

**Товпеко Дмитрий Викторович**

**Разработка и исследование компонентного состава  
тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины  
человека для регенеративной медицины**

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

**Калужная-Земляная Лидия Ивановна**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (тканевой инженерии) научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра Федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

**Официальные оппоненты:**

**Афанасьев Сергей Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики научно-исследовательского института кардиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

**Лактионов Павел Петрович**, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»

Защита состоится «20» марта 2026 г. в 9-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.1 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
доцент

Т.Н. Ильичёва

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Повреждения мягких тканей и кожных покровов, вызванные механическими, термическими или иного генеза травмами, являются распространенной патологией как в условиях мирного, так и военного времени [Ye H. & De S., 2017; Prevaldi C. et al., 2016]. Результаты хирургического лечения таких повреждений зависят от характера и механизма нанесения ран, степени их инфицированности, течения воспалительно-репаративного процесса, а также от качества и сроков оказания медицинской помощи. Обширные или длительно незаживающие раны способны привести к значительным функциональным, физиологическим и серьезным косметическим дефектам, которые существенно снижают качество жизни пациентов, увеличивают время и стоимость лечения, а также могут стать причиной тяжелых осложнений, вплоть до летального исхода [Solarte David V.A. et al., 2022]. Существующие стандарты в современной медицине предполагают использование собственных тканей пациента для замещения обширных дефектов – аутопластики [Suamte L. et al., 2023]. Однако дополнительный объем хирургического вмешательства и травматичность донорского участка ограничивают применение традиционных стратегий лечения и не всегда приводят к желаемым результатам. Дальнейшее совершенствование сугубо хирургических методов, инструментов, оборудования, квалификации врачей уже не позволяет существенно улучшить результаты лечения пациентов данного профиля, так как предел влияния указанных факторов ограничен биологическим потенциалом тканей к восстановлению. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины представляются как перспективные терапевтические решения проблемы восстановления структуры и функций поврежденных тканей и органов. Ключевая задача заключается в разработке тканеинженерных конструкций, предназначенных для имплантации, с применением биосовместимых материалов как самостоятельно, так и в сочетании с клетками и другими биологическими препаратами [Socci M.C. et al., 2023; Farag M.M., 2023]. Особое внимание уделяется поиску высокорегенеративных биоматериалов и созданию на их основе тканеинженерных конструкций, способствующих улучшению условий естественного течения раневого процесса, повышению качества лечения и сокращению сроков восстановления тканей. Биоматериал должен быть структурно и функционально близким к нативной структуре заменяемой ткани и/или органа, выполняя не только роль трехмерного механического каркаса, но и создавая оптимальные условия для адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток, что обеспечивает эффективное восстановление поврежденных участков [Suamte L. et al., 2023]. В настоящее время при изготовлении тканеинженерных конструкций в качестве каркаса применяют различные материалы природного и/или синтетического происхождения [Suamte L. et al., 2023]. Однако наибольший интерес вызывает биологический материал, получаемый из тканей и органов человека и животных путем

их децеллюляризации с сохранением структуры и архитектоники естественного внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ представляет собой высокотканеспецифичную трехмерную сеть, состоящую в основном из коллагенов, фибронектина, ламининов, эластина, протеогликанов и гликозаминогликанов [Yi S. et al., 2017; Cesur N.P. et al., 2020]. Компоненты ВКМ играют ключевую роль в формировании клеточной ниши, регулируя процессы адгезии, миграции, дифференцировки, пролиферации и роста клеток, обеспечивая им структурную и биохимическую поддержку, необходимые для морфогенеза и гомеостаза тканей [Cesur N.P. et al., 2020]. Важно подчеркнуть, что ВКМ характеризуется уникальным биохимическим составом и структурной организацией, специфичными для каждой ткани, что открывает широкие перспективы для развития тканевой инженерии и регенеративной медицины. Ткани провизорных органов, обеспечивающие внутриутробное развитие плода и прекращающие функционирование после рождения ребенка, к которым относятся пуповина и плацента, все чаще рассматриваются как перспективный источник не только клеток, но и биоматериалов благодаря своей высокой биосовместимости, биоразлагаемости, низкой иммуногенности и содержанию разнообразных биологически активных молекул, способствующих регенерации и ремоделированию тканей [Beiki V. et al., 2017; Penolazzi L. et al., 2020; Kehtari M. et al., 2018; Fayon A. et al., 2022]. Особое внимание уделяется Вартонову студню пуповины человека, представляющему собой твердую слизистую соединительную ткань внеэмбрионального происхождения, которая сохраняет особенности эмбрионального фенотипа, что проявляется в способности к быстрой регенерации поврежденных и безрубцовому заживлению ран плода. Эти уникальные свойства делают пуповину человека наиболее подходящим высокорегенеративным, доступным и возобновляемым биологическим материалом гомологичного происхождения. При этом ее использование не сопровождается этическими или юридическими ограничениями, что делает данный подход особенно привлекательным для исследований в области тканевой инженерии и регенеративной медицины.

