

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

На правах рукописи

МЕЛКОНЯН КАРИНА ИГОРЕВНА

**РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ БИОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ
НА ОСНОВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ
В КАЧЕСТВЕ ТКАНЕЗАМЕЩАЮЩИХ И АКТИВИРУЮЩИХ
РЕПАРАЦИЮ СРЕДСТВ**

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание учёной степени
доктора медицинских наук

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

Краснодар – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Характеристика коллагенов и их роль в репарации	18
1.2 Особенности процессов регенерации кожи при локальном воздействии биопластическими материалами	23
1.3 Биоматериалы на основе компонентов внеклеточного матрикса	26
1.4 Методы и подходы к децеллюляризации дермы	32
1.4.1 Химические агенты	37
1.4.2 Биологические агенты	40
1.4.3 Физическое воздействие и прочие агенты	43
1.5 Особенности ангиогенеза в децеллюляризованных матриксах	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1 Получение нативной дермы	51
2.2 Методология децеллюляризации образцов дермы	52
2.3 Оценка качества децеллюляризации образцов дермы	53
2.3.1 Количественный анализ ДНК	53
2.3.2 Окрашивание DAPI	53
2.3.3 Оценка цитотоксичности биоматериалов методом Live/Dead	54
2.3.4 Оценка метаболической активности клеток (МТТ-тест)	54
2.3.5 Подкожная имплантация/инъекция образцов биоматериалов	55
2.4. Биохимические методы оценки состава биопластических материалов	56
2.4.1 Количественное определение коллагена	56
2.4.2 Количественное определение содержания гликозаминогликанов	56
2.4.3 Количественное определение содержания гиалуроновой кислоты	57
2.5 Гистологические исследования	57
2.6 Иммуногистохимические исследования	58

2.7	Иммуноферментный анализ	59
2.8	Выделение и характеристика дермальных фибробластов из кожи свиньи ..	59
2.9	Биомеханические тесты	60
2.10	Моделирование ожоговой раны и экспериментальное лечение мелких лабораторных животных	62
2.11	Статистическая обработка данных	62

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА – АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА (АДМ) В КАЧЕСТВЕ РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ		64
3.1	Сравнительный анализ результатов обработки образцов дермы свиньи детергентно-энзиматическим способом	64
3.2	Обоснование выбора оптимальной методики обработки дермы для получения ацеллюлярного дермального матрикса	68

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ		72
4.1	Разработка способа моделирования ожоговой раны на крупных лабораторных животных	72
4.2	Результаты сравнительной оценки эффективности применения ацеллюлярного дермального матрикса для лечения ожоговых ран в эксперименте	74

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА – АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА (АДМ) ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ		84
5.1	Разработка способа подготовки больших лоскутов дермы свиньи для создания ацеллюлярного дермального матрикса	84
5.2	Способ децеллюляризации дермы свиньи для реконструктивной пластической хирургии	87

5.3	Морфологический анализ тканевой реакции на подкожную имплантацию фрагментов ацеллюлярного дермального матрикса	93
5.4	Исследования биомеханической прочности биопластического материала	98

ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА В КАЧЕСТВЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ИМПЛАНТА

103

6.1	Результаты экспериментального хирургического лечения грыжи передней брюшной стенки с использованием ацеллюлярного дермального матрикса	104
6.2	Результаты экспериментального применения ацеллюлярного дермального матрикса в качестве фиксирующего материала для маммопластики	110

ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОГЕЛЯ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ ДЕРМЫ СВИНЬИ

116

7.1	Подбор оптимальной методики обработки дермы для получения гидрогелевого материала	116
7.2	Биохимический анализ состава дермального гидрогеля	119
7.3	Оценка жизнеспособности клеток и цитотоксичности дермального гидрогеля	122
7.4	Оценка местной токсичности гидрогелевого материала на основе дермы свиньи	125

ГЛАВА 8. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЕРМАЛЬНОГО ГИДРОГЕЛЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВЫХ РАН

128

8.1	Оценка эффективности заживления ожоговых ран при экспериментальном применении дермального гидрогеля	129
8.2	Динамика изменения содержания про- и противовоспалительных факторов в сыворотке при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс	139

8.3 Динамика изменения содержания факторов роста в сыворотке при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс	148
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	154
Выводы	167
Практические рекомендации	169
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	170
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	172
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	205
ПРИЛОЖЕНИЯ	212
Приложение А. Патенты на изобретения	212
Приложение Б. Акты об использовании предложений	216
Приложение В. Протокол	222

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В последнее время в клинических ситуациях, характеризующихся выраженным тканевым дефицитом, всё большую значимость приобретают материалы на основе биополимеров – природных биомолекул, синтезируемых микроорганизмами, растениями и животными и обладающих оптимальной биосовместимостью. В частности, весьма актуальна разработка различных каркасов на основе биоактивных полимеров, которые не только обладают барьерными свойствами, но и положительно действуют на обмен веществ, ускоряя процессы репарационной регенерации [M. Ishii, 2017; О.В. Владимирова и соавт., 2021; T.G. Sahana et al., 2018]. Проллиферативные, ангиогенные антибактериальные и иммуномодулирующие свойства биополимеров создают микросреду, благоприятную для процесса заживления [Т.И. Салихова и соавт., 2017]. На данный момент для восполнения тканевых дефектов используются биополимерные материалы на основе целлюлозы, альгинатов, гиалуроновой кислоты, коллагена и хитозана [T.G. Sahana et al., 2018; М.Г. Дроздова и соавт., 2016]. Коллаген является одним из наиболее перспективных биоматериалов, широко применяемых в мировой медицинской практике, коллагенсодержащие препараты используются в различных областях медицины как самостоятельный фактор стимуляции регенерации тканей. Недостатком применения данных биоматериалов является отсутствие необходимого комплексного воздействия для восстановления полноценных обменных процессов, а также относительно высокие сроки биodeградации. При этом, становится очевидно, что монокомпонентные и синтетические материалы, в связи с ограниченным естественным потенциалом поврежденных тканей к восстановлению, не смогут обеспечить необходимую степень терапевтической эффективности без наличия в своем составе биологически активных компонентов, способных оптимизировать и/или индуцировать репаративный гистогенез. Потенциальным источником природоподобного комплекса биополимеров, сходного с нативным дермальным матриксом, являются децеллюляризованные соединительнотканые каркасы кожи

и дермы. Децеллюляризация нативных органов и тканей способствует сохранению биохимического состава, тканевой структуры, а также механических свойств сохранившегося внеклеточного матрикса на оптимальном уровне, а также обеспечивает отсутствие иммуногенности. Кроме того, в последние годы было показано, что компоненты дермального матрикса играют ключевую роль в контроле таких особенностей клеточной физиологии как пролиферативная активность, способность к дифференцировке и миграции, потентность (стволовость) и уровень метаболизма [J. Cheng et al., 2019]. Внеклеточный матрикс (ВКМ) дермы, полученный после децеллюляризации, может обеспечивать сигналы для адгезии, сайты связывания для факторов роста и ферментов, деградирующих ВКМ при миграции клеток. Немаловажную роль в деградации коллагена и ремоделировании ВКМ принимают участие матриксные металлопротеиназы, обуславливающие также миграцию кератиноцитов, агрегацию тромбоцитов и пролиферацию клеток [S.T. Diniz-Fernandes et al., 2018; Л.Н. Рогова и соавт., 2018]. Понимание механизмов, лежащих в основе данных функций важно для получения материалов, которые могут имитировать молекулы биологического распознавания, способные контролировать взаимоотношения между клетками и их естественным микроокружением, а также для разработки терапевтических подходов, позволяющих усилить репарацию при повреждении тканей.

Таким образом, разработка биопластических материалов на основе ВКМ дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств и внедрение в клинику новых медицинских технологий с использованием данных средств является актуальной для фундаментальной медицины и практического здравоохранения.

Степень разработанности темы исследования

Использование различных подходов регенеративной терапии является одним из наиболее перспективных методологических подходов для активации репарации и ремоделирования тканей [T.G. Sahana et al., 2018; К.В. Дергилев и соавт., 2016]. Для лечения острых травм и хронических заболеваний, поражающих мышцы, кости, мягкие ткани используют локальное инъекционное введение аутологичной

обогащенной тромбоцитами плазмы, фибриновые гели, матриксы и др. [Д.А. Маланин и соавт., 2020; С.А. Епифанов и соавт., 2021]. В целях создания оптимальных условий для регенерации и предотвращения чрезмерных потерь биологически важных для организма жидкостей и веществ при лечении ожоговых ран исследуются различные временные раневые покрытия (эквиваленты кожи, алло- и ксенотрансплантаты), являющиеся одними из последних достижений в области молекулярной и клеточной биологии [И.А. Алмазов, 2017; Л.И. Будкевич и соавт., 2018]. Одним из таких материалов является биологическое покрытие на основе нереконструированного коллагена I типа «Коллост». Это стерильный биопластический материал с полностью сохраненной нативной структурой коллагена, полученный из кожи крупного рогатого скота, который является матрицей для направленной тканевой регенерации [Оболенский В.Н. и соавт., 2012; Будкевич Л.И. и соавт., 2018]. При получении отечественного биологического покрытия «Ксенодерм» (ЗАО «АБ Медикал») свиную кожу обрабатывают лиофильным способом путем замораживания и высушивания в вакууме, что не лишает её ксеногенных компонентов. На сегодняшний день имеется несколько хирургических материалов на основе биополимеров, использующихся для реконструкции мягких тканей – AlloDerm™, Strattice™, DermaMatrix™, SurgiMend®, Permacol™, Veritas®, FlexHD®. Однако не все они могут применяться в отечественной хирургии в связи с законодательством (AlloDerm™, DermaMatrix™, Dermalogen™, Cymetra®), а материалы из бычьего коллагена могут вызывать сильную аллергическую реакцию и являться источником трансмиссивной губчатой энцефалопатии (прионной болезни) [А.В. Shekhter et al., 2019; N. Smart et al., 2012]. Наиболее многообещающими в данном направлении являются матриксы на основе дермы свиньи (Evolence™, Strattice™, Fibroquel™, Permacol™), использование которых резко снижает риск аллергических осложнений [P. Lucey et al., 2014]. Более того, использование дермы свиньи, которую можно получать из продуктов вторичного сырья, увеличивает производительность методики получения материалов. Тем не менее, данные хирургические материалы имеют крайне высокую стоимость, что ставит перед современной регенеративной медициной задачу по

созданию более экономичного аналога. Также разработаны и изучены комплексные гидрогели для регенерации кожи и для применения в биомедицинских исследованиях, например, в биопринтинге и при культивировании клеточных культур [J. Xu et al., 2017; S. Ji et al., 2017; S.Mitura et al., 2020; E.E. Beketov et al., 2021]. Перспективным материалом для создания таких биополимерных гидрогелей является ВКМ тканей, состоящий из коллагенов, эластина, гликозаминогликанов и других биологически активных молекул [J.C. Rodríguez-Cabello et al., 2018; И.С. Кудряшова и соавт., 2021; J. Halper et al., 2014]. Источником ВКМ в большинстве случаев являются ткани животных, в частности, дерма свиней и крупного рогатого скота [R.D. Ventura et al., 2020]. В связи с этим в последнее время наблюдается повышенный интерес к разработке оптимального метода получения гидрогелей на основе ВКМ тканей животных.

Однако репаративный и метаболический потенциал коллагенсодержащих материалов изучен не полностью, а имеющиеся на данный момент результаты исследований в этой области противоречивы и недостаточны для понимания тех процессов, которые лежат в основе особенностей действия биопластических материалов на основе ВКМ дермы.

Цель исследования – разработка фундаментальных принципов создания биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы и экспериментальное обоснование их применения в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств.

Задачи исследования:

1. Разработать методику детергентно-энзиматической обработки ксеногенной дермы для получения биопластического материала с сохранением внеклеточного матрикса.

2. Провести комплексную оценку полученного биопластического материала – ацеллюлярного дермального матрикса (АДМ), включающую биохимический анализ на содержание сульфатированных гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты для оценки сохранности небелковых компонентов ВКМ, а также определить его биологические и биомеханические характеристики.

3. Разработать способ моделирования ожоговой раны на крупном лабораторном животном для оценки эффективности полученного биопластического материала.

4. Изучить эффективность применения АДМ в качестве раневого покрытия на модели острой ожоговой раны крупных лабораторных животных по динамике репаративных изменений в коже.

5. Выявить особенности биоинтеграции, а также оценить эффективность применения АДМ в качестве импланта при реконструктивной хирургии на модели крупных лабораторных животных.

6. Разработать методику химической обработки дермы для получения дермального гидрогеля – гидрогелевого материала на основе гидролизованного коллагена ВКМ дермы.

7. Провести комплексную оценку дермального гидрогеля: определение биохимического состава; анализ цитотоксичности, местной токсичности; адгезионная способность клеток при инкубации на разработанном материале *in vitro*.

8. Провести сравнительную оценку эффективности репаративных процессов и восстановления ВКМ кожи при применении дермального гидрогеля на модели ожоговой раны мелких лабораторных животных.

9. Изучить защитно-приспособительные процессы на модели ожоговой раны крыс при применении дермального гидрогеля по закономерностям изменения иммунологических параметров в сыворотке крови.

Научная новизна исследования. Впервые:

Разработана технология забора дермы свиньи в лабораторных условиях с помощью электродерматома, позволяющая целенаправленно получать лоскуты с заданными размерами.

Впервые предложена методика детергентно-энзиматической обработки дермы, позволяющая расширить возможности обработки сырья с различной массой с максимальным сохранением гистологической структуры дермы без использования сшивающих токсических агентов.

На основании проведенного комплексного исследования биопластических материалов доказана их биосовместимость и возможность применения в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств.

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

Созданы оригинальные биорезорбируемые биопластические материалы, не содержащие синтетических сшивающих агентов, которые могут служить прототипами для последующей разработки медицинских изделий – раневых покрытий и хирургических имплантов.

Оптимизирована методика щелочного гидролиза дермы, позволившая получить гидрогелевый материал – дермальный гидрогель, обладающий биосовместимостью и отсутствием цитотоксичности.

Результаты исследования позволили получить новые данные о механизмах регенерации кожи в ответ на воздействие гидрогелевого материала на основе гидролизованного коллагена ВКМ дермы на пораженные участки кожи: ранняя эпителизация, накопление цитокератина, снижение темпов ресинтеза коллагена I типа; отсутствие динамики уровней коллагена IV типа и фибронектина.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о механизмах регенерации кожи и о патогенетической природе возникающих в тканях 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 и культивировании культур клеток для регуляции клеточной адгезии, дифференцировки, пролиферации и миграции клеток. Полученные данные могут быть использованы в разработке протоколов по применению биопластических материалов 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 АДМ в качестве хирургических имплантов для маммопластики и герниопластики) и регенеративной медицине (терапия трофических язв, создание искусственных эквивалентов кожи. Анализ полученных данных может быть использован для разработки альтернативных подходов к терапии травматических повреждений кожных покровов, в ряде случаев поможет отказаться от оперативного вмешательства по восстановлению поврежденных 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, в частности маммопластики и герниопластики.

Методология и методы исследования

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

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

2. Биохимические исследования: выделение биополимеров внеклеточного матрикса дермы свиньи, определение остаточной ДНК, общего белка, коллагена I типа, сульфатированных гликозаминогликанов (с-ГАГ), гиалуроновой кислоты.

3. Биофизические исследования: определение механической прочности, растяжимости.

4. Патолофизиологические методы: моделирование ожоговых ран III и IV степени на крупных и мелких лабораторных животных.

5. Определение коллагена I, IV типов, фибронектина, цитокератина, виментина – компонентов внеклеточного матрикса; CD31, CD3, CD16b, CD68 – маркеров воспалительного процесса методом иммуногистохимического анализа.

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

7. Гистологический анализ: рутинная окраска гематоксилин-эозином, окраска по Массону

8. Исследование биосовместимости и биodeградации биополимерных матриц *in vivo* (подкожная имплантация, общая цитотоксичность, местная токсичность).

9. Клеточные культуральные работы: исследование адгезии, пролиферации и дифференцировки дермальных фибробластов; фенотипирование культуры фибробластов, определение их жизнеспособности и степени пролиферации.

10. Статистическая обработка данных проводилась с использованием методов описательной статистики, данные представляли в виде средних и распределения ($M \pm SD$) или 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 зависимых групп – критерий Вилкоксона. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная методика детергентно-энзиматической обработки дермы свиньи позволяет получить тканезамещающий материал – ацеллюлярный дермальный матрикс с сохранением компонентов внеклеточного матрикса.

2. Биологические эффекты использования ацеллюлярного дермального матрикса в качестве раневого покрытия с метаболической, патохимической и функциональной сторон определяют оптимизацию процессов эпителизации, коллагеногенеза и ангиогенеза ожоговой раны.

3. Применение ацеллюлярного дермального матрикса эффективно при экспериментальной восстановительной пластике за счет способности к морфофункциональной интеграции в ткани.

4. Гидрогелевый материал на основе гидролизованного коллагена ВКМ дермы позволяет создать условия для регенерации ожоговой раны, а именно способствует ранней эпителизации, накоплению цитокератина и ресинтезу

коллагена, мобилизации защитно-приспособительных реакций за счет вовлечения медиаторов воспаления и иммуномодуляции.

Степень достоверности и апробации работы

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 были представлены на 24-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (5–9 октября 2020 г., Пущино), VIII Международной научной Интернет-конференции: «Физико-химическая биология» (25–27 ноября 2020 г., Ставрополь), TERMIS EU (26–29 мая 2020 г., Манчестер), 2nd UK-Russia Young Medics Conference (6–7 января 2020 г., Кембридж), XVII научно-практической межрегиональной заочной конференции «Биомедицина и биомоделирование» (26–27 мая 2021 г., Москва), III Всероссийской научно-технической конференции «Состояние и перспективы развития современной науки по направлению «Биотехнические системы и технологии» (27–28 мая 2021 г., Анапа), Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (24–25 июня 2021 г., Сочи), VII Съезде биохимиков России, X российском симпозиуме «Белки и пептиды», VII съезде физиологов СНГ (3–8 октября 2021 г., Сочи), 6th International World Congress THERMIS (15–19 ноября 2021 г., Маастрихт), научно-практической конференции с международным участием «БИОХИМИЯ XXI ВЕКА» (26 ноября 2021 г., Краснодар), Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию Белорусского государственного медицинского университета (13–17 декабря 2021 г., Минск), III Международной конференции «Время научного прогресса» (01 февраля 2022 г., Волгоград), 25-ая Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (18–22 апреля 2022 г., Пущино), 1-й круглом столе «Новые

полимерные и композиционные материалы: наука и бизнес» (29 июня – 02 июля 2022 г., Калининград), Краевой отчетной конференции грантодержателей Кубанского научного фонда (20–22 июня 2022 г., Сочи), IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» (20–22 апреля 2022 г., Москва), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (23–25 ноября 2022 г., Москва), 26-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (9–13 апреля 2023 г., Пущино).

Публикации по теме диссертации

Всего по материалам диссертации опубликовано 57 работ, в том числе 33 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, или индексируемых базой данных RSCI, или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, и издания, приравненные к ним, в том числе 21 работа в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и WoS, 4 патента РФ (Приложение А).

Внедрение результатов исследования

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

Личный вклад автора состоял в постановке цели и формировании 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, написан текст диссертации и иллюстративный материал, сформулированы выводы, а также внедрение в практику результатов диссертационной работы.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 222 страницах машинописного текста и состоит из введения, 8 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, иллюстрирована 14 таблицами и 84 рисунками. Список литературы содержит 320 источников, из которых 46 отечественных и 274 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

К природным полимерам или биополимерам относят органические молекулы, синтезированные живыми организмами. Структурно они представляют собой последовательность мономеров – аминокислот, моносахаридов, нуклеотидов или эфиров, которые удерживаются ковалентными связями с образованием полипептидов, полисахаридов, полифенолов или сложных полиэфиров. Различают биополимеры растительного (альгинаты, крахмал, целлюлоза, натуральный каучук, пектины), животного (коллаген, гиалуроновая кислота, хитозан), грибного (хитин) и бактериального происхождения (бактериальная целлюлоза, экзополисахариды). Биополимерные материалы, используемые для закрытия раневых поверхностей или в качестве имплантируемых матриц, имеют преимущество перед синтетическими повязками благодаря их биосовместимости, биоразлагаемости, меньшей антигенности и способности к биоинтеграции [X. Yang et al., 2013; T.G. Sahana et al., 2018; M. F.P. Graça et al., 2020].

Раневые повязки, созданные на основе биополимеров, способны абсорбировать избыток раневой жидкости, поддерживать физиологически влажную среду и минимизировать бактериальную инфекцию в месте раны. Терапевтическая эффективность этих раневых повязок зависит от соотношения биополимеров, используемых в сочетании, природы используемых сшивающих агентов, времени сшивания, природы используемых наполнителей, а также включения БАВ и антибактериальных агентов [B.A. Aderibigbe et al., 2018].

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

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

Источник сырья	Биополимер	Биологический эффект	Ссылка
Плотная соединительная и хрящевая ткань животных	Коллаген	Индукция пролиферации фибробластов, хемотаксический фактор для макрофагов	[D. Brett, 2008]
Клеточные стенки растений и бактерий	Целлюлоза	Поддержание влажной среды, впитывание раневого экссудата	[M.H. Kim et al., 2018]
Бурые водоросли	Альгинаты, альгиновая кислота	Активация моноцитов, индукция пролиферации и миграции фибробластов	[B.A. Aderibigbe et al., 2018]
Соединительная ткань животных	Гиалуриновая кислота	Индукция пролиферации и миграции фибробластов и кератиноцитов, противовоспалительный	[M. Litwiniuk et al., 2016]
Экзоскелет ракообразных, моллюсков, насекомых; клеточная стенка грибов	Хитозан	Индукция пролиферации и миграции фибробластов и кератиноцитов	[S. Ahmed et al., 2016]
Бурые водоросли	Фукоидан	Ангиогенный, индукция пролиферации фибробластов и кератиноцитов	[H.Y. Zeng et al., 2018]

Современные биоинженерные стратегии, привели к созданию из этих биополимеров материалов нового поколения для лечения раневых процессов. Физические и химические свойства биополимеров позволяют легко превращать их в гидрогели, пластины, смешивать с другими полимерами, для обеспечения повышенной механической прочности, биомиметических свойств, пористости и ряда других характеристик, необходимых для разработки раневых покрытий и хирургических имплантов [S. Hamdan et al., 2017].

1.1 Характеристика коллагенов и их роль в репарации

Коллагены являются достаточно распространенными белками у всех млекопитающих, так как они являются основными компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ). Коллагены составляют около 1/3 от всего белка в организме человека и примерно 3/4 сухого веса кожи. Из различных типов коллагена лишь

немногие используются в производстве биоматериалов на основе коллагена. На сегодняшний день идентифицировано 29 различных типов коллагена (тип XXIX принадлежит к классу коллагенов, содержащих домены фактора фон Виллебранда типа А 11), и все они имеют тройную спиральную третичную структуру, кроме коллагенов типа I, II, III, V и XI, которые имеют фибриллярную четвертичную структуру [Ю.П. Потехина, 2016; M.D. Shoulders et al., 2009, D. Brett, 2008].

Каждая полипептидная цепь в тройной спирали коллагена состоит примерно из тысячи аминокислотных остатков. Эти цепи, выстроенные параллельно и закрученные в левозакрученную полипролиновую спираль II типа (РРII), закручиваются друг вокруг друга, образуя правозакрученную тройную спираль, которая стабилизируется межцепочечными водородными связями и внутрицепочечными $n \rightarrow \pi^*$ взаимодействиями [D. Brett, 2008; E.J. Miller, 2018].

В фибриллярном коллагене тройные спирали тропоколлагена собираются в фибриллы, которые агломерируются, образуя волокна. Эти образующие фибриллы коллагены имеют большие участки гомологичных последовательностей и представляют собой наиболее часто используемые формы биоматериалов на основе коллагена для заживления ран и в целях тканевой инженерии [S. Varma et al., 2016].

Коллаген типа I является наиболее распространенным типом у животных и наиболее часто используется в медицине. У животных отдельные тройные спирали коллагена (тропоколлаген) образуют макроскопические волокна и сети в тканях, костях и базальной мембране [Т.В. Поливанова и соавт., 2007; M. Aumailley et al., 2021]. В большинстве мягких и твердых соединительных тканей коллагеновые фибриллы и их сети составляют большую часть ВКМ и образуют высокоорганизованный трехмерный каркас, окружающий клетки. Коллаген также играет доминирующую роль в поддержании биологической и структурной целостности внеклеточного матрикса и является динамичным и гибким материалом, который подвергается постоянному ремоделированию для регуляции функционирования клеток и тканей [M.D. Shoulders et al., 2009].

Как и положено первичному структурному белку в организме, коллаген устойчив к протеолизу. Хотя пептидные связи в тройной спирали отделены от

ферментативных активных центров, одноцепочечные участки могут расщепляться матриксными металлопротеиназами (ММП). В частности, коллагены типа I–III гидролизуются ММП-1, ММП-2, ММП-8, ММП-13 и ММП-14, которые представляют собой коллагеназы. Образовавшиеся фрагменты коллагена далее расщепляются желатиназами и неспецифическими протеазами. Другие ММП, такие как ММП-3 и ММП-9, способны связываться с коллагеном I типа, но не участвуют в его деградации [A. Jabłońska-Trypuć et al., 2016; S.T. Diniz-Fernandes et al., 2018; D. Rodríguez et al., 2010].

Взаимодействия клетка-коллаген опосредованы четырьмя различными типами белков:

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

Многие белки (такие как декорин и ламинин), которые содержат аминокислотные последовательности Арг-Гли-Асп (RGD) или аналогичные последовательности распознавания интегрин, могут связываться как с коллагеном, так и с интегрин, способствуя клеточной адгезии и пролиферации [S.L. Bellis, 2011]

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

Коллаген и фрагменты его протеолитического расщепления (например, желатин) участвуют в восстановлении тканей. Коллаген I типа является наиболее

важным компонентом, участвующим в восстановлении тканей. Во время воспалительной фазы после травмы высвобождается несколько протеолитических ферментов, которые расщепляют коллаген на более мелкие фрагменты. Аминокислотные последовательности Арг-Гли-Асп (RGD) этих фрагментов являются хемотаксическими факторами для макрофагов и митогенными для фибробластов, вызывая образование грануляционной ткани и пролиферацию [S.L. Bellis, 2011]. Точно так же в эпителии кератиноциты взаимодействуют с желатином и подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу, тем самым способствуя миграции, необходимой для восстановления тканей [I. Pastar et al., 2014]. Баланс между синтезом и деградацией коллагена является ключевым фактором, определяющим судьбу заживления [A.J. Schwartz et al., 2002]. При хронических ранах скорость распада коллагена превышает скорость синтеза из-за нарушения соотношения ММП/ТИМП (тканевой ингибитор металлопротеиназ), из-за чего новообразованные коллагены расщепляются на фрагменты, продлевая фазу воспаления [D. Rodríguez et al., 2010]. Добавление экзогенного коллагена на раневую поверхность может изменить процесс заживления, так как желатин, образующийся в результате расщепления этого коллагена, в дополнение к нативному коллагену, деактивирует избыток ММП и индуцирует пролиферацию, завершая фазу воспаления [D. Rodríguez et al., 2010].

Биоразлагаемый и нетоксичный экзогенный коллаген более биосовместим, чем другие природные полимеры, и лишь слабо антигенен [A. Sionkowska et al., 2021]. Основными источниками коллагена являются кожа и сухожилия крупного рогатого скота, свиней, слизистая мочевого пузыря и кишечника [M.M. Schmidt et al., 2006]. Коллагены используются в двух формах; либо в виде децеллюляризованного коллагенового матрикса, сохраняющего нативные свойства ВКМ, либо в виде коллагена, полученного путем выделения, очистки и деполимеризации [S. Chattopadhyay et al., 2014; T.W. Gilbert et al., 2006; T.W. Gilbert et al., 2012; C.R. Deeken et al., 2011]. Скорость деградации экзогенного коллагена может регулироваться с помощью перекрестного сшивания химическими, физическими или ферментативными способами [E. Marzec, 2018; N. Davidenko et al., 2015;

S.T. Khew, 2008]. Физиологическое действие коллагена может быть улучшено путем модификации поверхности, деполимеризации, добавления противовоспалительных и антимикробных веществ и т.д. Улучшение физических, механических и функциональных свойств биополимеров может быть достигнуто с помощью электроспиннинга, создания скаффолдов и комбинаций с другими молекулами лекарств [F. Wang et al., 2020].

Показано, что коллагеновые нановолокна, полученные методом электроспиннинга, и покрытые ламинином, соответствовали структуре нативного коллагена ВКМ и демонстрировали улучшенную клеточную адгезию и миграцию кератиноцитов [K.S. Rho et al., 2006]. Кверцетин и куркумин, включенные отдельно в коллагеновую матрицу, показали эффективное заживление диабетической раны за счет удаления активных форм кислорода и ускорения повторной эпителизации соответственно [K. Gomathi et al., 2003; D. Gopinath et al., 2004]. ПЭГирированный оксид графена и кверцетин, включенные в бесклеточный дермальный коллагеновый матрикс, показали дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в адипогенные и остеобластные клетки, способствуя клеточной адгезии, отложению коллагена, ангиогенезу в модели диабетической раны [J. Chu et al., 2018]. Коллаген и сульфатированный конъюгат ксилорамноглиуронана, полученные с помощью электроспиннинга показали, что коллагеновое выравнивание близко имитирует нативную дерму с повышенной прочностью на растяжение, способствующей пролиферации фибробластов [L. Kang et al., 2018].

Ориентация пучков коллагена может играть важную роль в определении процесса восстановления тканей. Нановолоконный каркас коллагена, уложенный в виде корзинчатого переплетения, аналогичного анатомическим особенностям нормальной кожи, усиливал процесс заживления за счет уменьшения воспаления, ускорения миграции фибробластов и кератиноцитов и стимулирования ангиогенеза [L. Sun et al., 2018; F. Berthod et al., 2001; И.А. Шурыгина и соавт., 2012]. Паттерн электропрядения коллагена и поликапролактона показал ускоренную направленную миграцию и пролиферацию фибробластов [J.I. Kim et al., 2018].

Материалы для заживления ран на основе коллагена в виде губок, гидрогелей, пленок, мембран, порошка и лиофилизированных листов

коммерчески доступны под разными торговыми названиями. Чаще всего используются; Biopad, Helix bioactive collagen, Stimulen, Biostep, Citrix, Cellerate, Cutimed, Derma Col, Fibracol и т.д. Активный компонент этих продуктов варьируется, и использование соответствующих продуктов для конкретных типов ран влияет на терапевтический результат [K. Varaprasad et al., 2017].

1.2 Особенности процессов регенерации кожи при локальном воздействии биопластическими материалами

Травмы кожи представляют серьезный риск для здоровья человека, поскольку такие функции кожи как, теплоизоляция, задержка жидкости в организме и защита от экзогенных патогенов зависят от повреждений кожи [А.В. Поляков и соавт., 2019; G. Petrof et al., 2014].

Процесс эндогенного заживления начинается почти мгновенно, что обеспечивает достаточно быстрое физиологическое заживление раны. Кровотечение останавливается в течение нескольких минут за счет агрегации тромбоцитов и образования фибриновых сгустков. Локально высвобождаемые факторы роста и клеточные медиаторы привлекают воспалительные клетки, такие как нейтрофилы и моноциты, к месту раны. Возникающая воспалительная реакция направлена на удаление инородных тел, бактерий и поврежденных эндогенных тканей. Ближе к концу воспалительной фазы макрофагальные факторы роста индуцируют фибробласты и эпителиальные клетки к пролиферации и миграции в рану. В фазе пролиферации образуются новые кровеносные сосуды, начинается синтез армирующих коллагеновых волокон, и грануляционная ткань строится из эпителиальных клеток, фибробластов и кератиноцитов. Полное заживление раны занимает несколько недель или месяцев [М.Р. Оразов и соавт., 2017].

По мере сокращения площади раны грануляционная ткань трансформируется в более стабильный внеклеточный матрикс [I.V. Yannas et al., 2015]. Общая

продолжительность процесса заживления зависит от возраста и состояния здоровья пациента (отрицательными факторами являются, например, диабет или венозная недостаточность), а также от внешних факторов, таких как наличие инородных тел или инфекций в ране. Закрытие острых ран происходит в соответствии с описанным выше процессом и заканчивается в течение 8–12 недель [О.А. Легонькова, 2016]. Напротив, хронические раны застывают в фазе воспаления, сопровождаясь значительным экссудатом, тяжелыми инфекциями, болью и некрозом тканей. В результате для полного заживления хронических ран может потребоваться несколько месяцев или лет.

Раневая поверхность при хронических трофических язвах, сахарном диабете и контактных дерматитах характеризуются дефектным ремоделированием ВКМ в результате длительного воспалительного процесса, что препятствует нормальной реэпителизации. Неспособность эпидермальных клеток к нормальной миграции по дну раневой зоны приводит к развитию гиперпролиферирующих клеток на границе раны. Одной из причин является гиперэкспрессия компонентов ВКМ – фибронектина и тромбоспондина, что приводит к клеточной дисфункции и дисрегуляции, в частности, к ингибированию апоптоза фибробластов и кератиноцитов [С.А. Кузнецова и соавт., 2008; В.П. Иванова и соавт., 2017; К.Р. Chalimidi et al., 2015; S. Werner et al., 2003]. Также описаны различия в нарушении регуляции репарации в отношении острых и хронических раневых процессов. На первой стадии раневого процесса в репарации участвуют клетки иммунной системы – макрофаги, которые активно продуцируют факторы роста и цитокины, способствующие переходу раны в стадию пролиферации за счет усиления синтеза коллагена и организации различных компонентов ВКМ [V. Falanga, 2005]. В дальнейшем происходит снижение количества макрофагов и миграция кератиноцитов на дно раны, а также взаимодействие между ММП, интегринами, противовоспалительными цитокинами, что приводит к усилению синтеза основных компонентов ВКМ [Н. Galkowska et al., 2006; А.Ю. Токмакова, соавт., 2007]. Репарация опосредована действием противовоспалительных цитокинов, которые приводят к физиологическому снижению концентрации ММП, способных к

разрушению факторов роста и компонентов ВКМ [J. Gillard et al., 2004]. ММП относятся к семейству цинкзависимых эндопептидаз, которые обеспечивают деградацию белковых компонентов ВКМ и базальных мембран. Данные протеазы подразделяют на 4 основных подсемейства: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, мембраносвязанные ММП. Коллагеназы участвуют в деградации фибриллярных коллагенов, к желатиназам относят ММП-2 (желатиназу А) и ММП-9 (желатиназу В), способных расщеплять коллаген IV и V типа, эластин, входящий в состав базальных мембран, денатурированный коллаген и ряд белков соединительнотканного ВКМ [Е.А. Baker et al., 2003; Y. Liu et al., 2009]. Таким образом, концентрация ММП при заживлении раневых дефектов способна влиять на скорость перестройки ВКМ и на процессы синтеза коллагена всех типов. В частности, высокий уровень ММП-9 в раневом инфильтрате является маркером острого воспаления и дефектного заживления ран при некоторых патологиях. Так установлено, что отношение ММП-9 к тканевому ингибитору металлопротеазы-1 (ТИМР-1) в экссудате снижается в ходе эффективного лечения раневых дефектов у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа в отличие от группы лиц с плохо заживающими язвенными дефектами и нормальным углеводным обменом, у которых этот показатель остается повышенным [M. Muller et al., 2008; S. Guo et al., 2013; G.S. Schultz et al., 2009].

