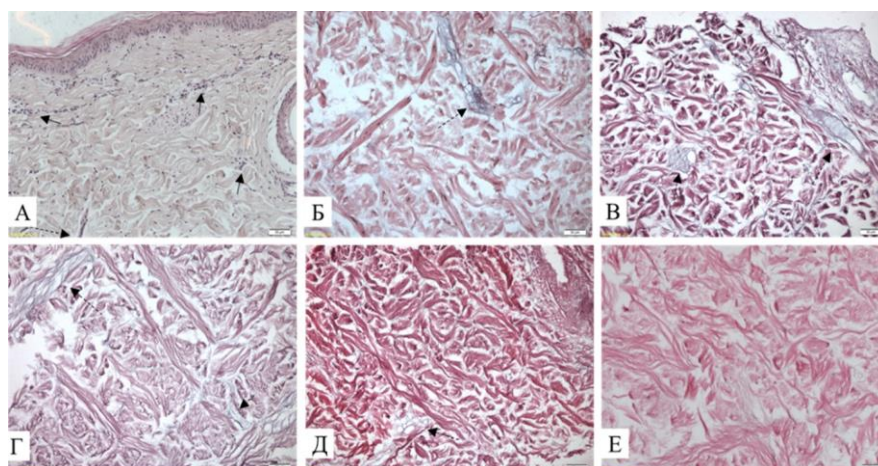
Для получения децеллюляризованных дермальных матриц (ДДМ), которые могут быть эффективно использованы в качестве раневого покрытия при ожоговых повреждениях кожи был разработан алгоритм децеллюляризации дермы свиньи на основе детергентно-энзиматического метода. Разработанный алгоритм позволил наиболее полным образом удалить клетки из тканей, но в то же время обладал щадящими свойствами по отношению к белкам волокон ВКМ. В основе алгоритма лежало использование водных растворов трипсина, дезоксихолата натрия и тритона X-100, которыми циклически обрабатывались

образцы дермы свиньи на шейкере и шейкере-инкубаторе в асептических условиях. Краткий алгоритм обработки представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Краткий алгоритм детергентно-энзиматической обработки дермы для получения ДДМ, использующихся в качестве раневого покрытия

Циклы	Реагент/воздействие	Время, ч	Температура, °С	Режим, об/мин
1	замораживание	72	-80	–
	трипсин-Версен 1 : 1	18	+37	170
5	тритон X-100 1 %	2	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 % + Na ₂ -ЭДТА 0,002М	2	+20–25	170
1	панкреатическая ДНКаза I, 2000 ЕД	4	+37	100

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, 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 (Рисунок 1).



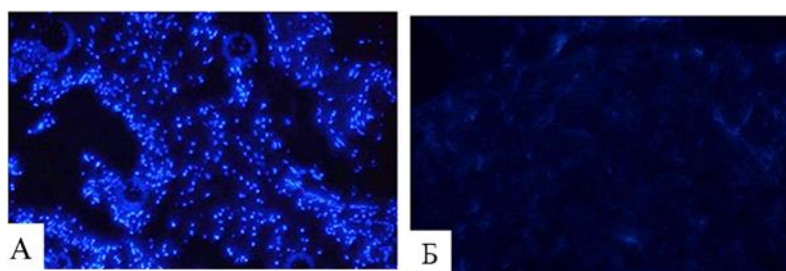
А – нативная дерма; Б–Е – дерма после 1–5 цикла обработки детергентами, соответственно. Сплошные стрелки указывают на интактные ядра. Пунктирные стрелки указывают на разрушенные ядра. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. ×200

Рисунок 1 – Динамика изменений гистологической структуры ВКМ дермы в процессе децеллюляризации

Тест на наличие интактных ядер и ядерного материала (окраска ДНК с помощью флуорофора DAPI) подтвердил эффективность использования предложенного алгоритма, так как была обнаружена лишь незначительная флуоресценция остаточной ДНК и аутофлуоресценция волокон ВКМ по сравнению с нативной дермой, где клеточные ядра активно флуоресцировали и были выявлены в большом количестве (Рисунок 2).

Количественный анализ показал, что содержание ДНК в децеллюляризированной дерме после пятого цикла обработки снижалось до

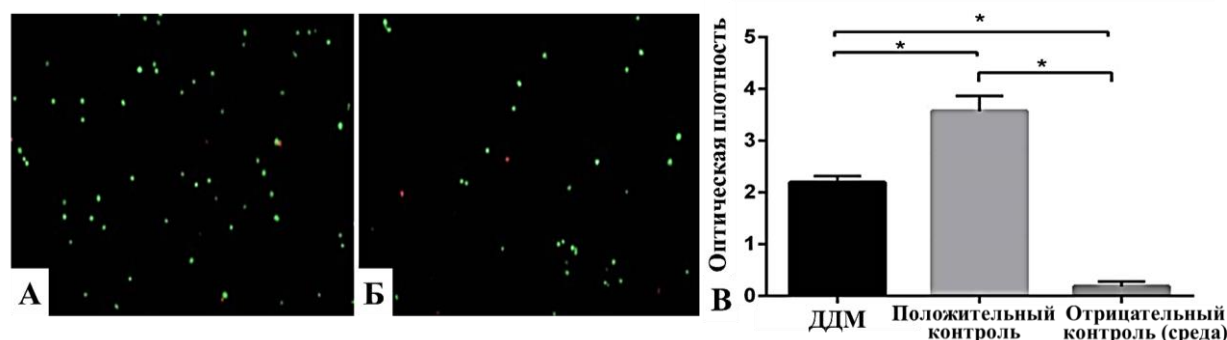
13,7 % ($45,4 \pm 2,8$ нг/мг ткани) по сравнению со значениями нативной дермы ($p < 0,05$).



А – образцы нативной дермы; Б – образцы ДДМ. Окрашивание DAPI. Ув. $\times 200$

Рисунок 2 – Результаты определения наличия интактных ядер

Дифференциальное окрашивание живых (флуоресценция с кальцеином) и мертвых (флуоресценция с гомодимером этидия) клеток позволило продемонстрировать жизнеспособность дермальных фибробластов, выделенных из кожи свиньи и засеянных статическим методом на образцы ДДМ. Метаболическая активность данных клеток по данным МТТ-теста была ниже, чем в контрольных лунках, но отличалась от холостой пробы (Рисунок 3).



А – контроль, дермальные фибробласты свиньи; окрашивание методом Live/Dead, ув. $\times 100$; Б – дермальные фибробласты свиньи после рецеллюляризации ДДМ; окрашивание методом Live/Dead, ув. $\times 100$; В – результаты МТТ-теста, * – $p < 0,05$

Рисунок 3 – Оценка жизнеспособности и метаболической активности дермальных фибробластов свиньи через 24 часа после рецеллюляризации ДДМ

Для получения ДДМ, которые могут быть эффективно использованы в качестве тканезамещающих материалов при дефектах соединительной ткани, была апробирована методика получения больших лоскутов дермы. С помощью электродерматома в лабораторных условиях были получены образцы дермы свиньи Ландрас, не содержащие эпидермиса, с равномерной толщиной образца 0,7 мм на всем протяжении, размерами не менее $10 \pm 0,5 \times 20$ см. Методика представляла собой следующий алгоритм: 1) в условиях операционной животное в состоянии наркоза укладывали на бок, производили разметку донорского участка размером $20-25 \times 60-70$ 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 образом, 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. В результате применения данной методики были получены 8 образцов дермы размерами не менее чем $10 \pm 0,7 \times 20$ см, для которых была произведена модификация разработанного ранее алгоритма децеллюляризации, предусматривающая сохранение биомеханических свойств соединительной ткани. Краткий алгоритм детергентно-энзиматической обработки приводящий к получению модифицированного децеллюляризованного дермального матрикса (мДДМ) представлен в Таблице 2.

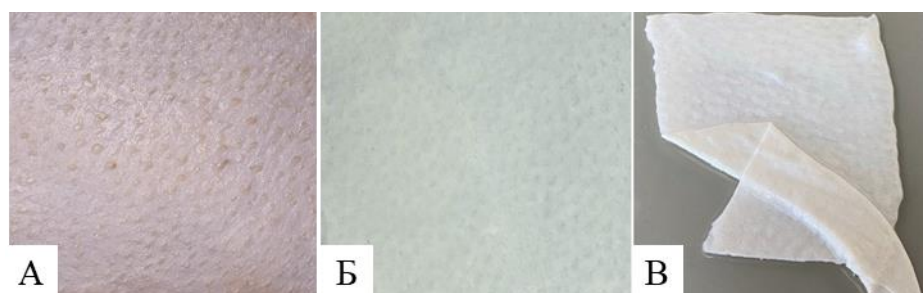
Таблица 2 – Краткий алгоритм детергентно-энзиматической обработки больших лоскутов дермы для получения мДДМ, использующихся для закрытия дефектов соединительной ткани

Циклы	Реагент/воздействие	Время, ч.	Температура, °С	Режим, об/мин.
1	замораживание	72	-80	–
	Трипсин-Версен 1 : 1	6	+37	100
1	трипон X-100 1 %	3	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 % + Na ₂ -ЭДТА 0,002М	3	+20–25	170
1	трипон X-100 1 %	3	+20–25	170
	дезоксихолат натрия 4 % + Na ₂ -ЭДТА 0,002М	3	+20–25	170
1	панкреатическая ДНКаза I, 2000 Ед/ФСБ	4	+37	100

В результате было сокращено время обработки дермы до 22 часов по сравнению с разработанным ранее алгоритмом, а также реализована возможность учитывать размеры образцов и экономить реагенты без потери эффективности удаления клеток. После обработки детергентно-энзиматическим методом нативные образцы дермы свиньи приобретали белый цвет, имели характерный рисунок поверхности (мерею) в виде сорочьих лапок, обладали оптимальной пластичностью для реконструктивной хирургии. Например, благодаря мягкости и эластичности мДДМ было возможно моделировать по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки (Рисунок 4).

Коллагеновые пучки мДДМ 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

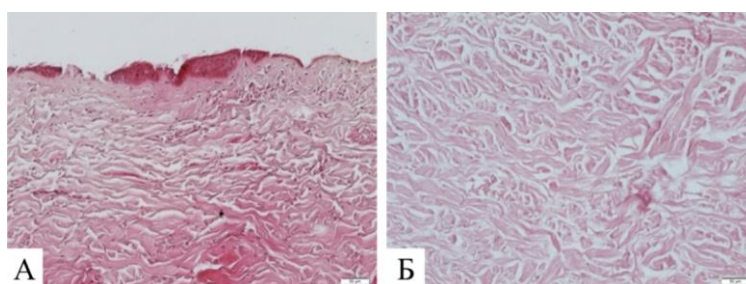
коллагеновых волокон в ходе обработки дермы ($78,2 \pm 2,4\%$ против $89,2 \pm 1,9\%$; $p < 0,05$). В нативных образцах клеточные ядра явно флуоресцировали и имели интактную форму, в отличие от образцов мДДМ, где обнаружили лишь незначительную аутофлуоресценцию волокон ВКМ.



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

Рисунок 4 – Децеллюляризированный дермальный матрикс, использующийся для закрытия дефектов соединительной ткани

Результаты анализа показали отсутствие клеточных структур и частичную сохранность гистоархитектуры в дермальном матриксе по сравнению с нативной дермой (Рисунок 5).



Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. $\times 100$

Рисунок 5 – Гистологический анализ образцов дермы до обработки (А) и после обработки по модифицированному алгоритму (Б)

Полученные образцы соответствовали требованиям, предъявляемым к качеству имплантируемых биологических материалов в отношении количества ДНК – менее 50 нг/мг ткани [P.M. Srapo et al., 2015], которое составляло $26,7\%$ от содержания ДНК в нативной ткани. Анализ данных, полученных по методике Live/Dead продемонстрировал, что $80 \pm 10\%$ клеток оставались жизнеспособными на образцах мДДМ, что свидетельствовало об отсутствии их цитотоксического действия.