**Степень разработанности темы исследования.** Децеллюляризованный матрикс, полученный из биологического материала пуповины человека, демонстрирует высокую эффективность в экспериментах по восстановлению и регенерации различных типов тканей и органов. Исследования показывают его успешное применение для восстановления хрящевой [Penolazzi L. et al., 2020], костной [Fu Y.S. et al. (2024); Ahmadi M. et al. (2017); Scomazzon L. et al. (2024)], сердечной [Gamba L.K. et al., 2025] и нервной [Kočí Z. et al., 2017] тканей, а также при лечении повреждений кожи и барабанной перепонки [Beiki V. et al., 2017; Najafi R. et al., 2023]. Однако в значительной части этих исследований не приводится всесторонний анализ структурных, морфологических и биологических характеристик полученных материалов, что может привести к серьезным проблемам на этапе разработки

и регистрации лекарственных препаратов и/или медицинских изделий на их основе, замедляя процесс внедрения инновационных решений в медицину и снижая доверие к новым технологиям со стороны научного сообщества, регуляторов и потенциальных потребителей.

**Цель исследования:** разработка технологии изготовления тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека и исследование их структурных, морфологических и биологических характеристик.

**Задачи исследования:**

1. Оценить эффективность условий децеллюляризации биологического материала пуповины человека в отношении полноты удаления клеточного и генетического материала, а также остаточного содержания агента децеллюляризации.

2. Исследовать компонентный состав матрикса Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации.

3. Провести анализ структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека.

4. Изучить биологическое действие тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

**Научная новизна.** Разработана технология изготовления тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, позволяющая сохранить несulfатированные и sulfатированные гликозаминогликаны и общий коллаген в наибольшей степени, при этом остаточное содержание клеточного и генетического материала соответствует общепринятым рекомендациям для минимизации нежелательных иммунных реакций, а содержание агента децеллюляризации находится ниже пороговых значений индуцированной детергентом цитотоксичности. Установлено, что в разработанных тканеинженерных продуктах из Вартонова студня пуповины человека присутствуют как структурные белки основного матрисома (коллагены различного типа, протеоглики, гликопротеины), так и регуляторные, аффилированные и секретлируемые вещества, относящиеся к матрисом-ассоциированным белкам. Оценены структурные и морфологические характеристики тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, включая пористость и сохранность тройной спирали коллагена. Экспериментально подтверждены гемо- и цитосовместимость тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека в исследованиях *in vitro*, а также оценена биологическая реакция подкожной ткани на тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека методом подкожной имплантации *in vivo* мышам.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основании комплексного анализа проведенных исследований разработаны лабораторный регламент и проект технологической схемы производства тканеинженерных продуктов из Вартонова студня

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

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

для оценки биологической реакции подкожной ткани на тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека.

**Положения, выносимые на защиту:**

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

2. Разработанная технология изготовления тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека позволяет получить материалы, характеризующиеся сохранением нативной структуры коллагенов и высокой гетеропористостью.

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

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов исследования обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных данных, а также применением комплекса современных стандартизированных методов анализа и статистической обработки результатов. Научная обоснованность выводов подкреплена репрезентативностью выборок, адекватностью методологического подхода поставленным задачам и объективностью используемых методик. В работе применены общепринятые и валидированные методы исследования, включая гистологические, спектрофотометрические и масс-спектрометрические, а также статистические методы анализа данных, что позволило получить релевантные, надежные и достоверные результаты и выводы. Основные положения и результаты диссертации доложены и обсуждены на III Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Новые материалы и энергетика в ВС РФ» (Анапа, 20–21 апреля 2022 г.); XV Всероссийской конференции патофизиологов Урала (Екатеринбург, 13–14 октября 2022 г.); V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 23–25 ноября 2022 г.); II Междисциплинарном форуме «Медицина молодая» (Москва, 7 декабря 2022 г.); на Международном военно-техническом форуме «Армия-2022» (г. Кубинка Московской области, 18–22 августа 2022 г.); VIII Всероссийском конгрессе с международным участием «Медицинская помощь при травмах. Новое в организации и технологиях. Фактор травмы в современном мире. Травматические эпидемии и борьба с ними» (Санкт-Петербург, 7–8 апреля 2023 г.); XXIX Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2023» (Санкт-Петербург, 30–31 марта 2023 г.); V Международной конференции «Физика – наукам о жизни» (Санкт-Петербург, 16–19 октября 2023 г.); XIX Международной

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

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

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

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

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** раскрываются актуальные проблемы, связанные с хирургическим лечением ран различной этиологии, и обозначаются перспективы развития технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины. Особое внимание уделяется обоснованию применения Вартонова студня пуповины человека для разработки лекарственных препаратов и/или медицинских изделий для регенеративной медицины. Далее формулируются цель и задачи исследования, подчеркиваются его научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Описывается методологическая база работы, а также формулируются основные положения, выносимые на защиту. Отдельно оценивается личный вклад автора в проведение экспериментов и анализ полученных результатов, приводятся сведения о представлении основных результатов исследования на научных конференциях и количестве публикаций по теме исследования.