Повреждение коллагена I типа является фактором, индуцирующим продукция цитокинов лейкоцитами, что обеспечивает хемотаксис необходимых типов клеток в очаг поражения. Фибронектин посредством интегринов связывает клетки, обеспечивая их депонирование в области раны, помимо этого молекулы фибронектина, полимеризуясь, меняют свою конформацию, что сопряжено с потерей экспрессии интегринов, а также других молекул, опосредующих регуляторную активность фибронектина в отношении формирования клеточно-матриксных адгезионных контактов, передачи сигнала клеткам [M. Sen et al., 2002]. Ламинин участвует в неоангиогенезе, ламинин-5 восстанавливает целостность базальной мембраны в области дермоэпидермального соединения [C.V. Denis, 2002]. Гиалуроновая кислота способствует удержанию воды во внеклеточном матриксе, а

также вместе с другими ГАГ функционирует как сигнальная молекула, регулируя синтез и секрецию фибробластами и эндотелиальными клетками необходимых для дальнейшего восстановления ткани факторов роста и цитокинов [G. Abatangelo et al., 2010; R.T. McGrath et al., 2010].

Таким образом, последние исследования в области тканевой инженерии и регенеративной медицины привели к лучшему пониманию процессов заживления ран и разработке различных методов восстановления и регенерации кожи. Перевязка ран с использованием биологических материалов, клеточных компонентов и факторов роста представляет значительный интерес для исследований [L.E. Tracy et al., 2016; R.F. Pereira et al., 2013; И.М. Волкова и соавт., 2015]. На сегодняшний день известно несколько типов искусственных каркасов, которые получены различными методами [В.А. Жуковский, 2016; E. Avishai et al., 2017]. Идеальный искусственный каркас должен обладать высокой биосовместимостью, хорошей биоразлагаемостью и механическими свойствами, подходящим размером пор и высокой пористостью [J. Boateng et al., 2015; Ю.С. Винник и соавт., 2011].

1.3 Биоматериалы на основе компонентов внеклеточного матрикса

В настоящее время растет потребность в новых материалах для восстановления кожных дефектов, вызванных травмами, ожогами, инфекциями и системными патологиями [Y. Xi et al., 2018; C. Mao et al., 2017; A.M. Coenen et al., 2018]. Современные методы лечения дефектов кожи включают аутологичные кожные трансплантаты, аллотрансплантаты, применение биологических и искусственных каркасов [P.P. Рахматуллин, 2011; C. Wang et al., 2019; S.C. Wu et al., 2010; Q. Wen et al., 2020]. Однако аутооттрансплантаты вызывают длительные послеоперационные осложнения, как в области дефекта, так и в месте донорства. Аллотрансплантаты подвержены риску вирусной инфекции, передачи заболеваний и иммунного отторжения [А.М. Морозов и соавт., 2020]. В последние годы

искусственные каркасы стали альтернативной методикой лечения, так как они не имеют недостатков аутотрансплантатов и аллотрансплантатов. Ткани животного происхождения тысячелетиями использовались для прикрытия обширных ран. Их неограниченная доступность – одно из преимуществ использования гетерологичных матриц. Кожа свиньи является одной из нескольких исследуемых гетерологичных матриц, в основном из-за ее высокого сходства с кожей человека и ее биосовместимости, механической устойчивости и низкой антигенности [R.D. Ventura et al., 2020]. Свиная кожа является хорошо подходящей временной повязкой на рану при ожогах второй степени и обычно способствует заживлению без рубцов со средним временем заживления около 10 дней [A.W.C. Chua et al., 2016; M. Rahimnejad et al., 2017].

Биоматериалы на основе природного коллагена можно разделить на две категории в зависимости от степени их очистки: децеллюляризованные коллагеновые матрицы, сохраняющие исходные свойства ткани и структуру ВКМ; и более рафинированные каркасы, полученные путем экстракции, очистки и полимеризации коллагена [M. Nowacki et al., 2017; S.F. Badylak, 2009; R. J. Warth et al., 2015]. Децеллюляризация коллагена влечет за собой сочетание физических (мгновенная заморозка или высокое давление), химических (кислотная или щелочная обработка, хелатирование с ЭДТА или обработка детергентами или растворами с высокой осмолярностью) и ферментативных (например, расщепление трипсином) методов для получения коллагена [X. Yu et al., 2016].

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

Производство таких биоматериалов требует выделения и очистки коллагена из натуральных тканей. Однако растворению коллагена препятствует его низкая растворимость из-за многочисленных ковалентных поперечных связей. Нативный коллаген нерастворим в органических растворителях, но может растворяться в

водных растворах, в зависимости от существующих поперечных связей. Наиболее распространенные растворители включают нейтральный солевой раствор (0,15–0,20 М NaCl), разбавленный раствор кислоты (0,5 М уксусная кислота) или раствор протеолитических ферментов, поскольку трехспиральный домен коллагена устойчив к протеазам, таким как пепсин, химотрипсин или фицин при температуре ниже ~ 20 °C. Однако пепсин при весовом соотношении фермента к сухой ткани 1 : 10 в разбавленной уксусной кислоте обеспечивает среду, в которой коллаген может легко набухать и растворяться [L. Delgado et al., 2015; M.C. Gomez-Guillen et al., 2011; A. Mandal et al., 2010; D. Manou et al., 2019].

Создание искусственных каркасов, имитирующих внеклеточный матрикс, является одним из наиболее важных шагов в тканевой инженерии. Комбинация различных типов материалов для естественной тканевой инженерии в первую очередь предназначена для получения искусственных каркасов, максимально похожих на ВКМ [A. Meleshina et al., 2017; P.V. Milan et al., 2020; M. Shalaby et al., 2020]. В частности, был разработан и применен комплекс коллагена и хитозана, сшитого глутаровым альдегидом, имитирующий внеклеточный матрикс [L. Ma et al., 2003]. Однако остатки сшивающего агента в каркасе являются источником токсичных побочных продуктов, таких как мономер глутаральдегида и гемиацеталь, которые влияют на рост эндотелиальных клеток. Показано, что глутаровый альдегид не имеет преимуществ во многих методах лечения тканеинженерными каркасами. Также был разработан каркас, сконструированный из трех основных компонентов внеклеточного матрикса кожи человека, коллагена, хондроитинсульфата и гиалуроновой кислоты, которые ближе по составу к внеклеточному матриксу дермы. В данном исследовании коллаген экстрагировали из кожи кислотным гидролизом, каркас сшивался гидрохлоридом 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, который также имел определенную степень токсичности [W. Wang et al., 2010].

Желатин является одним из биополимеров, который обычно используется при разработке раневых покрытий и в области тканевой инженерии, так как он является естественным имитатором внеклеточного матрикса тканей и органов человека. Свойства желатина, которые привлекли внимание большинства биомедицинских

исследований, включают превосходную биосовместимость, хорошую биоразлагаемость, взаимодействие с клетками, неиммуногенность, а также его высокую технологичность, доступность и экономическую эффективность. Довольно низкая антигенность желатина также делает его хорошо зарекомендовавшим себя биополимером, используемым в многочисленных биологических приложениях. Однако желатин является гидрофильным белком и обычно требуется химическая сшивка для улучшения его механических характеристик и стабильности [A. Gaspar-Pintilieșcu et al., 2019; S.P. Ndlovu et al., 2021; Y. Zheng et al., 2018].

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

АДМ представляет собой срез бесклеточной ткани, полученный из кожи животных или человека, который содержит все компоненты ВКМ и сохраняет соответствующую структуру. На сегодняшний день эксперименты на животных и первоначальные клинические испытания показали, что ацеллюлярные дермальные матрицы (АДМ), соответствующие по микроструктуре дермальному ВКМ, можно эффективно применять для восстановления дефектов кожи и соединительных тканей и с 1990-х годов АДМ производятся в виде различных коммерческих продуктов [H. Cui et al., 2019; F. Gossetti et al., 2017].

Перспективным направлением в лечении ожогов является применение децеллюляризированной трупной кожи. Основными преимуществами такого биологического материала являются состав и организация используемой дермы, аналогичные собственной дерме пациента, позволяющие использовать ее как временное биологическое покрытие [А.В. Сачков и соавт., 2018]. В частности, регенеративная тканевая матрица AlloDerm™ была разработана корпорацией LifeCell в 1990-х годах; этот материал получен из аллогенной дермы трупа человека, которая хранится в банках тканей в соответствии со стандартами, установленными Американской ассоциацией банков тканей [L.A. Jansen et al., 2013; S.B. Glasberg et al., 2012]. Свежую человеческую дерму децеллюляризируют

на вошере в диспазе и Тритоне X-100 или додецилсульфате натрия, не допуская нарушения пучков коллагена и базальных мембран, а затем лиофилизируют для дальнейшего применения. Было доказано, что AlloDerm™ способствует клеточной адгезии *in vitro*, хотя клетки на AlloDerm™ распределяются в основном на внешней поверхности. AlloDerm был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для замещения поврежденной и несостоятельной кожи, например, как покрытие донорских участков, таких как радиальный лоскут предплечья, в виде листового трансплантата без покрывающего его расщепленного трансплантата. После нанесения на раневое ложе AlloDerm™ происходит быстрая инфильтрация клетками из области шва через 6 недель, в то время как центральные области имплантированного материала остаются свободными от клеток более 12 недель.

На сегодняшний день AlloDerm™ вместе с аутологичными кожными трансплантатами широко применяются для покрытия ожоговых ран, тем самым уменьшая последующее рубцевание. Известно, что AlloDerm™ применяется для восстановления гортани, влагалища и других дефектов мягких тканей, также для покрытия протезов и восстановления поврежденных стенок таза и брюшной полости. Широкие перспективы продемонстрировало применение АДМ в качестве заменителя кожи после рецеллюляризации с помощью аллогенных кератиноцитов, стволовых клеток, полученных из жировой ткани, фибробластов и эндотелиальных клеток пупочной вены человека [L.A. Jansen et al., 2013].

Коммерчески доступны и другие матриксы, в том числе продукты децеллюляризованной дермы, полученные из свиной дермы, такие как Medeor® Matrix, Permacol™, Strattice™ и Gelfoam™ [S.A. Macadam et al., 2012; W. Peng et al., 2022].

Получение АДМ Strattice™ состоит из трех этапов: деэпидермизация с помощью NaCl, содержащего Triton X-100, децеллюляризация с помощью дезоксихолата натрия и удаление ДНК с помощью ДНКазы, показано, что данный матрикс может обеспечивать сигналы хемотаксиса для облегчения агрегации клеток и ингибировать индукцию клеточного апоптоза [K.E. Mulier et al., 2011].

Medeor® Matrix – еще один продукт децеллюляризованной свиной дермы, производимый корпорацией Kensey Nash с использованием запатентованного процесса OPTRIX™, который включает циклы обработки органическими растворителями, детергентами, растворами солей и ферментов. Разница между Strattice™ и Medeor® Matrix заключается в том, что последний сохраняет больше фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и трансформирующего фактора роста TGF-β. Кроме того, кондиционированная среда от Medeor® Matrix положительно влияет на пролиферацию и миграцию клеток. Более того, этот материал демонстрирует повышенную адгезию к клеткам по сравнению с другими продуктами децеллюляризованной дермы. Благодаря оптимальному сшиванию хирургические имплантаты Permacol™ обладают длительной структурной стабильностью, что обеспечивает целостность имплантированного трансплантата во время процесса заживления ран *in vivo*. Кроме того, Permacol™ обладает высокой прочностью и используется при пластике вентральной грыжи и реконструкции брюшной стенки, однако использование сшивающих реагентов может способствовать плохой адгезии клеток [C. Qi et al., 2015; P. Niespielak et al., 2021; P.W. Hsu et al., 2009].

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

В последние годы наблюдается рост интереса к такой группе материалов, как гидрогели, которые обладают высокой биосовместимостью и способностью имитировать высокогидратированные ткани организма. В состав гидрогелей возможно включение клеток, регуляторных пептидов и факторов роста, что в перспективе может обеспечить этому классу материалов лидирующие позиции на рынке костно-дермальных материалов [А.Б. Шехтер и соавт., 2015; W. Xu et al., 2020].

Спектр средств на гидрогелевой основе, предназначенных для коррекции эстетических недостатков и лечения ран, достаточно велик и постоянно пополняется. Жидкая или гель-форма ВКМ может дополнительно расширить клиническое использование скаффолдов дермы, позволяя материалу посредством минимально инвазивных методов доставляться на необходимые участки. Солюбилизированный ВКМ может быть внесен катетером или иглоуправляемыми хирургическими методами на различные по строению анатомические участки [A.S. Hoffman, 2012; M.T. Spang et al., 2018; S. Lohrasbi et al., 2020]. При этом в процессе обработки дермы должны быть минимизированы этапы, которые могут уничтожить активные факторы роста и низкомолекулярные пептиды, имеющиеся в нативном ВКМ, для сохранения биологической активности гелевой формы. Исследования показали, что может быть получена гель-форма из подслизистой тонкой кишки свиньи, которая способна поддерживать рост и дифференцировку клеток *in vitro*, но для получения этой гель формы необходим агрессивный процесс очистки коллагена, который, вероятно, приведет к потере биоактивных молекул [X.Y. Chen et al., 2022].

1.4 Методы и подходы к децеллюляризации дермы

ВКМ, полученный из децеллюляризованной ткани, все чаще используется в регенеративной медицине и тканевой инженерии, включая использование трехмерных каркасов ВКМ, полученных путем децеллюляризации всего органа. Биологические хирургические материалы, состоящие из ВКМ, создают из различных аллогенных или ксеногенных тканей, включая дерму, мочевого пузыря, тонкую кишку, легкие, пульпозные ядра, амниотическую оболочку, перикард и сердечные клапаны [S.F. Badylak et al., 2011; L. Yu et al., 2020; E. Cady et al., 2020; A.B. Daly et al., 2012; R.H. Fu et al., 2014; M. Gholipourmalekabadi et al., 2015].

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

Было показано, что внеклеточный матрикс влияет на клеточный митогенез и хемотаксис [T. Hoshiba et al., 2010], направляет дифференцировку клеток [G.S. Nussey et al., 2018] и вызывает реакции ремоделирования ткани [X. Y. Chen et al., 2022]. Вполне вероятно, что трехмерная ультраструктура, топология поверхности и состав ВКМ способствуют этим эффектам. Имеются также данные о том, что остаточный клеточный материал ослабляет или полностью сводит на нет преимущества конструктивного ремоделирования тканей вместо биологических каркасных материалов *in vivo* [J.E. Reing et al., 2010; T.W. Gilbert, 2012]. Таким образом, методы обработки тканей, включая децеллюляризацию, являются решающими факторами клинического успеха.

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

Таблица 2 – Отдельные агенты и методы децеллюляризации тканей

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

Продолжение таблицы 2

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

Окончание таблицы 2

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

1.4.1 Химические агенты

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

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

Основания (например, гидроксид кальция, сульфид натрия и гидроксид натрия) достаточно агрессивны и обычно используются для удаления волос или шерсти из образцов дермы на ранних стадиях децеллюляризации [F.T. Rodrigues et al., 2010; T. Tsuchiya et al., 2014]. Однако основания могут полностью вымывать факторы роста из матрикса и снижать механические свойства ВКМ более значительно, чем другие химические и ферментативные агенты [A. Neishabouri et al., 2022]. Основным механизмом, посредством которого такие основания, как гидроксид натрия, снижают механические свойства, является расщепление коллагеновых фибрилл и нарушение поперечных связей коллагена [A.H.A. Zahmati et al., 2017].

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

Ионные, неионные и цвиттерионные детергенты солюбилизируют клеточные мембраны и отделяют ДНК от белков, поэтому они также эффективны при удалении клеточного материала из ткани [А.В. Alshaikh et al., 2019]. Степень удаления белков ВКМ и ДНК детергентами увеличивается со временем воздействия и зависит от типа ткани, органа и возраста донора. Сочетание нескольких детергентов увеличивает потерю компонентов ВКМ, но также обеспечивает более полное удаление детергента из внеклеточного матрикса после децеллюляризации [Р.М. Crapo et al., 2011; D.E. Heath et al., 2019].

Неионогенные детергенты, такие как Тритон X-100, могут сильно разрушать липид-липидные и липид-белковые связи, но они менее эффективны при белок-белковом взаимодействии. Хотя они сохраняют ультраструктуру децеллюляризованной ткани и сохраняют факторы роста, они менее эффективны в удалении клеточного материала, чем додецилсульфат натрия (ДСН). Тритон X-100 не подходит для тканей, важными составляющими которых являются ГАГ и липиды. Тритон X-100 может эффективно удалять клеточные остатки из более толстых тканей, таких как перикард, клапаны, где ферментативные и осмотические методы недостаточны, с сопутствующей потерей белка ВКМ, сопровождающейся снижением неблагоприятного иммунного ответа *in vivo* [Р.М. Crapo et al., 2011; Y. Fu et al., 2010].

Додецилсульфат натрия (ДСН) является более эффективным чем Тритон X-100 для удаления ядер из плотных тканей и органов, таких как почки и височно-нижнечелюстной сустав, при сохранении биомеханики тканей. Добавление детергента ДСН к протоколу децеллюляризации значительно влияет на степень удаления клеточных ядер, но при этом происходит разрушение ультраструктуры ВКМ и элиминация факторов роста [А. Gilpin et al., 2017]. Таким образом, ДСН, как правило, более эффективен для удаления клеточных остатков из тканей по сравнению с другими детергентами, но также более разрушительно действует на ВКМ. Неионогенные детергенты, такие как Triton X-100, более эффективны для удаления липидов из тканей, чем ионные детергенты, такие как дезоксихолат [Р.М. Crapo et al., 2011].

Цвиттерионный детергент 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат – CHAPS наиболее эффективен для удаления клеток из более тонких тканей, таких как легкие, и может быть неэффективен для децеллюляризации более толстых тканей, при использовании в комбинации с ДСН или отдельно для относительно бесклеточных тканей [Т. Tsuchiya et al., 2014]. Сравнительное исследование использования детергентов для децеллюляризации периферических нервов показало лучшее сохранение ультраструктуры при обработке неионогенными и цвиттерионными детергентами, но лучшее удаление клеток ионными детергентами [А.В. Lovati et al., 2018].

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

Спирты, такие как глицерин, способствуют децеллюляризации тканей путем обезвоживания и лизиса клеток. Изопропанол, этанол и метанол, более эффективны, чем липаза, в удалении липидов из тканей и обработка жировой ткани достаточно эффективна за относительно короткий период времени. Следует соблюдать осторожность при обработке тканей спиртами, такими как этанол и метанол, из-за их способности осаждать белки (поэтому они используются в качестве фиксаторов тканей в гистологии) и повреждать ультраструктуру ВКМ [Р.М. Crapo et al., 2011; А. Neishabouri et al., 2022].

Ацетон также можно использовать для удаления липидов во время децеллюляризации. Однако, как и со спиртами, использование ацетона приводит к повреждению ультраструктуры внеклеточного матрикса. По сравнению с обработкой детергентами, ацетон сшивает ВКМ, образуя более жесткие каркасы с механическими свойствами, еще более далекими от свойств нативной ткани [Р.М. Crapo et al., 2011; А. Neishabouri et al., 2022].

Трибутилфосфат представляет собой органический растворитель с вирулицидными свойствами. Для децеллюляризации плотных тканей, таких как сухожилия, трибутилфосфат показал себя более эффективным, чем детергенты, такие как Тритон X-100 и ДСН [C.R. Deeken et al., 2011].

1.4.2 Биологические агенты

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

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

Трипсин, представляющий собой сериновую протеазу, обычно используется в качестве ферментативного агента децеллюляризации. Однако белки ВКМ, такие как коллагены, обладают ограниченной устойчивостью к расщеплению трипсином, поэтому воздействие трипсина на ткани следует использовать с осторожностью. По сравнению с детергентами трипсин больше разрушает эластин и коллаген и медленнее удаляет клетки, но лучше сохраняет содержание ГАГ [D. Moffat et al., 2022; S. Sajith, 2017]. Нарушение трипсином ВКМ может быть связано с изменениями его механических свойств. Удаление клеток и

компонентов внеклеточного матрикса трипсином зависит от времени, и полная децеллюляризация одним только трипсином может потребовать длительной инкубации даже для тонких тканей. Трипсин можно эффективно использовать для разрушения ультраструктуры ткани и улучшения проникновения последующих агентов децеллюляризации; поэтому воздействие трипсина в качестве начального шага в протоколе децеллюляризации тканей может быть желательным или даже необходимым, особенно для полного удаления клеточных ядер из плотных тканей [D. Moffat et al., 2022; D.E. Heath et al., 2019].

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

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

Децеллюляризованные ксеногенные ткани можно обрабатывать α -галактозидазой для удаления иммуногенного антигена клеточной поверхности галактозы- α -(1,3)-галактозы (Gal-эпитоп) [M.L. Wong et al., 2014].

Хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА), способствуют диссоциации клеток от белков ВКМ за счет связывания ионов металлов [M. Asadi et al., 2021]. Вполне вероятно, что хелатирующие агенты способствуют нарушениям белок-белковых взаимодействий по тому же механизму. Одних только хелатирующих агентов недостаточно для поверхностного удаления клеток, поэтому их обычно используют в сочетании с ферментами, такими как трипсин, или детергентами. Комбинированная эффективность хелатирующих агентов и простых гипер- или гипотонических растворов для децеллюляризации неизвестна [D.E. Heath et al., 2019; C.R. Deeken et al., 2011].

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

Сыворотка связывается с фрагментами нуклеиновых кислот, помогая их удалению из ткани, но не удаляет некоторые иммуногенные компоненты, такие как фосфолипиды. Кроме того, недостатком ксеногенной сыворотки является введение иммуногенных компонентов, которые могут ассоциироваться с ВКМ, тем самым усиливая последующую неблагоприятную иммунную реакцию. Поэтому использование сыворотки при подготовке ВКМ для клинических применений ограничено [L. Gui et al., 2010].

Ингибиторы сериновых протеаз, такие как фенилметилсульфонилфторид, апротонин и лейпептин, предотвращают нежелательное повреждение внеклеточного матрикса, которое в противном случае могло бы возникнуть в

результате высвобождения внутриклеточных протеаз во время лизиса клеток. Антибиотики и антимикотики, такие как пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В и азид натрия, могут использоваться для минимизации микробного загрязнения во время децеллюляризации, но также представляют собой потенциальное нормативное препятствие для клинического применения биологических каркасов [P.M. Crago et al., 2011].

1.4.3 Физическое воздействие и прочие агенты

Процесс замораживания-оттаивания эффективно лизирует клетки в тканях и органах, но поврежденные мембраны и внутриклеточное содержимое остается, и требует удаления в последующих стадиях обработки. Один цикл замораживания-оттаивания может уменьшить неблагоприятные иммунные реакции, такие как инфильтрация лейкоцитами в васкуляризованных каркасах ВКМ [P. Cravedi et al., 2017]. Многократные циклы замораживания-оттаивания могут использоваться для эффективной децеллюляризации и, при этом, существенно не увеличивают потерю белков ВКМ из ткани. Процесс замораживания-оттаивания вызывает незначительные нарушения ультраструктуры ВКМ и поэтому его следует использовать только тогда, когда такие эффекты приемлемы в конечном продукте, в частности это целесообразно для обработки механически прочных тканей, так как механические свойства при этом изменяются минимально [D.E. Heath et al., 2019; P.M. Crago et al., 2011].

Клетки на поверхности ткани или органа (например, мочевого пузыря, тонкого кишечника, кожи, амниона) можно эффективно удалить механически в сочетании с обработкой ферментами, гипертоническим раствором или хелатирующими агентами, все эти способы облегчают диссоциацию клеток от лежащей под ними базальной мембраны. Однако подлежащая ультраструктура и

целостность базальной мембраны неизменно повреждаются любым прямым приложением механической силы [P.M. Crago et al., 2011].

Гидростатическое давление требует относительно небольшого времени и может быть более эффективным, чем детергенты или ферменты для удаления клеток из кровеносных сосудов и тканей роговицы, хотя образование барических кристаллов льда может разрушить ультраструктуру ВКМ. Повышение температуры во время децеллюляризации под давлением предотвращает образование кристаллов льда, но может нарушить внеклеточный матрикс из-за связанного с этим увеличения энтропии, которое можно смягчить коллоидами, такими как декстран [Y. Hashimoto et al., 2010].

Нетермическая необратимая электропорация (NTIRE) также была исследована как один из подходов к децеллюляризации тканей. Микросекундные электрические импульсы прикладывают к резидентным клеткам ткани, вызывая образование микропор в клеточной мембране из-за дестабилизации электрического потенциала [P.M. Crago et al., 2011]. Наличие микропор вызывает нарушение клеточного гомеостаза и приводит к гибели клеток. При воздействии NTIRE на сонные артерии крыс *in vivo* было показано, что клеточные фрагменты медленно удалялись из ткани в течение нескольких дней, оставляя каркас ВКМ примерно через три дня после обработки NTIRE [M. Phillips et al., 2010].

NTIRE имеет некоторые очевидные ограничения. Зонды относительно малы, что ограничивает размер ткани, подлежащей децеллюляризации. Что еще более важно, поскольку предполагается, что механизм удаления клеток является иммуноопосредованным, процесс децеллюляризации должен происходить *in vivo*, что значительно ограничивает возможности применения. Тем не менее, в одном недавнем исследовании изучалось использование NTIRE *in vitro* в сочетании с перфузией сосудов для децеллюляризации печени свиньи. Результаты показали, что перфузия лактатным раствором Рингера облегчает удаление клеточного дебриса, образовавшегося в результате электропорации [M.B. Sano et al., 2010].

1.5 Особенности ангиогенеза в децеллюляризованных матриксах

Несмотря на многочисленные экспериментальные исследования, демонстрирующие возможность применения тканеинженерных конструкций (ТИК), в клинической практике они используются не так широко [D.F. Williams et al., 2019]. Основной причиной является недостаточная васкуляризация, так как ТИК, как правило, имеют достаточно большие размеры, значительно ограничивающие формирование сети кровеносных сосудов, которая способна обеспечить клетки питательными веществами и в дальнейшем поддержать быструю регенерацию ткани [V. Mastrullo et al., 2020]. Необходимо отметить, что использование таких методов, как 3D-биопринтинг, электроспиннинг, применение факторов роста и клеток различного типа, не способствует эффективной васкуляризации, несмотря на достижение тканеподобной структуры ТИК [G. Fernandez de Grado et al., 2018; D.F. Williams et al., 2019]. Усложнение и увеличение размера ТИК ограничивает степень диффузии газов, поступление питательных веществ и интеграцию сети кровеносных сосудов, при этом одной из главных задач становится обеспечение постоянного и контролируемого выделения факторов роста, так как они способствуют адгезии, миграции и пролиферации клеток, а также стимулируют ангиогенез в ТИК.

При выборе наиболее оптимального скаффолда, способствующего воссозданию особенностей кровоснабжения органа или ткани, необходимо учитывать структурные особенности каркаса, биологическую совместимость и время его деградации. Ключевую роль играет наличие в каркасе специфичных белков внеклеточного матрикса, так как компоненты ВКМ (коллаген, ламинин, фибронектин, энтактин, гиалуроновая кислота, протеогликаны, ГАГ и др.) проявляют проангиогенные свойства. Так, например, большое количество исследований *in vitro* показало, что растущие капилляры синтезируют фибронектин, сборка которого обеспечивает регуляцию и необходима для морфогенеза капилляров [M.L. Lindsey et al., 2015]. Таким образом, существенным недостатком

синтетических полимеров при создании ТИК и её последующей имплантации является отсутствие компонентов, связывающих клетки и ВКМ.

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

Предполагаемыми активаторами ангиогенеза являются ангиопоэтины и их Tie-рецепторы, тромбоцитарный фактор роста (PDGF-B), эфрины (Eph-B) и их рецепторы, которые также могут влиять на ремоделирование сосудов. Первым активатором ангиогенеза является сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF, ангиотензины, так же как эфрины и их рецепторы регулируют процессы инвагинации на более поздних стадиях. VEGF стимулирует формирование нового капиллярного сегмента посредством вовлечения перицитов и гладкомышечных клеток. Данные периэндотелиальные клетки важны для целостности формирующихся сосудов. В частности, для перицитов описаны три основные функциональные роли: сократимость, регуляция активности эндотелиальных клеток и макрофагов [Н.Л. Светозарский и соавт., 2015]. Известно, что взаимодействие Tie-2 и ангиопоэтина-1 поддерживает межклеточные связи эндотелиальных клеток, стабилизирует сосудистую стенку и способствует формированию сосуда [Z.L. Liu et al., 2023].

Другими известными медиаторами ангиогенеза являются: фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), доказано ангиогенное действие ангиопоэтина (ANGPT-1,2), инсулиноподобного фактора роста, ангиогенина, интерлейкина-8 и интерлейкина-6. Кроме этого, большое значение имеют такие факторы как: фактор роста гепатоцитов, тромбоцитарный

фактора роста (PDGF), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), пролиферин, лептин, NO, простагландины и молекулы клеточной адгезии (интегрины, селектины и кадгеринны) [H. Harjunpää et al., 2019].

Наряду с факторами, оказывающими стимулирующее воздействие на ангиогенез, существует ряд биологически активных веществ, обладающих выраженным супрессорным влиянием. Наиболее изучены эндостатин (фрагмент коллагена XVIII) и ангиостатин (фрагмент плазминогена) [M. Li et al., 2021; A.A. Ismail et al., 2021]. К ингибиторам ангиогенеза также относятся интерферон γ , вазогибин-1 (VASH-1), тромбоспондины-1,2 (TSP-1,2), интерлейкин-4 и т.д. [Y.A. Pei et al., 2022; A.M. Peluzzo et al., 2022; A. Helkin et al., 2015].

Продукты гликолиза, в частности лактат, также являются стимуляторами ангиогенеза. Повышенное содержание лактата потенцирует активацию Tie-2 (рецепторов ANGPT) и VEGFR-2 [K.D. Sack et al., 2020].

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

Внеклеточный матрикс необходим для всех стадий ангиогенеза. У взрослых ангиогенез начинается с активации эндотелиальных клеток, деградация базальной мембраны сосудов и прорастания сосудов в интерстициальный матрикс. Во время этой фазы прорастания связывание ВКМ с интегринными обеспечивает критическую сигнальную поддержку для пролиферации, выживания и миграции эндотелиальных клеток. ВКМ также вовлечен в молекулярный сигналинг цитоскелету эндотелиальных клеток, чтобы инициировать морфогенез кровеносных сосудов [A. Hielscher et al., 2016; D. R. Senger et al., 2011].

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

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

Необходимым условием проведения децеллюляризации ткани является количественная оценка остаточного ДНК. Преобладающим источником для изготовления большинства децеллюляризованных матриц для медицинского применения являются ксеногенные ткани. Поэтому процедура получения очищенного ВКМ должна обеспечивать отсутствие реакции отторжения ксенотрансплантата при его имплантации в ткани пациента.

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

Таблица 3 – Сравнительная характеристика различных методов децеллюляризации

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

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было одобрено локальным Независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (протокол № 96 от 29.01. 2021 г.). Все манипуляции с лабораторными животными соответствовали требованиям Приказа Минздрава России от 23.08.2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», комитета по биоэтике и Федерального закона РФ о защите животных (ст. 4 Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 г.), Приказа Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123)», Strasbourg, 1986. Кормление осуществлялось в соответствии с суточными нормами (Приказ ректора ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России от 09.07.2015 г. № 527 «О создании комиссии по определению норм кормления лабораторных животных»).

Различные виды исследований и экспериментальные работы проводились на базе центральной научно-исследовательской лаборатории, учебно-производственного отдела (вивария), кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО Кубанского государственного медицинского университета Минздрава России (г. Краснодар). Эксперимент по пересадке децеллюляризованных и рецеллюляризованных дермальных матриксов проводили на поросенке породы Ландрас (возраст 15 недель, масса 25,5 кг). Закрывтие грыжевого дефекта было выполнено на трёх свиньях-грыженосителях породы Ландрас возрастом 4–6 месяцев массой $27 \pm 6,1$ кг. Моделирование

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

2.1 Получение нативной дермы

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

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



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

Полученные образцы промывали стерильным физиологическим раствором (ООО «МОСФАРМ», Россия), помещали в маркированные зип-пакеты и хранили при температуре – 80 °С в течение 1–6 месяцев для предварительной криодеструкции клеточных элементов дермы.

2.2 Методология децеллюляризации образцов дермы

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), H₂O₂ (Йодные Технологии и Маркетинг, Россия), борная кислота (Реахим, Россия), ЭДТА (ThermoFisher Scientific, США), KCl (Реахим, Россия), NaCl (Реахим, Россия), CaCl₂ (Реахим, Россия), фосфатный буфер (Gibco, Великобритания);
- ферменты: Трипсин-Версен («Биолот», Россия), свиная панкреатическая ДНК-аза I 2000 ЕД («Sigma-Aldrich», США).

Все необходимые для децеллюляризации растворы готовили с использованием дистиллированной воды. Последовательность воздействия и концентрации растворов подбирались экспериментально и конечные алгоритмы децеллюляризации дермы для получения различных биопластических материалов представлены в главе 3 и 5.

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

2.3 Оценка качества децеллюляризации образцов дермы

2.3.1 Количественный анализ ДНК

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

2.3.2 Окрашивание DAPI

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

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

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

2.3.3 Оценка цитотоксичности биоматериалов методом Live/Dead

Для анализа цитотоксичности биоматериалов использовалась линия человеческих дермальных фибробластов DF-1, полученная из Российской коллекции клеточных культур позвоночных ФГБУН Института цитологии РАН (Приложение В). 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, при этом живые клетки приобретали зелёное, а мёртвые – красное свечение. Визуализация флуоресцентного свечения проводилась на флуоресцентном микроскопе Olympus CX 41 (Olympus, Япония) с использованием соответствующих светофильтров с помощью программного обеспечения Olympus CellSens Entry (Olympus, Япония). Количественный учет площади и интенсивности флуоресцентного окрашивания проводился с использованием программы ImageJ (National Institution of Health, США).

2.3.4 Оценка метаболической активности клеток (МТТ-тест)

Для проведения исследования образцы ацеллюлярного дермального матрикса инкубировали с клетками линии человеческих дермальных фибробластов DF-1 в среде DMEM (Gibco, Англия) в течение 3 часов в темноте в присутствии желтой соли тетразолия (МТТ) (соотношение питательной среды к МТТ – 10 : 1), затем

добавляли раствор 10 % додецилсульфата натрия в 0,01 М HCl и инкубировали 1 час. Положительным контролем служили лунки, где инкубировались только дермальные фибробласты, отрицательным контролем были лунки с полной питательной средой.

Интенсивность протекания реакции восстановления МТТ митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific Inc., США) при длине волны 560 нм.

2.3.5 Подкожная имплантация/инъекция образцов биоматериалов

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

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

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

2.4 Биохимические методы оценки состава биопластических материалов

2.4.1 Количественное определение коллагена

Проводили набором реагентов «ELISA Kit for Collagen Type I (COL1)» (Uscn Life Science & Technology Co., USA). Набор представляет собой сэндвич-ферментный иммуноанализ для количественного измерения *in vitro* коллагена 1-го типа при длине волны 450 нм. Анализ образцов выполнялся в гомогенатах биопластических материалов, полученных с помощью лизирующего буфера IS007.

2.4.2 Количественное определение содержания гликозаминогликанов

Проводили набором реагентов «Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay» (Biocolor Ltd. Northern Ireland, U.K.). Принцип метода заключается в количественном связывании красителя для анализа сульфатированных протеогликанов и ГАГ. Анализ можно использовать для измерения общего содержания с-ГАГ, а также можно использовать для определения соотношения О- и N-сульфатированных гликозаминогликанов в исследуемых образцах. Метка красителя, используемая в анализе, представляет собой 1,9-диметилметиленовый синий, и краситель применяется в условиях, которые обеспечивают специфическую метку для сульфатированного полисахаридного компонента протеогликанов или свободных от белка цепей с-ГАГ.

2.4.3 Количественное определение содержания гиалуроновой кислоты

Проводили набором реагентов «Blyscan™ Glycosaminoglycan Assay» (Biocolor Ltd. Northern Ireland, U.K.) по протоколу фирмы производителя. Принцип метода заключается в удалении тканевого белка и сульфатированных гликозаминогликанов перед измерением изолированной гиалуроновой кислоты, затем непосредственно выделение и измерение оптической плотности комплекса краситель «Stains-all» гиалуроновой кислотой (пределом обнаружения 0,2 мкг) при длине волны 655 нм.