Гомогенаты образцов ДДМ, полученные по двум различным алгоритмам (для получения раневого покрытия и хирургического импланта) подвергались биохимическому анализу на содержание сульфатированных общих и О-гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, для оценки сохранности небелковых компонентов ВКМ. Гомогенаты нативной дермы также подвергались данному исследованию и служили группой сравнения (Рисунок 6).

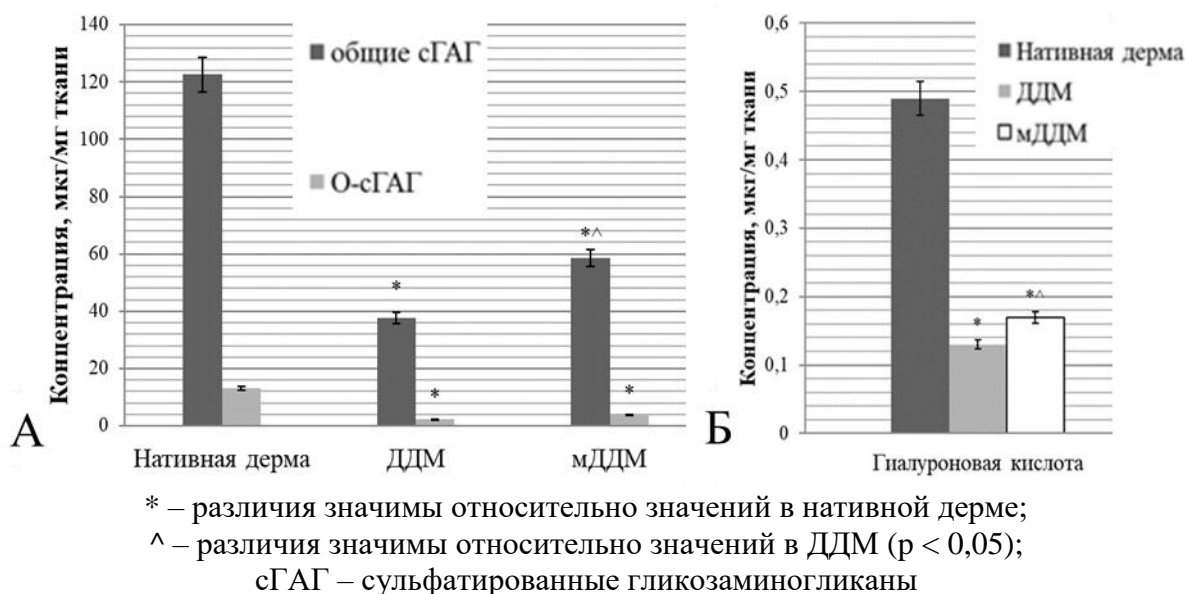


Рисунок 6 – Анализ содержания сульфатированных гликозаминогликанов (А) гиалуроновой кислоты (Б) в ДДМ и нативной коже свиньи

Полученные данные продемонстрировали значительную потерю компонентов ВКМ в процессе детергентно-энзиматической обработки по сравнению с исходной концентрацией различных гетерополисахаридов в нативной коже, при этом их содержание в ДДМ, обработанном по модифицированному протоколу было значимо выше ($p < 0,05$).

Исследования биомеханической прочности полученного мДДМ позволило определить его основные физические свойства (Таблица 3).

В проведенном исследовании установлено что, ксеногенный мДДМ, планируемый к применению в качестве эндопротеза для герниопластики, обладал высокими прочностными характеристиками, соответствующими показателям нативной свиной кожи.

Таблица 3 – Основные механические свойства биоматериалов, $M \pm SD$

Образец	Удлинение при разрыве ϵ_p , %	Прочность на разрыв σ_p , МПа	Модуль упругости E_0 , МПа
мДДМ	$21,1 \pm 2,3$	$9,1 \pm 0,6$	$50,0 \pm 1,6$
Нативная кожа свиньи	$25,4 \pm 4,2$	$11,6 \pm 2,8$	$56,1 \pm 9,2$
Permascol™ (продольное направление)	$29,7 \pm 2,4$	$12,0 \pm 1,7$	$47,2 \pm 6,5$
Permascol™ (поперечное направление)	$17,5 \pm 2,6^*$	$6,2 \pm 0,6^*$	$28,4 \pm 6,1^*$

* – различия значимы относительно значений нативной кожи

В проведенном исследовании установлено что, ксеногенный мДДМ, планируемый к применению в качестве эндопротеза для герниопластики, обладал высокими прочностными характеристиками, соответствующими показателям нативной свиной кожи. Образцы Permascol™ также показали 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.

Таким образом, проведенный анализ эффективности методики децеллюляризации дермы показал, что предложенный алгоритм эффективно удаляет клетки и ядерный материал, при этом архитектура межклеточного вещества незначительно изменяется, так как происходит частичное разрушение волокнистых структур. Показано, что исследуемые материалы биосовместимы, содержат незначительное количество детергентов – дезоксихолата натрия и тритона X-100. Таким образом, преимуществом детергентно-энзиматической децеллюляризации является сохранение структуры ВКМ и получение материалов с оптимальными биологическими и биомеханическими свойствами, приближенными к характеристикам нативной ткани.

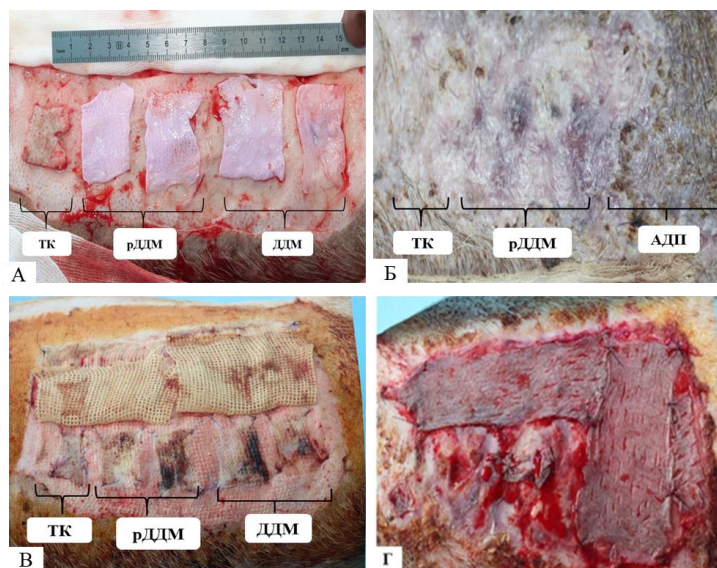
Результаты сравнительной оценки эффективности применения децеллюляризованного дермального матрикса для лечения ожоговых ран в эксперименте

На боковой поверхности свиньи Ландрас были сформированы раны двух типов: 1) рана размером 15×5 см, у которой дном являлись нижние слои дермы и мозаично обнаженные участки подкожно-жировой клетчатки (проксимальнее – ближе к позвоночнику). Данная рана по глубине поражения соответствовала III степени по классификации Вишневого; 2) рана размером 15×5 см, 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 различными раневыми покрытиями (размерами $2,5 \pm 0,7$ см × $4 \pm 0,9$ см × $0,03 \pm 0,01$ см), расстояния между раневыми покрытиями составило 1 – 2 см: 2 образца были представлены ДДМ, 2 образца рецеллюляризованными дермальными аллофибробластами ДДМ (рДДМ) и 1 образец аутокожей в качестве контроля, а раны второго типа были закрыты аналогичным образом через 8 дней после нанесения ожогового повреждения (Рисунок 7).

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 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 расщепленными трансплантатами на 20 сутки после начала эксперимента, так как кожный покров не восстанавливался. На гранулирующей ране (рана второго типа) матриксы лизировались и не приживались, что также потребовало проведения аутопластики расщепленным свободным лоскутом. Через 10 дней после аутопластики наблюдалась полная ячеичная эпителизация раневой поверхности. В отличие от ДДМ, рецеллюляризованные аллогенными фибробластами образцы, продемонстрировали адгезию к раневой поверхности. К 30-м суткам

рецеллюляризованные матриксы свободно откреплялись, но под ними был восстановлен полностью кожный покров, что не требовало дальнейшей аутодермопластики (Рисунок 7, Б).



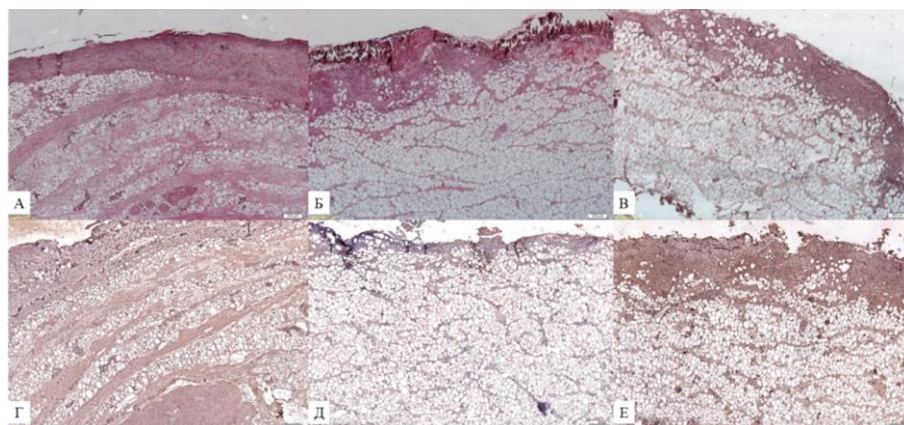
А – фиксация раневых покрытий на рану первого типа; Б – вид раны на 30-е сутки;
 В – фиксация раневых покрытий на гранулирующую рану; Г – закрытие раневой поверхности свободной кожной аутопластикой на 20-е сутки эксперимента;
 ТК – толстая кожа; ДДМ – децеллюляризованный дермальный матрикс;
 рДДМ – рецеллюляризованный дермальный матрикс

Рисунок 7 – Общий вид ожоговых ран на различные сутки эксперимента

Гистологический анализ исследуемых раневых покрытий на чистой ране выявил отличия в участках раны, закрытых ДДМ и рДДМ. Исследование динамики содержания виментина – белка промежуточных филаментов соединительных тканей при закрытии ожоговой раны ДДМ показало его накопление на 8-е сутки эксперимента – КПО составил $10,69 \pm 2,17$ %. Экспериментальное лечение ожоговой раны рДДМ показало его накопление на 16-е сутки – КПО составил $26,79 \pm 5,41$ % против $10,08 \pm 3,12$ % на 5-е сутки после нанесения раны. 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 (Рисунок 8). К 8 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.

Морфологический результат применения рДДМ существенно отличался от ДДМ. На 2–5 сутки после операции была отмечена плотная адгезия рДДМ к ране. Морфологическое исследование биоптатов показало, что на 2–5 сутки также развивалась слабовыраженная воспалительная реакция, однако она происходила только в верхних участках раны, граничащих с матриксом, также

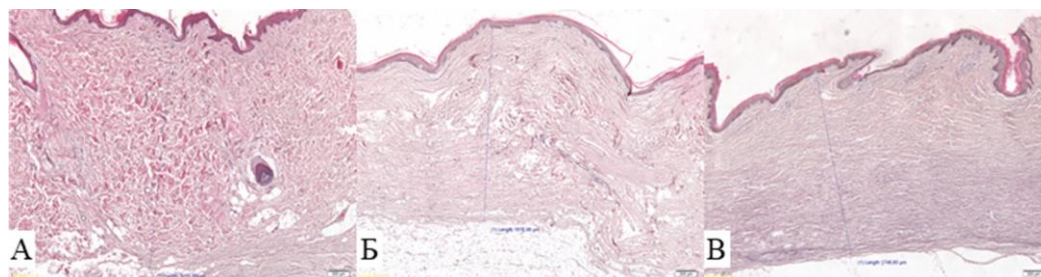
было отмечено появление дермального слоя толщиной до 200 мкм на 5 сутки эксперимента.