Во **первой главе** рассматриваются ограничения традиционных методов лечения обширных раневых дефектов. Подробно описываются ключевые компоненты ВКМ, их функциональная роль и значимость в процессах заживления ран. Особое внимание уделяется современным подходам к созданию тканеинженерных конструкций на основе ВКМ, с акцентом на различные методы децеллюляризации тканей и органов. В главе представлен обзор клинического использования децеллюляризованного ВКМ, а также обсуждается потенциал использования биологического материала пуповины человека в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Во **второй главе** перечислены объекты исследования, технология их изготовления с использованием детергентного метода децеллюляризации с применением стерильных растворов додецилсульфата натрия (SDS) с последующим ферментативным гидролизом с получением тканеинженерных продуктов – матрикса и гидролизата соответственно. Далее приведены методы оценки качества децеллюляризации, а также структурных, морфологических и биологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека. Объектами исследования являлись биологический материал пуповины человека, который был получен от здоровых доношенных новорожденных после естественных родов с предварительно полученного информированного добровольного согласия матерей, а также тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека. Все исследования, связанные с использованием биологического материала пуповины человека, а также эксперименты на животных, были выполнены в строгом соответствии с основными этическими принципами и правилами биологической безопасности и получили одобрение независимого Этического комитета при Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург, Россия, протокол № 203 от 20 марта 2018 г., протокол № 230 от 17 декабря 2019 г. и протокол № 263 от 31 мая 2022 г.). Для получения матрикса проводили децеллюляризацию Вартонова

студня пуповины человека детергентным методом с использованием стерильных растворов SDS. На предварительном этапе образцы пуповины подвергали циклам попеременного замораживания и оттаивания в диапазоне температур от  $-20$  до  $+30$  °C. Далее проводили промывку сверхчистой водой для удаления остатков компонентов крови, после чего обрабатывали 6%-ным раствором перекиси водорода и препарировали в боксе микробиологической безопасности с соблюдением правил асептики, извлекая вену и артерии. Затем Вартонов студень пуповины человека вместе с покрывающей его амниотической оболочкой подвергали механическому фрагментированию. Для определения наиболее эффективного способа децеллюляризации были опробованы различные концентрации SDS: 0,01; 0,03 и 0,05%. В каждом из трех растворов образцы пуповины обрабатывали в течение 24 ч при комнатной температуре (КТ) и постоянном перемешивании со скоростью вращения 180 об/мин в шейкере. По окончании децеллюляризации образцы подвергали отмывке фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, pH 7,4), а также сверхчистой водой с целью удаления детергента, открепившихся клеток и клеточного дебриса. Полученный материал лиофилизировали на лабораторной лиофильной сушке, а затем подвергали радиационной стерилизации при 25 кГр и хранили герметично упакованным при температуре  $-20$  °C. Для получения гидролизата лиофилизированный матрикс (приготовленный по описанной выше технологии) подвергали ферментативному гидролизу с использованием солянокислого раствора пепсина в концентрации 1 мг фермента на 1 мл 0,01 N HCl (pH  $1,8 \pm 0,2$ ). Соотношение матрикса к раствору составляло 10:1. Ферментативный гидролиз осуществляли в течение 72 ч при КТ и постоянном перемешивании со скоростью вращения 180 об/мин. Затем полученный гидролизат нейтрализовали добавлением 0,1 N раствором NaOH ( $\sim 1/9$  от исходного объема) и 10-кратного PBS ( $\sim 1/10$  конечного нейтрализованного объема) до достижения pH  $7,4 \pm 0,2$ . Водородный показатель контролировали с помощью pH-метра. Полученный материал лиофилизировали, а затем подвергали радиационной стерилизации при 25 кГр и хранили герметично упакованным при температуре  $-20$  °C. Для оценки качества децеллюляризации осуществляли выявление клеточных ядер методами гистологического окрашивания и флуоресцентной микроскопии, а также количественное определение содержания двухцепочечной ДНК спектрофотометрическим методом в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации. Также выполняли анализ размеров фрагментов остаточной ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия и количественное определение остаточного содержания SDS масс-спектрофотометрическим методом. При оценке компонентного состава в образцах Вартонова студня до и после децеллюляризации проводили количественное определение гидроксипролина и расчет общего коллагена на его основе, растворимого и нерастворимого коллагена, а также несulfатированных (гиалуроновой кислоты) и sulfатированных