2.5 Гистологические исследования

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

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

$$\text{СД} = \frac{\text{ДФ}}{\text{ТК}} \times 100,$$

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

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

2.6 Иммуногистохимические исследования

При иммуногистохимическом исследовании использовали термическую демаскировку антигена и поликлональные антитела к Т-лимфоцитарному рецептору – CD3 (кат. номер ab11089, Abcam, Великобритания), маркеру нейтрофилов – CD16b (кат. номер ab89207, Abcam, Великобритания) и к макросиалину моноцитов и макрофагов – CD68, (кат. номер ab955, Abcam, Великобритания), к фибробластам дермы anti-Vimentin antibody (кат. номер ab8978, Abcam, США), к цитокератинам Anti-pan Cytokeratin antibody (кат. номер ab7753, Abcam, США), к компонентам ВКМ – фибронектину (кат. номер FNab03122, FineTest, Китай), коллагену I (кат. номер FNab01836, FineTest, Китай) и IV типа (кат. номер FNab01844, FineTest, Китай) согласно инструкции производителя. Все образцы до и после имплантации исследовали с помощью микроскопа Olympus CX 41 (Olympus, Япония) при различном увеличении. При количественном подсчёте результатов иммуногистохимического исследования использовали цветовую сегментацию с выделением зеленого канала, бинаризацию по цвету и инструмент «анализатор частиц» с помощью программного обеспечения Image J (National Institution of Health, США) и плагина

ИНС metrics. Затем рассчитывали КПО – коэффициент площади окрашивания, который представляет собой отношение площади, занимаемой иммунореактивным цветным продуктом, к общей площади среза

2.7 Иммуноферментный анализ

Содержание нативного коллагена I типа в гомогенатах нативной дермы и дермального гидрогеля, содержание цитокинов 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), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующего фактора роста бета (TGF β 1) и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) определяли в плазме животных до и после нанесения ожоговой раны в динамике репарации на 1-е, 3-е, 7-е, 14-е сутки методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Filter Max F5 («Molecular Devices», США) с использованием наборов реагентов ELISA («Cloud-Clone Corp.», Китай) согласно протоколу производителя.

2.8 Выделение и характеристика дермальных фибробластов из кожи свиньи

Дермальные фибробласты свиньи были выделены из кожи поросенка породы Ландрас путем их механического измельчения и добавления 0,2 % раствора коллагеназы и раствора трипсин-ЭДТА с последующим инкубированием в течение 18–20 часов. Затем выполнялось механическое разделение эпидермиса от дермы, повторное измельчение образцов и три цикла отмывки фосфатно-солевым буфером. К осадку добавляли 1 % раствор коллагеназы в соотношении «фермент: осадок» – 3 :

1 и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут. Полученную суспензию 3 раза отмывали в большом количестве фосфатно-солевого буфера, затем переносили в культуральные флаконы. Дальнейшее культивирование проводили в стандартной питательной среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 1 % антибиотика-антимикотика. На втором пассаже клетки фенотипировали с использованием проточного цитометра BD FACS Calibur (Becton Dickinson, США) (рисунок 2).

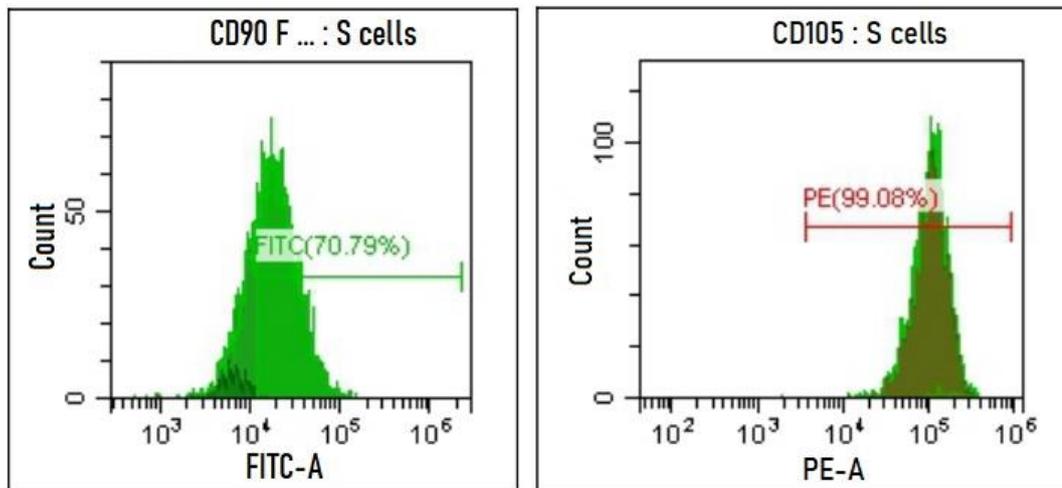


Рисунок 2 – Результат фенотипирования клеток, выделенных из дермы свиньи на маркеры стволовых клеток CD90 и CD105

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

2.9 Биомеханические тесты

Для сравнительной оценки механических свойств АДМ все биологические образцы были разделены на 3 группы по 15 образцов в каждой. В первую вошли образцы АДМ (дерма свиньи, обработанная детергентно-энзиматическим способом). Во вторую группу вошли нативные образцы свиной дермы, не

прошедшие обработку. Контрольную группу составили образцы ($n = 15$) разрешенного к применению в РФ ксенотрансплантата для герниопластики «Permacol Surgical Implant[®]», «Covidien» (Франция).

Исследование напряжения, относительной деформации при разрыве и начального модуля упругости образцов было проведено с помощью универсальной разрывной машины Instron 1122 (Instron, США). Был применён следующий режим испытаний: скорость растяжения 20 мм/мин, температура 23 ± 1 °С, влажность – 45 %, давление – 762 мм рт. ст. Базовая длина образцов – 30 мм, испытания – во влажном состоянии. Перед началом испытаний образцы нарезались и помещались в специальные рамки с целью минимизации их деформации при заправке в разрывную машину.

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

$$\sigma_p = \frac{P_p}{F_0}, \quad (1)$$

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

$$\varepsilon_p = \frac{\Delta \ell}{\ell_0}, \quad (2)$$

где ε_p – относительная деформация при разрыве (%), $\Delta \ell$ – абсолютное удлинение (мм), а ℓ_0 – начальная длина (мм);

$$E_0 = \frac{\Delta \sigma}{\Delta \varepsilon}, \quad (3)$$

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

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

2.10 Моделирование ожоговой раны и экспериментальное лечение мелких лабораторных животных

Экспериментальное применение дермального гидрогеля было проведено на 60 половозрелых самцах крыс породы 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 дермальным гидрогелем, или опытная группа ($n = 20$). Всем животным под общим газовым наркозом «Изофлуран» (индукция 2–5 %, поток 0,25–4 %; ООО «Миралек», Китай) 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 дермальным гидрогелем в объёме 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, 14-е и 21-е сутки с прилежащими тканями для гистологического исследования.

2.11 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Office 2016, Graph Pad Prism version 6.04 (США). Применялись методы дескриптивной статистики, анализ средних и распределений

($M \pm SD$), медианы с первым и третьим квартилем ($Me [Q_1; Q_3]$), проводилось построение кривых распределений с последующей нормализацией, а также вычисление абсолютных и относительных частот изучаемых показателей. 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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3.

РАЗРАБОТКА БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА – АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА (АДМ) В КАЧЕСТВЕ РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ

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

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

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

Таблица 4 – Алгоритмы детергентно-энзиматической обработки дермы

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

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

Различие в алгоритме предложенных методик было продиктовано желанием сократить время воздействия дезоксихолата натрия на ткани и оценить разницу в эффекте воздействия на ткани в сравнении с алгоритмом, в котором использован

более мягкий по своему действию на внеклеточный матрикс детергент – тритон X-100. Следует отметить, что на первых этапах разработки способа получения АДМ одним из реагентов выбора был раствор додецилсульфата натрия. Однако, высокая концентрация вещества, необходимая для разрушения клеток дермы, оказывала значительное повреждающее воздействие на волокна ВКМ. Невозможность полностью элиминировать действующий раствор из матрикса приводила к значительному цитотоксическому действию на клетки, таким образом, полученные данные заставили отказаться от дальнейшего применения раствора додецилсульфата натрия.

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

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

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

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

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

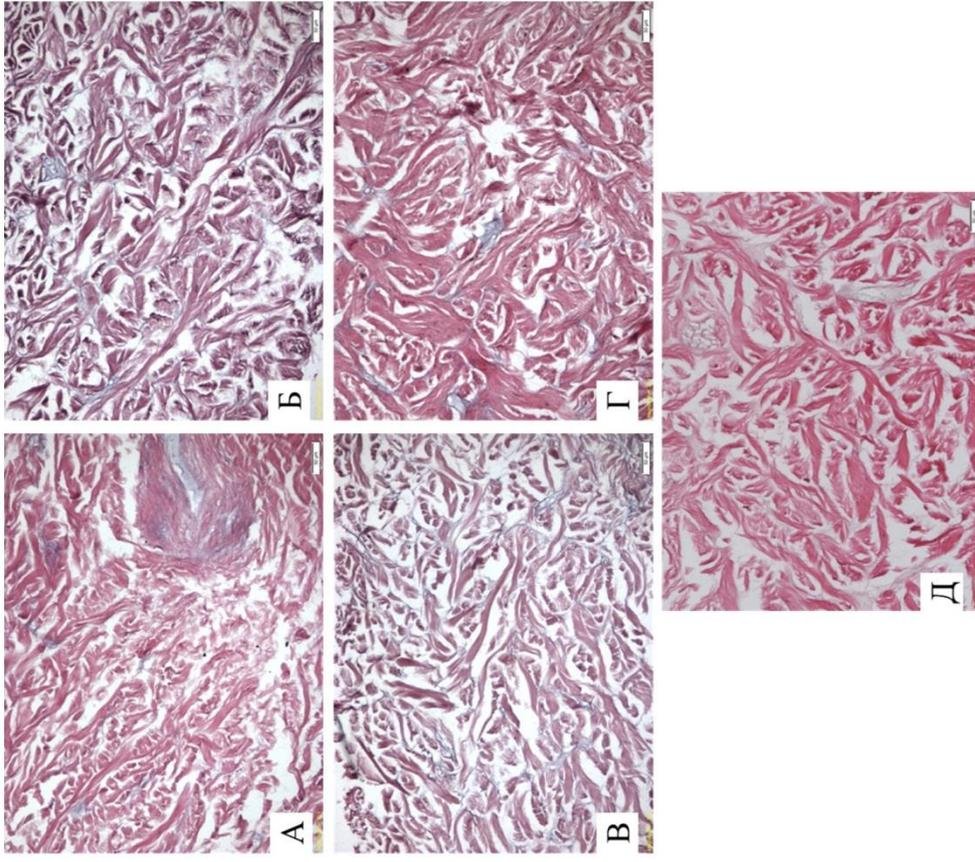


Рисунок 4 – Динамика последовательных изменений структуры ВКМ дермы в процессе децеллюляризации по алгоритму № 2:

А – нативная дерма; Б–Е – дерма после 1–5 цикла обработки детергентами соответственно (гистологическая структура нативной дермы представлена на рисунке 1А). Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. ×200

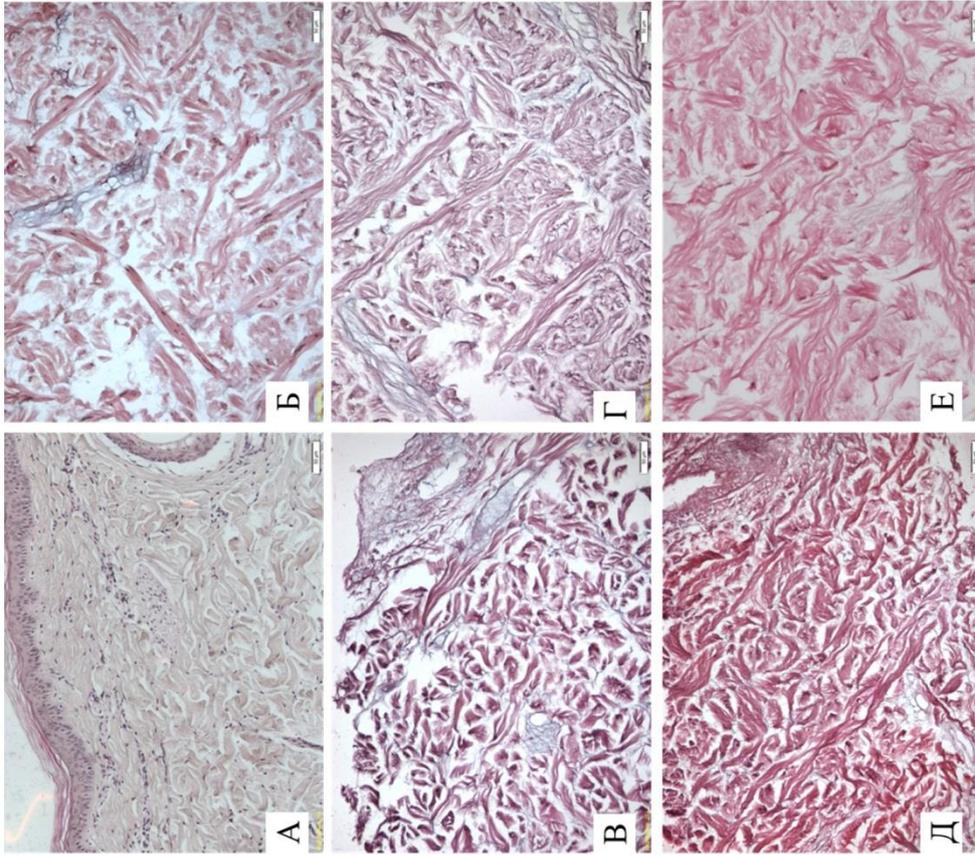


Рисунок 3 – Динамика последовательных изменений структуры ВКМ дермы в процессе децеллюляризации по алгоритму № 1:

А – нативная дерма; Б–Е – дерма после 1–5 цикла обработки детергентами соответственно. Окрашивание гематоксилин-эозином.

Ув. ×200

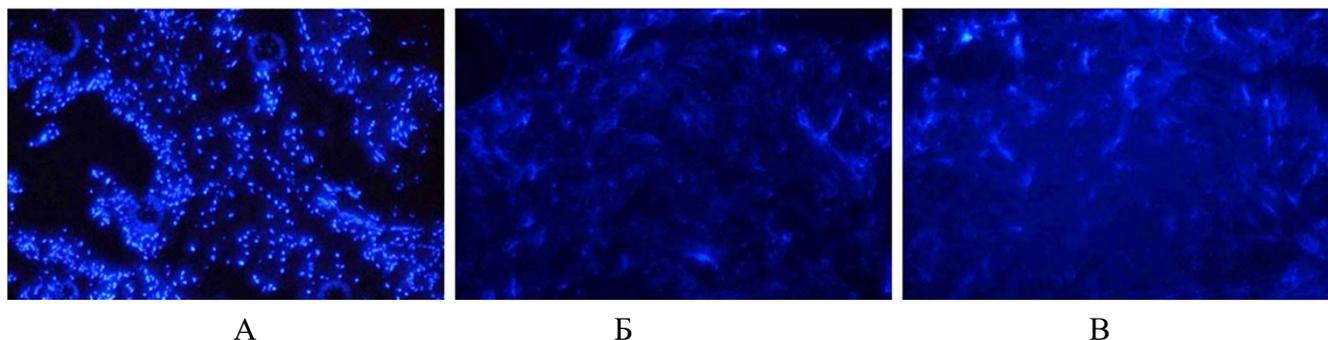


Рисунок 5 – Результаты определения наличия интактных ядер: А – образцы нативной дермы; Б – образцы дермы после обработки по алгоритму № 1; В – образцы дермы после обработки по алгоритму № 2. Окрашивание DAPI. Ув. $\times 200$

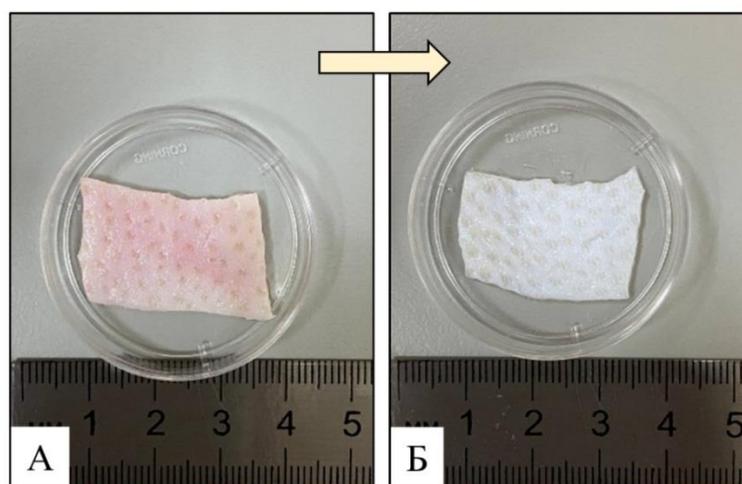


Рисунок 6 – Внешний вид образца дермы А (до) и Б (после) обработки детергентно-энзиматическим способом по алгоритму № 1

3.2 Обоснование выбора оптимальной методики обработки дермы для получения ацеллюлярного дермального матрикса

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

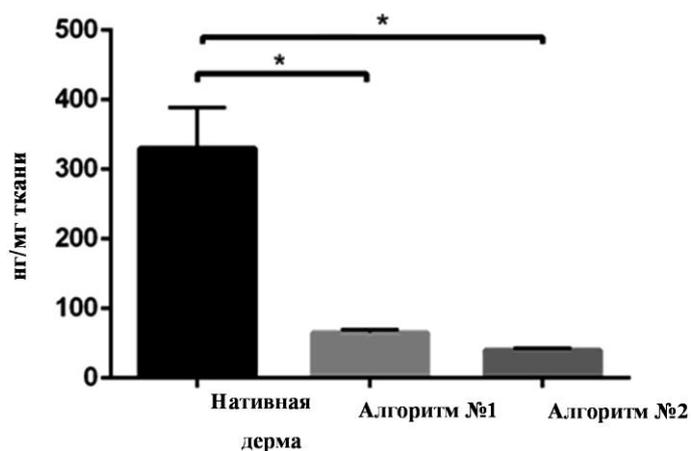


Рисунок 7 – Результаты количественного анализа содержания ДНК в нативной и децеллюляризированной дерме свиньи, * – $p < 0,05$

Полученные результаты свидетельствовали об эффективности двух исследуемых методик децеллюляризации дермы.

Образцы АДМ, полученные по двум предложенным алгоритмам, культивировали совместно с дермальными фибробластами, выделенными из дермы свиньи (см. раздел 2.8), затем проводили оценку метаболической активности и жизнеспособности клеток.

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

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

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

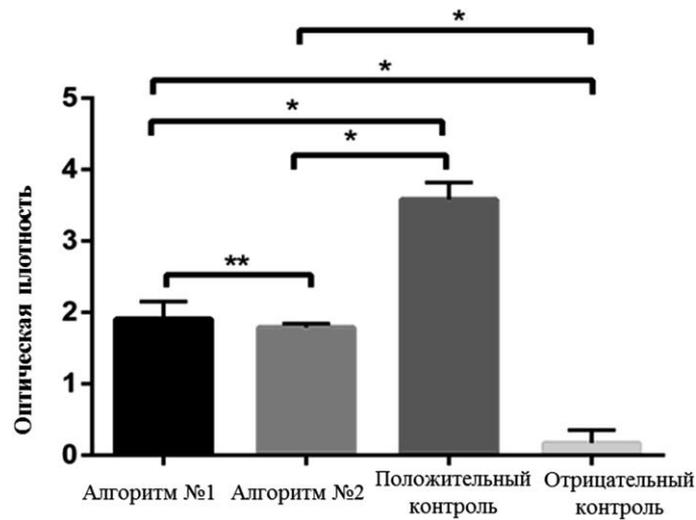


Рисунок 8 – Результаты цитотоксических тестов биопластических материалов на основе дермы свиньи. Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p > 0,05$

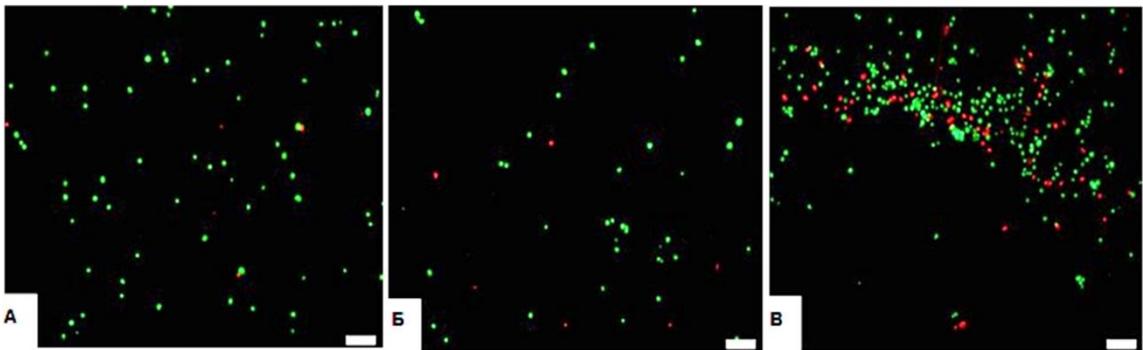


Рисунок 9 – Оценка цитотоксичности образцов АДМ методом Live/Dead через 24 часа после инкубации: А – контроль; Б – алгоритм № 1; В – алгоритм № 2. Окрашивание кальцеином АМ и гомодимером этидия. Увеличение $\times 100$

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

Из данных таблицы видно, что несмотря на высокую пролиферативную активность клеток, культивируемых в присутствии образцов АДМ, полученных по алгоритму № 2, процент погибших клеток был выше, чем в лунках с образцами, полученными по алгоритму № 1. Разницу в результатах мы связываем с меньшей длительностью обработки дермы раствором дезоксихолата натрия при выполнении алгоритма № 1 и, как следствие, меньшим его остаточным содержанием в матриксе.

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

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

Таким образом, проведенный сравнительный анализ двух методик децеллюляризации дермы показал, что оба алгоритма эффективно удаляют клетки и ядерный материал, при этом архитектура межклеточного вещества сохраняется неповрежденной, так как не происходит разрушения волокнистых структур. Но при оценке биосовместимости матриксов на основе анализа жизнеспособности клеток и их адгезии к матриксу преимущества продемонстрировал матрикс, обработанный комплексно детергентами дезоксихололатом натрия и тритоном X-100 по алгоритму № 1.

Резюме

Поиск оптимального алгоритма обработки ткани является основополагающим для дальнейшего использования АДМ в качестве раневого покрытия, что продиктовано, прежде всего, получением такого биопластического материала, который бы максимально соответствовал нативному внеклеточному матриксу дермы, был биосовместим и активно функционален. В настоящей работе определение способа децеллюляризации и начальных характеристик полученного матрикса является первым этапом для дальнейшей разработки биопластических материалов.

ГЛАВА 4.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ СВИНЬИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

4.1 Разработка способа моделирования ожоговой раны на крупных лабораторных животных

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

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

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

- 1) стандартная обработка операционного поля;
- 2) разметка будущего раневого дефекта с помощью сантиметровой линейки;
- 3) нанесение раскалённой металлической контактной площадкой ожоговой раны необходимых размеров и необходимой глубины (ШБ и IV ст. по классификации Вишневского);

4) некрэктомия с помощью электродерматома с формированием двух ран:
 а) рана, у которой дном является нижние слои дермы и мозаично обнажённые участки подкожно-жировой клетчатки (IIIБ степень); б) рана, у которой дном является поверхностная фасция и мышечная ткань (IV степень) (рисунок 10, рисунок 11).



Рисунок 10 – Моделирование раневой поверхности различной глубины с помощью электродерматома: А – IIIБ степень; Б – IV степень



Рисунок 11 – Внешний вид смоделированной раневой поверхности различной глубины

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

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

Таким образом, данный способ позволяет:

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

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

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

выделение медиаторов воспаления и образование *in situ* токсических липидно-белковых комплексов приводит к местному воспалению. Помимо интенсивной поддерживающей терапии лечение ожогов требует быстрого удаления токсического струпа и восстановления структуры и функции разрушенной кожи. Это достигается путем хирургического иссечения струпа (некрэктомия) и последующей трансплантации аутологичных расщепленных лоскутов со здоровых участков кожи того же пациента [И.А. Алмазов, 2017; A.W.C. Chua et al., 2016].

В настоящее время не существует искусственных кожных конструкций, которые бы полностью воспроизводили нормальную кожу [Д.Я. Алейник и соавт., 2015; M. Klimov et al., 2016]. Но вместе с тем, продолжают исследования в области разработки раневых покрытий, содержащих клеточный компонент [J. G. Seavey et al., 2016], в связи с этим на данном этапе исследования нами была проведена сравнительная оценка эффективности применения АДМ, засеянного аллогенными фибробластами свиньи, для лечения ожоговых ран в качестве раневого покрытия, для чего предварительно была смоделирована кожная раны у свиньи в эксперименте *in vivo* (см. раздел 4.1).

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

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

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

Раны первого типа были сразу закрыты 5 образцами раневых покрытий (размерами $2,5 \pm 0,7$ см × $4 \pm 0,9$ см × $0,03 \pm 0,01$ см каждое), расстояния между раневыми покрытиями составило 1–2 см: 2 образца были представлены ацеллюлярными дермальными матриксами, полученными по алгоритму № 1; 2 образца – рецеллюляризованными дермальными аллофибробластами матриксами и 1 образец – аутокожей в качестве контроля (рисунок 12).

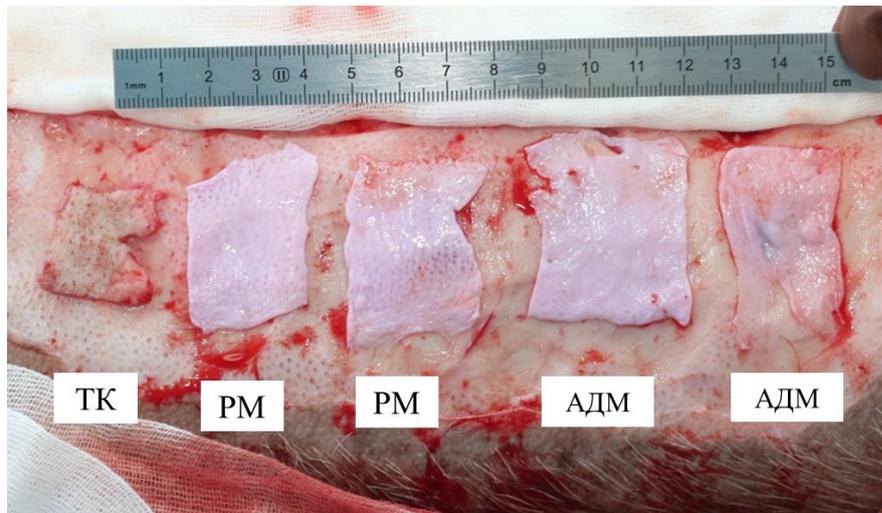


Рисунок 12 – Фиксация исследуемых раневых покрытий: ТК – толстая кожа;
 АДМ – ацеллюлярный дермальный матрикс;
 РМ – ретцеллюляризованный дермальный матрикс

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

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

При наблюдении за ранами отмечалась различная динамика их заживления в зависимости от применяемого экспериментального матрикса и типа раны. В частности, в чистой ране к 12 суткам, раневое покрытие, представленное АДМ, становилось сухим и уплотнялось, свободно открепляясь от поверхности раны, что потребовало иссечения сформированной под ним рубцовой ткани и последующей свободной кожной аутопластики расщеплёнными трансплантатами толщиной 0,3–0,5 мм, взятыми на этом же боку на 20 сутки после начала эксперимента для закрытия раневого дефекта, так как кожный покров не

восстанавливался. На гранулирующей ране матриксы лизировались и не приживались, что также потребовало проведения аутопластики расщепленным свободным лоскутом. Через 10 дней после аутопластики наблюдалась полная ячеичная эпителизация раневой поверхности (рисунок 14).

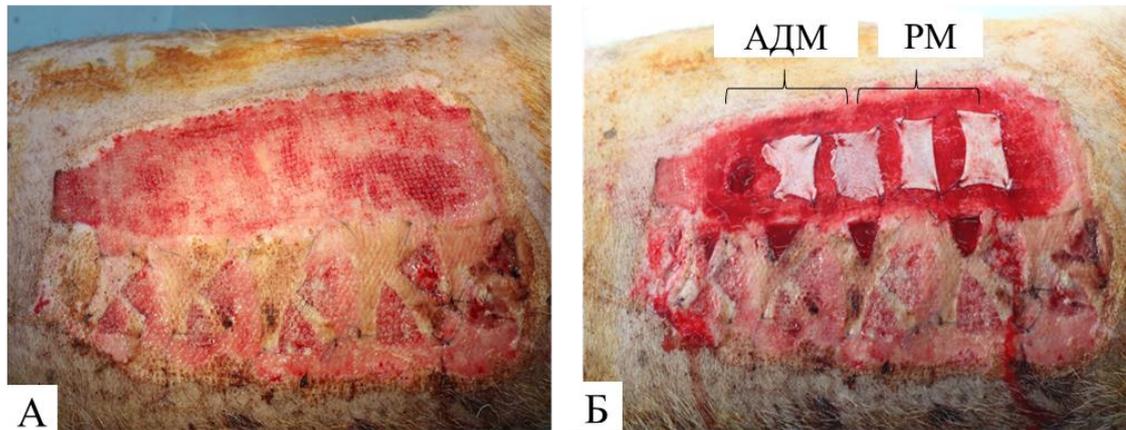


Рисунок 13 – Вид раны в динамике: А – рост грануляционной ткани через 8 дней; Б – фиксация исследуемых раневых покрытий (АДМ – ацеллюлярный дермальный матрикс, РМ – ретцеллюляризованный дермальный матрикс)

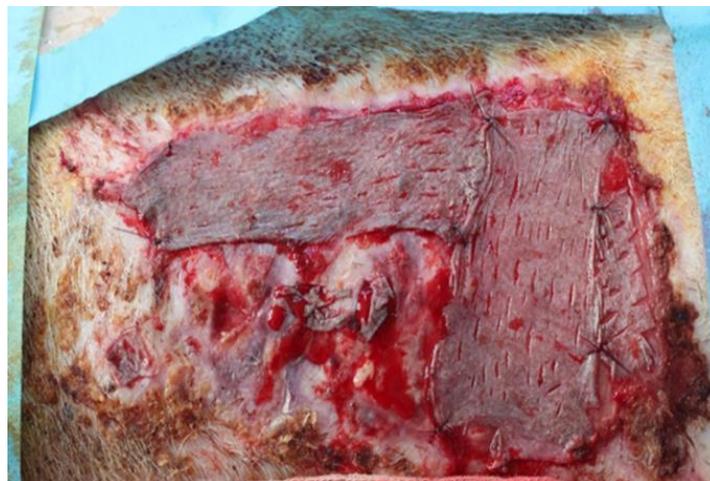


Рисунок 14 – Закрытие раневой поверхности свободной кожной аутопластикой на 20-е сутки эксперимента

В отличие от ацеллюлярного матрикса, ретцеллюляризованные аллогенными фибробластами образцы, продемонстрировали адгезию к раневой поверхности. К 30-м суткам ретцеллюляризованные матриксы свободно откреплялись, но под ними был восстановлен полностью кожный покров, что не требовало дальнейшей аутодермопластики (рисунок 15).

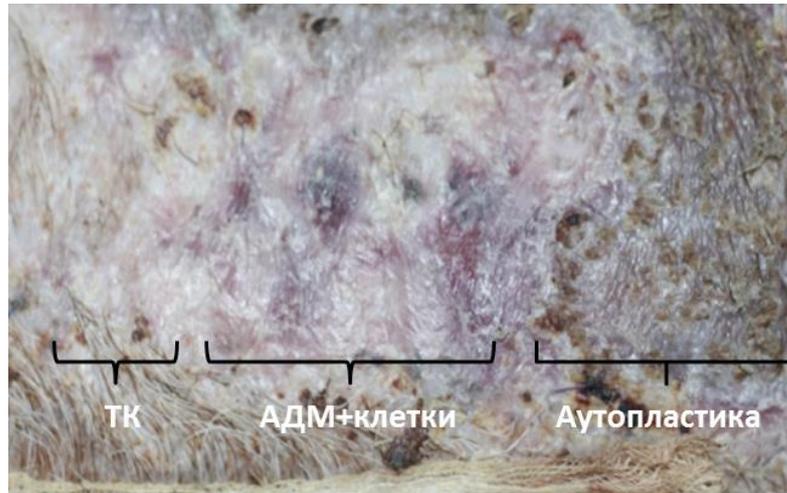


Рисунок 15 – Вид раны на 30-е сутки после начала эксперимента:
ТК – толстая кожа; АДМ – ацеллюлярный дермальный матрикс

Гистологический анализ исследуемых раневых покрытий на чистой ране выявил отличия в участках раны, закрытых АДМ и рецеллюляризованными дермальными матриксами.

На вторые сутки после экспериментального лечения с помощью АДМ в подлежащих тканях развивалась слабовыраженная воспалительная реакция с лимфомакрофагальной инфильтрацией и пропитыванием матрикса фибрином и эритроцитами. К 8 суткам послеоперационного периода в ране наблюдалась значительная пролиферация фибробластов в прилежащем к матриксу участке дна раны, их количество достигало 125 ± 37 в поле зрения при увеличении $\times 200$, что привело к формированию рубцовой ткани. Новый дермальный слой под покрытием не формировался (рисунок 16, А–В).

Морфологический результат применения рецеллюляризованного аллофибробластами дермального матрикса как раневого покрытия существенно отличался от АДМ. На 2–5 сутки после операции нами была отмечена плотная адгезия имплантата 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.

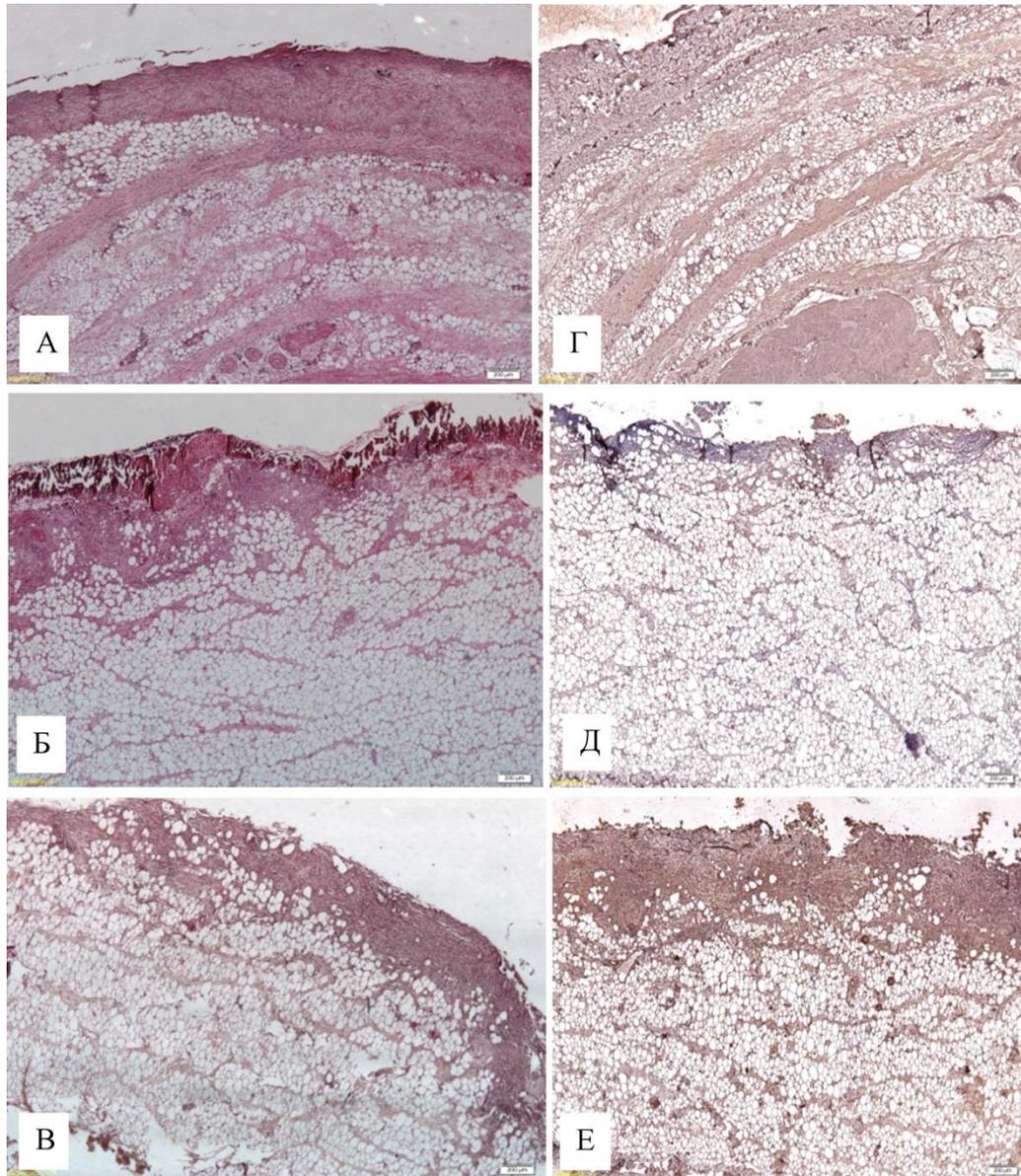


Рисунок 16 – Морфологический анализ результатов имплантации АДМ:
 А, Г – 2 сутки; Б, Д – 5 сутки; В, Е – 8 сутки послеоперационного периода. А–В – окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$; Г–Е – иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину – белку промежуточных филаментов соединительных тканей. Ув. $\times 100$

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 после трансплантации толщина новообразованной дермы возросла до 2,5 мм, увеличилось количество интрадермальных придатков кожи. К этому сроку имплантированный нами матрикс самопроизвольно открепился от поверхности новообразованного под ним эпидермиса (рисунок 17).