А, Г – 2 сутки; Б, Д – 5 сутки; В, Е – 8 сутки послеоперационного периода;
А–В – окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$; Г–Е – Виментин – белок
промежуточных филаментов соединительных тканей (ИГХ). Ув. $\times 40$

Рисунок 8 – Морфологический анализ результатов имплантации ДДМ

В последующие сутки под рецеллюляризированным матриксом 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 толщина дермы возросла до 2,5 мм, увеличилось количество интрадермальных придатков кожи, имплантированный матрикс самопроизвольно открепился от поверхности новообразованного эпидермиса. Через 5 месяцев после проведения эксперимента было также выполнено исследование участков кожи свиньи, на которых моделировалась ожоговая рана. Из полученных данных видно, что толщина вновь сформированной дермы была сопоставима в участках, закрытых рДДМ и вторичной аутодермопластикой – $1962,1 \pm 56,3$ мкм и $1738,2 \pm 67,9$ мкм соответственно ($p > 0,05$), но не достигала значений на участках, закрытых аутокожей (контроль) – $2596,2 \pm 69,1$ мкм ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно) (Рисунок 9).



А – закрытие толстой кожей; Б – закрытие рДДМ; В – вторичное закрытие с помощью
расщепленного лоскута. Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$

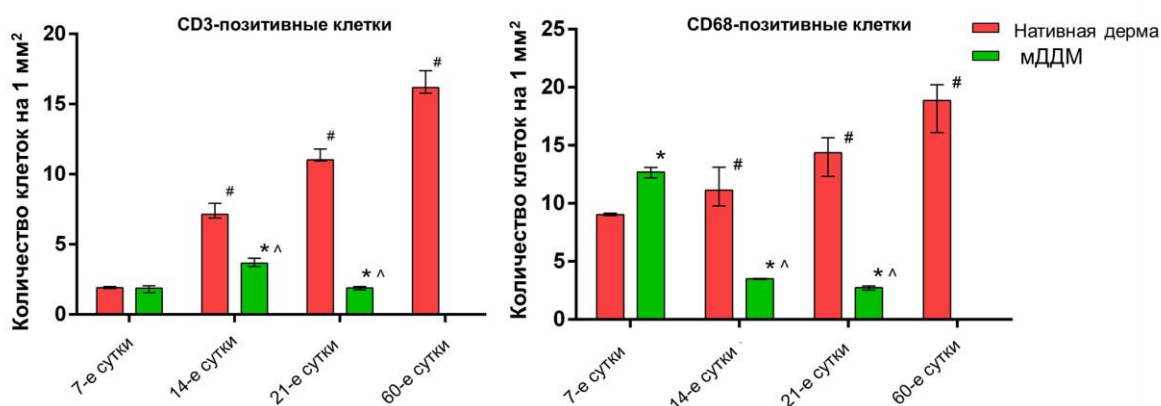
Рисунок 9 – Морфологический анализ участка ожоговой раны через 5 месяцев после лечения

Таким образом, под рецеллюляризированным ДДМ в чистой ране произошло полное восстановление всех слоев кожного покрова с

формированием полноценных дермального и эпидермального слоев.

Результаты экспериментального применения модифицированного децеллюляризированного дермального матрикса при замещении дефектов соединительной ткани

Первым этапом эксперимента была проверка биосовместимости и биодegradации ксеногенных мДДМ при подкожной имплантации крысам образцов мДДМ и нативной дермы свиньи (Рисунок 10).



* – значимость отличий между контрольной и экспериментальной группой, $p < 0,05$;

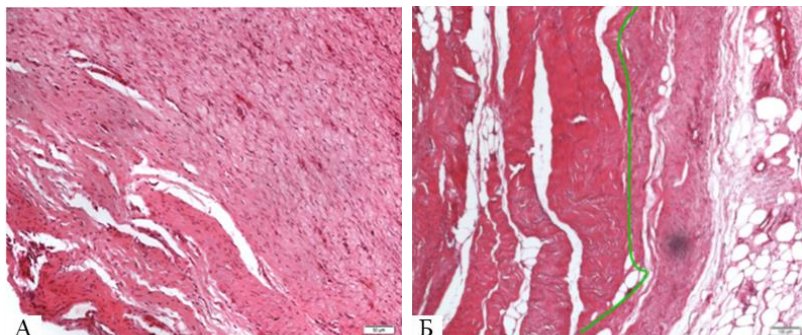
– значимость отличий для значений контрольной группы на разные сроки, $p < 0,05$;

^ – значимость отличий для значений экспериментальной группы в разные сроки, $p < 0,05$

Рисунок 10 – Содержание CD3⁺ – Т-лимфоцитов и CD68⁺ – макрофагов в области подкожной имплантации мДДМ в различные сроки эксперимента

Иммуногистохимическое исследование воспалительного инфильтрата вокруг и непосредственно внутри имплантата на различных сроках эксперимента позволили утверждать, что полученный мДДМ, по сравнению с нативной дермой свиньи, обладает минимальной иммуногенностью. В пользу слабых антигенных свойств мДДМ говорило низкое содержание CD3- и CD68-позитивных клеток по сравнению с нативной дермой и тонкая соединительнотканная капсула вокруг имплантированного фрагмента, отмеченная в срезах на 60-е сутки эксперимента. После этого было проведено экспериментальное хирургическое лечение грыжи передней брюшной стенки у двух свиней Ландрас. Ненатяжную герниопластику методом sublay грыжевого дефекта (13 x 5 см) выполняли с помощью мДДМ (размерами 15 x 7 x 0,07 см) – опытная группа и грыжевого дефекта (11 x 7 см) с помощью коммерческого импланта Permacol™ (размерами 15 x 10 x 1 см) – группа сравнения). 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 импланта Permacol™. Через 60 дней после экспериментальной герниопластики с использованием мДДМ отмечалось отсутствие таких осложнений, как адгезия матрикса к внутренним органам,

образование свищей и сером. 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 признаков воспаления (Рисунок 11, А).



А – мДДМ; Б – Permacol™, линия указывает на границу между тканями животного (слева) и имплантированным материалом (справа). Гематоксилин-эозин. Ув. ×200

Рисунок 11 – Гистологическое исследование тканей из области имплантации биопластических материалов в дефект апоневроза

Иммуногистохимическое окрашивание продемонстрировало присутствие большого количества коллагена I типа, а также значительную часть клеток мезенхимного происхождения – в частности, фибробластов и эндотелиоцитов, которые формировали типичный пейзаж рубца (Таблица 4).

Анализ образцов животного, которому был имплантирован Permacol™, показал, что 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 Permacol™ формировались небольшие очаги липоматоза и мелкие серомы.

Таблица 4 – Морфологическая характеристика соединительной ткани в области экспериментальной герниопластики и маммоластики

Маркер	мДДМ		Permacol™	
	герниопластика	маммоластика	герниопластика	маммоластика
коллаген I типа, КПО, %	56,2 [38,7; 65,3] *	48,8 [41,1; 52,5] *	44,2 [33,2; 51,5]	42,7 [37,1; 49,5]
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] *	22,4 [13,3; 24,2] *	68,1 [49,7; 73,9]	18,1 [9,9; 23,4]
CD31, КПО, %	26,3 [22,2; 29,7]	16,1 [12,8; 22,9]	22,2 [18,3; 25,9]	23,9 [15,5; 29,1]
CD3, КПО, %	0,0	0,0	0,0	0,0
CD68, КПО, %	0,0	0,0	0,0	0,0

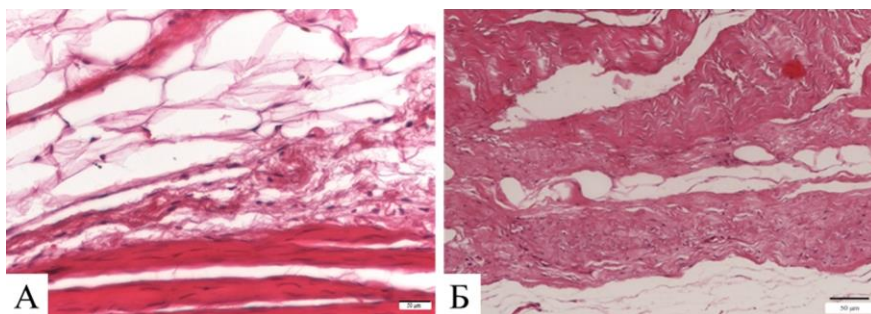
Примечание: КПО – коэффициент площади окрашивания; ПЗ – поле зрения;

* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к группе сравнения

При этом из-за достаточной жесткости, обуславливающей натяжение

имплантата, сформировалось незначительное расслоение коллагеновых волокон в апоневрозе (Рисунок 11, Б).

Результаты экспериментального применения мДДМ в качестве фиксирующего материала для маммопластики показали, что образцы животного, которому был имплантирован матрикс, характеризовались интеграцией матрикса в собственные ткани свиньи, о чём говорило отсутствие соединительно-тканной капсулы на границе между имплантом и мышечной тканью (Рисунок 12, А).



Гематоксилин-эозин. Ув. ×400

Рисунок 12 – Граница между мДДМ и грудной фасцией (А); граница между Permacol™ и грудной фасцией (Б)

Воспалительных изменений, в том числе затухших, выявлено не было. В образцах мДДМ был отмечен клеточный компонент, представленный фибробластоподобными клетками. Хорошо заметная граница между мДДМ и грудной фасцией обусловлена тем, что в плотной соединительной ткани все коллагеновые волокна ориентированы параллельно друг другу, а в имплантированном мДДМ их расположение разнонаправленное. В препаратах животного, у которого для маммопластики использовали Permacol™, отмечалась хорошая интеграция импланта в собственные ткани. На границе грудной фасции 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. В отдельных полях зрения отмечалась выраженная фрагментация имплантированного биоматериала и очаговая гиперплазия адипоцитов (Рисунок 12, Б).

Для оценки сохранности ВКМ в месте имплантации мДДМ было проведено исследование коллагена I типа, продемонстрировавшее его достаточно равномерное распределение, что говорит о нормальном формировании соединительной ткани, в частности, её оформленного межклеточного вещества. Известно, что коллагеновые имплантаты вызывают легкий воспалительный процесс, характеризующийся отложением компонентов ВКМ по мере деградации коллагена, с очень незначительной васкуляризацией имплантата или без нее. Имплантаты из сшитого коллагена вызывают более интенсивный и устойчивый тканевой ответ с повышенным отложением компонентов ВКМ [А.Н. Morris et al.,

2017]. В связи с этим было интересно провести сравнительную оценку иммунного ответа на разработанный матрикс и сшитый гексаметилендиизоцианатом Permascoll™. ИГХ анализ 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. Равномерное распределение коллагена во всех полях зрения свидетельствовало о полноценной регенерации с формированием зрелой соединительной ткани у животного с имплантацией Permascoll™. Об отсутствии иммуногенности имплантированного материала свидетельствовало отсутствие Т-лимфоцитов (CD3⁺) и макрофагов (CD68⁺) в тканевых срезах. 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 (Таблица 4).

Таким образом, сравнительные морфологические результаты, полученные через 60 дней после проведения экспериментов по замещению дефектов апонервоза и грудной фасции, позволили утверждать, что иммуногенность, уровень интеграции в ткани животного и темпы биodeградации мДДМ сопоставимы с коммерческими имплантами Permascoll™.

Оценка структурных и функциональных особенностей децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе 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 5% раствором гидроксида натрия при гидромодуле 1 : 5 при комнатной температуре, после чего отмывали в деионизированной воде до нейтрального значения pH. Полученный гидрогель был прозрачным, плотным и гомогенным, что связано с набуханием биополимеров и объясняется нарушением структуры коллагена, а именно частичным гидролизом коллагеновых фибрилл и разрушением невосстанавливаемых коллагеновых сшивков (Рисунок 13).