гликозаминогликанов спектрофотометрическим методом. Для анализа белкового состава применяли масс-спектрометрическое секвенирование пептидов с определением их аминокислотных последовательностей. Для анализа структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов применяли методы гистологического исследования, сканирующую электронную микроскопию с изучением рельефа поверхностей и поперечного сечения, измерение пористости с использованием этанола, а также методику инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье для оценки целостности тройной спирали молекул коллагенов. Анализ цитотоксичности тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека проводили в соответствии с ГОСТ ISO 10993-5-2023 двумя методами: исследованием экстрактов и методом прямого контакта. В качестве тест-системы в исследовании использовали две неиммортиализованные линии клеток человека, обладающие мультипотентными свойствами, – фибробласты дермы и фетальные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека. Оценка гемолитической активности образцов тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека проводили непрямой метод, а именно, по гемолизу, индуцированному веществами, экстрагируемыми из анализируемых образцов в соответствии с ГОСТ ISO 10993-4-2020. Исследование биологической реакции подкожной ткани на тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека проводили согласно ГОСТ ISO 10993-6-2021 на белых беспородных мышах 3-4 месячного возраста обоего пола, массой тела  $24,25 \pm 0,48$  г. Место имплантации с достаточным количеством окружающей его ткани собирали для оценки местной тканевой реакции. После гистологической проводки образцы заливали в парафин и изготавливали срезы с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином (H&E) и по методу Массона. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета программного обеспечения SPSS Statistics v. 26.0 (IBM, США). Описательная статистика представлена следующими показателями: средняя арифметическая (M), медиана (Me), стандартное отклонение (SD), межквартильный размах (IQR), нижний квартиль (Lower), верхний квартиль (Upper), минимум (Min), максимум (Max). Поскольку распределение данных отличалось от нормального, для сравнения двух зависимых выборок при оценке качества децеллюляризации, а также структурных и морфологических характеристик тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека применяли непараметрический критерий Вилкоксона, для двух независимых выборок – критерий Манна-Уитни. При сравнении трех и более зависимых выборок использовали двухфакторный ранговый дисперсионный анализ Фридмана для связанных выборок с post-hoc анализом и применением поправки Бонферрони на множественность сравнений. При сравнении трех и более независимых выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса с последующим апостериорными парными сравнениями с помощью

критерия Данна. Данные представляли в виде Me (Lower–Upper). Результаты исследования биологического действия тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека проверяли на нормальность с помощью критерия Колмогорова и анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием апостериорного критерия Тьюки и представляли в виде  $M \pm SD$ . За уровень статистической значимости для данных критериев принимали  $p < 0,05$ .

В **третьей главе** представлены результаты исследования и их обсуждение.

**Оценка качества децеллюляризации.** Гистологические исследования с использованием H&E не выявили наличия ядерного или цитоплазматического окрашивания в децеллюляризованных образцах. Анализ окрашенных DAPI образцов Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием растворов SDS различной концентрации также показал отсутствие клеточных ядер во всех случаях по сравнению с образцами Вартонова студня пуповины человека до децеллюляризации. При оценке размеров фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле было подтверждено отсутствие молекул ДНК длиной более 200 пар нуклеотидов в образцах Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации. Остаточное содержание ДНК в образцах Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации соответствовало критериям качественной децеллюляризации. Отсутствие цитотоксического действия децеллюляризованного ВКМ для клеток в сайте имплантации в значительной степени зависит также от качественного удаления агентов децеллюляризации [White L.J. et al., 2017]. По сравнению с другими агентами децеллюляризации, SDS способствует более полному удалению клеточного и генетического материала [Chakraborty J. et al., 2020], но его полная элиминация из продукта затруднена, что может стать причиной проявления токсических эффектов при рецеллюляризации [Friedrich E.E. et al., 2018]. Учитывая предназначение нашего продукта для лечения ран, мы уделили особое внимание определению остаточного содержания SDS в нем. Полученные значения составили 7,5 (7,0–8,3), 13,7 (12,4–14,5) и 29,8 (28,8–31,3) пг/мг соответственно, что значительно ниже пороговых значений, описанных для различных клеточных линий, что позволяет ожидать отсутствие индуцированной детергентом цитотоксичности тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека. Таким образом, результаты оценки качества децеллюляризации с использованием различных концентраций детергента соответствуют общепринятым критериям, направленным на минимизацию риска возникновения нежелательных иммунных реакций.

**Оценка влияния условий децеллюляризации на сохранность компонентного состава тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека.** Общий выход после децеллюляризации биологического материала пуповины демонстрировал тенденцию

к снижению с увеличением концентрации детергента. Значения выхода составили ( $52,2 \pm 1,8$ ), ( $50,9 \pm 2,2$ ) и ( $49,2 \pm 1,3$ ) % для образцов Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием растворов SDS в концентрации 0,01, 0,03 и 0,05% соответственно. Этот эффект может быть обусловлен более интенсивным разрушением структур ВКМ и удалением некоторых его компонентов при использовании более высоких концентраций детергента. Для подтверждения изменений, связанных с воздействием детергента, и выбора протокола децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека был проведен количественный анализ содержания ключевых компонентов ВКМ в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации. После оценки и пересчета содержания гидроксипролина в эквивалентное содержание общего коллагена были определены диапазоны его значений в анализируемых образцах. Содержание общего коллагена по гидроксипролину в Вартоновом студне пуповины человека до децеллюляризации находится в пределах от 277,0 (254,5–313,4) до 498,6 (458,1–564,1) мкг/мг. После децеллюляризации с использованием раствора SDS в концентрации 0,01% этот показатель находится на уровне от 413,1 (404,9–423,1) до 743,5 (728,9–761,5) мкг/мг, в концентрации 0,03% – от 407,1 (387,3–427,1) до 732,7 (697,1–768,8) мкг/мг, а при применении раствора SDS в концентрации 0,05% – от 398,0 (388,5–415,6) до 716,3 (699,3–748,1) мкг/мг. Увеличение количества коллагена в децеллюляризованных тканях по сравнению с нативной обусловлено удалением клеток, а также вымыванием водорастворимых молекул и молекул, наиболее чувствительных к воздействию агента децеллюляризации, что приводит к относительному увеличению доли некоторых ключевых компонентов в оставшемся ВКМ. Анализ содержания растворимого и нерастворимого коллагена проведен с использованием коммерческих наборов, позволяющих определить содержание коллагена благодаря способности анионного азокрасителя Сириуса красного, содержащего боковые сульфокислотные группы, специфически связываться в условиях анализа с боковыми группами определенных аминокислотных остатков молекул коллагенов. Результаты оценки содержания суммы растворимого и нерастворимого коллагена представлены на Рисунке 1.