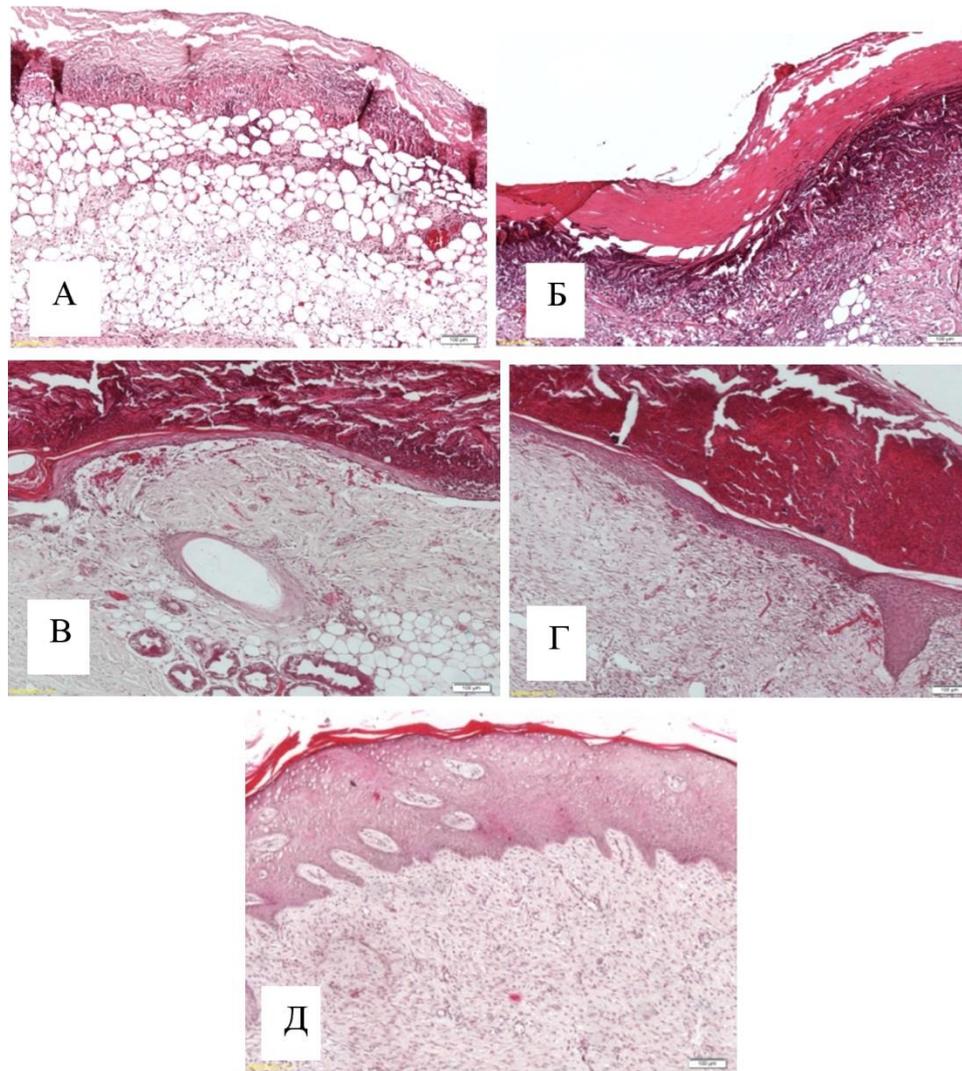


Рисунок 17 – Морфологический анализ результатов имплантации рециеллюляризованного дермального матрикса: А – 2 сутки; Б – 5 сутки; В – 8 сутки; Г – 16 сутки; Д – 20 сутки.

Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$

Исследование динамики содержания виментина – белка промежуточных филаментов соединительных тканей при закрытии ожоговой раны децеллюляризованным матриксом показало его накопление на 8-е сутки эксперимента – КПО составил $10,69 \pm 2,17$ % (рисунок 16, Г–Е). Экспериментальное лечение ожоговой раны рециеллюляризованным матриксом 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 (рисунок 18). Увеличение количества виментина в процессе заживления свидетельствовало о способности внесенных и резидентных фибробластов к миграции за счет регуляции образования различных клеточных контактов и транспорта различных сигнальных белков, участвующих в регуляции клеточной подвижности [И.С. Черноиваненко и соавт., 2013].

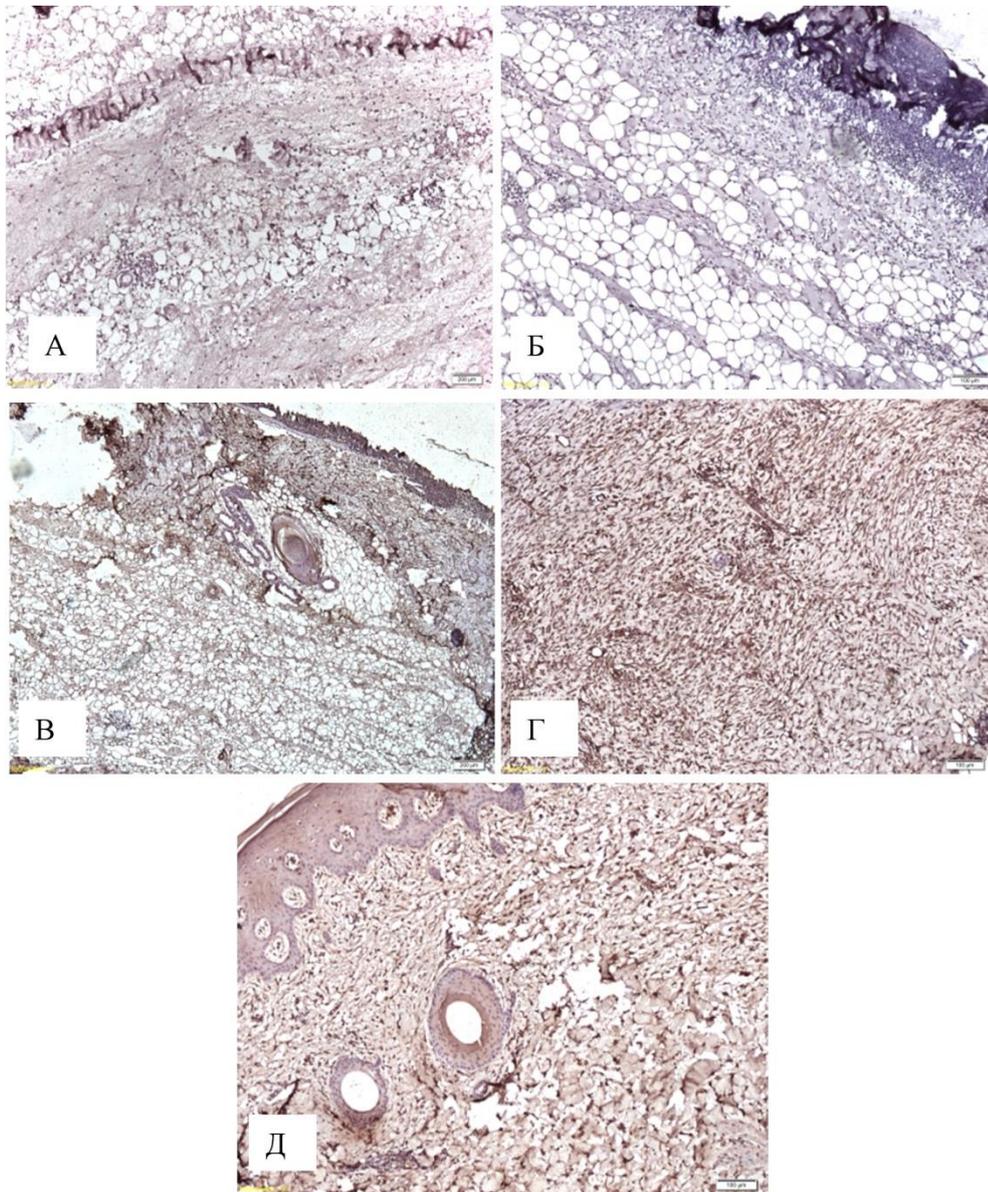


Рисунок 18 – Морфологический анализ результатов имплантации рецеллюляризованного дермального матрикса: А – 2 сутки; Б – 5 сутки; В – 8 сутки; Г – 16 сутки; Д – 20 сутки.

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

Полученные результаты позволили дать нам характеристику исследуемым матриксам. С одной стороны, оба матрикса, как децеллюляризованный, так и рецеллюляризованный обладали биосовместимостью на тканевом уровне, вызывали слабую воспалительную реакцию, при этом не образовывалась соединительнотканная капсула, отграничивающая матрикс от окружающих тканей. С другой стороны, была отмечена принципиальная разница между двумя типами матрикса, которая заключалась в формировании разного типа ткани под ними. В отличие от децеллюляризованного матрикса, под которым

формировалась соединительная ткань, под рещеллюляризованным матриксом образовалась полнослойная кожа.

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

Из полученных данных видно, что толщина вновь сформированной дермы была сопоставима в участках, закрытых исследуемым раневым покрытием (АДМ, засеянный аллогенными дермальными фибробластами) и аутодермопластикой – $19621 \pm 56,3$ мкм и $1738 \pm 67,9$ мкм соответственно ($p > 0,05$), но не достигала значений на участках, закрытых аутокожей – $2596,2 \pm 69,1$ мкм ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно) (рисунок 19, рисунок 20, рисунок 21).

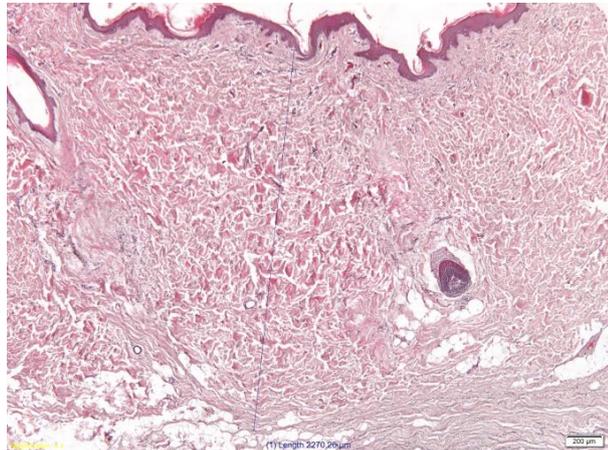


Рисунок 19 – Морфологический анализ участка раны, закрытого толстой кожей через 5 месяцев после лечения. Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$

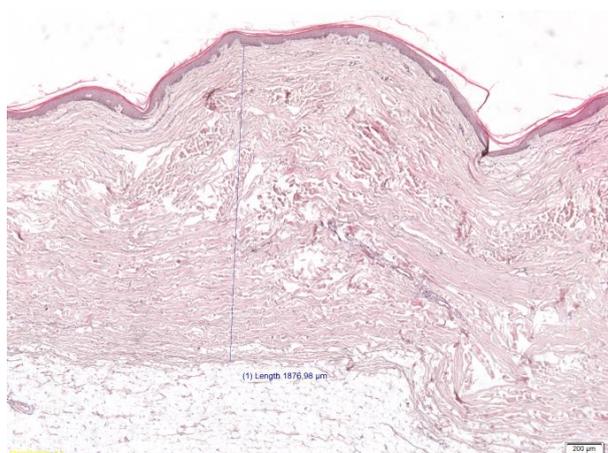


Рисунок 20 – Морфологический анализ участка раны, закрытого рещеллюляризованным дермальным матриксом, через 5 месяцев после лечения. Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. $\times 40$



Рисунок 21 – Морфологический анализ участка раны, закрытого с помощью расщеплённого лоскута, через 5 месяцев после лечения. Окрашивание гематоксилином-эозином. Ув. ×40

Таким образом, под рецеллюляризированным матриксом в чистой ране произошло полное восстановление всех слоев кожного покрова с формированием полноценных дермального и эпидермального слоев.

Резюме

Результаты экспериментальной работы показали, что АДМ вне зависимости от типа раны сыграл роль временного покрытия, что потребовало проведения дополнительных методов закрытия раневых поверхностей, а именно аутопластики. Анализ результатов показал, что предпочтительным является рецеллюляризированный аллогенными фибробластами матрикс, так как он позволил создать условия для полноценной регенерации кожи. И, несмотря на его открепления в отдаленные сроки после имплантации, наличие полнослойной кожи не потребовало дополнительных методов закрытия раны.

ГЛАВА 5.

РАЗРАБОТКА БИОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА – АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА (АДМ) ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ

Для проведения реконструктивной пластической хирургии в большинстве случаев необходимый размер матрикса составляет примерно 10 × 20 см, поэтому в хирургической практике приходится сшивать имеющиеся в продаже матриксы, что снижает их механическую прочность и, соответственно, клиническую эффективность их применения [S.T. Lanier et al., 2010]. Кроме того, длительная предоперационная подготовка материала требуемого размера может привести к бактериальной контаминации материалов.

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

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

5.1 Разработка способа подготовки больших лоскутов дермы свиньи для создания ацеллюлярного дермального матрикса

В комбустиологии для забора кожи и дермы человека обычно используют дерматомы с широкими лезвиями, а большей площади добиваются благодаря

расщеплению лоскута перфоратором кожных трансплантатов, что значительно уменьшает биомеханическую прочность. Нашими же задачами было:

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

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

Методика представляла собой следующий алгоритм:

- 1) в условиях операции животное в состоянии наркоза укладывали на бок, производили разметку донорского участка размером $20\text{--}25 \times 60\text{--}70$ см, включающего области ягодиц, спины, боковой поверхности живота и шеи;
- 2) выполняли инъекционное пропитывание подкожной жировой клетчатки физиологическим раствором при помощи шприца;
- 3) производили одномоментный разрез кожи по намеченному контуру и равномерными пилящими движениями скальпеля по плоскости получали полнослойный кожный лоскут на всей площади забора единым образцом, включающим эпидермис, дерму и мозаичные участки жировой ткани;
- 4) забранный кожный лоскут помещали на валик, обрабатывали вазелиновым маслом и срезали с донорского участка дисковым электродерматомом эпидермис, на котором предварительно установлена величина зазора 0,7 мм, подготавливая лоскут к забору дермы;
- 5) полученный лоскут растягивали зажимами Кохера, создавая равномерное натяжение на всей площади, далее электродерматомом с диаметром дискового ножа 100 мм производили забор образцов дермы толщиной 0,7 мм в направлении, перпендикулярном направлению лоскута (рисунок 22–24).



Рисунок 22 – Забор эпидермального слоя с донорского участка дисковым электродерматомом



Рисунок 23 – Подготовленное операционное поле для получения образцов дермы не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см

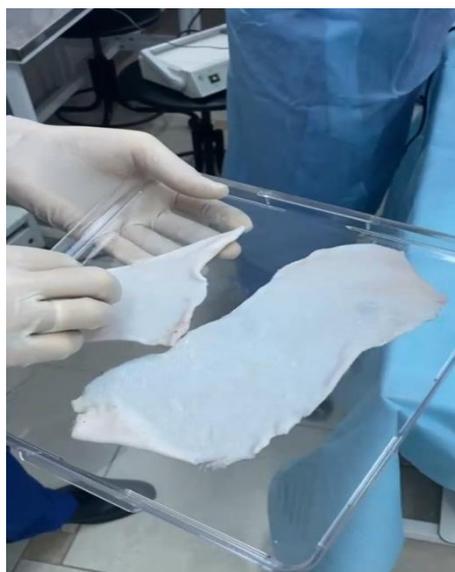


Рисунок 24 – Полученные образцы дермы размерами не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см толщиной 0,7 мм

В результате применения данной методики нами были получены 8 образцов дермы размерами не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см, которые были использованы для получения фиксирующего биоматериала для реконструктивной хирургии – ацеллюлярного дермального матрикса (АДМ).

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

5.2 Способ децеллюляризации дермы свиньи для реконструктивной пластической хирургии

При разработке АДМ, который показал свою эффективность при использовании в качестве раневого покрытия, нами был получен матрикс размерами $2,5 \pm 0,7 \times 4 \pm 0,9 \times 0,03 \pm 0,01$ см (см. главу 3). Полученный биопластический материал не мог эффективно использоваться в реконструктивной хирургии, так как не имел достаточной механической прочности, а также обладал небольшими линейными размерами, кроме того, процесс децеллюляризации занимал 48 часов. Вышесказанное послужило основанием для модификации и оптимизации алгоритма децеллюляризации образцов дермы размерами $10 \pm 0,5 \times 20 \pm 1$ см $0,07 \pm 0,01$ см. Необходимо было решить следующие задачи:

– сократить продолжительность этапов процессов децеллюляризации образца дермы;

- расширить возможности обработки дермы с различной массой с максимальным сохранением его гистологической структуры и отсутствием клеточных компонентов;
- получить образцы децеллюляризированной дермы с минимальным содержанием остаточной ДНК;
- экономить реагенты, за счет предварительного расчета соотношения массы образца дермы и необходимого объёма растворов;
- оценить показатели, значимо влияющие на биосовместимость децеллюляризованного образца дермы.

Модифицированная методика представляла собой следующий алгоритм:

1. Взвешивали лоскут дермы свиньи размерами $10 \pm 0,5 \times 20 \pm 1$ см $0,07 \pm 0,01$ см (примерной массой 23 г).
2. Замораживали при температуре -80 °С на 72 часа, затем образец размораживали.
3. Рассчитывали объёмы всех необходимых растворов при соотношении массы образца к объёму раствора – 1 : 10.
4. Заливали образцы раствором трипсин-Версена (230 мл) и помещали на шейкер-инкубатор в режиме 100 об/мин при $+37$ °С на 6 часов, меняя раствор через каждые 2 часа.
5. Помещали образцы на вращающуюся платформу в режиме 170 об/мин и подвергали последовательному циклическому воздействию растворов детергентов: 1 % раствора Тритона X-100 (230 мл) в течение 3 часов и 4 % раствора дезоксихолата натрия (230 мл) в течение 3 часов, затем цикл повторяли, после воздействия каждого детергента образец промывали в деионизированной воде.
6. Обработывали образец раствором свиной панкреатической ДНКазы I 2000 ЕД /230 мл в фосфатном буфере с кальцием и магнием (230 мл) на шейкере-инкубаторе в режиме 100 об/мин при $+37$ °С в течение 4 часов.

Кратко алгоритм обработки представлен в таблице 6.

В результате нами было достигнуто сокращение времени обработки биоматериалов до 22 часов, а также возможность учитывать размеры образцов без потери эффективности удаления клеток и с целью экономии реагентов.

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

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

После обработки нативного образца детергентно-энзиматическим методом АДМ приобрел белый цвет. Полученный АДМ имел характерный рисунок поверхности (мерею) в виде сорочьих лапок. Гладкая микропористая поверхность обеспечивала удобство размещения импланта в непосредственном контакте с органами брюшной полости. Полученный АДМ обладал оптимальной пластичностью для реконструктивной хирургии. Например, благодаря мягкости и эластичности матрикс было возможно моделировать по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки (рисунок 25).

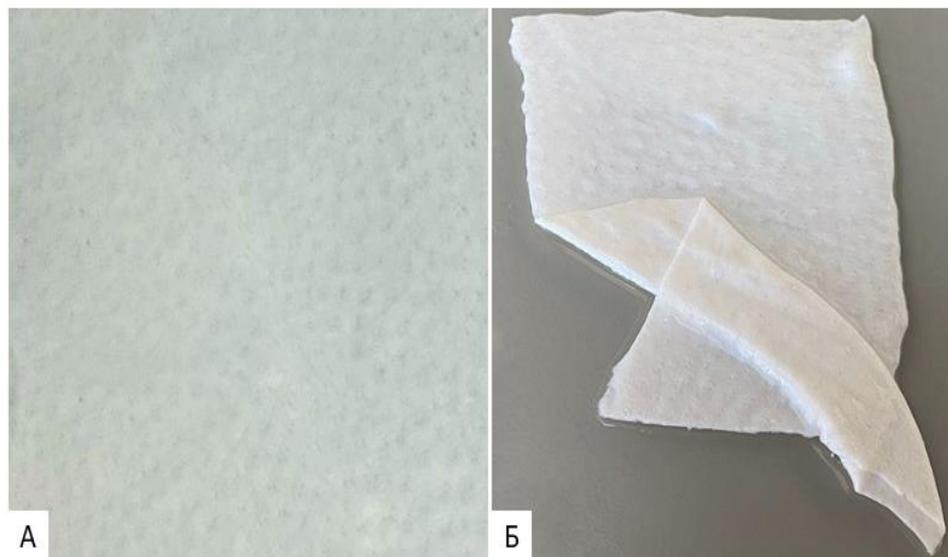


Рисунок 25 – Ацеллюлярный дермальный матрикс:

А – внешний вид, структура; Б – пластичность (способность моделироваться по форме)

В нативных образцах клеточные ядра явно флуоресцировали и имели интактную форму, в отличие от децеллюляризированных образцов, где обнаружили лишь незначительную аутофлуоресценцию волокон внеклеточного матрикса (рисунок 26).

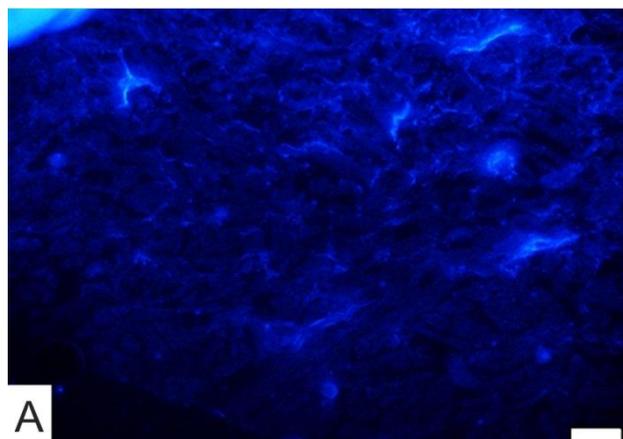


Рисунок 26 – Результаты определения содержания ДНК в образцах тканей дермы после детергентно-энзиматической обработки. Окрашивание DAPI. Ув. $\times 200$

Качество децеллюляризации определяли с помощью контроля остаточного содержания ДНК в трех повторностях (рисунок 27).

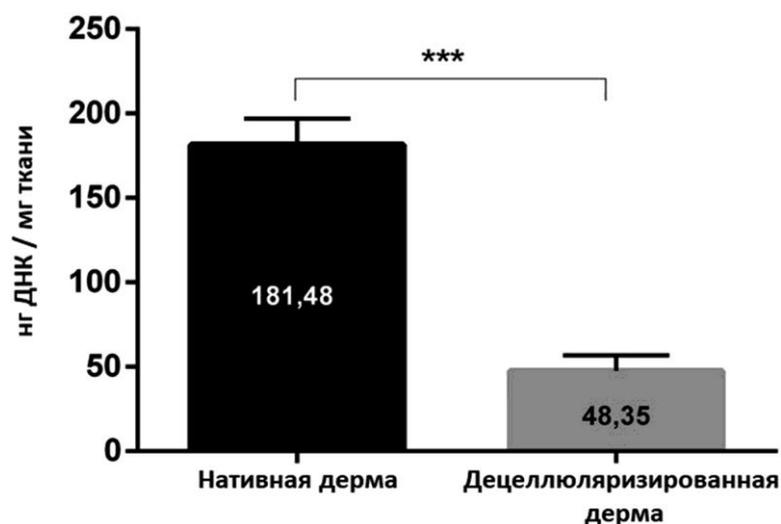


Рисунок 27 – Результаты количественного анализа ДНК в образце нативной и децеллюляризированной дермы, * – $p < 0,05$

Полученные образцы соответствовали требованиям к качеству имплантируемых биологических материалов в отношении количества ДНК – менее 50 нг/мг ткани, которое составляло 26,7 % от содержания ДНК в нативной

ткани. Относительно низкое содержание остаточных нуклеиновых кислот в АДМ говорит в пользу малого иммуногенного потенциала полученной конструкции.

Результаты анализа показали отсутствие клеточных структур и частичную сохранность гистоархитектуры в дермальном матриксе по сравнению с нативной дермой (рисунок 28).

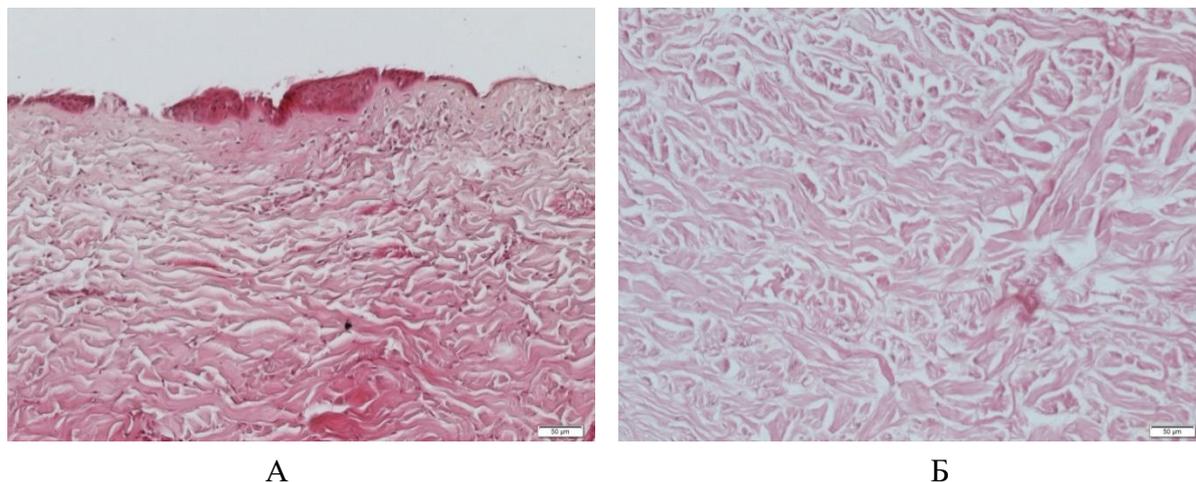


Рисунок 28 – Гистологический анализ образцов дермы до обработки (А) и после обработки (Б).
Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$.

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

Гомогенаты образцов АДМ, полученные по модифицированному алгоритму, подвергались биохимическому анализу на содержание сульфатированных общих и О-гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, для оценки сохранности небелковых компонентов ВКМ. Гомогенаты нативной дермы также подвергались данному исследованию и служили группой сравнения (рисунок 29, рисунок 30).

Таким образом, детергентно-энзиматическая обработка привела к потере (вымыванию) ГК 65,31 % относительно нативной дермы для алгоритма получения АДМ – хирургического импланта и 73,47 % относительно нативной дермы для алгоритма получения АДМ – раневого покрытия. Концентрация сульфатированных

ГАГ также уменьшилась в ходе обработки относительно нативной дермы на 52,18 % для АДМ – хирургического импланта и на 69,32 % для АДМ – раневого покрытия.

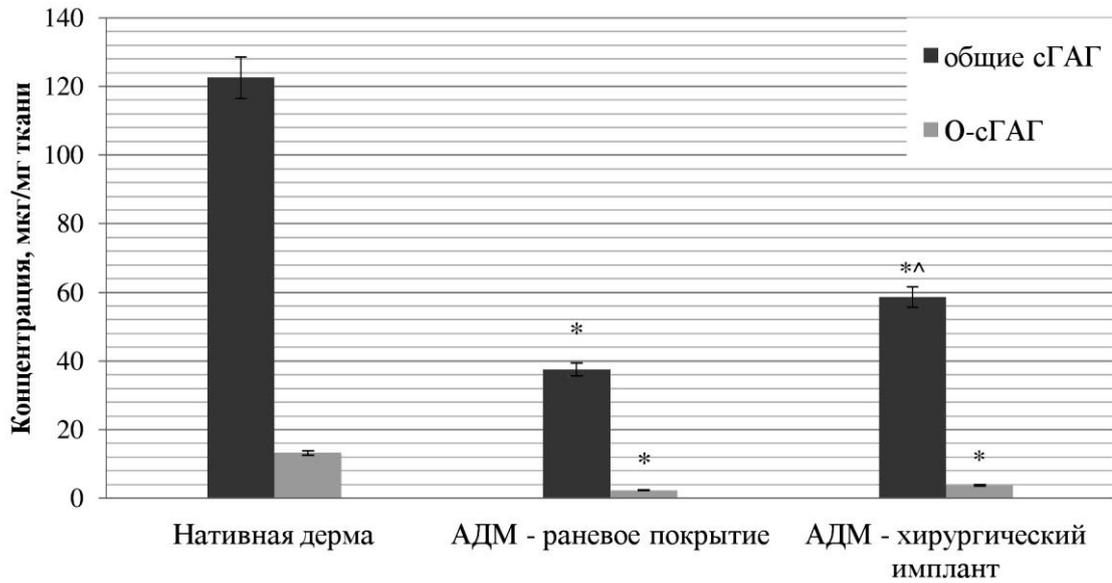


Рисунок 29 – Анализ содержания сульфатированных гликозаминогликанов в АДМ и нативной дерме: * – различия значимы относительно значений в нативной дерме; ^ – различия значимы относительно значений в раневом покрытии ($p < 0,05$); сГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

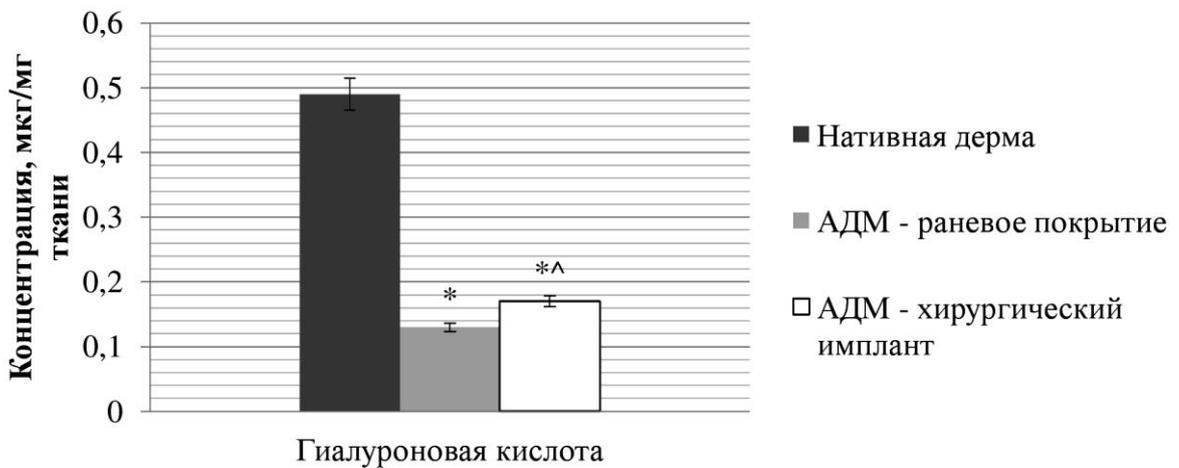


Рисунок 30 – Анализ содержания гиалуроновой кислоты в АДМ и нативной дерме: * – различия значимы относительно нативной дермы; ^ – различия значимы относительно значений в раневом покрытии ($p < 0,05$)

Анализ данных, полученных по методике Live/Dead продемонстрировал, что 80 ± 10 % клеток DF-1 оставались жизнеспособными на исследуемых образцах дермы. Данный результат свидетельствовал об отсутствии цитотоксического действия образцов исследуемых матриц (рисунок 31).

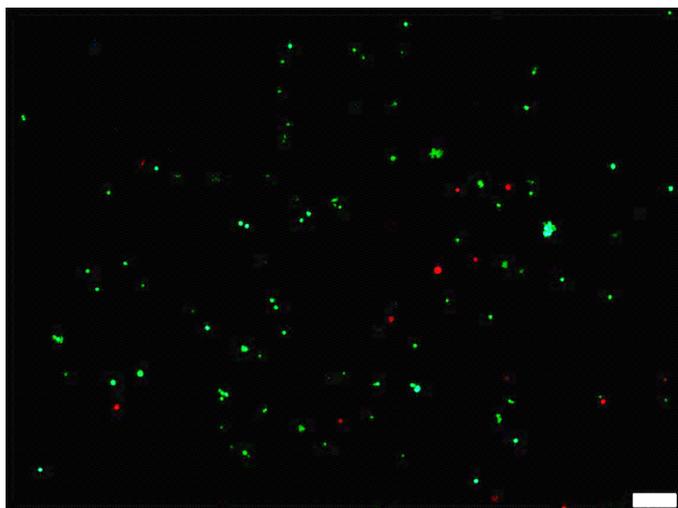


Рисунок 31 – Оценка цитотоксичности децеллюляризированной дермы методом Live/Dead: зеленое окрашивание – живые клетки, красное окрашивание – мертвые клетки. Ув. $\times 40$

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

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

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

На 7 сутки после имплантации в экспериментальной группе отмечалось умеренно выраженное асептическое воспаление. В клеточном инфильтрате по данным иммуногистохимического исследования и компьютерной морфометрии было выявлено 12,70 [12,19; 13,09] макрофагов и 1,87 [1,56; 2,04] лимфоцитов на 1 мм^2 площади среза, а также незначительное количество нейтрофилов. При окрашивании трихромом по Массону были хорошо заметны неповрежденные

коллагеновые волокна имплантированной конструкции толщиной 12,88 [11,87; 13,60] мкм. В образцах из контрольной группы в те же сроки наблюдалось выраженное асептическое воспаление с примесью эозинофилов в воспалительном инфильтрате, а также хорошо заметное полнокровие сосудов кожи и мышц спины. При окрашивании по Массону было отмечено пропитывание имплантата кровью и инфильтрация воспалительными клетками – 9,03 [8,94; 9,16] макрофагов и 1,91 [1,84; 1,99] лимфоцитов на 1 мм². Следует отметить, что количество лимфоцитов в экспериментальной группе не отличалось от контрольной группы ($p = 0,062$), а число макрофагов было статистически значимо выше ($p = 0,043$) (рисунок 32).