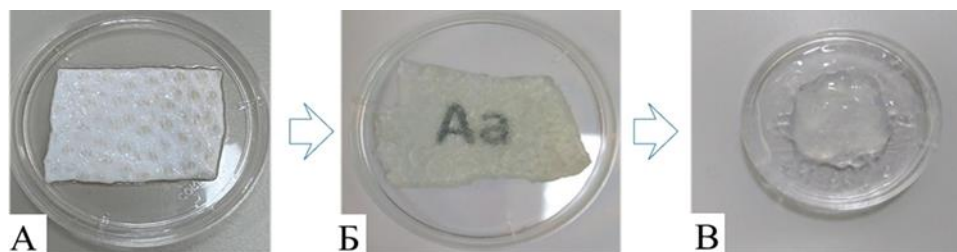


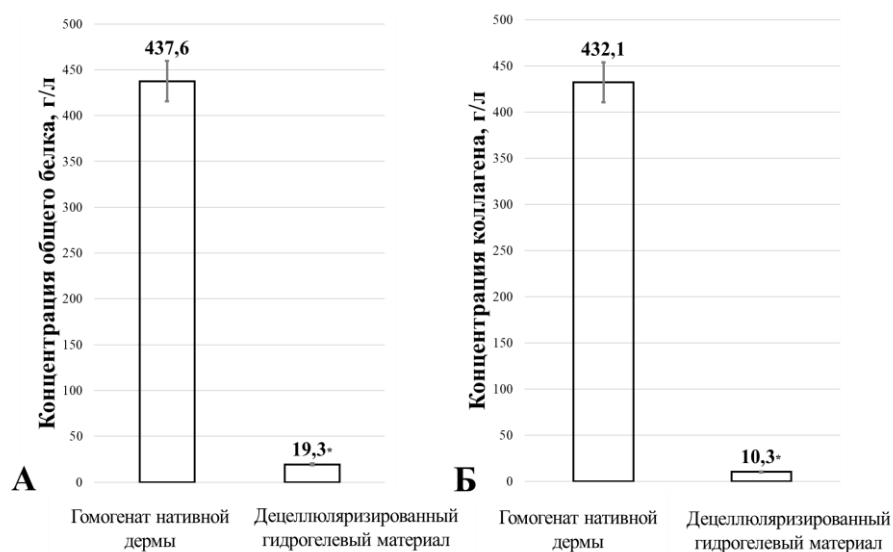
Рисунок 13 – Внешний вид образца дермы до обработки щелочным раствором (А), после 6 ч обработки 5 % NaOH (Б), после 20 ч обработки 5 % NaOH (В)

По результатам окрашивания DAPI в образцах полученного гидрогеля не было обнаружено клеточных ядер, показывающих интенсивное свечение в нативной дерме. Количественный анализ показал, что в процессе обработки нативной дермы было удалено около 71 % ДНК ($54,2 \pm 17,2$ нг/мг в гидрогеле по

сравнению с $183,9 \pm 12,3$ нг/мг – в нативной дерме, $p < 0,001$), это свидетельствовало о том, что образцы были в значительной степени очищены от ДНК.

МТТ-тест показал наличие живых, метаболически активных клеток после 24 часов инкубирования с децеллюляризированным гидрогелевым материалом на основе дермы свиньи при этом жизнеспособность клеток оказалась значимо ниже, чем в контрольных лунках, но выше, чем в отрицательном контроле. Оценка биосовместимости образцов показала, что уже на 3-и сутки в месте инъекции гидрогеля на кожных покровах и в подлежащих тканях не наблюдалось признаков воспаления, некроза тканей и неоангиогенеза. Гидрогель характеризовался частичной биодеградацией, был незначительно пропитан фибринозным экссудатом, что свидетельствует о возможности его применения как основы для формирования соединительной ткани при поверхностных ранениях кожи.

Образцы гидрогеля, полученные химической децеллюляризацией, анализировались на содержание общего белка, нативного коллагена, гиалуроновой кислоты, сульфатированных общих и О-гликозаминогликанов и ДНК для оценки сохранности компонентов ВКМ. Гомогенаты нативной дермы 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 14, А).

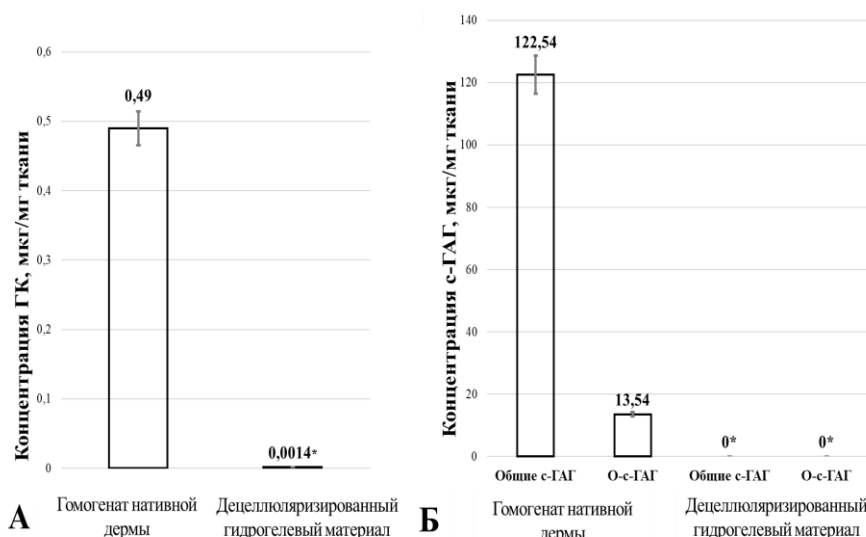


А – содержание общего белка; Б – содержания нативного коллагена (по данным ИФА); * – значимость различий по сравнению с нативной дермой, $p < 0,001$

Рисунок 14 – Результаты анализа биохимических показателей децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи

В результате обработки дермы 5 % раствором NaOH произошло удаление 96,7 % белка (в сравнении с содержанием в образцах 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 14, Б. В результате обработки дермы 5 % раствором NaOH произошло удаление 97 % коллагена ($10,3$ г/л в гидрогеле по

сравнению с 432,1 г/л – в гомогенате нативной дермы, $p < 0,001$), что объясняется его возможным разрушением (частичным гидролизом, денатурацией) и вымыванием. Количественный анализ содержания гиалуроновой кислоты в полученном гидрогеле продемонстрировал её полную потерю (вымывание) ($p < 0,001$ в сравнении с содержанием в образцах до обработки дермы (Рисунок 15, А). Установлено, что в результате обработки дермы также произошла полная потеря О- и N-сульфатированных гликозаминогликанов ($p < 0,001$ в сравнении с содержанием в образце дермы до обработки) (Рисунок 15, Б).



А – концентрация гиалуроновой кислоты (ГК); Б – содержание сульфатированных гликозаминогликанов (с-ГАГ); * – значимость различий по сравнению с нативной дермой свиньи, $p < 0,001$

Рисунок 15 – Результаты анализа количественного определения содержания гетерополисахаридов в децеллюляризованном гидрогелевом материале на основе дермы свиньи

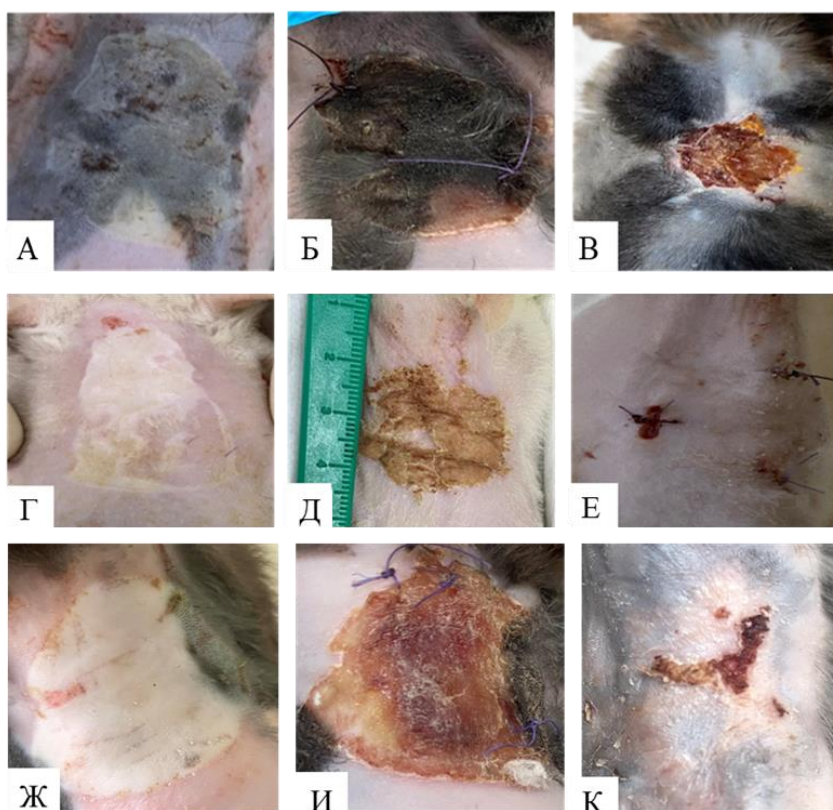
При проведении теста на миграционную активность в условиях экспозиции децеллюляризованного гидрогелевого материала и ППС 1,8 : 1 наблюдалось более активное продвижение фибробластов в зону дефекта, сопровождаемое формированием выраженных ламеллоподий – структур, характерных для клеток с высоким уровнем 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. 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 [Т.А. Wynn 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. 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].

Результаты исследования децеллюляризованного гидрогелевого материала на основе дермы свиньи показали, что его использование обуславливает высокую скорость заживления в сравнении с животными, не получавшими лечения (контрольная группа) (Рисунок 16).



А, Б, В – контрольная группа, без лечения; Г, Д, Е – опытная группа, лечение децеллюляризированным гидрогелевым материалом; Ж, И, К - лечение мазью «Левомеколь»
А, Г, Ж – день операции; Б, Д, И – 3 день эксперимента; В, Е, К – 9 день эксперимента

Рисунок 16 – Внешний вид животных после нанесения ожоговой раны

На 3-и сутки после нанесения ожоговой раны в образцах кожи крыс, не получавших лечения, обнаруживались признаки острого воспаления и выраженного гистоллиза. В тканях присутствовало большое количество нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов по данным компьютерной морфометрии. На поверхности присутствовал фибринозно-гнойный экссудат. 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 и макрофагами. Некротические и дистрофические изменения были выражены умеренно (Таблица 5).

Таблица 5 – Количественный анализ иммуногистохимического анализа образцов тканей ожоговых ран в экспериментальных группах

Группа/сутки	Контрольная группа группа 1	Группа сравнения группа 2	Опытная группа группа 3
CD16b (КПО, %, Me [Q ₁ ; Q ₃])			
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, %, Me [Q ₁ ; Q ₃])			
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, Me [Q ₁ ; Q ₃])			
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.			

В образцах ран, покрытых децеллюляризированным гидрогелевым материалом на основе дермы свиньи, на третьи сутки отмечалось умеренно выраженное диффузное воспаление, незначительные некротические и дистрофические изменения и полнокровие сосудов. Анализ биоптатов, полученных на седьмые сутки, от не имевших раневого покрытия животных, показал умеренно 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. Образцы от животных, в те же сроки получавших лечение препаратом сравнения, демонстрировали слабо выраженное воспаление с небольшими очагами лимфомакрофагальной инфильтрации, выраженный отёк коллагеновых волокон и незначительное полнокровие капилляров в грануляционной ткани. Пролиферирующий эпидермис в данном случае формировал тонкий однородный пласт. В препаратах животных, ожоговая рана которых была покрыта

децеллюляризованным гидрогелевым материалом на основе дермы свиньи, наблюдалось слабо выраженное воспаление, при котором лейкоциты формировали мелкие скопления. На 14-е сутки после нанесения ожоговой раны в образцах тканей всех трёх групп животных наблюдались статистически незначимые различия в количественном составе резидуальных воспалительных клеток в дерме, а также в плотности микроциркуляторного русла и толщине эпидермального пласта.