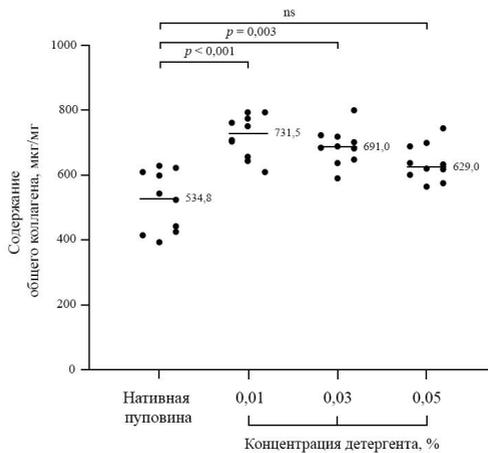


Рисунок 1 – Содержание суммы растворимого и нерастворимого коллагена в образцах Вартонова студня пуповины человека до и после децеллюляризации с использованием растворов додецилсульфата натрия различной концентрации, представленное в виде точек и медианы,  $n = 10$  для каждой группы. ns – не является статистически значимым

Стоит обратить внимание, что показатели содержания суммы растворимого и нерастворимого коллагена в образцах Вартонова студня пуповины человека до децеллюляризации находятся вблизи верхней границы или превышают диапазон значений, рассчитанных на основе содержания гидроксипролина, демонстрируя более высокие значения. Аналогичная ситуация наблюдается и при оценке содержания коллагена в образцах Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием растворов SDS различной концентрации: полученные показатели в основном находятся в диапазоне значений, определенном по содержанию гидроксипролина, однако отмечается повышенная вариативность данных внутри групп образцов децеллюляризованных тканей. Данное различие может быть обусловлено взаимодействием некоторых компонентов ВКМ с красителем Сириусом красным. Действительно, ряд исследований показывает, что Сириус красный может связываться не только с аминокислотами коллагена, но и с основными аминокислотами неколлагеновых белков. Дополнительным фактором, влияющим на результаты, могут быть изменения, вызванные обработкой SDS. Известно, что SDS индуцирует диссоциацию белков на субъединицы и их денатурацию, включая нарушение структурной целостности молекул коллагена. Кроме того, SDS способен извлекать неколлагеновые белки, которые потенциально могут неспецифически взаимодействовать с красителем Сириусом красным. Таким образом, наблюдаемые различия в результатах определения содержания коллагена могут отражать как структурные изменения в коллагеновой сети, так и снижение вклада неколлагеновых молекул во взаимодействие с красителем вследствие их удаления. Содержание гиалуроновой кислоты и сульфатированных

гликозаминогликанов в Вартоновом студне пуповины человека до децеллюляризации составляет 12,3 (11,5–14,4) и 19,3 (16,2–21,5) мкг/мг соответственно. После децеллюляризации с использованием раствора SDS в концентрации 0,01% содержание гиалуроновой кислоты и сульфатированных гликозаминогликанов составило 15,7 (12,2–18,3) и 26,8 (25,6–27,9) мкг/мг соответственно, в концентрации 0,03% – 14,5 (13,0–16,4) и 25,2 (24,5–25,6) мкг/мг соответственно, а при применении раствора SDS в концентрации 0,05% – 12,7 (11,4–14,7) и 22,2 (20,7–23,2) мкг/мг соответственно. После сравнения результатов содержания ключевых компонентов ВКМ установлено, что децеллюляризация с использованием раствора SDS в концентрации 0,01%, в отличие от иных, обеспечивает более высокую сохранность коллагенов и гликозаминогликанов в продукте, а также эффективное удаление клеточного и генетического материала и содержание агента децеллюляризации ниже пороговых значений индуцированной детергентом цитотоксичности.