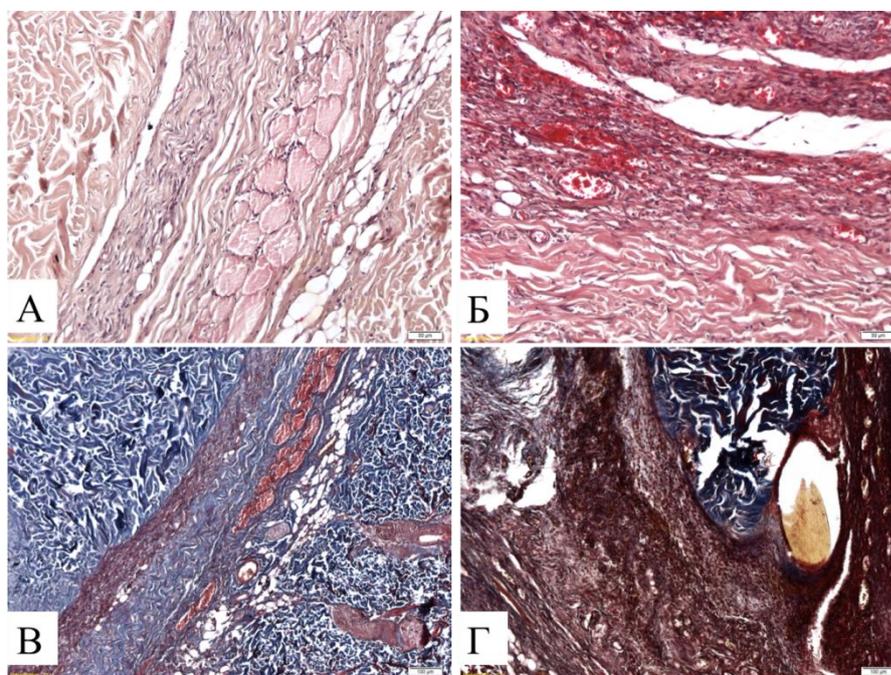


Рисунок 32 – Гистологическая оценка препаратов АДМ и нативной дермы свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 7 сутки: А – АДМ, гематоксилин-эозин; Б – нативная дерма свиньи, гематоксилин-эозин; В – АДМ, трихром по Массону; Г – нативная дерма свиньи, трихром по Массону. Ув. $\times 200$

На 14 сутки в образцах экспериментальной группы было отмечено образование тонкой соединительнотканной капсулы вокруг имплантированной конструкции. Толщина капсулы составляла 18,17 [14,73; 20,32] мкм, в стенках были отмечены единичные макрофаги (3,50 [3,44; 3,54] CD68⁺ клеток на 1 мм² среза по данным компьютерной морфометрии). Кнаружи от неё имелся тонкий

слой грануляционной ткани. Отмечалось слабо выраженное полнокровие сосудов в месте имплантации, средний диаметр сосудов составил 30,97 [29,71; 31,82] мкм. Не было выявлено дегградации коллагеновых волокон АДМ и его инфильтрации воспалительными клетками. В образцах эксплантированной нативной дермы свиньи нами была отмечена картина воспаления вокруг инородного тела с преобладанием относительно большого числа макрофагов (11,13 [9,79; 13,11] CD68⁺ клеток по данным компьютерной морфометрии) по сравнению с этим показателем в экспериментальной группе на 14 сутки ($p = 0,007$) и с контрольной группой на 7 сутки ($p = 0,033$). Вокруг имплантата сформировалась более плотная толстостенная капсула со средней толщиной 165,2 [152,90; 188,80] мкм по сравнению с экспериментальной группой ($p = 0,003$). Коллагеновые волокна имплантата были фрагментированы, отёчны, имели выраженную оксифильную реакцию среды и были пропитаны кровью с примесью нейтрофилов и макрофагов. Было выявлено значительное количество тонких полнокровных сосудов непосредственно вблизи капсулы (средний диаметр 20,81 [19,41; 21,61] мкм) (рисунок 33). Кроме того, наблюдалось большее число CD3-позитивных клеток в двух группах животных относительно предыдущего срока эксплантации образцов – 3,66 [3,42; 4,01] клеток на 1 мм² для экспериментальной группы ($p = 0,039$) и 7,14 [6,87; 7,93] клеток на 1 мм² для контрольной группы ($p = 0,041$).

Спустя 21 сутки после имплантации АДМ в образцах толщина капсулы вокруг имплантата составляла 10,02 [9,95; 10,10] мкм и наблюдалось небольшое количество клеток воспаления: на 1 мм² среза 2,73 [2,54; 2,89] CD68⁺ макрофагов и 1,90 [1,76; 1,99] CD3⁺ лимфоцитов, что было значительно ниже чем в контрольной группе ($p = 0,012$ и $p = 0,009$, соответственно). Средний диаметр капилляров составлял 26,61 [19,48; 31,52] мкм, полнокровия кровеносных сосудов не наблюдалось. Коллагеновые волокна инкапсулированного АДМ были полностью сохранены и имели диаметр 11,67 [10,02; 14,50] мкм. Кроме того, не было обнаружено скопления лейкоцитов в АДМ или пропитывание его кровью. У животных контрольной группы в те же сроки наблюдалось формирование плотной соединительнотканной капсулы толщиной 66,53 [61,24; 7,59] мкм; были отмечены многочисленные небольшие

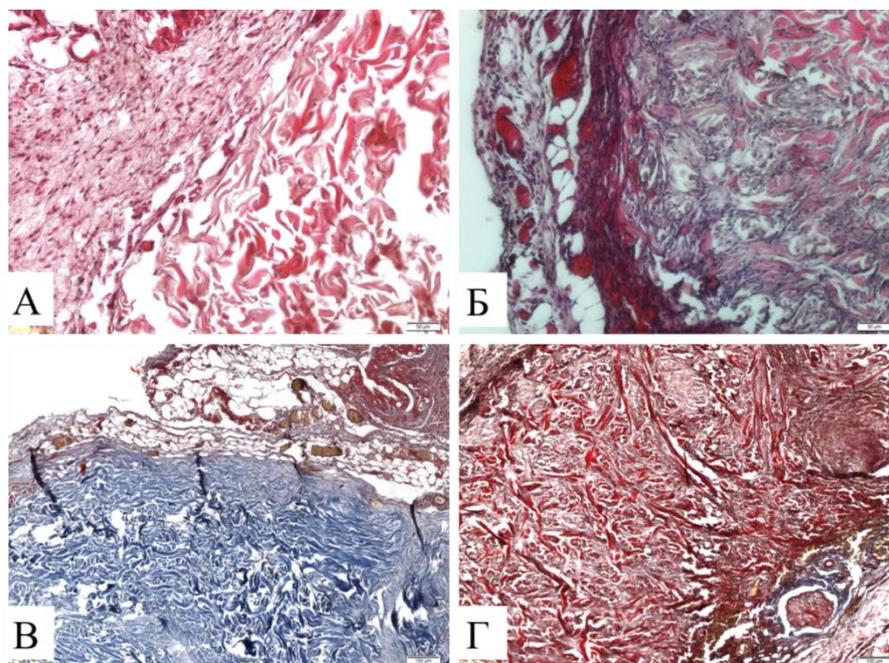


Рисунок 33 – Гистологическая оценка препаратов АДМ и нативной дермы свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 14 сутки: А – АДМ, гематоксилин-эозин; Б – нативная дерма свиньи, гематоксилин-эозин; В – АДМ, трихром по Массону; Г – нативная дерма свиньи, трихром по Массону. Ув. $\times 200$

скопления Т-лимфоцитов, CD68-позитивных макрофагов (содержание составило 14,37 [12,33; 15,65] клетки на 1 мм^2 среза) и клеток инородных тел. Интересно, что наряду с выраженной инкапсуляцией было отмечено появление полнокровных сосудов диаметром 23,80 [19,24; 27,76] мкм внутри образца, что свидетельствовало об активной его биодеградации. Коллагеновые волокна были набухшими и частично разрушенными – толщина их варьировала от 5 до 37 мкм. В толще имплантата присутствовали макрофаги и Т-лимфоциты, что также подтверждало иммунное отторжение.

На 60 сутки после подкожной имплантации АДМ был окружен соединительнотканной капсулой (толщина 13,83 [12,03; 15,54] мкм), воспалительные явления полностью отсутствовали (рисунок 34).

Иммуногистохимическая реакция не выявила наличия макрофагов и Т-лимфоцитов в месте имплантации. Атрофия окружающих тканей отсутствовала, отмечался очаговый реактивный липоматоз. Коллагеновые волокна имплантата диаметром 15,06 [12,45; 15,99] мкм были полностью сохранены, явления биодеградации в нем минимальны. В образцах контрольной группы отмечалась

значительная деградация имплантата за счет его лизиса макрофагами, а также сохраняющееся перифокальное воспаление. Вокруг фрагмента нативной дермы свиньи сформировалась многослойная капсула толщиной 107,20 [91,32; 117,50] мкм, окружающие её сосуды были полнокровны и имели диаметр 28,50 [26,32; 31,45] мкм.

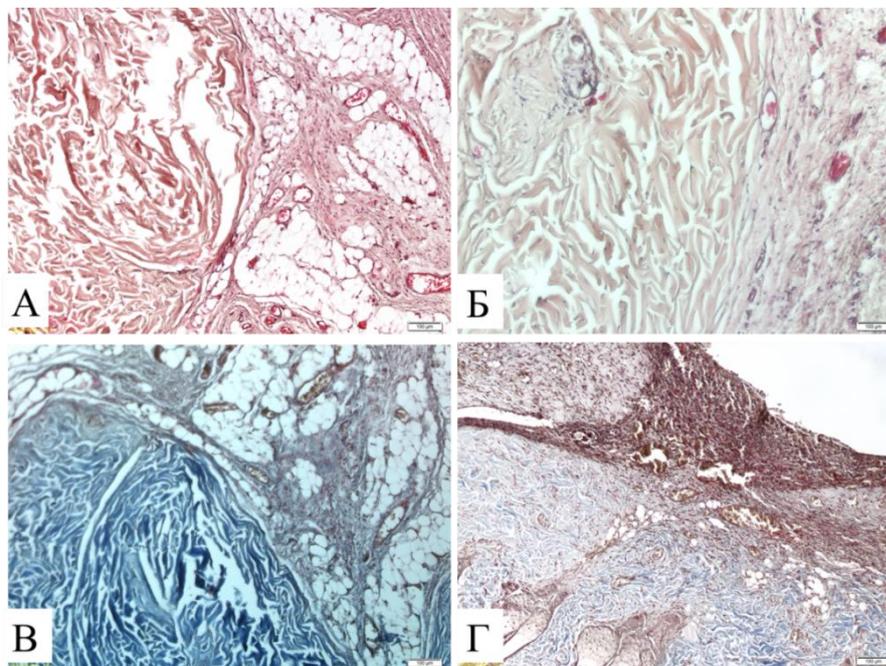


Рисунок 34 – Гистологическая оценка препаратов АДМ и нативной дермы свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 60 сутки: А – АДМ, гематоксилин-эозин; Б – нативная дерма свиньи, гематоксилин-эозин; В – АДМ, трихром по Массону; Г – нативная дерма свиньи, трихром по Массону. Ув. $\times 200$

Количественная оценка показала присутствие 15,79 [14,50; 17,67] Т-лимфоцитов и 18,86 [16,09; 20,22] макрофагов на 1 мм^2 среза ткани, что было значимо выше относительно предыдущей контрольной точки ($p = 0,008$ и $p = 0,048$ соответственно) (рисунок 35).

Таким образом, результаты иммунофенотипирования воспалительного инфильтрата вокруг и непосредственно внутри имплантата на различных сроках эксперимента позволяют утверждать, что полученный АДМ, по сравнению с нативной дермой свиньи, обладает минимальной иммуногенностью. В пользу низких антигенных свойств АДМ говорит также низкое содержание CD3 и CD68-позитивных клеток по сравнению с нативной дермой и тонкая

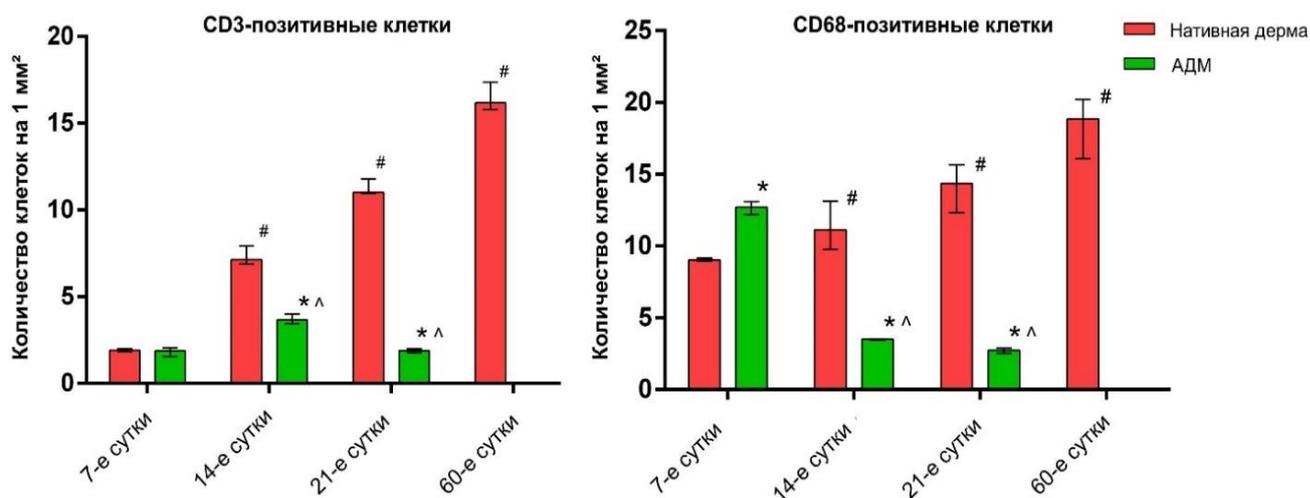


Рисунок 35 – Содержание CD3⁺ – Т-лимфоцитов и CD68⁺-макрофагов в области имплантации в различные сроки эксперимента: * – значимость отличий между контрольной и экспериментальной группой, $p < 0,05$; # – значимость отличий для значений контрольной группы на разные сроки, $p < 0,05$; ^ – значимость отличий для значений экспериментальной группы в разные сроки, $p < 0,05$

соединительнотканная капсула вокруг имплантированного фрагмента, отмеченная в срезах на поздних этапах эксперимента. При этом на всём протяжении исследования коллагеновые волокна АДМ, представляющие собой основную составляющую организованного внеклеточного матрикса дермы и обуславливающие её механические свойства, оставались практически интактными. В то же самое время вследствие выраженного воспалительного ответа имплантированная нативная дерма свиньи подверглась значительной биодеградации, о чем свидетельствовала фрагментация коллагеновых волокон, наличие полнокровных капилляров, а также плотная фиброзная капсула, окружающая имплантированный фрагмент.

5.4 Исследования биомеханической прочности биопластического материала

Устранение обширных дефектов брюшной стенки и объемных грыж представляет трудности из-за больших размеров грыжевых ворот [А.А. Vuenafe et al., 2019; J.A. Warren et al., 2017]. При этом наложение тугих швов для сближения и закрытия дефекта в натяжной герниопластике может привести к

расхождению раны, рецидиву или деформации области грыжи [S. Najibandeh et al., 2017]. На сегодняшний день данные проблемы можно преодолеть благодаря методу ненатяжной герниопластики с применением поддерживающих материалов [B.T. Miller et al., 2022; J.E. Cho et al., 2019].

Одной из основных функций биоматериалов для герниопластики является способность выдерживать нагрузки при движениях пациента и при повышенном внутрибрюшинном давлении [M.M. Ibrahim et al., 2018]. Прочность биоматериала при растяжении должна быть не ниже показателей прочности самой брюшной стенки, показатель прочности 32 Н/см является достаточным для большинства случаев в герниопластике [W. He et al., 2021]. При этом жесткость биоматериала не должна быть слишком низкой, так как это может привести к недостаточной опорной функции, или чрезмерно высокой, что будет провоцировать сильные послеоперационные боли [O.A. Olavarria et al., 2021].

Данные, полученные при растяжении имеющихся образцов, приведены в таблице 7. На основании этих данных построены диаграммы растяжения образцов биоматериалов (рисунок 36) и определены их основные физические свойства, представленные в таблице 8.

Таблица 7 – Механические показатели, полученные при растяжении биологических образцов

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

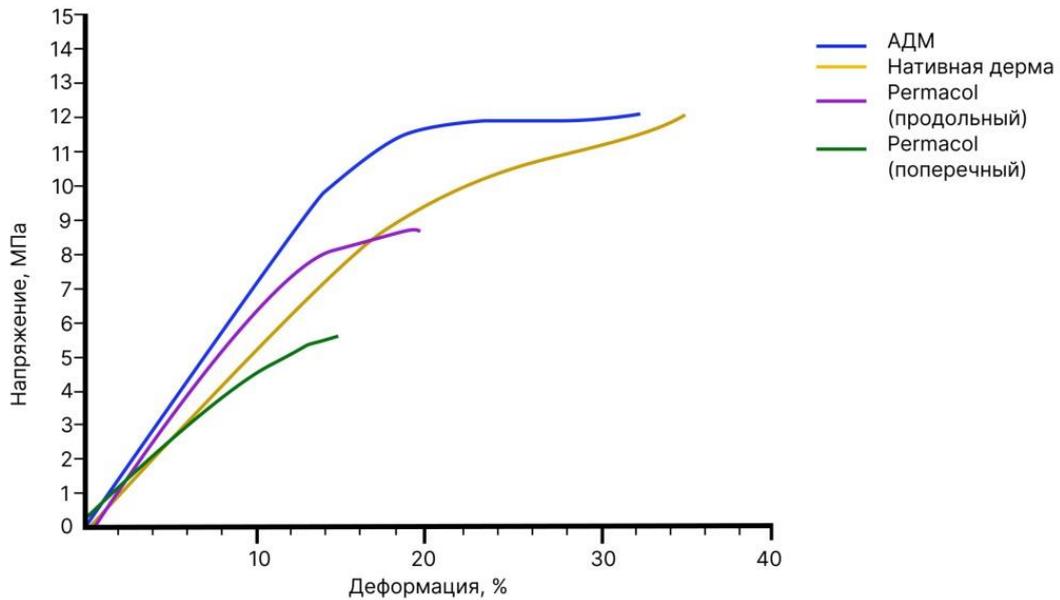


Рисунок 36 – Диаграммы растяжения образцов биоматериалов

Как видно из представленных данных нативная кожа свиньи обладала прочностью $11,6 \pm 2,8$ МПа, удлинение при разрыве $25,4 \pm 4,2$ %, а модуль упругости $56,1 \pm 9,2$ МПа. Кожа свиньи, обработанная детергентно-энзиматическим способом (образцы 1 группы), с учетом погрешности измерений имела механические свойства, близкие к исходному образцу: $\sigma_p = 9,1 \pm 0,6$ МПа, $\epsilon_p = 21,1 \pm 2,3$ %, $E_0 = 50,0 \pm 1,6$ МПа.

Образцы 2 группы по механическим характеристикам наиболее близки к контрольному образцу в продольном направлении, а образцы 1 – к контрольному образцу в поперечном направлении (таблица 8).

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

Образец	ϵ_p , %	σ_p , МПа	E_0 , МПа
№ 1 АДМ	$21,1 \pm 2,3$	$9,1 \pm 0,6$	$50,0 \pm 1,6$
№ 2 Нативная кожа свиньи	$25,4 \pm 4,2$	$11,6 \pm 2,8$	$56,1 \pm 9,2$
№ 3 «Permacol» (продольный)	$29,7 \pm 2,4$	$12,0 \pm 1,7$	$47,2 \pm 6,5$
№ 3 «Permacol» (поперечный)	$17,5 \pm 2,6$	$6,2 \pm 0,6$	$28,4 \pm 6,1$

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

Фотографии образцов во время и после испытаний представлены на рисунках 37–39.

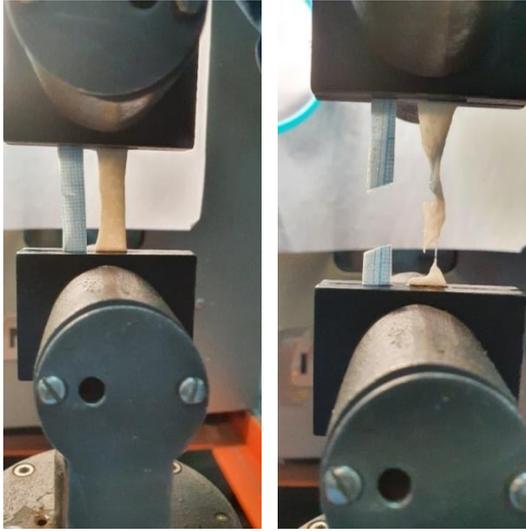


Рисунок 37 – Результаты испытаний образцов АДМ с помощью разрывной машины Instron 1122

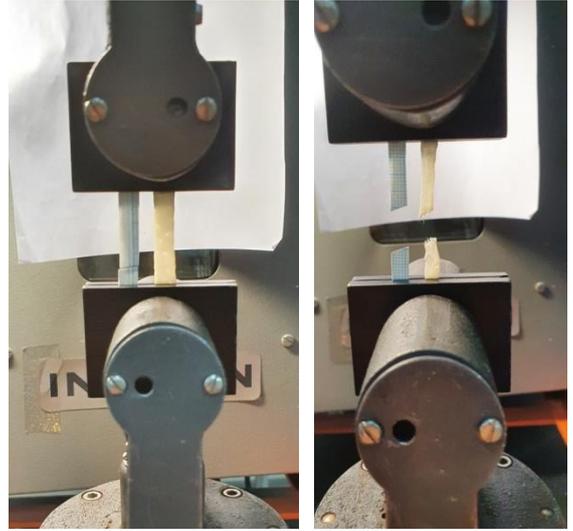


Рисунок 38 – Результаты испытаний образцов Permacol™ с помощью разрывной машины Instron 1122

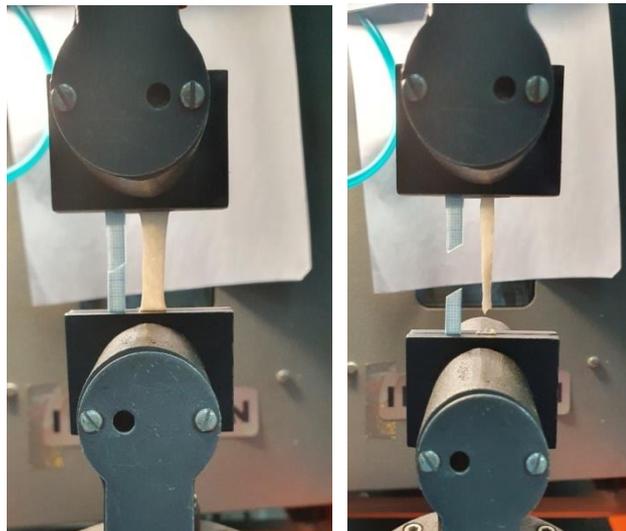


Рисунок 39 – Результаты испытаний образцов нативной дермы с помощью разрывной машины Instron 1122

В настоящем исследовании установлено что, ксеногенный АДМ, планируемый к применению в качестве эндопротеза для герниопластики, обладает высокими прочностными характеристиками, которые сопоставимы или даже выше аналогичных показателей синтетических аналогов. Его прочность на разрыв составляет $9,1 \pm 0,6$ МПа (910 Н/см^2), удлинения при разрыве – $21,1 \pm 2,3$ %, а модуль упругости – $50,0 \pm 1,6$ МПа. Эти характеристики во многом соответствуют

прочностным показателям нативной свиной дермы и намного превышают физиологически необходимые параметры, которые нужно учитывать при герниопластике. Наилучшие показатели получены при испытаниях дермы обработанной детергентно-энзиматическим способом.

Контрольный образец «Permacol Surgical Implant[®]» также показал очень высокие прочностные свойства, однако эти свойства значительно различались при продольной и поперечной нагрузке на образец. При поперечной нагрузке они снижались в 1,5–2 раза, что диктует необходимость выбора правильного положения эндопротеза во время выполнения операции. Кроме того, АДМ обладает значительно более выраженными пластическими свойствами по сравнению с «Permacol[™]», что дает ему преимущество при закрытии сложных по форме грыжевых дефектов, а также минимизирует образования грубой соединительнотканной капсулы вокруг эндопротеза.

Таким образом, разработанный бесклеточный ксеногенный дермальный матрикс обладает необходимыми физическими характеристиками для использования его в качестве хирургического импланта при лечении грыж передней брюшной стенки в эксперименте.

Резюме

В разработанных биоматериалах было выявлено достаточно низкое содержание ДНК, что указывает на их невысокую иммуногенность и позволяет рекомендовать детергентно-энзиматическую и химическую обработку свиной дермы как перспективные методики децеллюляризации тканей. По результатам работы было определено, что оптимальными материалами в отношении механических свойств при использовании в герниопластике являются ацеллюлярный дермальный матрикс, структурная организация которого максимально соответствовала структуре свиной дермы, и коммерческий имплант Permacol[™]. Однако для изучения механизмов взаимодействия биоматериалов с окружающими тканями, а также биомеханических свойств разрабатываемых материалов на основе дермы свиньи необходимы дальнейшие экспериментальные исследования с моделированием вентральных грыж.

ГЛАВА 6.**РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ
АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА
В КАЧЕСТВЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ИМПЛАНТА**

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

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

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

Задача хирургического лечения грыжевых дефектов – это укрепление передней брюшной стенки, позволяющее снизить натяжение тканей в зоне операции, избегая при этом повышения внутрибрюшного давления [F. Tahir et al., 2021]. На данный момент поиск материалов, которые бы обеспечивали прочность, одномоментную пластику грыжевого дефекта и не снижали функциональность передней брюшной стенки, сфокусирован на изучении использования имплантатов биологического происхождения. Опираясь на эти важные функции, имплантаты на основе внеклеточного матрикса находят широкое применение в регенеративной медицине для реконструкции тканей [K. Baylón et al., 2017; P.M. Бадыров и соавт., 2018; A.B. Баулин и соавт., 2011; В.Г. Богдан и соавт., 2014; A. Costa et al., 2019].

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

После обработки нативного образца детергентно-энзиматическим методом АДМ приобрел белый цвет. Полученный АДМ имел характерный рисунок поверхности (мерею) в виде сорочьих лапок. Гладкая микропористая поверхность обеспечивала удобство размещения импланта в непосредственном контакте с органами брюшной полости.

Полученный АДМ обладал оптимальной пластичностью для герниопластики. Благодаря мягкости и эластичности матрикс было возможно моделировать по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки. Результаты анализа показали отсутствие клеточных структур и частичную сохранность гистоархитектуры.

Данные образцы соответствовали требованиям к качеству имплантируемых биологических материалов в отношении количества ДНК – менее 50 нг/мг ткани, которое составляло $45,3 \pm 13,7$ нг/мг ткани, $p < 0,0001$.

В результате теста LIVE/DEAD в контрольной лунке жизнеспособность дермальных фибробластов составляла $75,6 \pm 2,8$ %, а в присутствии АДМ – $81,2 \pm 3,6$ % ($p > 0,05$). Данные результаты указывали на отсутствие токсических эффектов АДМ на культивируемые клетки.

Экспериментальная герниопластика проводилась на 2 свиньях породы Ландрас (возрастом 4–6 месяцев, массой $27 \pm 6,1$ кг). Ненатяжную герниопластику грыжевого дефекта (13×5 см) выполняли с помощью АДМ ($15 \times 7 \times 0,06$ см) – опытная группа и грыжевого дефекта (11×7 см) с помощью коммерческого импланта Permacol™ ($15 \times 10 \times 1$ см) – группа сравнения).

Закрытие грыжевого дефекта осуществлялось методом ненатяжной предбрюшинной герниопластики передней брюшной стенки (методом sublay) (рисунок 40).

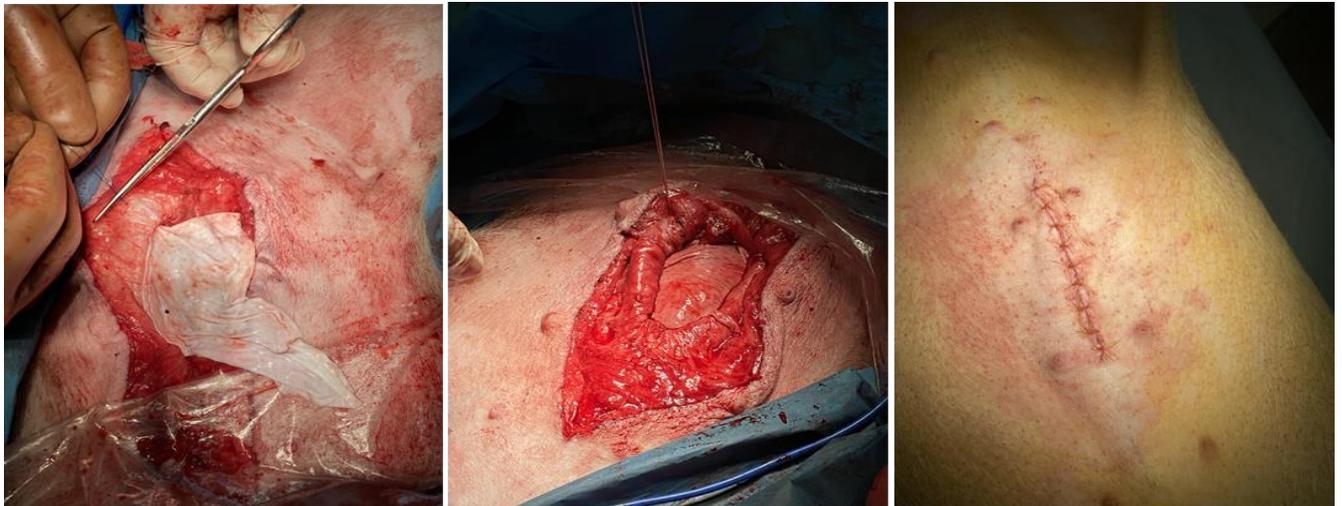


Рисунок 40 – Этапы экспериментальной герниопластики с использованием АДМ

Хирургические импланты были закреплены несколькими узловыми швами полипропиленовыми монофиламентными нитями ($1/2$, 36 мм, USP 4, «Володь», 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 АДМ и коммерческого импланта Permacol™ (рисунок 41).



Рисунок 41 – Внешний вид свиньи-грыженосителя: А – до герниопластики с помощью АДМ;
 В – до герниопластики с помощью Permacol™;
 Б, Г – после экспериментального лечения (21-е сутки)

Через 60 дней после экспериментальной герниопластики с использованием АДМ была проведена биопсия, при этом отмечалось отсутствие таких осложнений, как адгезия матрикса к внутренними органами, образование свищей и сером. Фрагменты тканей послеоперационного шва и области примыкания белой линии живота к имплантированному ацеллюлярному матриксу были подвергнуты гистологическому исследованию. Послеоперационный рубец характеризовался выраженным развитием плотной волокнистой соединительной ткани. Воспалительные изменения в тканях полностью отсутствовали. Ткани из области имплантации АДМ демонстрировали развитие зрелого состоятельного рубца с большим количеством коллагеновых и эластических волокон на фоне полного отсутствия признаков воспаления (рисунок 42).

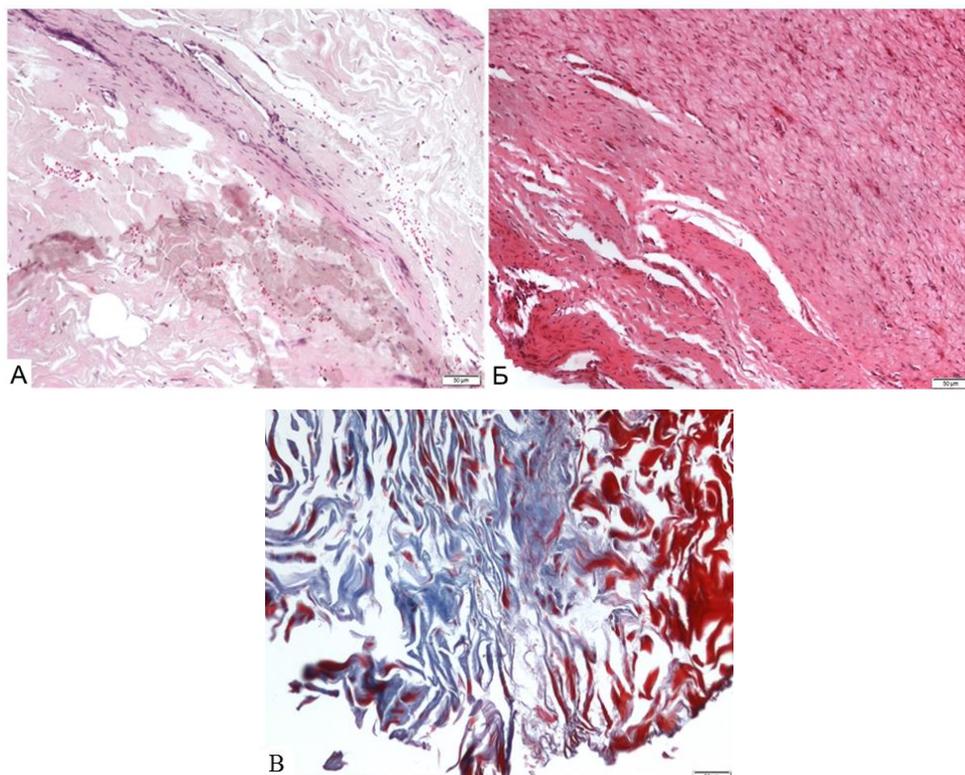


Рисунок 42 – Гистологическое исследование тканей из области имплантации АДМ:
 А – послеоперационный рубец, гематоксилин-эозин; Б – место имплантации АДМ,
 гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$; В – хорошо развитая плотная волокнистая соединительная
 ткань, трихром по Массону. Ув. $\times 200$

Иммуногистохимическая реакция установила присутствие большого количества коллагена I типа, а также значительную часть клеток мезенхимного происхождения – в частности, фибробластов и эндотелиоцитов, которые формируют типичный пейзаж рубца (рисунок 43, рисунок 44).