Исследование морфофункциональных особенностей тучных клеток в раневом ожоговом регенерате у крыс показало, что во всех 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 гидрогелем к 7-м суткам экспериментального лечения степень дегрануляции снизилась на 63,2 % и 38,3 % относительно контрольной группы и группы сравнения соответственно ($p < 0,05$) (Таблица 6).

Таблица 6 – Степень дегрануляции и количество тучных клеток в образцах тканей экспериментальных групп

Группа	Контрольная группа		Опытная группа		Группа сравнения	
	СД, %	ТК, кол-во в поле зрения	СД, %	ТК, шт	СД, %	ТК, шт
3-и 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

Известно, что при использовании коллагенсодержащих раневых покрытий коллаген способен обратимо связывать факторы роста, защищая их от протеолиза, с этим фактом возможно связать уменьшение функциональной активности тучных клеток в опытной группе в результате лечения децеллюляризованным гидрогелевым материалом на основе дермы свиньи.

Проведение ИГХ анализа позволило выявить особенности динамики восстановления компонентов ВКМ кожи в различных группах. 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 (Таблица 7).

Оценка содержания белка базальных мембран коллагена IV типа показала, что во всех группах произошло восстановление концентрации данного белка до нормальных значений. Следует отметить сходную картину в увеличении КПО фибронектина во всех группах, который является адгезионным белком для коллагена ВКМ и эпителиальных клеток. Особенностью опытной группы была ранняя эпителизация по сравнению с контрольной группой, т.к. КПО цитокератина на 7-й день после лечения был выше, однако к 14-м суткам количество цитокератина в образцах кожи крыс всех групп не отличалось.

Гистоморфологические особенности заживления ожоговой раны под разными покрытиями на более ранних этапах, позволяют сделать вывод о том, что применение гидрогеля было наиболее эффективно по сравнению с применением мази «Левомеколь». В образцах, покрытых гидрогелем быстрее затухало воспаление и были минимально выражены некробиотические изменения, репаративные процессы были завершены в течение двух недель после получения раны.

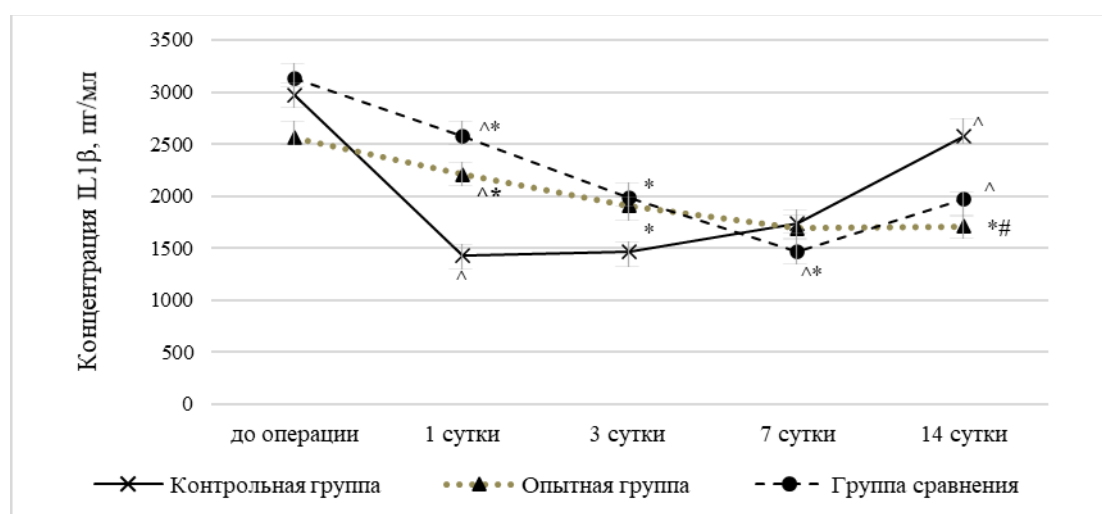
Таблица 7 – Динамика восстановления компонентов ВКМ кожи после ожоговой раны в образцах тканей экспериментальных групп крыс

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 [^]
Цитокератин, КПО, %			
Контрольная группа	0	0,7 ± 0,3	7,2 ± 0,4
Опытная группа	0	1,4 ± 0,2*	6,0 ± 0,5
Группа сравнения	0	0,7 ± 0,2	7,3 ± 0,2
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; КПО – коэффициент площади окрашивания			

Таким образом, децеллюляризированный гидрогелевый материал на основе дермы свиньи способствовал ускоренному заживлению ожоговых ран. Простота и низкая себестоимость технологии получения гидрогеля делают его потенциально перспективным и конкурентоспособным отечественным биологическим материалом для заживления ран.

Динамика изменения содержания про- и противовоспалительных факторов репарации при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс децеллюляризированным гидрогелевым материалом на основе дермы свиньи

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 17). 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.

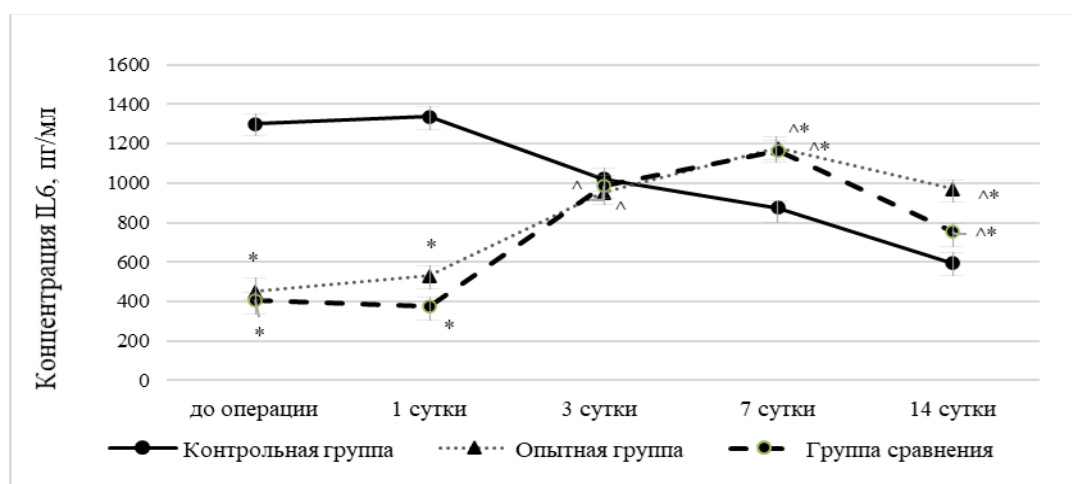


* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 17 – Уровни IL1 β при лечении ожоговых ран крыс в динамике

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 β 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 децеллюляризованного 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.

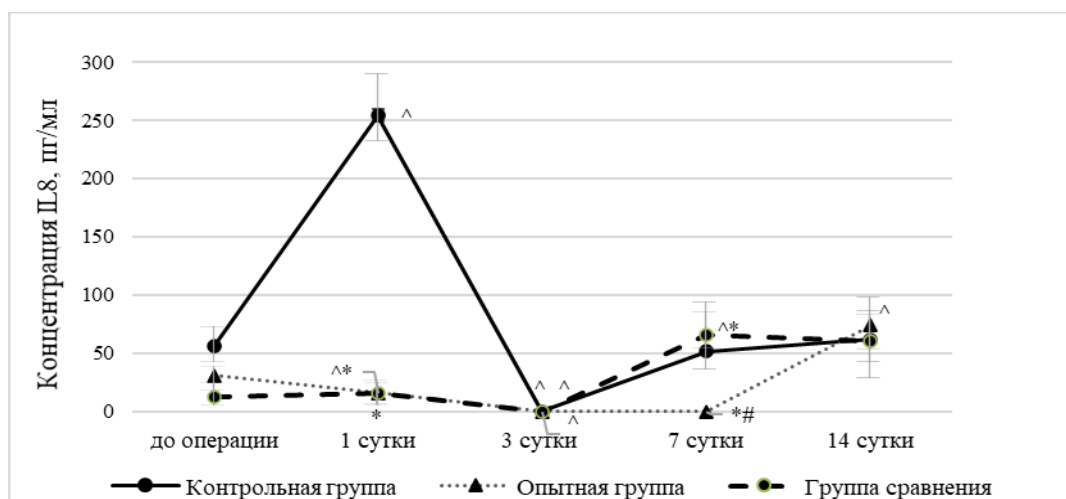
Следующим провоспалительным цитокином, для которого был проведён сравнительный анализ динамики в ходе эксперимента, был IL6. Известно, что при повреждении тканей в ранние сроки индуцируется синтез IL6, которые способствует активации острофазовых иммунных реакций, кроме того, известно, что IL-6 способствует пролиферации кератиноцитов и образованию коллагена в дермальных фибробластах [Tanaka T. 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. При сравнении групп с лечением децеллюляризированным гидрогелевым материалом, а также в группе сравнения не было выявлено значимой разницы на всех сроках эксперимента у крыс (Рисунок 18).



* – $p < 0,05$, 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 18 – 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 19).

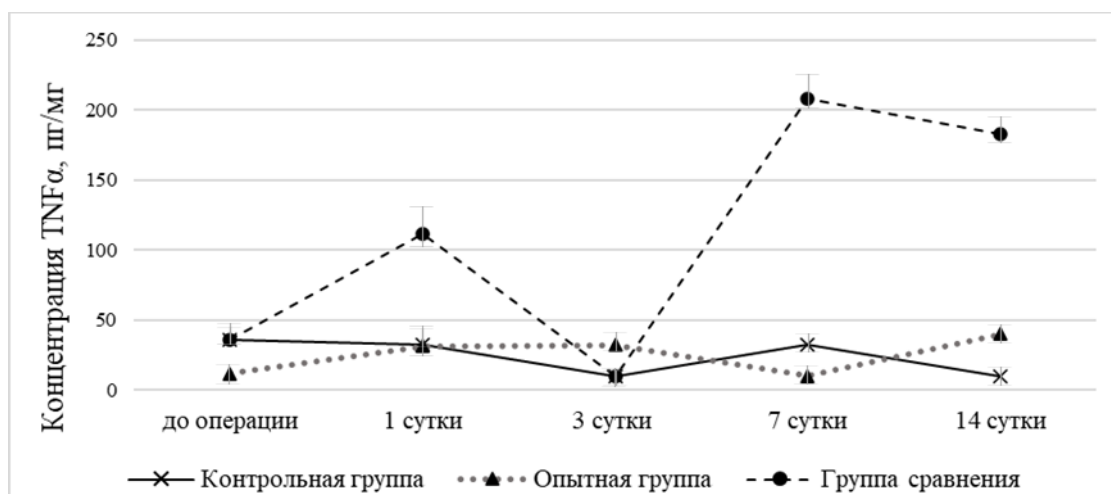


* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 19 – 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 значительно 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.

Анализ данных, полученных при определении содержания TNF α , показал, что профили данного провоспалительного фактора в группах с лечением мазью «Левомеколь» и децеллюляризованным 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. 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 (Рисунок 20).