Для всесторонней характеристики состава Вартонова студня пуповины человека с точки зрения протеомного содержания до и после децеллюляризации, был проведен масс-спектрометрический анализ. Исследование выполняли на образцах Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием раствора SDS в концентрации 0,01%. Установлены как общие, так и уникальные наборы белков для анализируемых групп. В Вартоновом студне пуповины человека до децеллюляризации было идентифицировано 566 белков, из которых часть относится к собственно ВКМ, а часть – к белкам, связанным с экзосомами и другими растворимыми факторами, что подтверждает двойную роль ВКМ как поддерживающей структуры и хранилища адсорбированных растворимых сигналов. После децеллюляризации в оставшемся матриксе было выявлено 162 белка. Несмотря на значительное снижение общего числа обнаруженных молекул, что может быть связано с удалением клеточного материала, а также части растворимых компонентов, ряд ключевых белков основного матрисома и матрисом-ассоциированных белков был сохранен. В частности, в Вартоновом студне после децеллюляризации были выявлены такие важные белки, как фибронектин, люмикан, декорин, бигликан и тенасцин, которые играют центральную роль в регуляции процессов заживления ран, ангиогенеза, ремоделирования ВКМ и иммуномодуляции. Также были идентифицированы множественные типы коллагена, в основном фибриллярные (типы I, III, V, VI), но также связанные с фибриллами (тип XII) и сетеобразующие (тип IV), что свидетельствует о сохранении структурной организации ВКМ после процесса децеллюляризации. После количественной и качественной оценки состава полученного матрикса из Вартонова студня пуповины человека проводили ферментативный гидролиз солянокислым пепсином, который способен разрушать от 5 до 15% пептидных связей в белках. Таким образом, гидролизат, полученный из матрикса из Вартонова студня пуповины человека, представляет собой смесь полипептидных фракций.

**Оценка структуры и морфологии тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека.** Рельеф поверхностей и поперечного сечения, а также структуру тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека исследовали с использованием сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 2).

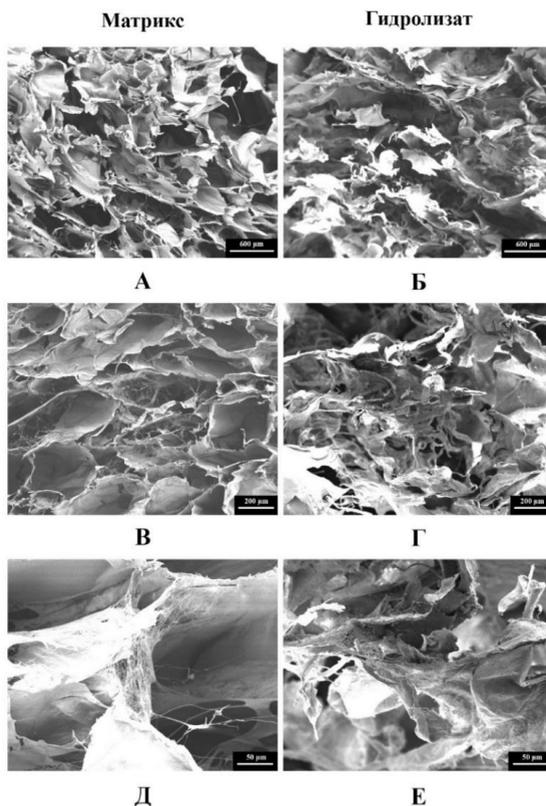


Рисунок 2 – Изображения поверхности (А, Б) и поперечного сечения (В–Е) тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека, полученные методом сканирующей электронной микроскопии. А, Б – Масштабный отрезок 600 мкм, В, Г – Масштабный отрезок 200 мкм, Д, Е – Масштабный отрезок 50 мкм

Матрикс и гидролизат Вартонова студня пуповины человека были гетеропористыми на поверхности и имели слоистые листовые структуры на поперечном сечении. Размеры пор варьировали от 50 до 1200 мкм, что свидетельствует о наличии микро- и макропористости тканеинженерных продуктов. Эта характеристика имеет ключевое значение, поскольку поры диаметром от 20 до 125 мкм обеспечивают оптимальные условия для миграции клеток, их адгезии и дифференцировки, а поры диаметром более 140 мкм играют важную роль в стимуляции ангиогенеза, формировании структурированных тканей и диффузии внеклеточной

жидкости [Кондратенко А.А. и др., 2021; Vilela M.J.C. et al., 2021]. Также была проведена оценка пористости образцов тканеинженерных продуктов. Пористость матрикса составила 97,8 (97,2–97,9) %, в то время как для гидролизата этот показатель был ниже – 90,3 (90,0–92,1) %. Наблюдаемое снижение пористости гидролизата может быть связано с ферментативным гидролизом солянокислым пепсином, который вызывает частичное разрушение коллагеновой сети, высвобождение более мелких белковых фрагментов и изменение пространственной организации материала. Высокая пористость тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека играет ключевую роль в их функциональности, придавая материалам важное свойство гигроскопичности и способствуя эффективной абсорбции раневого экссудата, поддержанию оптимальной влажности в области раны и созданию благоприятных условий для заживления.

Также были изучены структурные характеристики образцов нативной пуповины человека и тканеинженерных продуктов из нее методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. В спектрах анализируемых образцов присутствуют основные полосы поглощения при 3500–3100 (амид А), 2970–2850 (асимметричные валентные колебания групп  $\text{CH}_3$  и  $\text{CH}_2$ ), 1740–1630 (амид I), 1630–1510 (амид II) и 1270–1230 (амид III)  $\text{см}^{-1}$ , свойственные колебаниям функциональных групп, присутствующих в молекулах белков. Спектры также демонстрируют полосы поглощения между 1170 и 800  $\text{см}^{-1}$ , которые возникают в основном из-за валентных колебаний связей  $\text{C-O}$  и  $\text{C-O-C}$ , характерных для углеводных фрагментов коллагена и протеогликанов [Li Y. et al. (2024), Nugrahani I. et al., 2020; Dubus M. et al., 2022; Basiri A. et al., 2019; Nashchekina Y. et al., 2021]. Также при анализе спектров анализируемых образцов установлено, что соотношение интенсивностей пика амида III к пику около 1450  $\text{см}^{-1}$ , превышает 1, а разница частот между максимумами поглощения амида I и амида II составляет менее 100  $\text{см}^{-1}$ . Полученные данные указывают на сохранение относительно неповрежденной тройной спирали молекул коллагенов в анализируемых образцах.