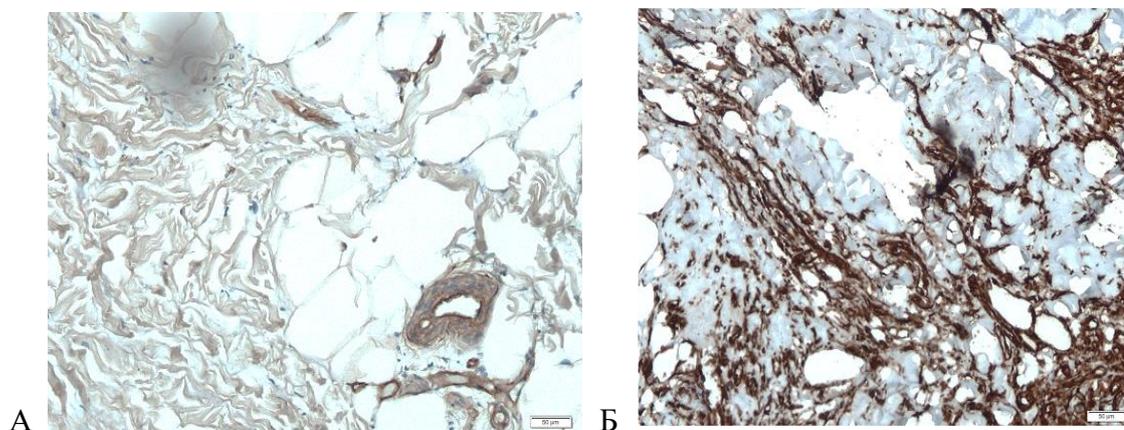


Рисунок 43 – Иммунофенотипирование соединительной ткани послеоперационного рубца:
 А – значительное количество коллагена I типа; Б – многочисленные виментин-позитивные
 клетки. Стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция. Ув. $\times 200$

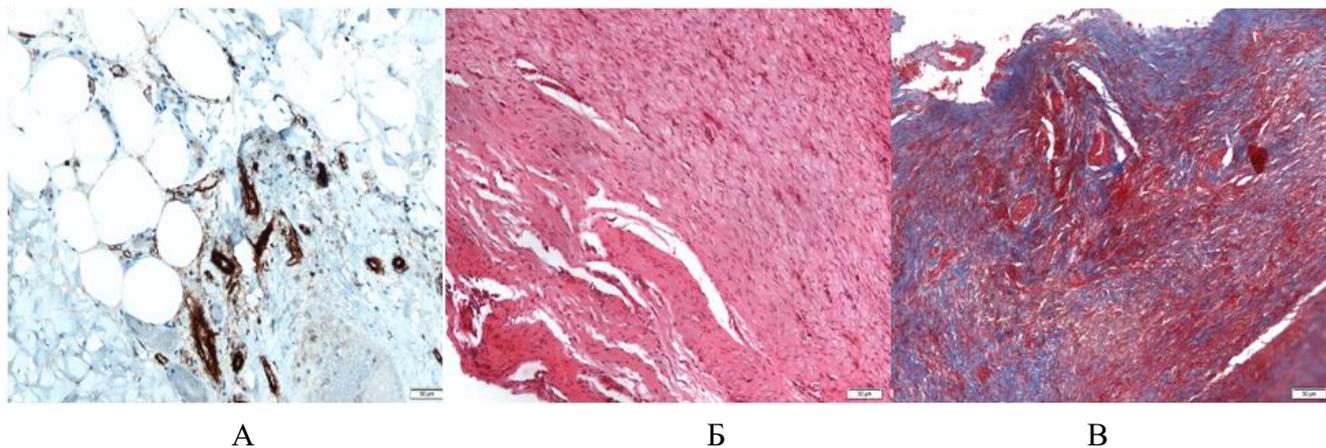


Рисунок 44 – Соединительная ткань в области послеоперационного рубца. Многочисленные капилляры (CD31-позитивные эндотелиоциты) на границе с жировой клетчаткой:

А – стрептавидин-пероксидазная иммуногистохимическая реакция; Б – гематоксилин-эозин; В – трихром по Массону. Ув. $\times 200$

Анализ образцов животного, которому был имплантирован PermascollTM, 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 PermascollTM формировались небольшие очаги липоматоза и мелкие серомы. При этом из-за достаточной жесткости, обуславливающей натяжение имплантата, сформировалось незначительное расслоение коллагеновых волокон в апоневрозе (рисунок 45).

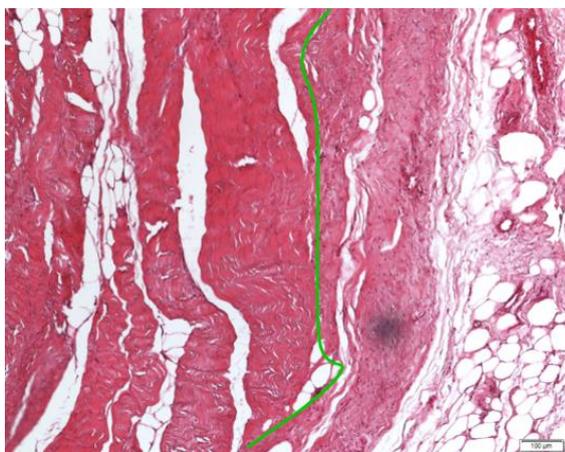


Рисунок 45 – Область имплантации материала PermascollTM. Линия указывает на границу между тканями животного (слева) и имплантированным материалом (справа). Гематоксилин-эозин.

Ув. $\times 200$

Исходя из результатов гистологического исследования, можно сделать вывод о прочности АДМ, использованного для закрытия грыжевого дефекта, что подтверждается состоятельностью рубца. Кроме того, не наблюдалось визуальной и морфологической границы между АДМ и апоневрозом, что демонстрирует способность матрикса к полной биоинтеграции.

По результатам биопсии наличие таких осложнений, как адгезия АДМ к внутренним органам, образование свищей и сером, не было обнаружено. В результате гистологического исследования было установлено, что имплантированный АДМ не имел соединительнотканной капсулы в отличие от шовного материала, который провоцировал формирование типичной гранулёмы инородного тела. Вокруг области имплантации материала наблюдалось развитие зрелой соединительной ткани, особенностью которой являлось наличие большого количества коллагеновых и эластических волокон и пролиферирующих фибробластоподобных клеток, при этом отсутствовали признаки воспаления.

Таким образом, нами разработан биологический материал, который обладал следующими характеристиками:

- разработанный АДМ хорошо моделировался по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки, что существенно оптимизировало хирургические манипуляции при герниопластике;
- благодаря биологической природе АДМ, тканевые и клеточные реакции в области его расположения протекали более физиологично, и наблюдалось постепенное замещение материала вновь образованной соединительной тканью;
- биоматериал показал высокие прочностные характеристики, надёжно укреплял дефект передней брюшной стенки и был устойчив к прорезыванию шовным материалом;
- отмечалось отсутствие спаечного процесса, образования свищей, сером, формирования грубой фиброзной капсулы.

6.2 Результаты экспериментального применения ацеллюлярного дермального матрикса в качестве фиксирующего материала для маммопластики

Наиболее часто применяемым методом реконструкции груди после мастэктомии является установка тканевого экспандера или имплантата. Плюсом использования данного метода является снижение травматизации окружающих тканей. Кроме того, реабилитация пациентов проходит быстрее, с меньшим нарушением функционирования, чем при реконструкции с переносом аутологичных тканей [А.Д. Зикирходжаев и соавт., 2018; М.В. Ермощенкова и соавт., 2017]. Но использование экспандера или имплантата имеет свои ограничения, связанные с состоянием мягких тканей, окружающих и поддерживающих грудной протез. Создание лоскутов *m. serratus*, *m. pectoralis minor* и фасциальные вытягивания мышц передней брюшной стенки, которые выполняются для оптимизации укрытия мягкими тканями, приводят к усилению послеоперационных болей, ослаблению мышечной функции и отсроченной реабилитации [S.T. Lanier et al., 2010; J.T. Nguyen et al., 2011].

Для обеспечения полного укрытия протеза без задействования дополнительных мышечных лоскутов в последнее время используется хирургический материал – ацеллюлярный дермальный матрикс, который, близок по структуре к собственным тканям человека и обладает биологической инертностью [S.B. Glasberg et al., 2012; T.L. Hartzell et al., 2010; К.А. Приходько и соавт., 2017].

Хирургическая техника включает выделение нижнего края *m. pectoralis major* с внедрением листка АДМ между нижней инфрамаммарной складкой и нижней границей *m. pectoralis major*. Данная техника позволяет обеспечивать дополнительный покровный слой для реконструируемой груди. Преимущества АДМ, такие как создание определенной формы реконструируемой груди, минимизация экспозиции грудного протеза, интраоперационно больший объем

тканевого экспандера, одномоментная реконструкция без необходимости последующих процедур, описаны в многочисленных работах [S.A. Macadam et al., 2012].

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

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

Моделирование субпекторального кармана проводилось на 2 свиньях породы Ландрас (возраст 4 месяца, самки, вес $33 \pm 1,7$ кг) (рисунок 46).



Рисунок 46 – Этапы имплантации АДМ без помещения грудного эндопротеза в сформированный карман

В области передней грудной стенки с помощью АДМ (опытная группа) и коммерческого импланта PermacolTM (группа сравнения) формировали карман для эндопротеза (без вложения). Его границами являлись: внутри – место прикрепления большой грудной мышцы к грудице, снаружи – брюшная порция большой грудной мышцы и грудная фасция, переходящая на пучки передней зубчатой мышцы и наружной косой мышцы живота, вверху – грудоакромиальный сосудистый пучок, внизу – ребро и сохранённая дистальная точка крепления

брюшной порции большой грудной мышцы. После подшивания АДМ/Permacol™ приступали к ушиванию раны.

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

Материал животного, которому был имплантирован АДМ, характеризовался хорошей интеграцией матрикса в собственные ткани свиньи, о чём говорит отсутствие соединительно-тканной капсулы на границе между имплантом и мышечной тканью. Воспалительных изменений, в том числе затухших, выявлено не было. В АДМ появился клеточный компонент, представленный фибробласто-подобными клетками. Хорошо заметная граница между АДМ и апоневрозом обусловлена тем, что в апоневрозе все коллагеновые волокна ориентированы параллельно друг другу, а в имплантированном АДМ их расположение разнонаправленное (рисунок 47).

Для оценки особенностей биоинтеграции имплантируемых материалов было проведено исследование коллагена I типа иммуногистохимическим методом, продемонстрировавшее его достаточно равномерное распределение, что говорит о нормальном формировании соединительной ткани, в частности, её оформленного межклеточного вещества (рисунок 48).

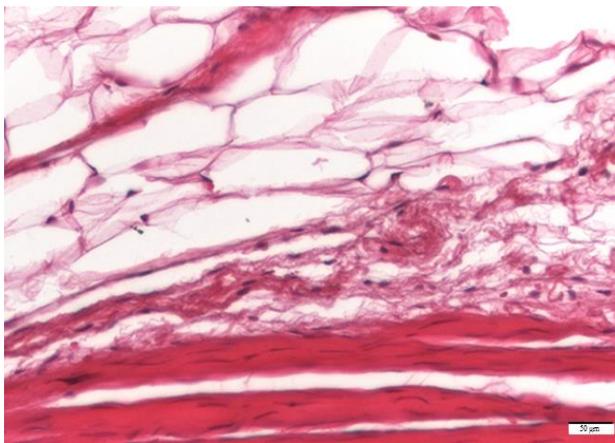


Рисунок 47 – Граница АДМ и апоневроза белой линии живота, гематоксилин-эозин.
Ув. ×400

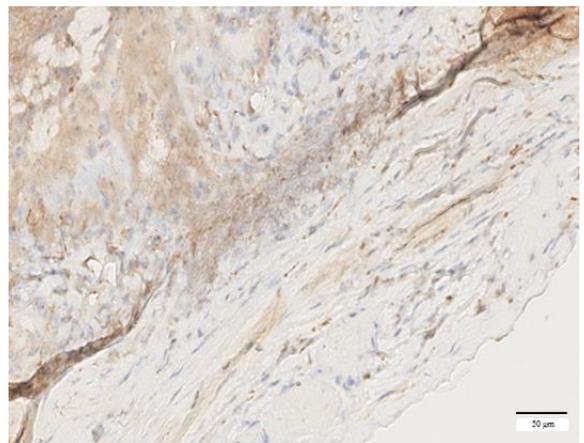


Рисунок 48 – Коллагеновые волокна располагаются диффузно или в виде пучков относительно равномерно в поле зрения. Иммуногистохимическая реакция. Ув. ×400

Известно, что коллагеновые имплантаты вызывают легкий воспалительный процесс, характеризующийся в основном присутствием макрофагов и разрешающийся отложением компонентов внеклеточного матрикса по мере деградации коллагена, с очень незначительной васкуляризацией имплантата или без нее. Имплантаты из сшитого коллагена вызывают более интенсивный и устойчивый ответ с повышенным отложением компонентов ВКМ [А.Н. Morris et al., 2017]. В связи с этим было интересно провести сравнительную оценку иммунного ответа на разработанный матрикс и сшитый гексаметилендиизоцианатом Permacol™. Иммунофенотипирование лейкоцитов в месте имплантации АДМ не позволило обнаружить экспрессию CD3- и CD68-рецепторов (рисунок 49), что коррелировало с авоспалительной гистологической картиной.

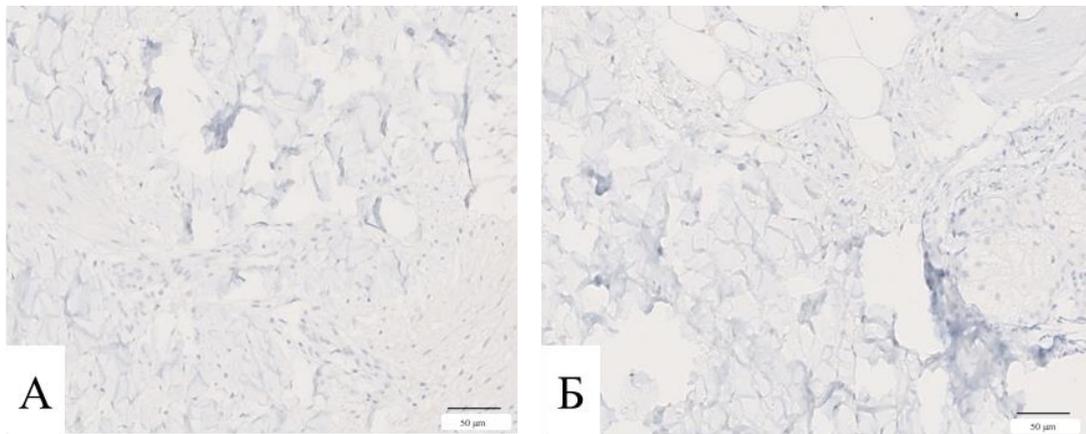


Рисунок 49 – Отсутствие воспалительных элементов в месте имплантации АДМ: А – окрашивание на CD3-позитивные Т-лимфоциты; Б – окрашивание на CD68-позитивные макрофаги. Иммуногистохимическая реакция. Ув. ×400

Экспрессия PECAM-1 (CD31) была положительной в большей части капилляров в поле зрения. Это можно расценивать как отсутствие феномена эндотелиальной дисфункции и адекватную работу микроциркуляторного русла в области имплантации (рисунок 50).

В препаратах животного, у которого для герниопластики использовали Permacol™, отмечалась хорошая интеграция импланта в собственные ткани. На границе апоневроза и имплантированного материала не сформировалось соединительно-тканной капсулы. Активное или разрешившееся воспаление отсутствовало.

Лоскут Permacol™ характеризовался сформировавшимся клеточным компонентом, представленным в основном фибробластоподобными элементами. Визуально собственные ткани отличались от импланта более упорядоченным расположением коллагеновых волокон и отсутствием промежутков между ними (рисунок 51). Кроме того, в отдельных полях зрения отмечалась выраженная фрагментация имплантированного биоматериала и очаговая гиперплазия адипоцитов.

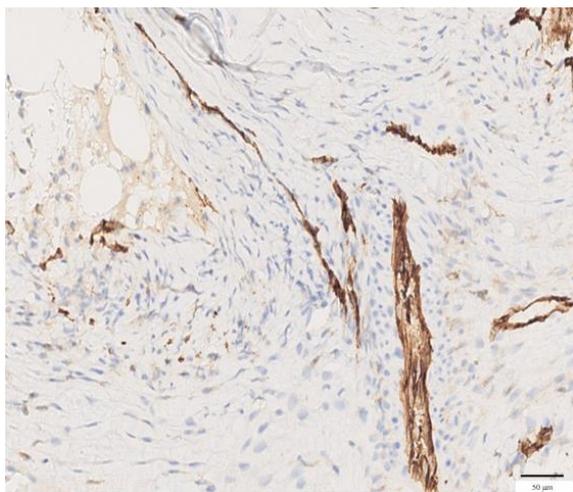


Рисунок 50 – Экспрессия CD31 в месте имплантации АДМ. Иммуногистохимическая реакция. Ув. ×400

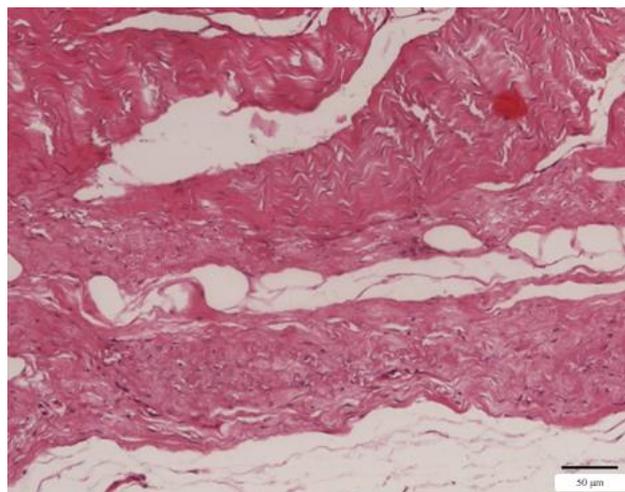


Рисунок 51 – Граница Permacol™ и белой линии живота. Выраженный клеточный компонент в импланте. Соединительно-тканная капсула и признаки воспаления отсутствуют. Гематоксилин-эозин. Ув. ×400

Равномерное распределение коллагена во всех полях зрения свидетельствует о полноценной регенерации с формированием зрелой соединительной ткани (рисунок 52).

Об отсутствии иммуногенности имплантированного материала свидетельствовало отсутствие Т-лимфоцитов (CD3+) и макрофагов (CD68+) в тканевых срезах (рисунок 53, А, Б). Более того, отсутствие макрофагов можно расценивать как прогностически благоприятный признак биоинтеграции.

Иммуногистохимическое выявление молекул клеточной адгезии PECAM показало положительную реакцию в большинстве эндотелиальных клеток в срезе ткани (рисунок 53В). Это говорит, с одной стороны, об адекватной регенерации в зоне операционной раны, а с другой, может служить прогностическим признаком недостаточной биодеградации импланта.

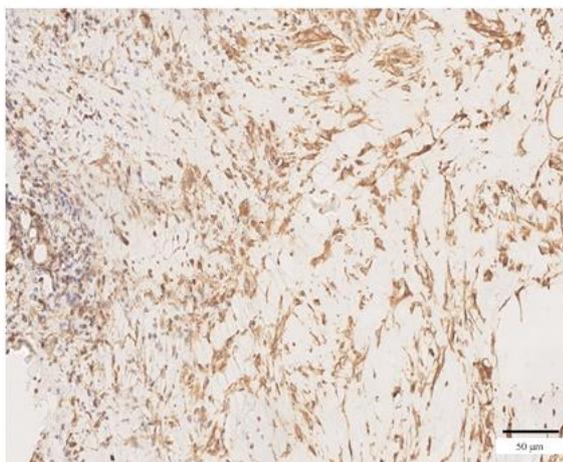


Рисунок 52 – Равномерное расположение коллагена I типа в месте имплантации Permacol™. Иммуногистохимическая реакция. Ув. ×400

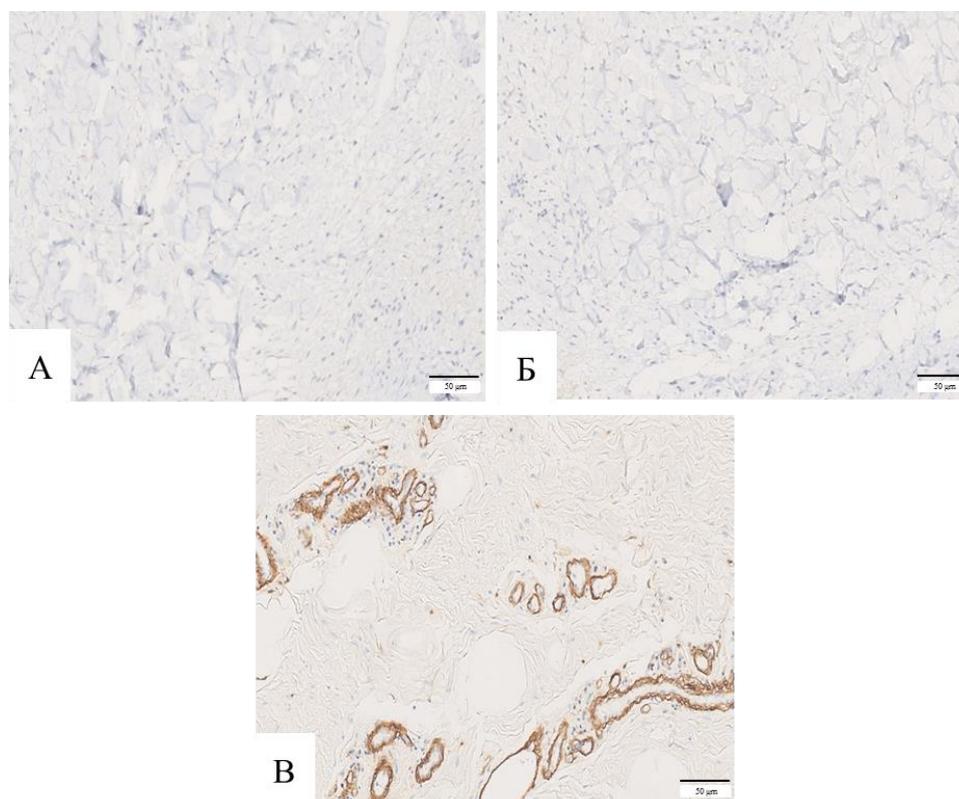


Рисунок 53 – Иммуногистохимическое окрашивание в месте имплантации Permacol™: А – иммунофенотипирование CD3-позитивных Т-лимфоцитов; Б – иммунофенотипирование CD68-позитивных макрофагов; В – иммунофенотипирование CD31-позитивных клеток (эндотелиоцитов). Иммуногистохимическая реакция. Ув. ×400

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

ГЛАВА 7.**РАЗРАБОТКА КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОГЕЛЯ
НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ ДЕРМЫ СВИНЬИ**

Коллагеновые гидрогели в настоящее время являются перспективными биоматериалами, применяемыми в различных направлениях биомедицины, клеточных технологиях и тканевой инженерии [G. Sharifzadeh et al., 2017]. Особенно актуально их применение в качестве ранозаживляющих материалов, основы для отверждаемых и активированных костно-пластических материалов, для 3D культивирования клеток, а также в качестве чернил для 3D-биопринтинга соединительнотканых конструкций, так как коллаген является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса [Е.М. Ahmed, 2015; N. Annabi et al., 2017; Н.Л. Фатхудинова и соавт., 2018; А.Б. Шехтер и соавт., 2015].

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

7.1 Подбор оптимальной методики обработки дермы для получения гидрогелевого материала

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

5 % раствор (группа 4); 5,5 % раствор (группа 5), при гидромодуле 1 : 5 при комнатной температуре, после чего отмывали в деионизированной воде до нейтрального значения pH.

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

В результате проведенного эксперимента оптимальные характеристики имели образцы группы 4, которые обладали меньшим временем гелеобразования по сравнению с образцами группы 2 и 3, и значительно меньшим временем нейтрализации по сравнению с образцами в группе 5 (таблица 9).

Таблица 9 – Результаты подбора оптимальной концентрации щелочного раствора для обработки дермы

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

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

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

Образцы дермы группы 4, полученные после воздействия 5 % щелочного раствора в течение $6,6 \pm 1,52$ часов, приобрели упругую структуру, сохраняли форму при деформации и не продавливались пинцетом (рисунок 54).

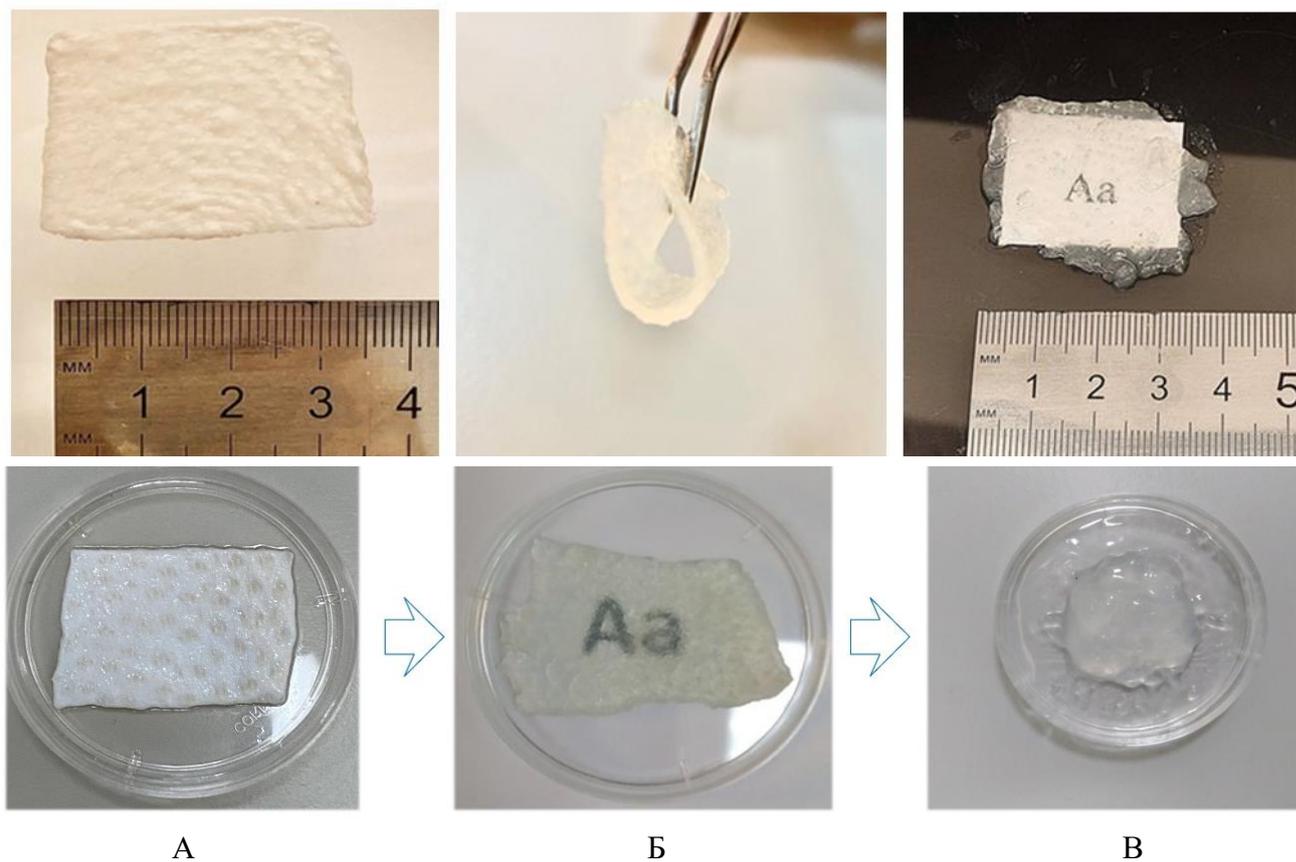


Рисунок 54 – Внешний вид образца дермы до обработки щелочным раствором (А), после 6 ч обработки 5 % NaOH (Б), после 20 ч обработки 5 % NaOH (В)

Через $20 \pm 0,7$ часов после начала обработки образцы группы 4 приобрели структуру гидрогелевого коллагенсодержащего материала, что вероятно связано с набуханием коллагеновых волокон и объясняется нарушением структуры коллагена, а именно расщеплением коллагеновых фибрилл и разрушением невосстанавливаемых коллагеновых сшивок (Рисунок 54, В). Образцы данной группы соответствовали всем критериям отбора, следовательно, установленные параметры обработки были признаны оптимальными для получения гидрогеля на основе дермы в лабораторных условиях.

Полученный гидрогель был прозрачным, плотным и гомогенным. В полученный гидрогель добавлялся 1 % раствор антибиотика-антимикотика (Gibco (Thermo Scientific), США) в соотношении 10 : 1 (гидрогель : раствор антибиотика), гидрогель хранился в стерильных условиях при температуре $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.2 Биохимический анализ состава дермального гидрогеля

Образцы дермального гидрогеля, полученные химической децеллюляризацией подвергались биохимическому анализу на содержание общего белка, нативного коллагена, гиалуроновой кислоты, сульфатированных общих и O-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 дермальном гидрогеле показал, что его концентрация составила $19,3 \pm 6,2$ г/л (рисунок 55).

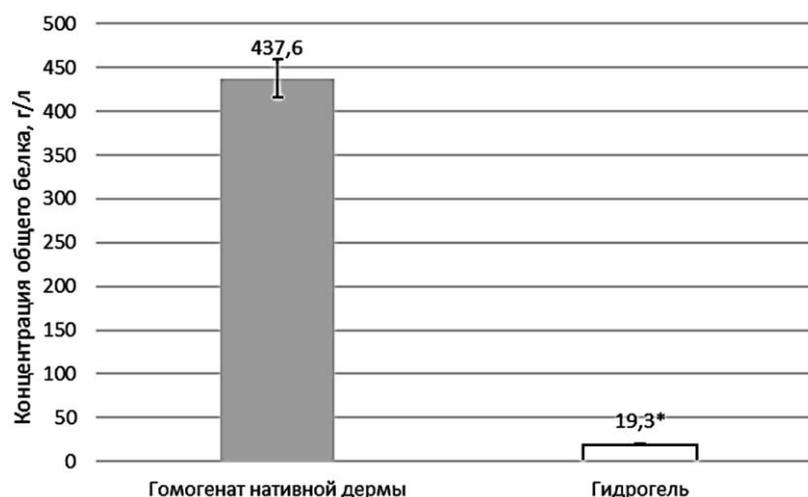


Рисунок 55 – Результаты анализа содержания общего белка в дермальном гидрогеле:

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

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

Количественный анализ содержания нативного коллагена в полученном гидрогеле для определения степени его вымывания из нативного образца представлен на рисунке 56.

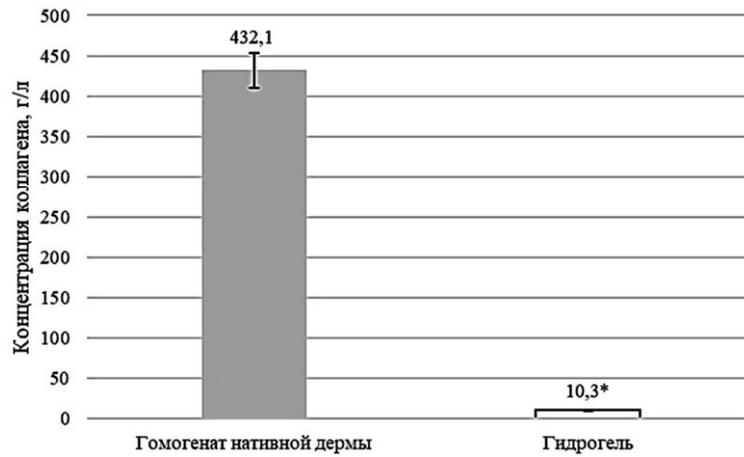


Рисунок 56 – Результаты анализа содержания нативного коллагена в дермальном гидрогеле (по данным ИФА), * – значимость различий по сравнению с нативной дермой, $p < 0,001$

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 и вымыванием.

Был произведен количественный анализ содержания гиалуроновой кислоты в полученном гидрогеле для определения степени вымывания углеводов из нативного образца (рисунок 57).

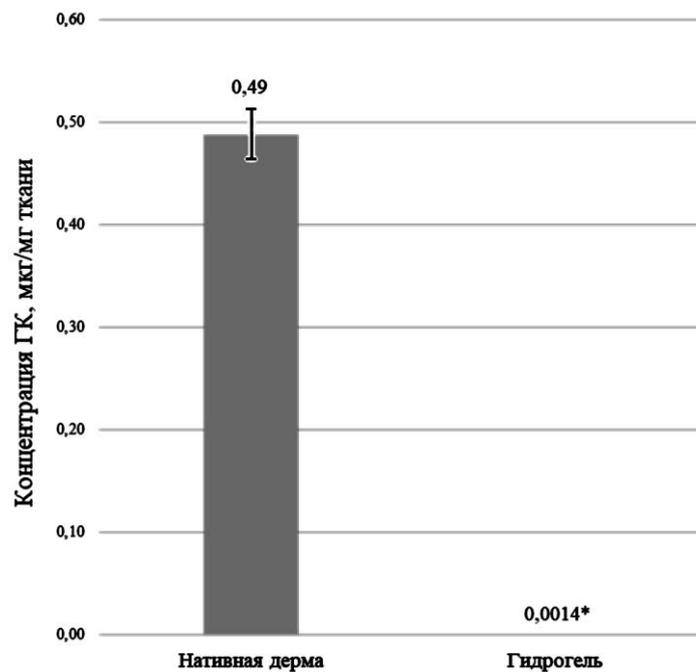


Рисунок 57 – Результаты анализа содержания гиалуроновой кислоты в дермальном гидрогеле:

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

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

Кроме того, нами были получены данные о количественном содержании с-ГАГ в полученном дермальном гидрогеле, которые способствовали определению степени вымывания углеводов из нативного образца (рисунок 58).

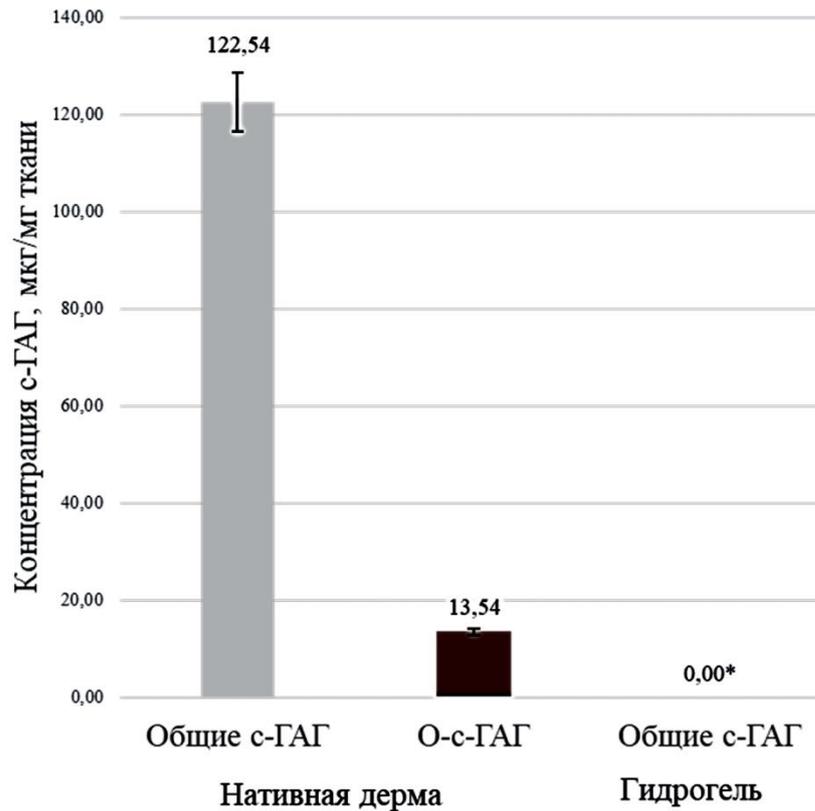


Рисунок 58 – Результаты анализа содержания сульфатированных гликозаминогликанов в дермальном гидрогеле: * – значимость различий по сравнению с содержанием общих с-ГАГ в нативной дерме, $p < 0,001$, с-ГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

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

Определение остаточного содержания ДНК после процедуры щелочной обработки образцов дермы проводилось для оценки иммуногенности полученного дермального гидрогеля (рисунок 59).

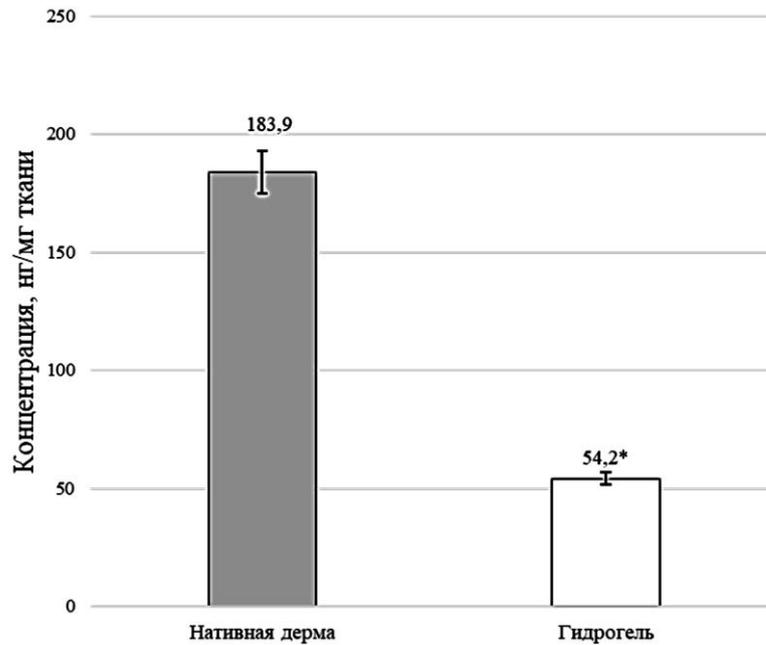


Рисунок 59 – Количественное содержание ДНК в дермальном гидрогеле:

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

Количественный анализ показал, что в процессе обработки нативной кожи 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 коже, $p < 0,001$), это свидетельствовало о том, что полученный дермальный гидрогель был в значительной степени очищен от ДНК.