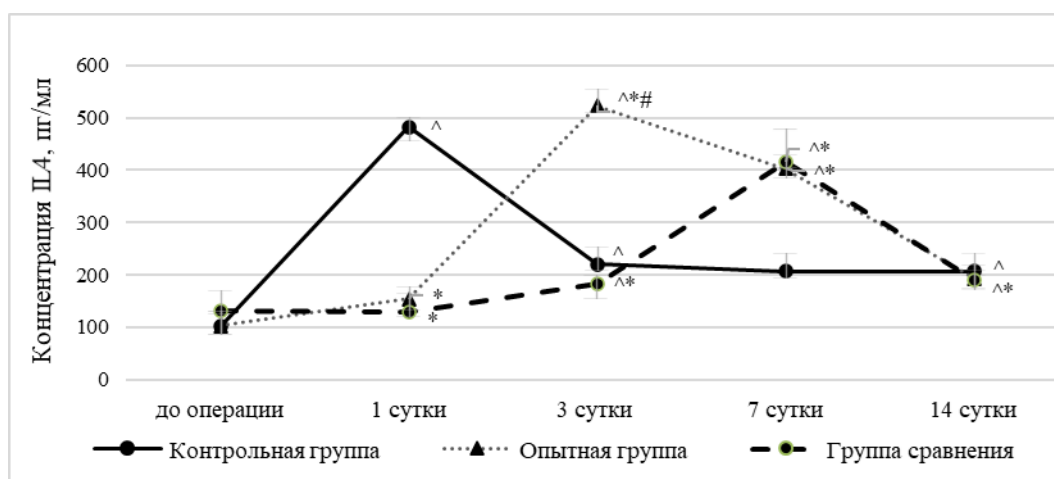


* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 20 – Динамика уровней TNFα при лечении ожоговых ран крыс

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 21).



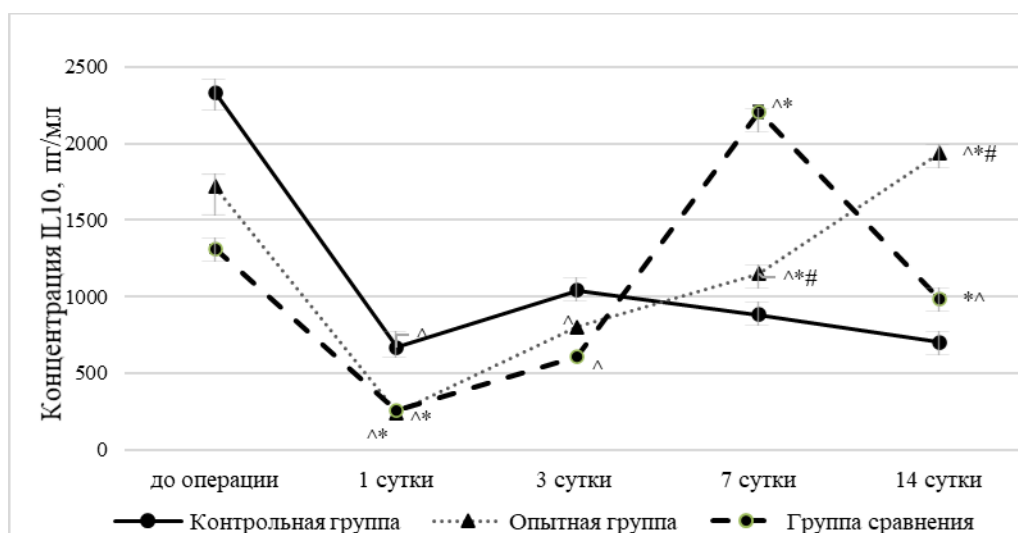
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 21 – Динамика уровней IL4 при лечении ожоговых ран крыс

Внесение гидрогеля позволило значительно увеличить 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. В группе сравнения наблюдалось более 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.

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 22).

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 гидрогелем наблюдалось сначала снижение концентрации IL10, затем к 7-м суткам её увеличение.



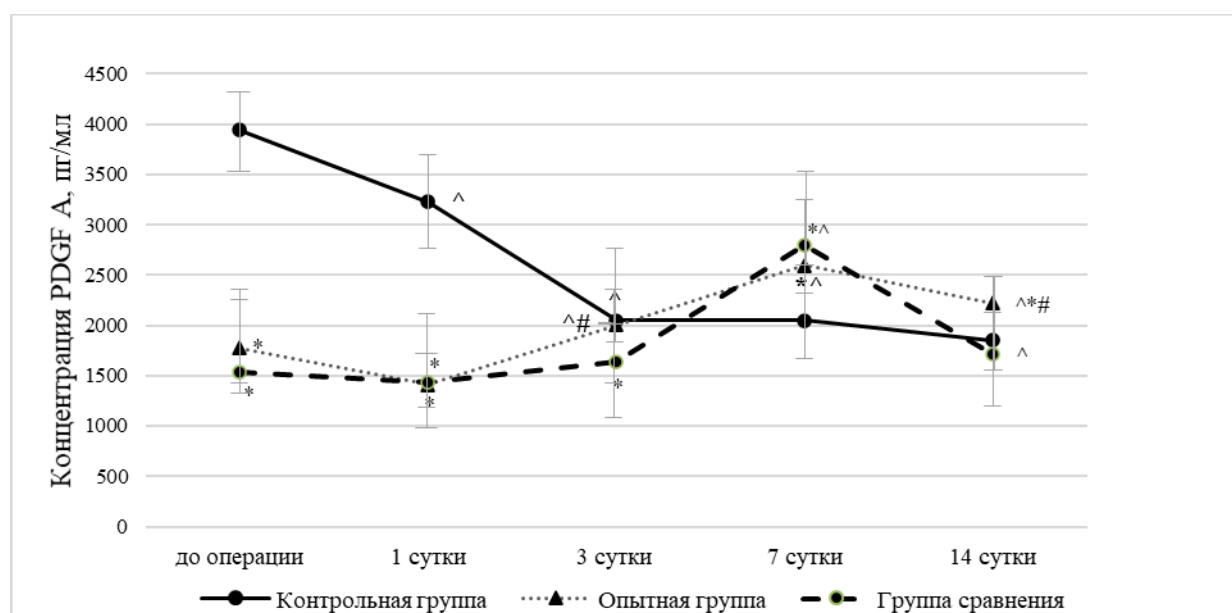
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 22 – Динамика уровней IL10 при лечении ожоговых ран крыс

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 $IL1\beta$ 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 $TNF\alpha$, 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.

При проведении сравнительного анализа изменения уровня PDGF было выявлено, что под действием провоспалительных цитокинов его концентрация в контрольной группе снижалась на 1-е и 3-е сутки эксперимента (Рисунок 23). 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».



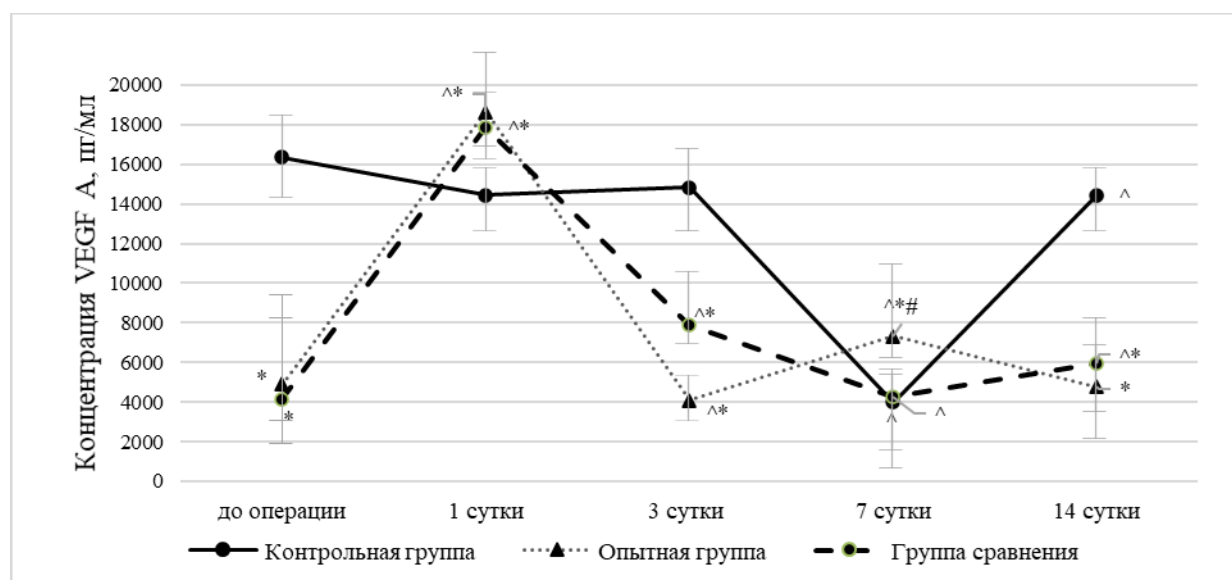
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 23 – 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 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 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].

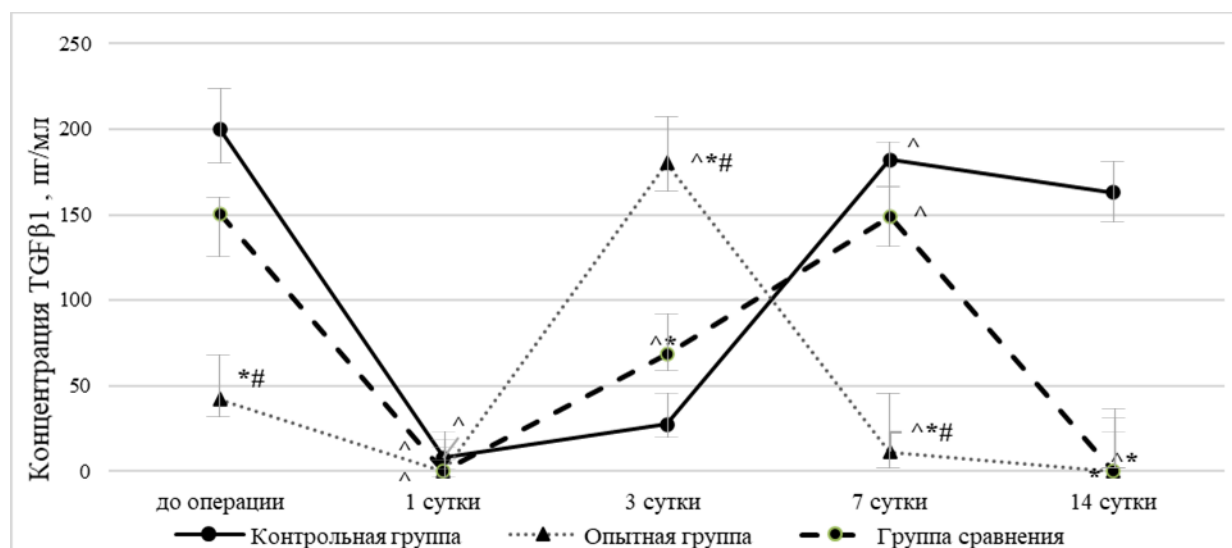
При определении уровня VEGF A наблюдался пик в группе лечения децеллюляризированным гидрогелевым материалом и мазью «Левомеколь» на 1-е сутки эксперимента в отличие от контрольной группы. На 14-е сутки уровни VEGF A в опытной и контрольной группе не отличались от значений, полученных до начала эксперимента, а в группе сравнения были незначительно выше (на 44 %; $p < 0,05$) исходного значения (Рисунок 24).



* – $p < 0,05$, 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 24 – Динамика уровней VEGF A при лечении ожоговых ран крыс

Анализ профилей TGFβ1 продемонстрировал значительное влияние внесения экзогенных биополимеров на процесс репарации кожи (Рисунок 25).