**Оценка биологического действия тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека.** Результаты оценки влияния тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека на жизнеспособность культивируемых фибробластов дермы человека, полученные с использованием МТТ-теста, представлены на Рисунке 3.



воспалительной реакции – лейкоцитарная инфильтрация в зоне имплантации была минимальной или отсутствовала. Вокруг имплантатов не наблюдалось формирования плотной соединительнотканной капсулы. На 42-е сут после имплантации продукты визуализируются в гистологических препаратах. На основании результатов проведенных исследований разработаны лабораторный регламент и проект технологической схемы производства тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека с использованием методов децеллюляризации и ферментативного гидролиза (Рисунок 4).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенных исследований показана перспективность и практическая реализуемость разработки на основе биологического материала пуповины человека лекарственного препарата и/или медицинского изделия, предназначенного для лечения пациентов с повреждениями кожи и мягких тканей. Условия децеллюляризации, использованные в ходе экспериментальных исследований, обеспечивают эффективное удаление клеточного и генетического материала, а также агента децеллюляризации, сохраняя при этом основные структурные и функциональные компоненты нативной ткани. В составе Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации идентифицировано более 100 различных белков, а также установлено высокое содержание общего коллагена и гликозаминогликанов. Эти компоненты обладают высоким потенциалом для стимуляции процессов регенерации и заживления ран за счет обеспечения структурной поддержки внеклеточного матрикса и создания условий для миграции, пролиферации и дифференцировки клеток в процессе восстановления. Оценка биологического действия тканеинженерных продуктов из Вартонова студня пуповины человека показала отсутствие цитотоксических эффектов на фибробласты дермы и фетальные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга человека, хорошую гемосовместимость при определении гемолитической активности в исследованиях *in vitro*, а также успешную интеграцию в окружающие ткани без признаков отторжения при подкожной имплантации мышам *in vivo*.

### **ВЫВОДЫ**

1. Децеллюляризация Вартонова студня пуповины человека с использованием раствора ионного детергента додецилсульфата натрия в концентрации 0,01% обеспечивает достижение рекомендуемого уровня антигенности и неиммуногенности матрикса с остаточным содержанием агента децеллюляризации ниже пороговых значений индуцированной им цитотоксичности.

2. Матрикс Вартонова студня пуповины человека после децеллюляризации с использованием раствора додецилсульфата натрия в концентрации 0,01% содержит в своем составе структурные коллагены различных типов – от 413,1 (404,9–423,1) до 743,5 (728,9–761,5) мкг/мг, гиалуроновую кислоту – 15,7 (12,2–18,3) мкг/мг и сульфатированные

гликозаминогликаны – 26,8 (25,6–27,9) мкг/мг, а также функциональные молекулы фибронектина, люмикана, бигликана, декорина и другие важные для заживления ран белки и пептиды.

3. Тканеинженерные продукты из Вартонова студня пуповины человека (матрикс и гидролизат) сохраняют потенциально целостность тройной спирали молекул коллагенов и обладают высокой пористостью с размерами пор от 50 до 1200 мкм.

4. Матрикс и гидролизат Вартонова студня пуповины человека не проявляют цитотоксичности по отношению к дермальным фибробластам и фетальным мезенхимальным стволовым клеткам человека, обладают гемосовместимостью в исследованиях *in vitro* и успешно интегрируются в окружающие ткани при подкожной имплантации мышам в экспериментах *in vivo*, не вызывая реакций отторжения.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