7.3 Оценка жизнеспособности клеток и цитотоксичности дермального гидрогеля

С целью оценки качества децеллюляризации проводился анализ DAPI, показывающий степень деструкции клеточных ядер. По результатам исследования, в образцах гидрогеля не было обнаружено клеточных ядер, показывающих интенсивное свечение в нативной коже (рисунок 60).

Перед проведением ХТТ-анализа проводился дозоподбор оптимального объема дермального гидрогеля для инкубации с клетками. С этой целью в 96-луночный планшет помещались различные объемы гидрогеля с последующим

засеиванием его дермальными фибробластами DF-1 в соотношениях питательная среда : дермальный гидрогель – 9 : 1; 5 : 1; 3 : 1 и 1,8 : 1) и питательная среда с клетками без дермального гидрогеля (таблица 10).

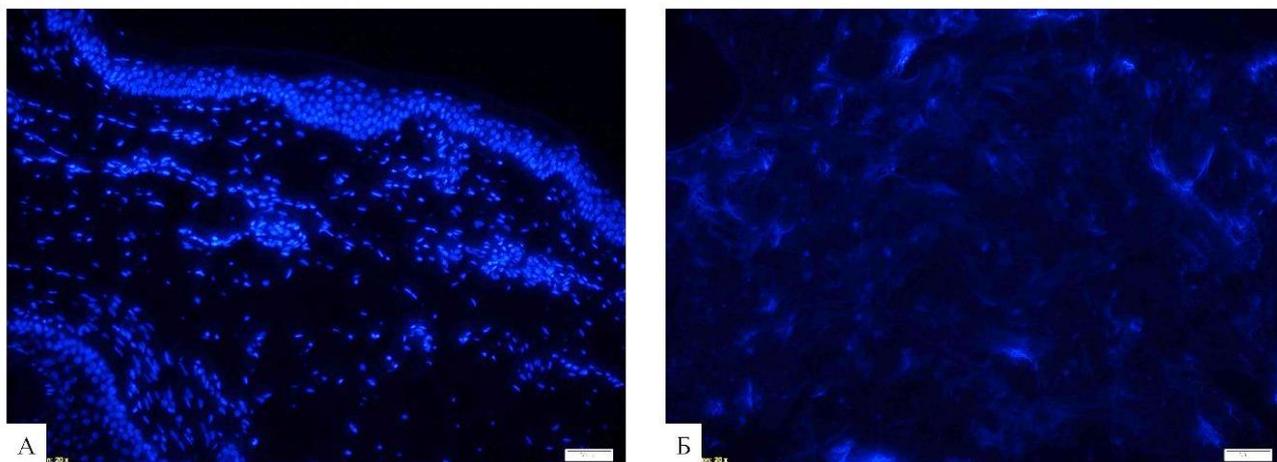


Рисунок 60 – Результаты окрашивания DAPI. Образцы (А) нативной дермы и (Б) после химической децеллюляризации. Ув. $\times 200$

Таблица 10 – Степень жизнеспособности и пролиферативной активности дермальных фибробластов при инкубации с дермальным гидрогелем

Соотношение ППС к гидрогелю	Общее количество клеток	% живых клеток
24 часа инкубации		
9 : 1	83,34 \pm 5,51	92,32
5 : 1	62,33 \pm 6,09	82,42
3 : 1	45,67 \pm 3,78	85,89
1,8 : 1	46,33 \pm 6,56	85,07
Контроль	262,83 \pm 10,80	72,87
72 часа инкубации		
9 : 1	86,17 \pm 2,04	85,37
5 : 1	79,50 \pm 6,83	89,36
3 : 1	167 \pm 11,47	92,05
1,8 : 1	231,33 \pm 9,48	96,27
Контроль	226 \pm 31,08	66,58

Через 24 часа инкубации в контрольной лунке клетки сохраняли сферическую форму, что говорило о худшем прикреплении клеток к пластику в отличие от клеток с гидрогелем, где клетки после 24 часов инкубации приобрели веретенообразную форму (рисунок 61).

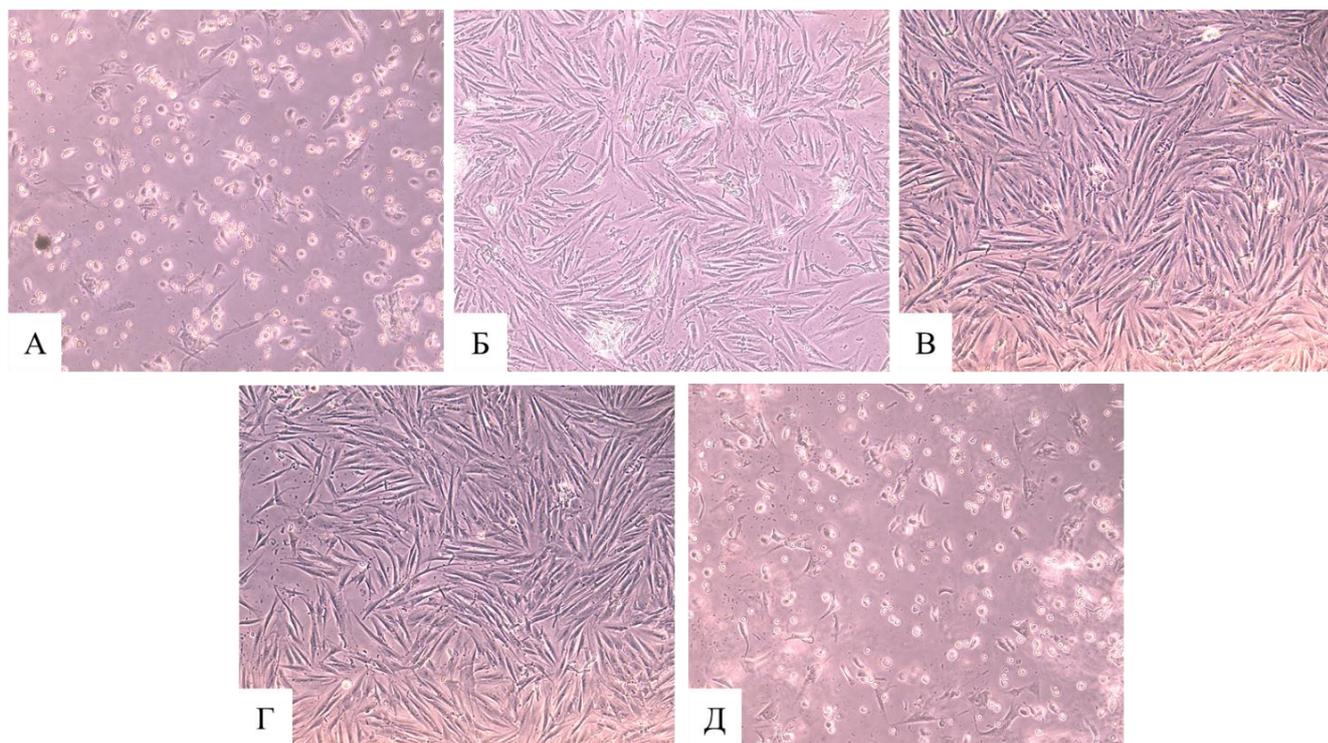


Рисунок 61 – Морфология клеток DF-1 на дне лунок планшета при различных соотношениях питательной среды и дермального гидрогеля: А – 9 : 1; Б – 5 : 1; В – 3 : 1; Г – 1,8 : 1; Д – контроль. Ув. $\times 100$

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

При этом наблюдались множественные межклеточные контакты. Эти данные демонстрируют достаточную клеточную совместимость разработанного гидрогеля для фибробластов. Также было отмечено, что оптимальные результаты были получены при соотношении питательной среды и дермального гидрогеля 1,8 : 1, поэтому данное соотношение было выбрано для дальнейшего ХТТ-анализа.

ХТТ-тест, проведенный после засеивания дермального гидрогеля клетками в описанном выше соотношении, показал наличие живых, метаболически активных клеток после 24 часов инкубирования. При этом жизнеспособность клеток оказалась значимо ниже, чем в контрольной лунке, тем не менее, данный показатель был принят как приемлемый в отношении цитотоксичности дермального гидрогеля (рисунок 62).

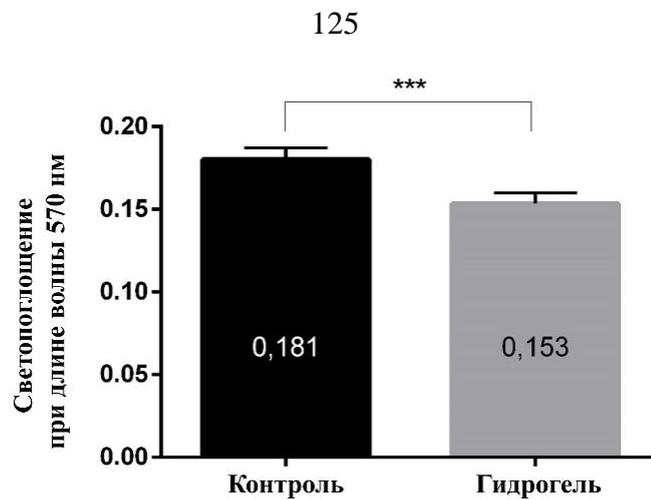


Рисунок 62 – Данные ХТТ-анализа жизнеспособности дермальных фибробластов при инкубации в присутствии дермального гидрогеля. Контроль – дермальные фибробласты, культивируемые только в полной питательной среде: *** – значимость различий по сравнению с нативной дермой, $p < 0,001$

7.4 Оценка местной токсичности гидрогелевого материала на основе дермы свиньи

Оценка местной токсичности образцов показала, что уже на 3-и сутки в месте инъекции на кожных покровах и в подлежащих тканях не наблюдалось признаков воспаления (рисунок 63).

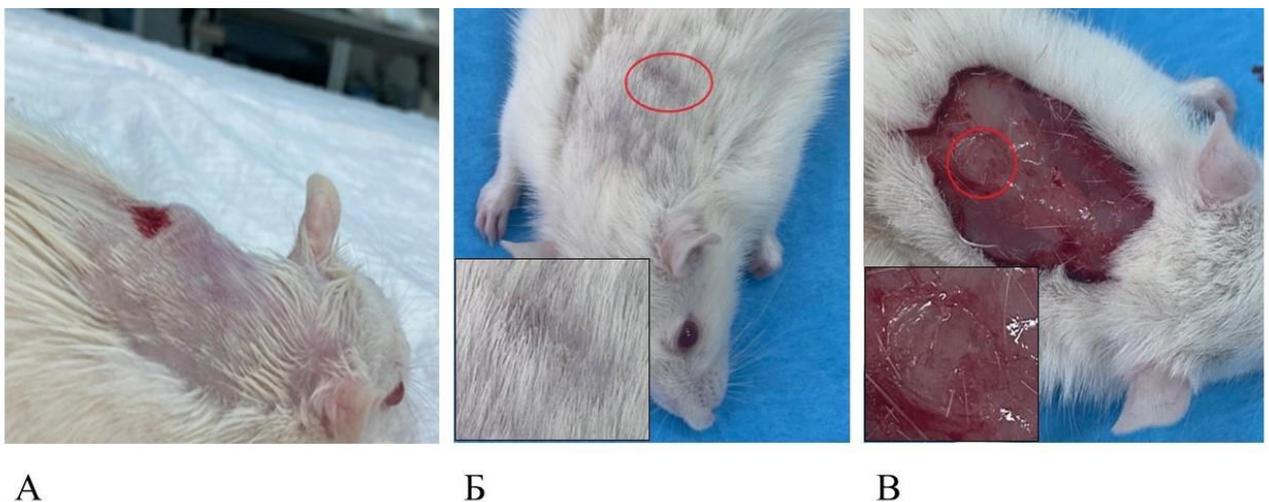


Рисунок 63 – Подкожная инъекция дермального гидрогеля лабораторным животными: А – внешняя оценка места инъекции, 1-е сутки; Б – внешняя оценка места инъекции, 3-и сутки; В – внешний вид тканей в месте инъекции, 3-и сутки

При гистологическом анализе образцов на 3-и сутки не наблюдалось некроза тканей, выраженного воспалительного ответа и неоангиогенеза. Гидрогель характеризовался частичной биodeградацией, был незначительно пропитан фибринозным экссудатом, что свидетельствует о возможности его применения как основы для формирования соединительной ткани при поверхностных ранениях кожи (рисунок 64).



Рисунок 64 – Гистологический анализ образцов дермы в месте инъекции гидрогеля на 3-и сутки (линией показана граница гидрогеля и окружающих тканей). Гематоксилин-эозин. Ув. ×100

Таким образом, дермальный гидрогелевый материал показал отсутствие токсичности и хорошую биodeградацию и в результате проведенного эксперимента были получены образцы гидрогеля, который в дальнейшем могут быть использованы для дальнейших исследований и также могут послужить основой для создания раневых покрытий при лечении раневых и ожоговых поверхностей.

Резюме

Оптимальная методика получения коллагенсодержащего гидрогеля на основе биополимеров дермы свиньи – дермального гидрогеля основывается на обработке 5 % раствором гидроксида натрия в течение 20 часов при гидромодуле 1 : 5.

Содержание общего белка составило 19,3 г/л, концентрация коллагена – 10,3 г/л, гиалуроновая кислота и с-ГАГ были вымыты из дермального гидрогеля, количество остаточного ДНК в дермальном гидрогеле составляло 54,2 нг/мг.

В результате эксперимента было показано, что исследуемый материал не был цитотоксичен, клетки в дермальном гидрогеле оставались жизнеспособными (жизнеспособность клеток составила 96,27 %), оптимальное соотношение дермального гидрогеля и дермальных фибробластов составило 1,8 : 1.

ГЛАВА 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЕРМАЛЬНОГО ГИДРОГЕЛЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОЖОГОВЫХ РАН

Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения, ежегодно регистрируется около 300 000 летальных случаев в результате термических ожогов, что делает лечение таких ран острой социальной проблемой [G.D. Mogoşanu et al., 2014]. На сегодняшний день в лечении ожоговых ран произошёл значительный прогресс, а способы обработки ран усовершенствованы, однако существующие методы лечения ожоговых ран требуют доработки с целью оптимизации процессов регенерации поражённых поверхностей [J.A. Ross et al., 2020; В. Harma et al., 2020; F.X. Maquart et al., 2014].

Существует большое количество раневых покрытий, которые отличаются структурно-функциональными особенностями. Наибольший интерес вызывают биополимерные раневые покрытия благодаря их биосовместимости, биодеградации и сходству с внеклеточным матриксом тканей [M.Farokhi et al., 2018]. Кроме того, известно, что биополимеры способны стимулировать процессы заживления ран и участвовать в восстановлении повреждённых тканей и, следовательно, в регенерации кожи [G.D. Mogoşanu et al., 2014].

Также стоит отметить, что в последнее время широко используются так называемые «влажные повязки», или гидрогели [D. Stern et al., 2019; В.К. Sun et al., 2014; G.К. Abilova et al., 2020]. Влажная среда подавляет образование рубцов, обеспечивает эффективную миграцию кератиноцитов и реэпителизацию. Более того, гелеобразная структура способна восполнять объём поражённой ткани, оказывая тем самым косметический эффект. За последние несколько лет было создано большое количество новых биоразлагаемых гидрогелей для лечения ожоговых ран. Одним из перспективных материалов для их создания является коллаген, обладающий способностью к адгезии и организации в раневом ложе [K. Lin et al., 2018]. Кроме того, известно, что молекулы коллагена в составе

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

8.1 Оценка эффективности заживления ожоговых ран при экспериментальном применении дермального гидрогеля

Результаты исследования дермального гидрогеля показали, что данный препарат имеет достаточно высокий репаративный эффект и скорость заживления в сравнении с животными контрольной группы (таблица 11).

Таблица 11 – Количественный анализ иммунофенотипирования образцов тканей ожоговых ран в экспериментальных группах

Группа/сутки	Контрольная группа	Группа сравнения	Опытная группа
CD16b (Me[Q₁;Q₃])			
3-и сутки	28,3 [22,6; 31,4]	17,4 [15,6; 20,9]*	16,6 [14,4; 19,2]*
7-е сутки	2,1 [1,8; 2,6] ^	2,6 [2,5; 3,1] ^	3,0 [2,4; 3,6] ^
14-е сутки	0^	0^	0^
21-е сутки	0	0	0
CD68 (Me[Q₁;Q₃])			
3-и сутки	15,9 [12,0; 19,4]	16,8 [13,8; 22,2]	11,3 [8,9; 15,0] *#
7-е сутки	8,4 [6,6; 10,9] ^	5,1 [3,9; 7,7] ^	2,9 [1,1; 4,0] ^#
14-е сутки	3,4 [2,9; 3,9] ^	2,3 [2,0; 2,7] ^	1,1 [0,7; 1,6] *#
21-е сутки	0^	0^	0^

* – $p < 0,05$, 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.

Так на 9 сутки исследования у крыс группы 2 не было отмечено визуальных признаков воспаления, некроза тканей или рубцевания (рисунок 65).

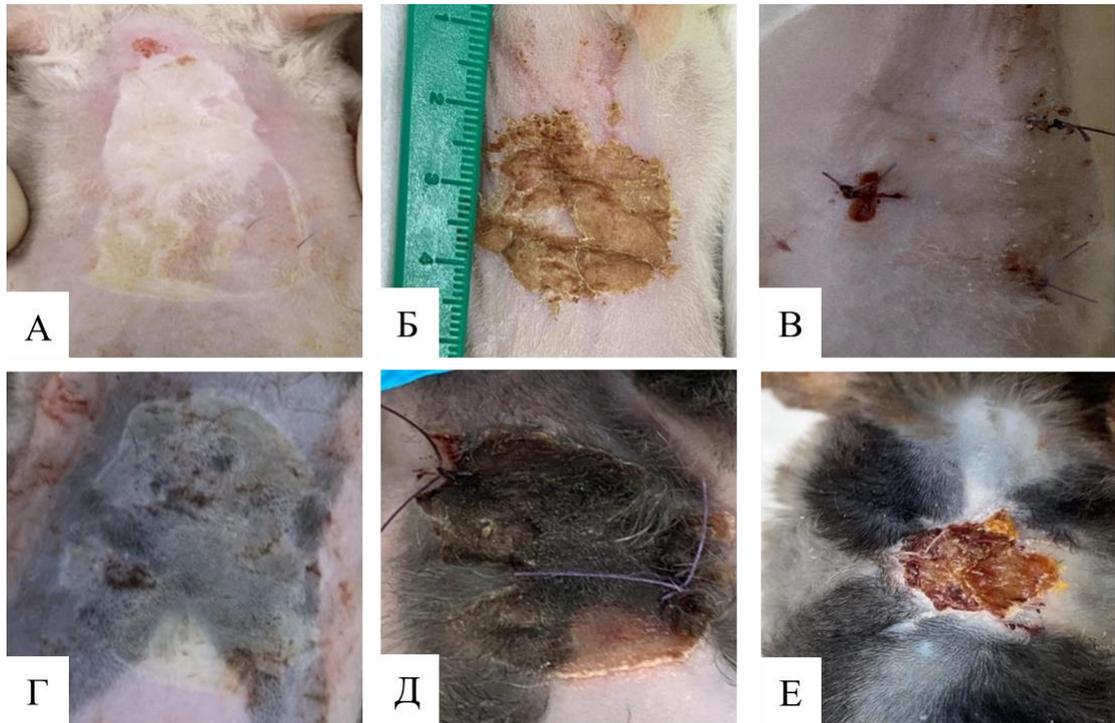


Рисунок 65 – Внешний вид животных после нанесения ожоговой раны:

А, Б, В – экспериментальная группа, лечение дермальным гидрогелем; Г, Д, Е – контрольная группа, без лечения; А, Г – день операции; Б, Д – 3 день эксперимента; В, Е – 9 день эксперимента

На третьи сутки после нанесения ожоговой раны в образцах кожи крыс, не получавших раневого покрытия, обнаруживались признаки острого воспаления и выраженного гистолиза. В тканях присутствует большое количество нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов (26,7 [23,3; 29,8] нейтрофилов и 15,9 [12,0; 19,4] макрофагов на 1 мм² ткани по данным компьютерной морфометрии). На поверхности присутствует фибринозно-гнойный экссудат (рисунок 66).

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 нейтрофильными гранулоцитами (20,1 [15,9; 25,5] на 1 мм² ткани) и макрофагами (16,8 [13,8; 22,2] на 1 мм²). Некротические и дистрофические изменения были выражены умеренно (рисунок 67).

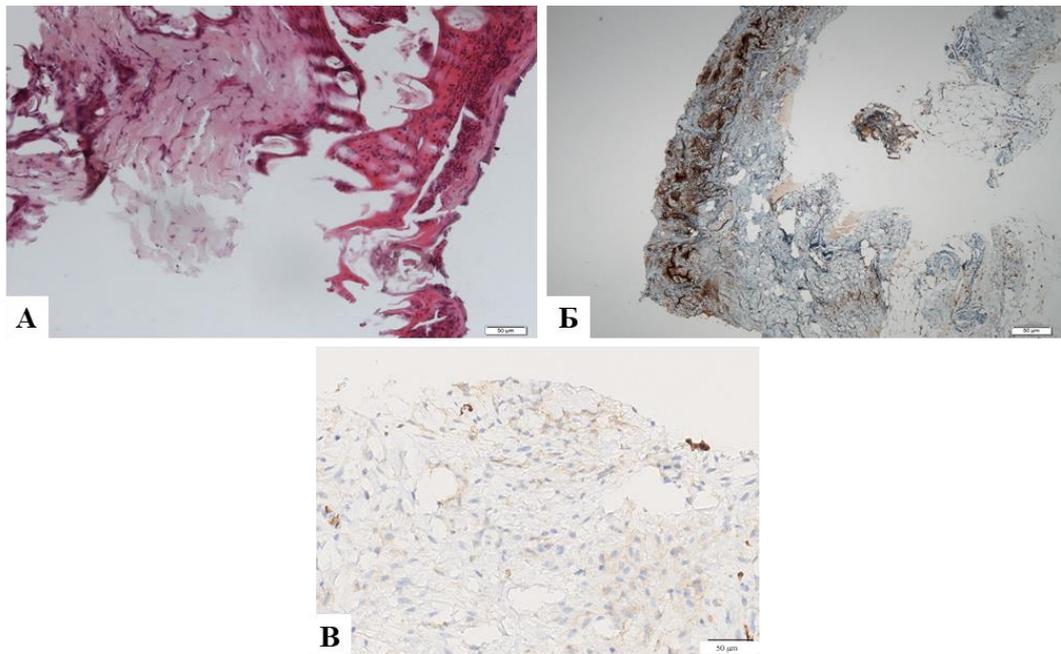


Рисунок 66 – Гистологическая картина ожоговой раны без лечения на 3-и сутки:

А – выраженная воспалительная инфильтрация дермы, на поверхности толстый слой фибринозно-гнойного экссудата; Б – многочисленные CD16b-позитивные нейтрофилы в поверхностных слоях раны; В – многочисленные CD68-позитивные макрофаги в поверхностных слоях раны; А – гематоксилин-эозин; Б, В – иммуногистохимическая реакция. Ув. $\times 200$

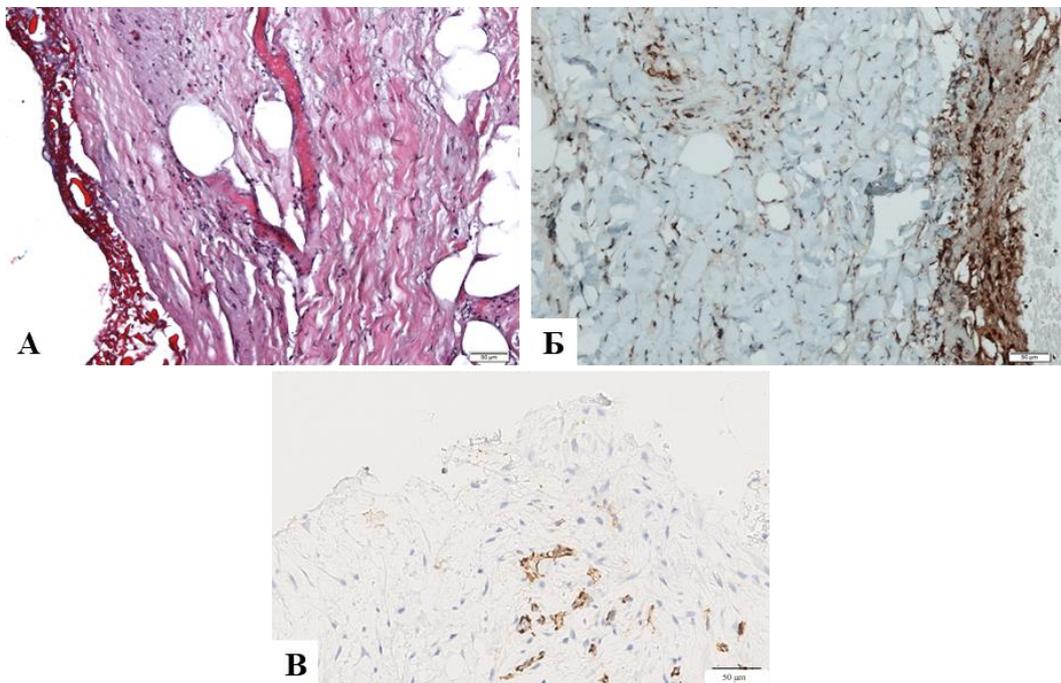


Рисунок 67 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой мазью «Левомеколь», на 3 сутки: А – раневое покрытие пропитано фибринозно-гнойным отделяемым, сосуды полнокровны, в дерме – мелкие очаги инфильтрации; Б – скопление CD16b-позитивных нейтрофилов в поверхностном слое, отдельные очажки инфильтрации в глубоких слоях; В – скопление CD68-позитивных макрофагов в поверхностном слое; А – гематоксилин-эозин; Б, В – иммуногистохимическая реакция. Ув. $\times 200$

В образцах ран, покрытых дермальным гидрогелем, на третьи сутки отмечалось умеренно выраженное диффузное воспаление, незначительные некротические и дистрофические изменения и полнокровие сосудов. По данным компьютерной морфометрии, в срезе содержится 23,0 [16,1; 29,1] CD16b-позитивных нейтрофилов и 11,3 [8,88; 15,0] CD68-позитивных макрофагов на 1 мм² ткани (рисунок 68).

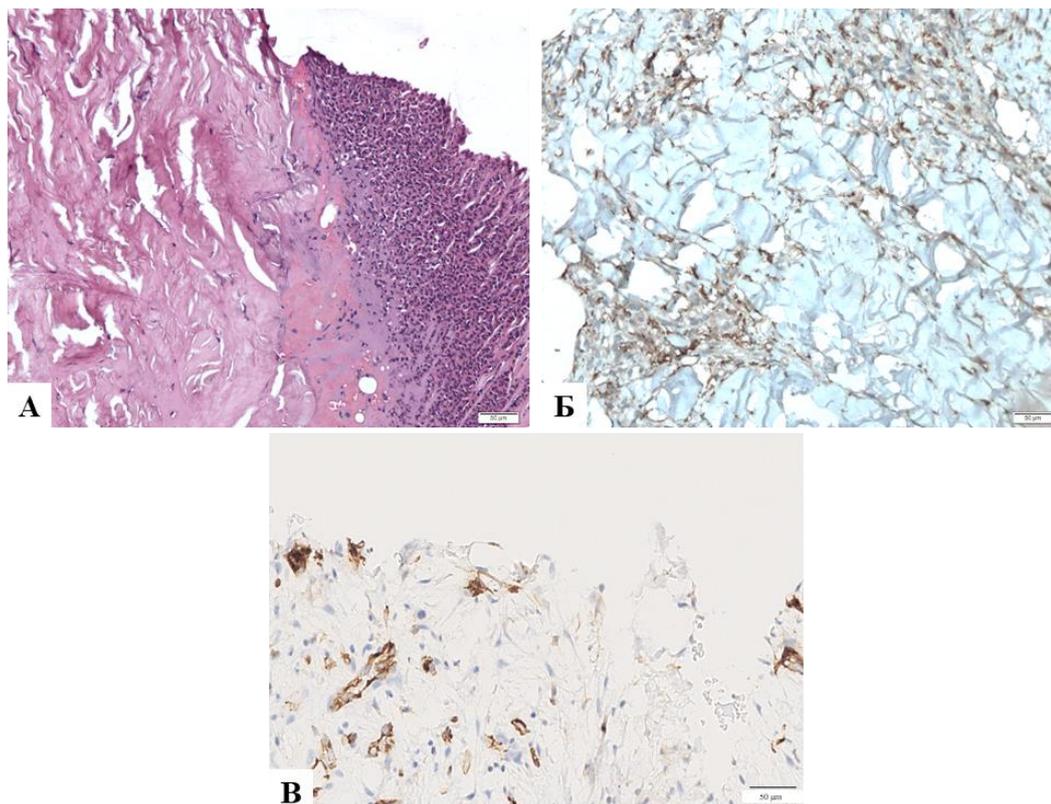


Рисунок 68 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой дермальным гидрогелем, на 3-и сутки: А – раневое покрытие пропитано гнойным экссудатом, мелкие очаги воспалительной инфильтрации в подлежащих слоях; Б – мелкоочаговые скопления нейтрофилов в дерме; В – скопление CD68-позитивных макрофагов в поверхностном слое; А – гематоксилин-эозин; Б, В – иммуногистохимическая реакция. Ув. ×200

Патологоанатомический анализ биоптатов, полученных на седьмые сутки от не имевших раневого покрытия животных, показал умеренно выраженное слабо выраженное воспаление с незначительной макрофагальной инфильтрацией (8,4 [6,6; 10,9] макрофагов на 1 мм² ткани), а также активные процессы репаративной регенерации – формирование грануляционной ткани и мелкие гнёзда пролиферирующего эпидермиса, дающего положительную реакцию на эпидермальный цитокератин (рисунок 69).

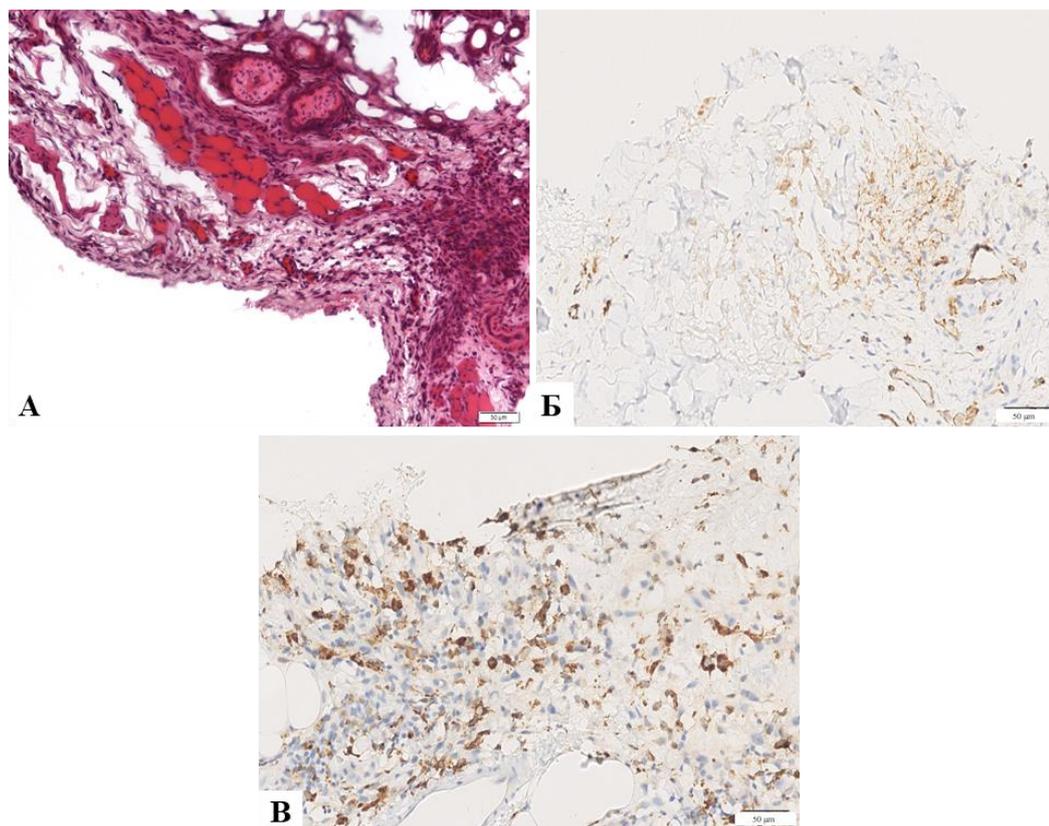


Рисунок 69 – Гистологическая картина ожоговой раны без лечения на 7-е сутки:

А – грануляционная ткань с многочисленными полнокровными сосудами и выраженным клеточным компонентом, небольшие скопления клеток многослойного эпителия; Б – скопления нейтрофилов в дерме; В – скопление CD68-позитивных макрофагов в поверхностном слое;

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

Образцы от животных, в те же сроки получавших лечение препаратом сравнения, демонстрируют слабо выраженное воспаление с небольшими очагами лимфомакрофагальной инфильтрации (5,1 [3,9; 7,7] макрофагов и 3,0 [2,2; 3,9] нейтрофилов на 1 мм^2 ткани), выраженный отёк коллагеновых волокон и незначительное полнокровие капилляров в грануляционной ткани. Проллиферирующий эпидермис в данном случае формирует тонкий однородный пласт (рисунок 70).

В препаратах животных, ожоговая рана которых была покрыта дермальным гидрогелем, наблюдалось слабо выраженное воспаление, при котором лейкоциты формировали мелкие скопления (2,9 [1,8; 4,0] макрофагов и 2,6 [2,3; 3,0] Т-лимфоцитов на 1 мм^2 ткани по данным компьютерной морфометрии). Эпидермис также формирует ровный однородный пласт, дающий хороший сигнал с антителами к эпидермальному цитокератину (рисунок 71, таблица 11).