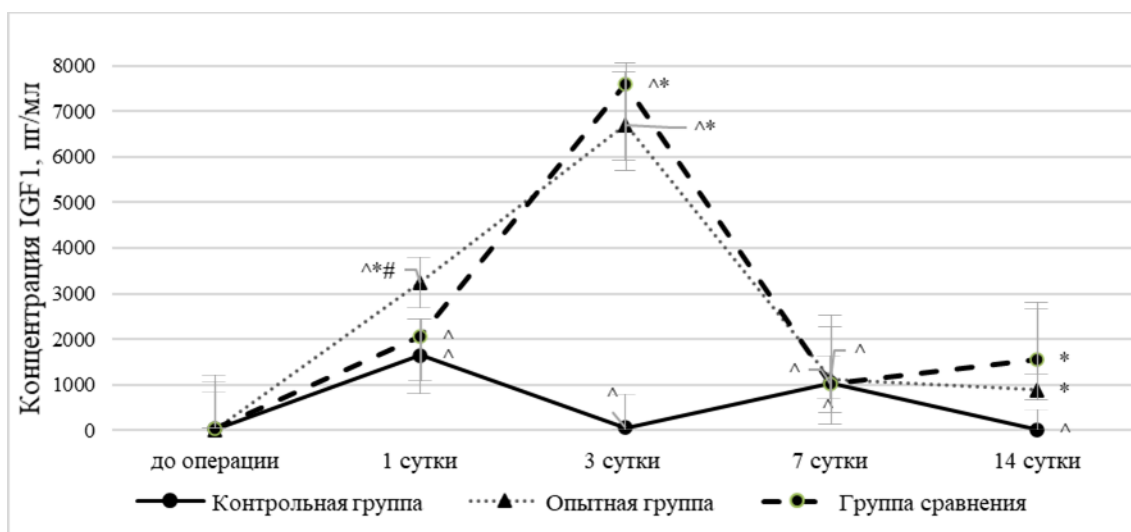
* – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Рисунок 25 – Динамика уровней TGFβ1 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 TGFβ1 по сравнению с опытной группой, где пик синтеза наблюдался уже 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 TGFβ, 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 26).

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 26 – 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящей работой показано, что применение децеллюляризованных материалов, получаемых из донорского материала животного (свиной ксенографт дермы) активирует репарацию и ремоделирование соединительной ткани и кожи при замещении повреждений и дефектов данными материалами. Однако, способность индуцировать конструктивное ремоделирование во многом зависит от методов, применяемых для получения децеллюляризованных материалов на основе дермы. Результаты исследования позволяют утверждать, что детергентно-энзиматическая обработка дермы приводит к сохранению комплекса структурных компонентов, объединенных в уникальную тканеспецифичную архитектуру, а также является экономически целесообразной и доступной техникой децеллюляризации. Обработка дермы свиньи щелочным раствором оказывает значительное гидролитическое воздействие на биополимеры ВКМ и позволяет получить децеллюляризованный гидрогелевый материал, содержащий высокомолекулярные компоненты, но не сохраняющий своей тканевой специфичности. Полученные материалы соответствуют таким характеристикам

как биологическая совместимость, способность интегрироваться в ткани и возможность быть носителем для клеток кожи. Использование рецеллюляризованного фибробластами матрикса дермы при ожоговой ране приводит к полному восстановлению всех слоев кожи, обеспечивает эпителизацию, миграцию фибробластов, более эффективное образование промежуточных филаментов, полноценную коллагенизацию и ангиогенез. Их применение в качестве тканезамещающих материалов при герниопластике показывает свою эффективность по достаточно равномерному распределению коллагена I типа, что говорит о нормальном формировании соединительной ткани, в частности, оформленного межклеточного вещества. При использовании гидрогелевого материала для лечения ожоговых ран наблюдается полное восстановление кожи в поражённой области в более ранние сроки с большим количеством фибробластов и слоёв эпидермиса относительно группы без лечения. Внесение экзогенных биологических компонентов ВКМ дермы свиньи – коллагена и его гидролизатов оказывает значительное влияние на регуляцию синтеза противовоспалительных цитокинов и динамику уровней факторов роста, контролирующих процессы синтеза и созревания коллагена в области ожоговой раны, что способствует оптимизации сроков эпителизации и заживления раны.

ВЫВОДЫ

1. Обработка дермы свиньи последовательным воздействием растворов детергентов (дезоксихолат натрия, тритон-X100) и ферментов (трипсин, ДНКаза) позволяет достаточно полно удалить клеточные и ядерные структуры и сохранить гистоархитектонику внеклеточного матрикса плотной соединительной ткани, так как коллагеновые пучки децеллюляризованной 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. Децеллюляризованный 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 децеллюляризованных и рецеллюляризованных материалов, как при раннем, так и при этапном хирургическом лечении.

4. Оценка патоморфологической картины заживления ожоговой раны показывает, что использование рецеллюляризованного 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 децеллюляризованным 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 повышается 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 активизирует ремоделирование тканей и ангиогенез.

10. Внесение гидрогелевого материала на основе внеклеточного матрикса дермы свиньи в зону ожоговой раны активизирует 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 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ **Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК при** **Минобрнауки России**

1. Сотниченко, А.С. Разработка методики получения дермального внеклеточного матрикса / А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич, **К.И. Мелконян**, Я.А. Юцкевич, А.В. Каракулев, С.Б. Богданов, И.М. Быков, А.Н. Редько, В.А. Порханов, С.Н. Алексеенко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 4. – С. 81-87. (**Scopus, WoS, ВАК, K1**)

2. **Мелконян, К.И.** Компоненты внеклеточного матрикса в восстановлении поврежденных тканей: биохимические взаимодействия и протективный эффект / К.И. Мелконян, А.О. Бирюкова, Н.Н. Улитина, Т.В. Русинова, Я.А. Юцкевич, М.Г. Литвинова, И.М. Быков, М.И. Карташевская // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2019. – Т. 9. – № 4. – С. 55-62. (**ВАК, K3**)

3. Сотниченко, А.С. Сравнительная морфологическая характеристика результатов имплантации децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриксов кожи свиньи / А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич, **К.И. Мелконян**, Я.А. Юцкевич, Т.В. Русинова, А.В. Каракулев, С.Б. Богданов, В.А. Аладьина, Ю.А. Белич, С.Е. Гуменюк, Д.И. Ушмаров, И.М. Быков, А.Н. Редько, В.А. Порханов, С.Н. Алексеенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170. – № 9. – С. 377- 382 (*в переводной версии журнала: Sotnichenko A.S. Comparative morphological characteristics of the results of implantation of decellularized and recellularized porcine skin scaffolds / A.S. Sotnichenko, I.V. Gilevich, **K.I. Melkonyan**, Y.A. Yutskevich, T.V. Rusinova, A.V. Karakulev, S.B. Bogdanov, V.A. Aladina, Yu.A. Belich, S.E. Gumenyuk, D.I. Ushmarov, I.M. Bykov, A.N. Redko, V.A. Porhanov, S.N. Alekseenko // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – Vol. 170 (3). – P. 378-383.*) (**Scopus, WoS**)

4. Богданов, С.Б. Способ моделирования кожной раны у свиней в эксперименте / С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, Ю.А. Богданова, А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич, **К.И. Мелконян**, В.А. Аладьина // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2021. – Т. 17. – № 1. – С. 46-50. (**ВАК, K2**)

5. **Мелконян, К.И.** Оценка элиминации ядерного материала при различных методах децеллюляризации дермы / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай,

А.С. Асякина // Биомедицина. – 2021. – Т. 17. – № S3. – С. 59-63. (ВАК, К1).

6. **Мелконян, К.И.** Сравнительная оценка биомеханических характеристик ацеллюлярного дермального матрикса для герниопластики / К.И. Мелконян, К.И. Попандопуло, С.Б. Базлов, Т.В. Русинова, О.А. Москалюк, И.М. Быков // Кубанский научный медицинский вестник. – 2022. – Т. 29. – № 5. – С. 94-107. (ВАК, К1)

7. Могильная, Г.М. Особенности заживления термической раны в условиях стимуляции неокollaгеногенеза: доклиническое экспериментальное рандомизированное исследование / Г.М. Могильная, Е.В. Фомичева, **К.И. Мелконян** // Кубанский научный медицинский вестник. – 2022. – Т. 29. – № 6. – С. 53-66. (ВАК, К1)

8. **Мелконян, К.И.** Морфологический анализ местной тканевой реакции на подкожную имплантацию фрагментов ацеллюлярного дермального матрикса / К.И. Мелконян, А.А. Веревкин, А.С. Сотниченко, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай, А.С. Асякина, М.И. Карташевская, К.Г. Гуревич, И.М. Быков // Бюллетень сибирской медицины. – 2022. – № 21 (2). – С. 97-104. (Scopus, WoS, ВАК, К1)

9. **Мелконян, К.И.** Выбор оптимальной методики для получения различных форм биосовместимых ксенодермальных материалов / К.И. Мелконян, Я.А. Козмай, А.А. Веревкин, Т.В. Русинова, А.С. Асякина, М.Л. Золотавина // Современные технологии в медицине. – 2022. – Т. 14 (1). – С. 34- 43. (Scopus, WoS)

10. Богданов, С.Б. Патоморфологическая характеристика раневого ложа перед кожной аутопластикой / С.Б. Богданов, **К.И. Мелконян**, А.В. Поляков, А.С. Сотниченко, А.А. Веревкин, И.В. Гилевич, В.А. Аладьина, Ю.А. Богданова, А.В. Каракулев, Л.А. Медведева, В.А. Порханов // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2022. – Т. 18. – № 1. – С. 73-77. (ВАК, К2)

11. **Мелконян, К.И.** Результаты экспериментальной герниопластики с применением ацеллюлярного дермального матрикса / **К.И. Мелконян**, К.И. Попандопуло, С.Б. Базлов, А.А. Веревкин, Т.В. Русинова, А.С. Асякина, И.В. Супрун, В.А. Заборова, К.Г. Гуревич // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174. – № 10. – С. 529-532 (в переводной версии журнала: **Melkonyan K.I.** Results of experimental hernioplasty with acellular dermal matrix / K.I. Melkonyan, K.I. Popandopulo, S.B. Bazlov, A.A. Verevkin, T.V. Rusinova, A.S. Asyakina, I.V. Suprun, V.A. Zaborova, K.G. Gurevich // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2023. – Vol. 174. – P. 514-517). (Scopus, WoS)

12. **Мелконян, К.И.** Разработка и изучение влияния дермального гидрогеля с экстрактом кукурузы столбиков с рыльцами на процесс репарации скарифицированных ран в эксперименте / К.И. Мелконян, Е.Б. Никифорова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67. – № 1. – С. 87-93. (ВАК, К1)

13. **Мелконян, К.И.** Оценка биомеханических свойств материалов на основе дермы для герниопластики / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай, Е.А. Солоп, О.А. Москалюк, А.С. Асякина, М.М. Манукян, К.Г. Гуревич // Российский журнал биомеханики. – 2023. – № 2. – С. 10-17. (ВАК, К2), в переводной версии журнала: **Melkonyan, K.I.** Biomechanical properties of derma materials for hernioplasty / K.I. Melkonyan, T.V. Rusinova, J.A. Kozmay, E.A. Solop, O.A. Moskalyuk, A.S. Asyakina, M.M. Manukyan, K.G. Gurevich // Russian Journal of Biomechanics. – 2023. – Vol. 2. – P. 6-11. (Scopus)

14. **Мелконян, К.И.** Разработка и экспериментальное обоснование использования ацеллюлярного дермального матрикса для герниопластики передней брюшной стенки / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.С. Асякина, Е.А. Солоп, А.А. Фоменко, Г.П. Чупрынин // Инновационная медицина Кубани. – 2023. – Т. 3. – С. 71-79. (**Scopus, ВАК, К3**)

15. **Мелконян, К.И.** Применение гидрогеля на основе дермы свиньи для экспериментального лечения поверхностных ран / К.И. Мелконян, Я.А. Козмай, Т.В. Русинова Г.П. Чупрынин, М.И. Карташевская, И.И. Карташевский, С.В. Сторожук, И.И. Селезнева, К.Г. Гуревич // Бюллетень сибирской медицины. – 2023. – Т. 22(3). – С. 54-60. (**Scopus, WoS, ВАК, К1**)

16. **Мелконян, К.И.** Сравнительная оценка эффективности репарации ожоговых ран при применении гидрогелевого материала на основе дермы: доклиническое экспериментальное исследование / К.И. Мелконян, С.Н. Алексеенко, И.М. Быков // Кубанский научный медицинский вестник. – 2023. – Т. 30(6). – С. 15-27. (**Scopus, ВАК, К1**)

Патенты на изобретение

1. Патент № 2726600 С1 G09В 23/28 А61В 17/00 Способ моделирования кожной раны у свиней в эксперименте / С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, В.А. Порханов, И.В. Гилевич, А.С. Сотниченко, **К.И. Мелконян**, Д.И. Ушмаров; заявитель и патентообладатель: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Научно-исследовательский институт – краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» министерства здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ «НИИ-ККБ № 1 им. проф. Очаповского»), С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, В.А. Порханов, И.В. Гилевич, А.С. Сотниченко, **К.И. Мелконян**, Д.И. Ушмаров, № 20191122965; заявл. 16.07.2019; опубл. от 14.07.2020; Бюл. № 20. – 12 с.