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

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

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

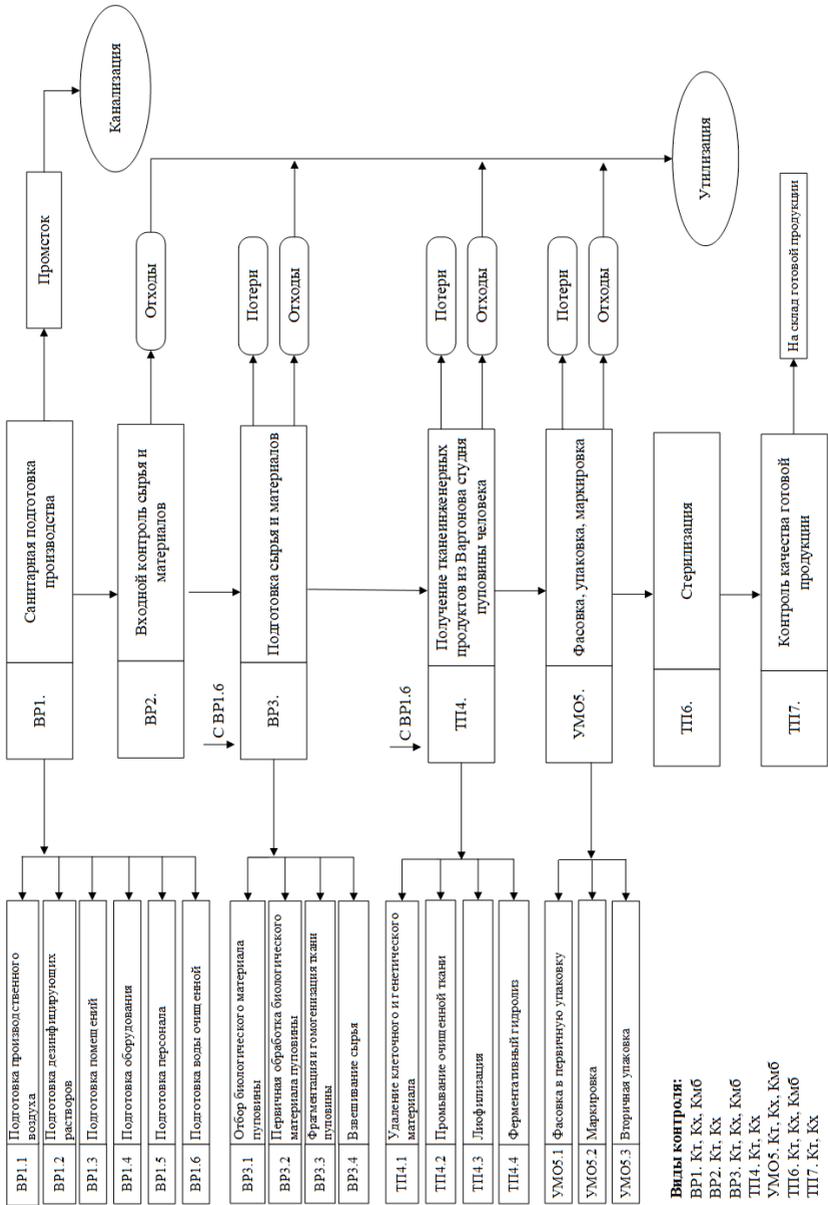


Рисунок 4 – Проект технологической схемы производства тканей из Вартонова студня пуповины человека

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ*****Публикации в рецензируемых научных изданиях:***

1. Kondratenko A.A., **Товпеко Д.В.**, Volov D.A., Kalyuzhnaya L.I., Chernov V.E., Glushakov R.I., Sirotkina M.Y., Zemlyanoy D.A., Bilyug N.B., Chebotarev S.V., Alexander-Sinclair E.I., Nashchekin A.V., Belova A.D., Grigoriev A.M., Kirsanova L.A., Basok Yu.B., Sevastianov V.I. Decellularized umbilical cord as a scaffold to support healing of full-thickness wounds // Biomimetics. – 2024. – Vol. 9, № 7. – P. 405. DOI: 10.3390/biomimetics9070405 (Web of Science Q1, Scopus Q2)

2. Кондратенко А.А., Чернов В.Е., **Товпеко Д.В.**, Волов Д.А., Белый Н.В., Земляной Д.А., Калюжная Л.И. Бактериостатические эффекты лиофилизатов бесклеточных матрикса и гидрогеля из пуповины человека // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2024. – Т. 26, № 3. – С. 361-372. DOI 10.17816/bmma629139 (Scopus Q4)

3. Кондратенко А.А., Калюжная Л.И., **Товпеко Д.В.**, Шевелева В.С., Глушаков Р.И. Биологические и функциональные свойства лиофилизированных форм тканеинженерных матриц из пуповины человека // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25, № 1. – С. 113-122. – DOI 10.15825/1995-1191-2023-1-113-122 (Scopus Q4)

4. **Товпеко Д.В.**, Кондратенко А.А., Калюжная Л.И., Чернов В.Е., Земляной Д.А., Полосков А.И., Нащекин А.В., Сениченков В.А. Биотехнологический бесклеточный неиммуногенный продукт сохраняет основные регенеративные структурные компоненты пуповины человека. Биотехнология. – 2023. – Т. 39, № 1. – С. 49-59. – DOI 10.56304/S0234275823010118 (Scopus Q4)

***Патенты и свидетельства:***

1. Калюжная-Земляная Л.И., **Товпеко Д.В.**, Кондратенко А.А., Земляной Д.А., Чернов В.Е., Чеботарев С.В., Волов Д.А. Способ изготовления бесклеточного матрикса из пуповины человека для создания высокорегенеративного раневого покрытия. Патент на изобретение RU 2795904 C1, 15.05.2023 (заявка № 2022118355 от 05.07.2022). Дата регистрации: 05.07.2022, опубликовано: 15.05.2023.

2. Хоминец В.В., Калюжная-Земляная Л.И., Кондратенко А.А., **Товпеко Д.В.**, Земляной Д.А., Волов Д.А., Чеботарев С.В. Способ применения бесклеточного лиофилизированного продукта из пуповины человека для заживления ран. Патент на изобретение RU 2816034 C1, 25.03.2024 (заявка № 2023115498 от 14.06.2023). Дата регистрации: 14.06.2023, опубликовано: 25.03.2024.