2. Патент № 2717088 С1 А61L 27/36 Способ получения ацеллюлярного дермального матрикса / И.В. Гилевич, А.С. Сотниченко, **К.И. Мелконян**, Я.А. Юцкевич, С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, В.А. Порханов; заявитель и патентообладатель: Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Научно-исследовательский институт – краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» министерства здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ «НИИ-ККБ N1 им. проф. Очаповского»), И.В. Гилевич, А.С. Сотниченко, **К.И. Мелконян**, Я.А. Юцкевич, С.Б. Богданов, А.В. Каракулев, В.А. Порханов, № 2019133278; заявл. 18.10.2019; опубл. от 18.03.2020; Бюл. № 8. – 8 с.

3. Патент № 2768156 С1G09В 23/28 А61В 17/00 А61В 17/322 А61L 27/36 Способ подготовки дермы свиньи для создания ацеллюлярного дермального матрикса в эксперименте / **К.И. Мелконян**, А.С. Сотниченко, А.А. Веревкин, Т.В. Русинова, А.С. Асякина, Я.А. Козмай; заявитель и патентообладатель: Мелконян К.И., Сотниченко А.С., Веревкин А.А., Русинова Т.В., Асякина А.С., Козмай Я.А., № 2021115743; заявл. 31.05.2021; опубл. 23.03.2022; Бюл. № 19. – 6 с.

4. Патент № 2791987 С1 А61L 27/60 А61F 2/10 1. Способ децеллюляризации дермы свиньи для реконструктивной пластической хирургии / **К.И. Мелконян**, А.А. Веревкин, Т.В. Русинова, А.С. Асякина, Я.А. Козмай; заявитель и патентообладатель: Мелконян К.И., Веревкин А.А., Русинова Т.В., Асякина А.С., Козмай Я.А., № 2022109499; заявл. 08.04.2022; опубл. 15.03.2023; Бюл. № 8. – 9 с.

Тезисы конференций

1. Гилевич, И.В. Морфологический анализ результатов комплексного подхода к лечению ожоговой раны с применением дермальных фибробластов / И.В. Гилевич, А.С. Сотниченко, А.В. Поляков, С.Б. Богданов, **К.И. Мелконян**, Л.А. Медведева, В.А. Порханов // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – С. 61- 62.
2. **Мелконян, К.И.** Сравнительная характеристика результатов имплантации децеллюляризованных и рецеллюляризованных матриц кожи свиньи / К.И. Мелконян, А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич, Т.В. Русинова, Я.А. Юцкевич, А.В. Каракулев, С.Б. Богданов, И.М. Быков, В.А. Порханов, А.Н. Редько, С.Н. Алексеенко // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – № S. – С. 150.
3. Сотниченко, А.С. Разработка новой методики получения дермального внеклеточного матрикса / А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич, **К.И. Мелконян**, Я.А. Юцкевич, А.В. Каракулев, С.Б. Богданов, И.М. Быков, В.А. Порханов, А.Н. Редько, С.Н. Алексеенко // Гены и Клетки. – 2019. – Т. 14. – № S. – С. 219.
4. **Мелконян, К.И.** Морфологическая оценка результатов имплантации децеллюляризованных и рецеллюляризованных дермальных матриц кожи свиньи / К.И. Мелконян, А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич, Я.А. Юцкевич, Т.В. Русинова, А.В. Каракулев, С.Б. Богданов, А.Н. Редько, В.А. Порханов, С.Н. Алексеенко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № S. – С. 147.
5. **Мелконян, К.И.** Разработка гидрогелевого раневого покрытия на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Я.А. Козмай, Т.В. Русинова, А.С. Асякина, Т.Г. Юдина // Материалы VIII Международной научной интернет-конференции «ФИЗИКО–ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ». – Ставрополь, 2020. – С. 123-127.
6. **Мелконян, К.И.** Оценка гидрогелевого раневого покрытия на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Я.А. Козмай, Т.В. Русинова, А.А. Верёвкин // Материалы VIII Международной научной интернет-конференции «ФИЗИКО–ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ». – Ставрополь, 2020. – С. 127-130.
7. Sotnichenko, A.S. Comparative analysis of the results of implantation of decellularized and recellularized pig skin matrices / A.S. Sotnichenko, **K.I. Melkonian**, I.V. Gilevich, Y.A. Yutskevich, T.V. Rusinova, A.V. Karakulev, S.B. Bogdanov, Y.A. Belich, S.E. Gumenyuk, D.I. Ushmarov, I.M. Bykov, A.N. Redko, V.A. Porhanov, S.N. Alekseenko // eCM Periodical. – Manchester, 2020. – P. 148.
8. Sotnichenko, A.S. Development of a protocol for the production of dermal extracellular matrix / A.S. Sotnichenko, **K.I. Melkonian**, I.M. Bykov, Y.A. Yutskevich, T.V. Rusinova, A.V. Karakulev, S.B. Bogdanov, Y.A. Belich, S.E. Gumenyuk, D.I. Ushmarov, I.M. Bykov, A.N. Redko, V.A. Porhanov, S.N. Alekseenko // eCM Periodical. – Manchester, 2020. – P. 159.
9. **Мелконян, К.И.** Результаты закрытия ожоговой раны тканеинженерной конструкцией кожи на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.С. Сотниченко, Я.А. Козмай, С.Б. Богданов // Сборник статей III Всероссийской научно–технической конференции. Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии». – Анапа, 2021. – С. 56-63.
10. **Мелконян, К.И.** Разработка и комплексная оценка дермального матрикса для реконструктивной пластической хирургии при радикальной

мастэктомии / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.А. Веревкин, Я.А. Козмай, А.С. Асякина // Сборник тезисов Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда. – Краснодар, 2021. – С. 183-187.

11. **Мелконян, К.И.** Исследование местной токсичности гидрогелевого раневого покрытия на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай, И.М. Быков, К.Г. Гуревич, А.С. Асякина, М.Л. Золотавина // VII съезд биохимиков России. X российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. – Сочи, Дагомыс, 2021. – С. 275- 276.

12. **Мелконян, К.И.** Разработка тканезамещающего биопластического материала на основе внеклеточного матрикса дермы / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай, К.Г. Гуревич // VII съезд биохимиков России. X российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. – Сочи, Дагомыс, 2021. – С. 182.

13. Sotnichenko, A. Porcine dermal matrix for skin tissue engineering: an experimental study / A. Sotnichenko, **K. Melkonyan**, I. Gilevich, S. Bogdanov, A. Verevkin, T. Rusinova, Y. Kozmay, I. Bykov, D. Yshmarov, S. Gumenyuk, V. Porhanov, A. Redko, S. Alekseenko // Book of abstracts TERMIS, 6th International World Congress. – Maastricht, 2021. – P. 709.

14. **Мелконян, К.И.** Оценка биосовместимости коллагенсодержащего гидрогеля для использования в качестве биочернил для 3D-биопринтинга / К.И. Мелконян, А.С. Асякина, М.Л. Золотавина // БИОХИМИЯ XXI ВЕКА. Материалы научно-практической конференции с международным участием. – Краснодар, 2021. – С. 170-174.

15. **Мелконян, К.И.** Современные методы получения и применения коллагеновых биоматериалов в регенеративной медицине и биотехнологии / К.И. Мелконян, Я.А. Козмай, И.М. Быков, Т.В. Ерёмкина // БИОХИМИЯ XXI ВЕКА. Материалы научно-практической конференции с международным участием. – Краснодар, 2021. – С. 175 – 178.

16. **Мелконян, К.И.** Сравнительный анализ результатов экспериментального лечения ожоговых ран / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай, А.А. Веревкин, А.С. Асякина, Е.А. Солоп // Сборник научных трудов по материалам III Международной конференции «Время научного прогресса». – Волгоград, 2022. – С. 115-120.

17. **Мелконян, К.И.** Результаты применения ацеллюлярного дермального матрикса в экспериментальной реконструктивной хирургии / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.А. Веревкин Я.А. Козмай, А.С. Асякина, А.А. Козлова, Е.А. Солоп, Г.П. Чупрынин, И.В. Супрун // Сборник материалов Ежегодной отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда. – Краснодар, 2022. – С. 293 – 295.

18. **Мелконян, К.И.** Оценка местной токсичности биопластического раневого покрытия на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Я.А. Козмай, А.С.Асякина, Е.А. Солоп, А.А. Веревкин // Сборник тезисов докладов IX Всероссийской научной молодежной школы–конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции». – Москва, 2022. – С. 109.

19. Супрун, И.В. Морфологическая оценка отдаленных результатов использования ацеллюлярного дермального матрикса для герниопластики /

И.В. Супрун, Г.П. Чупрынин, А.А. Фоменко, Е.А. Солоп, А.С. Асякина, А.А. Веревкин, Я.А. Козмай, Т.В. Русинова, **К.И. Мелконян** // Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 223-224.

20. **Мелконян, К.И.** Оценка цитотоксичности репаративного гидрогеля на основе дермы свиньи / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, И.В. Супрун, А.С. Асякина, Я.А. Козмай, А.А. Козлова // Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 150.

21. **Мелконян, К.И.** Оценка биосовместимости материала на основе дермы для герниопластики / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, Е.А. Солоп, С.Б. Базлов, И.И. Карташевский // Гены и Клетки. – 2022. – Т. 17, № 3. – С. 150.

22. Асякина А.С. Оценка отдаленных результатов имплантации ацеллюлярного дермального матрикса / А.С. Асякина, **К.И. Мелконян**, А.А. Веревкин, С.Б. Базлов, К.И. Попандопуло // Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – С. 76 – 77.

23. **Мелконян, К.И.** Оценка цитотоксических и морфологических эффектов дермального гидрогеля на дермальные фибробласты / К.И. Мелконян, Т.В. Русинова, А.С. Асякина, Я.А. Козмай, А.А. Козлова // Сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции «Клеточные технологии в экспериментальной медицине». – Курск, 2022. – С. 39-41.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГАГ – гликозаминогликаны

ГК – гиалуроновая кислота

ДДМ – децеллюляризованный дермальный матрикс

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ – иммуногистохимия

ИФА – иммуноферментный анализ

КПО – коэффициент площади окрашивания

мДДМ – модифицированный децеллюляризованный дермальный матрикс

ММП – матриксная металлопротеиназа

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ППС – полная питательная среда

рДДМ – рецеллюляризованный дермальный матрикс

С-ГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

СД – степень дегрануляции

ТК – тучные клетки

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindol)

IGF – инсулиноподобный фактор роста (insulinlike growth factor)

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)