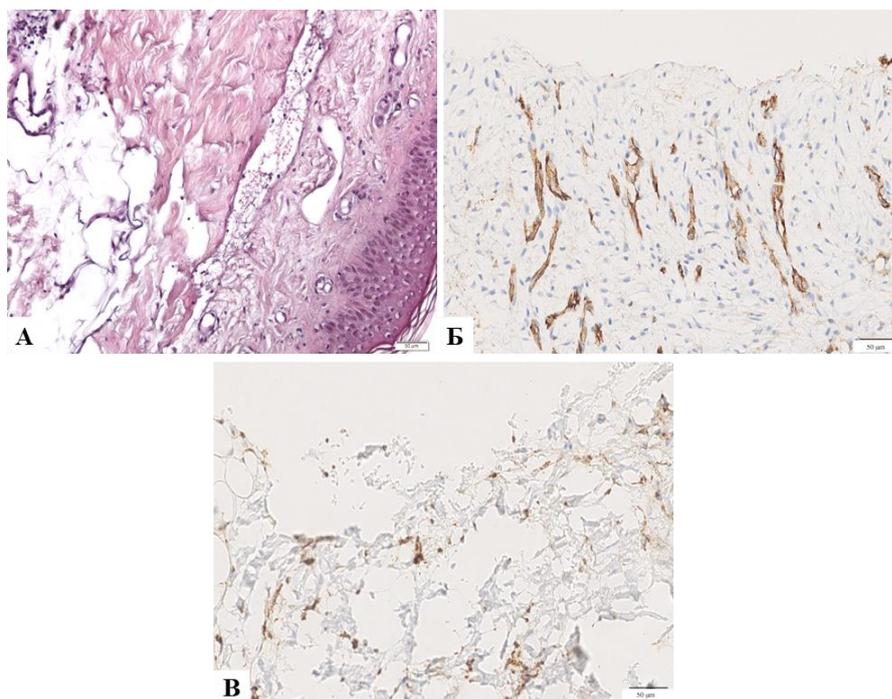


Рисунок 70 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой мазью «Левомеколь», на 7-е сутки: А – отёк коллагеновых волокон, слабо выраженная воспалительная инфильтрация, полнокровие капилляров, формирование эпидермального пласта на поверхности раны; Б – скопления нейтрофилов в дерме; В – скопление CD68-позитивных макрофагов в поверхностном слое; А – гематоксилин-эозин; Б, В – иммуногистохимическая реакция. Ув. $\times 200$

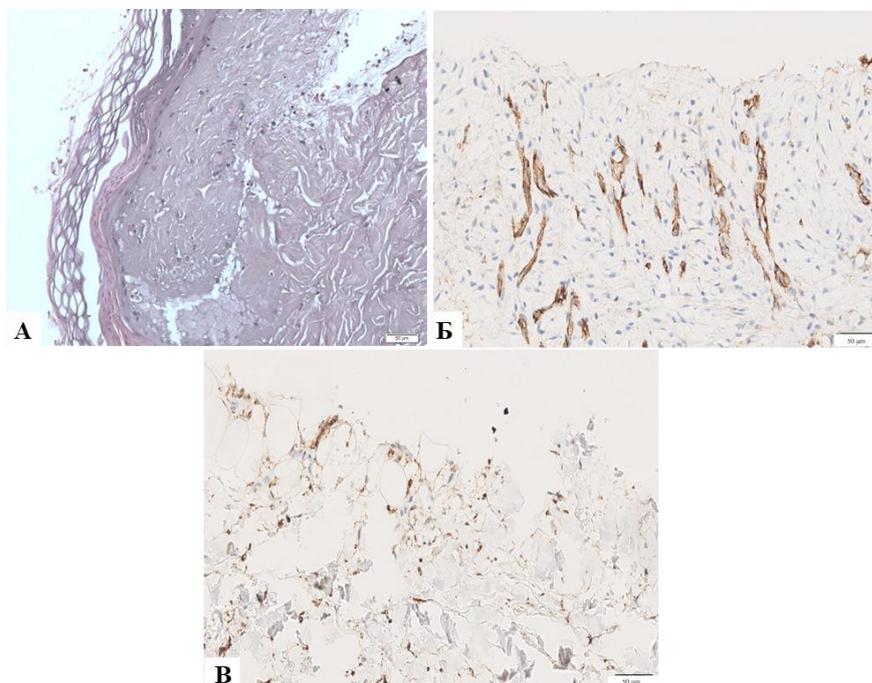


Рисунок 71 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой дермальным гидрогелем, на 7-е сутки: А – немногочисленные лейкоциты в дерме, формирование эпидермального пласта на поверхности раны; Б – скопления нейтрофилов (CD16b-позитивных клеток) в дерме; В – скопление CD68-позитивных макрофагов в поверхностном слое; А – гематоксилин-эозин; Б, В – иммуногистохимическая реакция. Ув. $\times 200$

На 14-е сутки после нанесения ожоговой раны в образцах всех трёх групп животных наблюдались статистически незначимые различия в количественном составе резидуальных воспалительных клеток в дерме, а также в плотности микроциркуляторного русла и толщине эпидермального пласта (рисунок 72).

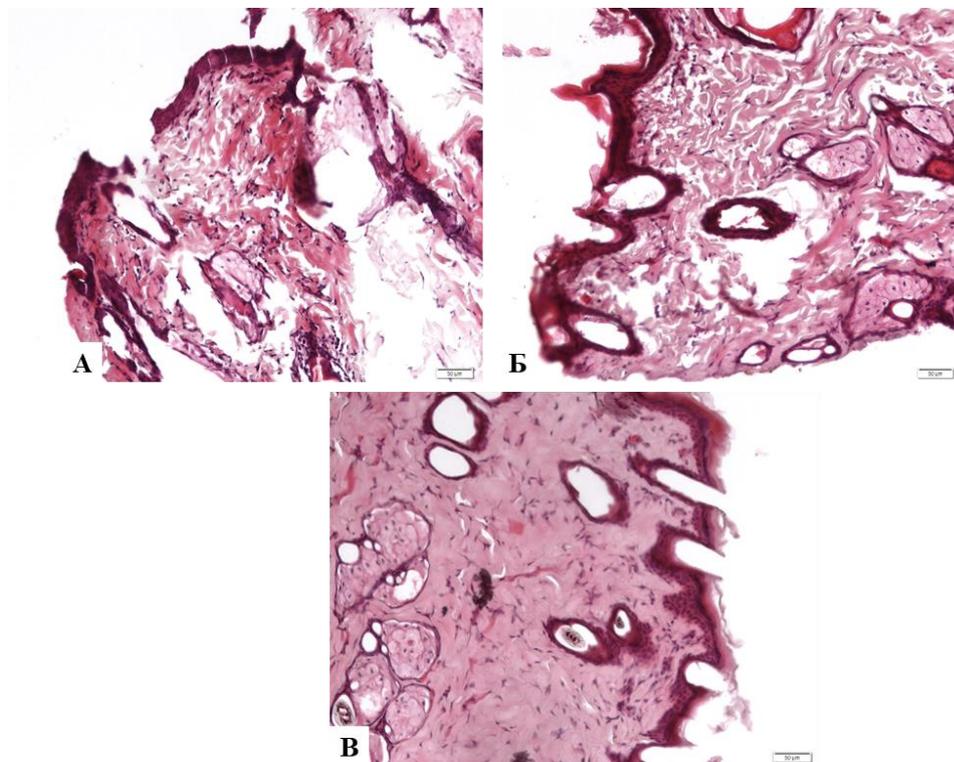


Рисунок 72 – Гистологическая картина ожоговых ран на 14-е сутки: А – контрольная группа, без лечения; Б – группа сравнения, мазь «Левомеколь»; В – опытная группа, дермальный гидрогель. Морфологические отличия практически отсутствуют. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$

На 14-е сутки после нанесения раны во всех группах животных макроскопический визуальный результат репаративной регенерации был также морфологически неотличим друг от друга вне зависимости от используемого экспериментального лечения.

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

Важная роль в процессах восстановления кожных покровов принадлежит тучным клеткам, способным выделять различные медиаторы, протеазы, цитокины и факторы роста, что ведет к подавлению активного воспаления и переходу процесса в стадию пролиферации за счет усиления ангиогенеза и привлечения фибробластов. При заживлении ран наблюдается постепенная дегрануляция тучных клеток с выделением биологически активных веществ [Т.М. Черданцева и соавт., 2012]. Поэтому для оценки влияния дермального гидрогеля на процесс восстановления кожных покровов были исследованы морфофункциональные особенности тучных клеток в раневом ожоговом регенерате у крыс трех экспериментальных групп (таблица 12, рисунок 73).

Таблица 12 – Степень дегрануляции и количество тучных клеток в образцах тканей экспериментальных групп

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

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

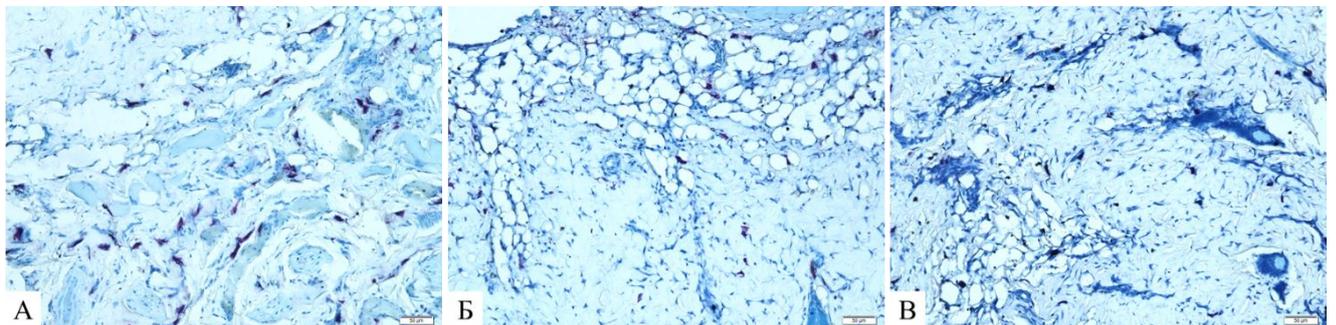


Рисунок 73 – Тучные клетки в образцах тканей экспериментальных групп на 7-е сутки: А – контрольная группа, без лечения; Б – группа сравнения, мазь «Левомеколь»; В – опытная группа, дермальный гидрогель. Толуидиновый синий. Ув. ×200

Исследование показало, что во всех исследуемых группах наблюдалось уменьшение числа тучных клеток при одновременном снижении степени их

дегрануляции на 7-е и 14-е сутки. При этом при обработке ожоговых ран дермальным гидрогелем к 7-м суткам экспериментального лечения степень дегрануляции снизилась на 63,2 % и 38,3 % относительно контрольной группы и группы сравнения соответственно ($p < 0,05$).

Известно, что при использовании коллагенсодержащих раневых покрытий коллаген способен обратимо связывать факторы роста, защищая их от протеолиза [Т.М. Черданцева и соавт., 2012], с этим фактом возможно связать уменьшение функциональной активности тучных клеток в опытной группе в результате лечения дермальным гидрогелем.

Проведение иммуногистохимического анализа позволило выявить биохимические особенности динамики восстановления компонентов ВКМ кожи в различных группах (таблица 13).

Таблица 13 – Динамика восстановления компонентов ВКМ кожи в образцах тканей экспериментальных групп

Группа	1-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
Коллаген I типа, КПО, %			
Контрольная группа	15,2 ± 2,2	28,0 ± 2,4 [^]	45,5 ± 3,1 [^]
Опытная группа	13,4 ± 1,9	24,9 ± 2,4 [^]	36,2 ± 2,4* [#] [^]
Группа сравнения	14,1 ± 1,5	26,7 ± 1,8 [^]	41,7 ± 1,1* [^]
Коллаген IV типа, КПО, %			
Контрольная группа	0	3,2 ± 0,2 [^]	4,3 ± 1,5
Опытная группа	0	3,8 ± 0,8* [^]	4,5 ± 0,9
Группа сравнения	0	2,8 ± 1,2 [^]	3,9 ± 0,6
Фибронектин, КПО, %			
Контрольная группа	0,5 ± 0,03	2,5 ± 0,04 [^]	5,2 ± 0,5 [^]
Опытная группа	0,3 ± 0,01	2,8 ± 0,03 [^]	4,8 ± 1,2 [^]
Группа сравнения	0,4 ± 0,01	2,6 ± 1,1 [^]	5,0 ± 0,8 [^]

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

В восстановлении основного белка ВКМ – коллагена I типа наблюдалась положительная динамика во всех исследуемых группах, при этом на 14-е сутки в опытной группе КПО был ниже, чем в контрольной группе и группе сравнения, что может негативно влиять на биомеханические свойства кожи, но также

способствовать ингибированию образования келоидных рубцов в области нанесения раны.

Оценка содержания нефибриллярного белка базальных мембран коллагена IV типа показала, что во всех группах произошло восстановление данного параметра до нормальных значений. Следует отметить сходную картину в увеличении КПО фибронектина во всех группах, который является адгезионным белком к коллагенам ВКМ и эпителиальными клетками.

В группе без лечения к 7-м суткам на фоне стихающего воспаления отмечалась регенерация эпидермиса в виде мелких кластеров, дающих положительную реакцию с антителами к эпидермальному цитокератину. К этому же сроку в группе сравнения пролиферирующий эпителий формировал сплошные пласты на поверхности раны с незначительными явлениями паракератоза (рисунок 74).

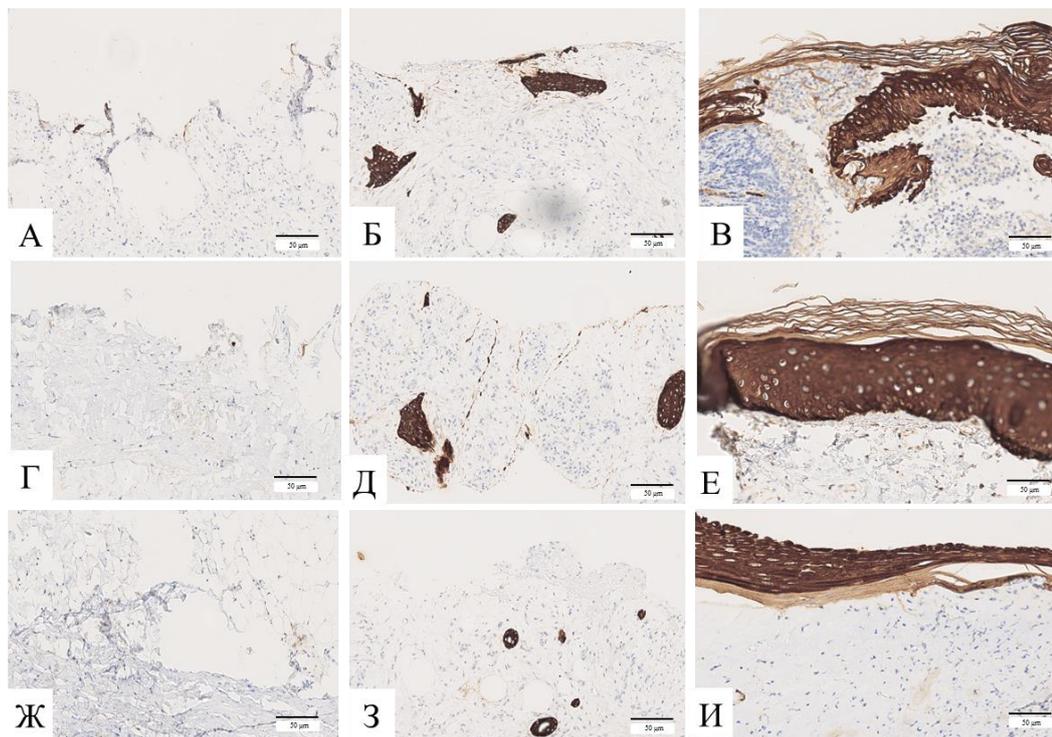


Рисунок 74 – Динамика содержания цитокератина после нанесения ожоговой раны у экспериментальных животных: А–В – образцы кожи из области раны на 3-е, 7-е, 14-е сутки в контрольной группе, соответственно; Г–Е – образцы кожи из области раны на 3-е, 7-е, 14-е сутки в опытной группе (лечение дермальным гидрогелем), соответственно; Ж–И – образцы кожи из области раны на 3-е, 7-е, 14-е сутки в группе сравнения, соответственно.

Иммуногистохимическая реакция. Ув. ×200

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

Таким образом, благодаря своим биоактивным свойствам, полученный нами дермальный гидрогель способствовал ускоренному заживлению ожоговых ран, что коррелирует с данными исследователей при изучении коллагенсодержащих ранозаживляющих покрытий. Простота и низкая себестоимость технологии получения дермального гидрогеля делают его потенциально перспективным и конкурентоспособным отечественным биологическим материалом для заживления ран.

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

Одним из основных медиаторов воспаления, вырабатываемых инфильтрирующими фагоцитами и резидентными клетками, способствующим дальнейшему хемотаксису и активации других элементов воспаления в области раны, является IL1. В ходе сравнительного анализа уровней провоспалительного цитокина IL1 β было выявлено, что после нанесения ожоговой раны значение данного параметра повышалось в экспериментальных группах относительно контрольной группы (рисунок 75). 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, что можно объяснить выраженным противовоспалительным эффектом компонентов дермального гидрогеля (таблица 14).

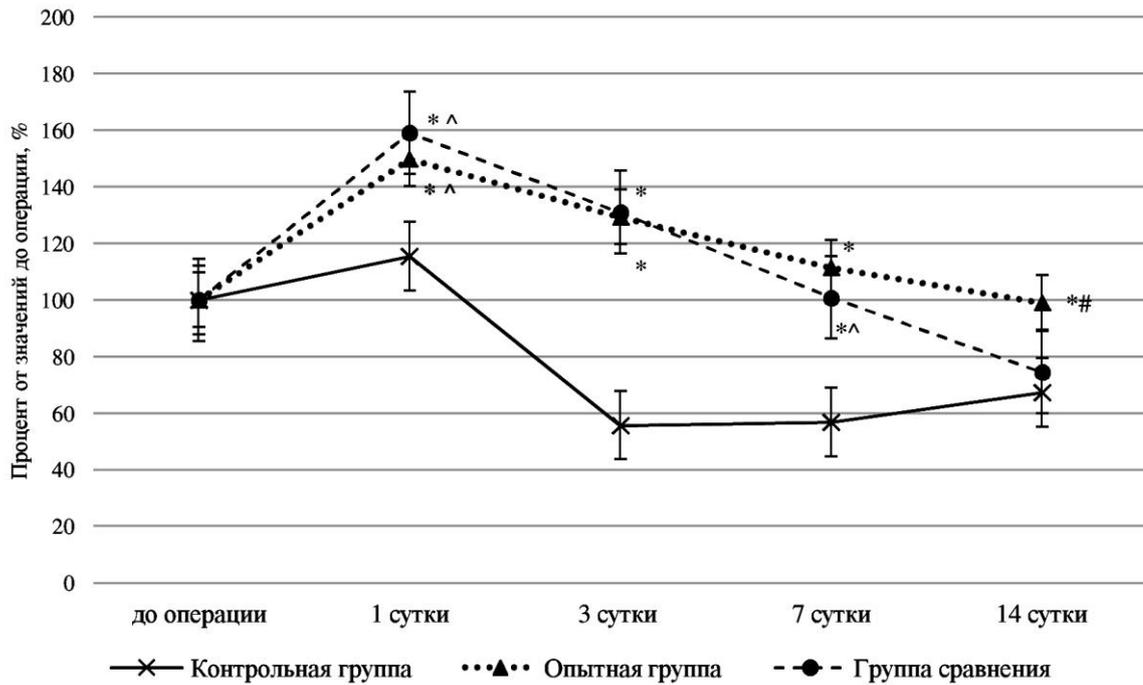
IL1 β 

Рисунок 75 – Относительное изменение уровней IL1 β при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, 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

Таблица 14 – Медианные значения концентраций про- и противовоспалительных цитокинов в динамике при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс (Me [Q₁; Q₃])

Сроки \ Группы	До операции	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки
1	2	3	4	5	6
IL1β, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	2976 [2967; 3000,5]	1435 [1428,75; 1498,25]	1467 [1450,75; 1491,5]	1733 [1708; 1750,5]	2577 [2569,05; 2626]
Опытная группа (n = 20)	2559 [2552,5; 2601,75]	2210,5 *^ [2200,75; 2226,25]	1909* [1895; 1924,25]	1696* [1690; 1755,75]	1709*# [1695,75; 1739,25]
Группа сравнения (n = 20)	3137 [3126,75; 3157,25]	2581,1 *^ [2574,75; 2592]	1998* [1981,5; 2046,75]	1468 *^ [1464,5; 1504]	1973 [1962; 2012,25]
IL6, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	1312 [1288,5; 1320,75]	1346 [1318,75; 1355,75]	1022,6 [1000,5; 1044,5]	873,55 [858,25; 888,75]	594 [586,75; 601,75]

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6
Опытная группа (n = 20)	458 [449,75; 475,25]	530 [526,75; 545,25]	961 *^ [942,75; 970,75]	1185 *^ [1159,25; 1197,25]	973*^ [960; 981]
Группа сравнения (n = 20)	403,25 [382,5; 431]	378 [362,25; 398,75]	988 *^ [978; 1002,25]	1162,35 *^ [1154; 1171,5]	756,2*^ [740,25; 770,25]
IL8, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	52,0 [40,5; 67,1]	255,7^ [229,0; 283,5]	0,0^ [0,0; 0,0]	47,0 [29,5; 69,0]	60,7^ [35,8; 84,0]
Опытная группа (n = 20)	27 [14,5; 31]	12*^ [6,75; 17]	0,0^ [0,0; 0,0]	0,0*# [0,0; 0,0]	74 *^# [47,5; 96,25]
Группа сравнения (n = 20)	10 [6; 13]	15* [9,75; 16]	0,0^ [0,0; 0,0]	65*^ [57,5; 77,75]	60*^ [53,75; 71,5]
TNFα, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	38 [29,5; 49]	36 [16,5; 44,5]	9^ [6,5; 11,25]	33 [27; 40,5]	9 [6,25; 10]
Опытная группа (n = 20)	12 [8,5; 13]	31*^ [19,5; 45,25]	32*# [28,75; 40]	10*# [7,5; 10,25]	40* [39,75; 41]
Группа сравнения (n = 20)	35 [32; 42]	111* [104; 124,75]	9^ [5,75; 10,25]	208*^# [206; 217,5]	185*^# [177,25; 192]
IL4, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	100 [95; 112,75]	492^ [474,75; 501]	222,5 [212,75; 236,5]	216,5 [197,5; 221,75]	206,5 [202,2; 211,5]
Опытная группа (n = 20)	102 [95; 114,25]	156,5* [141,5; 166]	524,5*^# [519; 531,25]	406,4*^ [397,25; 412]	191,2^ [187,1; 201,4]
Группа сравнения (n = 20)	131 [121,25; 138,75]	135* [120,75; 143,5]	184,5*^ [177,5; 198,25]	421*^ [411; 429,25]	187,2*^ [186; 201,25]
IL10, пг/мл					
Контрольная группа (n = 20)	2317 [2231; 2393,25]	667^ [584,75; 686]	1041,5 [942,25; 1105,75]	875 [783; 970,5]	696,5 [700; 709,5]

Окончание таблицы 14

1	2	3	4	5	6
Опытная группа (n = 20)	1717,5 [1599; 1751,5]	246,5* [^] [138,25; 344,5]	798 [666,25; 857,75]	1151,5* [#] [1071,75; 1219,25]	1928* ^{^#} [1930; 1944]
Группа сравнения (n = 20)	1314 [1217,75; 1359,75]	253,2* [^] [176; 327,75]	605,5 [541,5; 698,75]	2203,8* [^] [2101,75; 2244,5]	992,5* [^] [985; 992,8]

* – $p < 0,05$, 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.

Необходимо отметить, что относительное снижение уровня $IL1\beta$ на всех сроках исследования в контрольной группе было выраженным по отношению к группам с лечением дермальным гидрогелем и мазью «Левомеколь», что обусловлено терапевтическими эффектами препаратов и коррелирует с данными гистологического анализа (см. раздел 8.1). К 14-м суткам относительные показатели $IL1\beta$ в контрольной группе и в группе сравнения не отличались ($p > 0,05$) и были ниже значений опытной группы ($p < 0,05$), что может говорить о выраженном противовоспалительном эффекте и пролонгированном действии гидролизатов коллагена и компонентов ВКМ, являющихся основой дермального гидрогеля.

Следующим провоспалительным цитокином, для которого был проведён сравнительный анализ динамики в ходе эксперимента, был $IL6$ (рисунок 76). Известно, что при повреждении тканей в ранние сроки индуцируется синтез $IL6$, которые способствует активации острофазовых иммунных реакций. В нашем исследовании были выявлены значительные относительные повышения уровней данного цитокина на 3-и – 14-е сутки эксперимента в опытной группе и группе сравнения относительно контрольной группы ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно), при этом на 14-е сутки по отношению к дооперационному состоянию наблюдалась стабилизация уровней $IL6$ в группе животных подвергавшихся лечению (970,2 [812,4; 1023,8] пг/мл против 450,5 [329,8; 497,2] пг/мл при лечении дермальным гидрогелем, $p < 0,05$; 756,2 [587,8; 783,6] пг/мл против 403,2 [389,2; 536,8] пг/мл в

группе сравнения, $p > 0,05$). Характер изменения концентраций ИЛ6 может быть обусловлен его хемотаксическими свойствами по отношению к нейтрофилам на ранних сроках репарации и к макрофагам на более поздних стадиях заживления ожоговой раны.

При сравнении различных групп не было выявлено значимой разницы на 3-и, 7-е и 14-е сутки у крыс с лечением дермальным гидрогелем, а также в группе сравнения по отношению к контрольной группе, что свидетельствовало о более физиологичном затухании воспалительных процессов в группах с экспериментальным лечением, так как у крыс, не получавших лечения не было отмечено повышений уровня провоспалительного ИЛ6 на всём протяжении эксперимента.

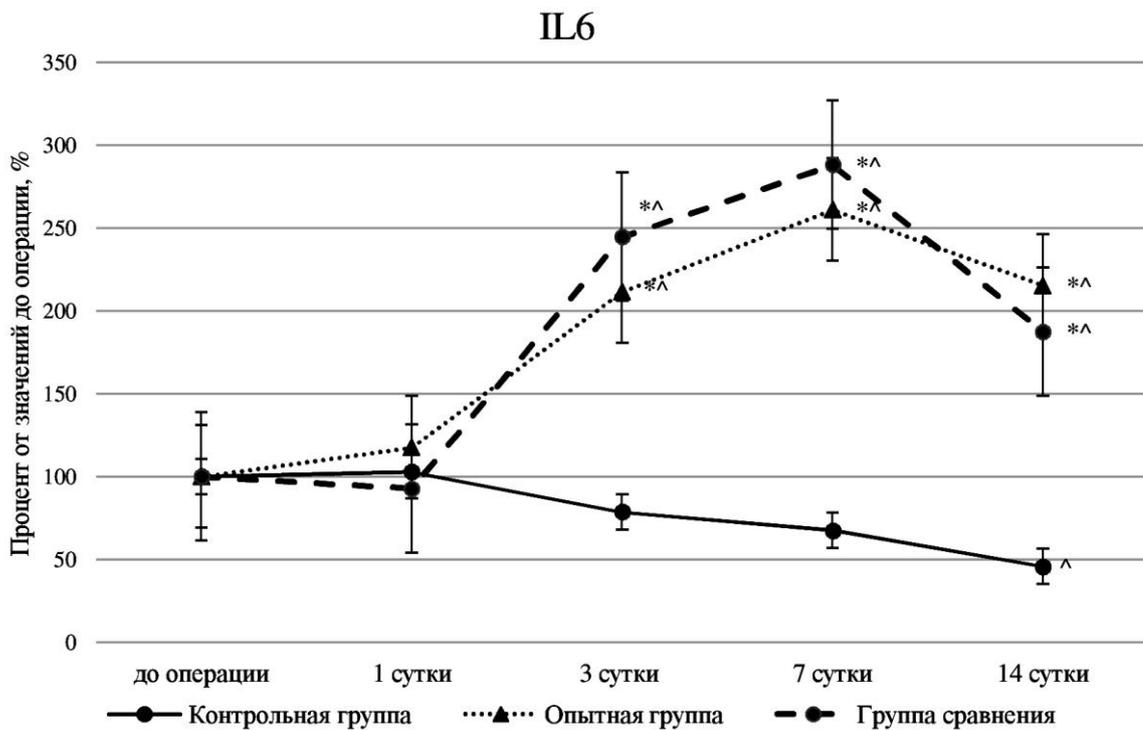


Рисунок 76 – Относительное изменение уровней ИЛ6 при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента приняты за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Типичный провоспалительный цитокин и хемоаттрактант для первых участников воспалительного процесса – нейтрофилов – ИЛ8 значительно повышался

на 1-е сутки после нанесения экспериментальной раны только в контрольной группе (рисунок 77). Внесение традиционной и экспериментальной лечебной терапии оказало значимое влияние на уровень данного цитокина в течение 3-х суток репаративного процесса.

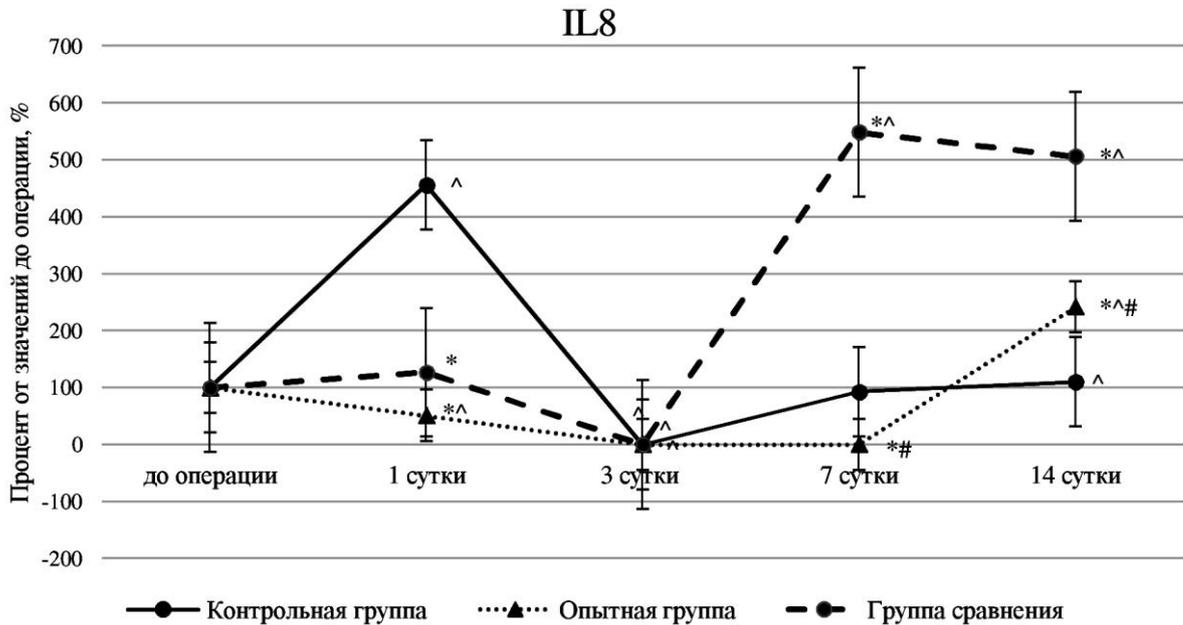


Рисунок 77 – Относительное изменение уровней IL8 при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о разнице во влиянии дермального геля на основе гидролизатов коллагена на поздние сроки заживления, так как динамика изменения уровня IL8 в группе сравнения значимо отличалась по отношению к контрольной и опытной группе на 7-е и 14-е сутки после нанесения ожоговой раны. Таким образом, внесение компонентов ВКМ способствовало негативной регуляции в отношении роста концентрации хемоаттрактанта IL8 на более поздних сроках заживления и обеспечивало затухание воспаления.

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

отличаются по отношению к контрольной группе и демонстрируют способность вносимых препаратов влиять на регуляцию воспалительного ответа, тем самым оптимизируя сроки эпителизации (рисунок 78). Кроме того, динамика изменения концентраций TNF α в экспериментальных группах не коррелировала с другими провоспалительными цитокинами – IL1 β , IL6 и IL8.

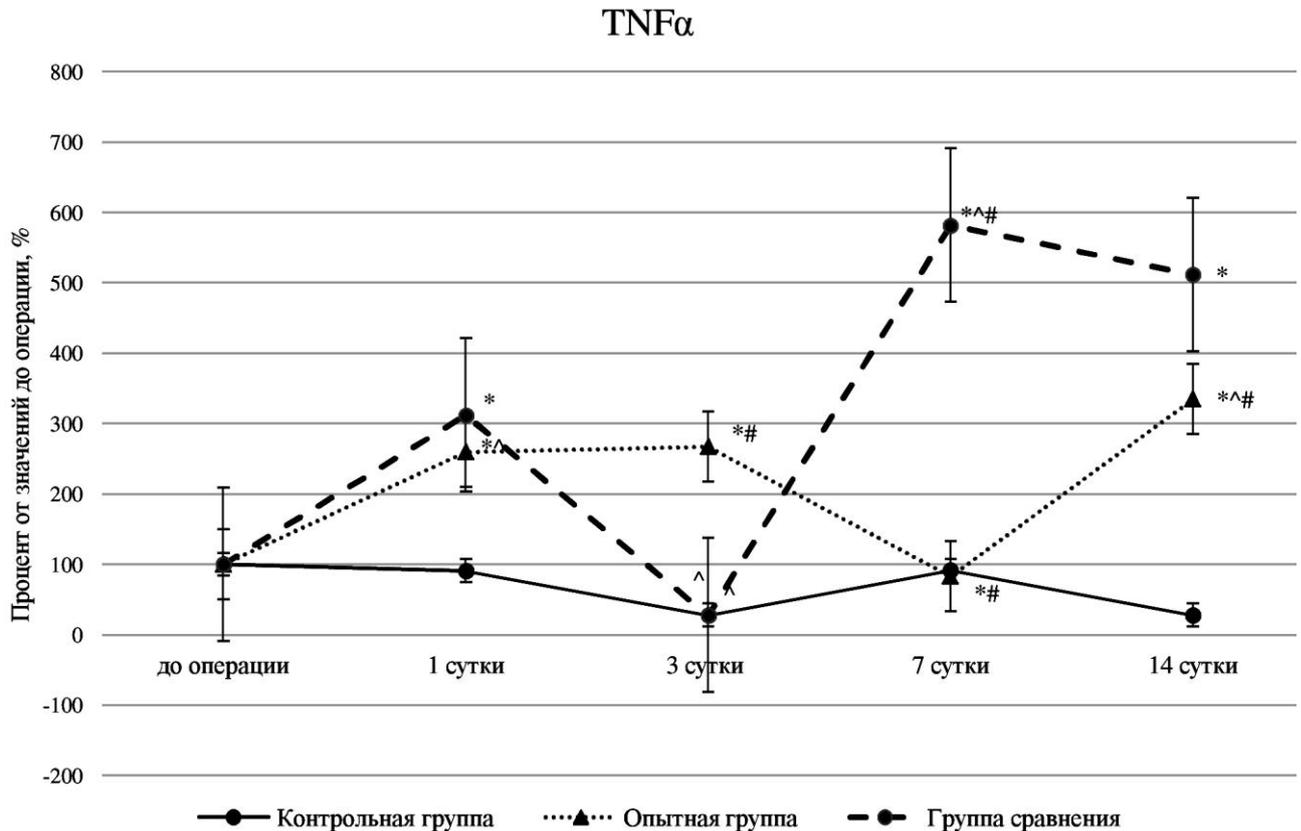


Рисунок 78 – Относительное изменение уровней TNF α при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

В 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 и опытной группы было выше по отношению к контрольной группе. В опытной группе на 7-и сутки наблюдалось снижение концентрации TNF α в отличие от предыдущего срока исследования ($p < 0,05$), 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 сроки заживления в экспериментальных группах были меньше, чем в группе без лечения, то данная тенденция может иметь регуляторное значение.

Следующим этапом исследования была сравнительная оценка уровней противовоспалительных цитокинов на различных сроках экспериментального лечения ожоговой раны. Для изучения процесса восстановления кожи необходимо учитывать вклад типичного противовоспалительного цитокина IL4, т.к. изменения его уровня влияют как на ранние, так и на поздние стадии восстановления. Изменение уровней противовоспалительного фактора IL4 продемонстрировало его положительное влияние на динамику заживления раны, так как он значительно повысился на первые сутки исследования, а затем к 14-м суткам не оказывал влияния в группе крыс, не получавших лечения (рисунок 79). В группе сравнения наблюдалось самое позднее повышение уровня IL4, он был значимо выше контрольной группы на 7-е сутки эксперимента. На стадии ремоделирования и активного коллагеногенеза (вторая неделя после нанесения раны) IL4 активно синтезировался в опытной группе, но не достиг значения первых суток после нанесения раны.

Основным противовоспалительным маркером для сравнительной оценки процессов заживления ожоговой раны был IL10. Анализ полученных данных о концентрациях IL10 показал, что группа лечения дермальным гидрогелем и группа лечения мазью «Левомеколь» не имели значимых различий на 1-е и 3-и сутки исследования (рисунок 80). 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-и сутки по сравнению с первым днем лечения. При лечении дермальным гидрогелем наблюдалось сначала снижение концентрации IL10, затем к 7-м суткам её увеличение и стабилизация на 14-е сутки эксперимента.

IL4

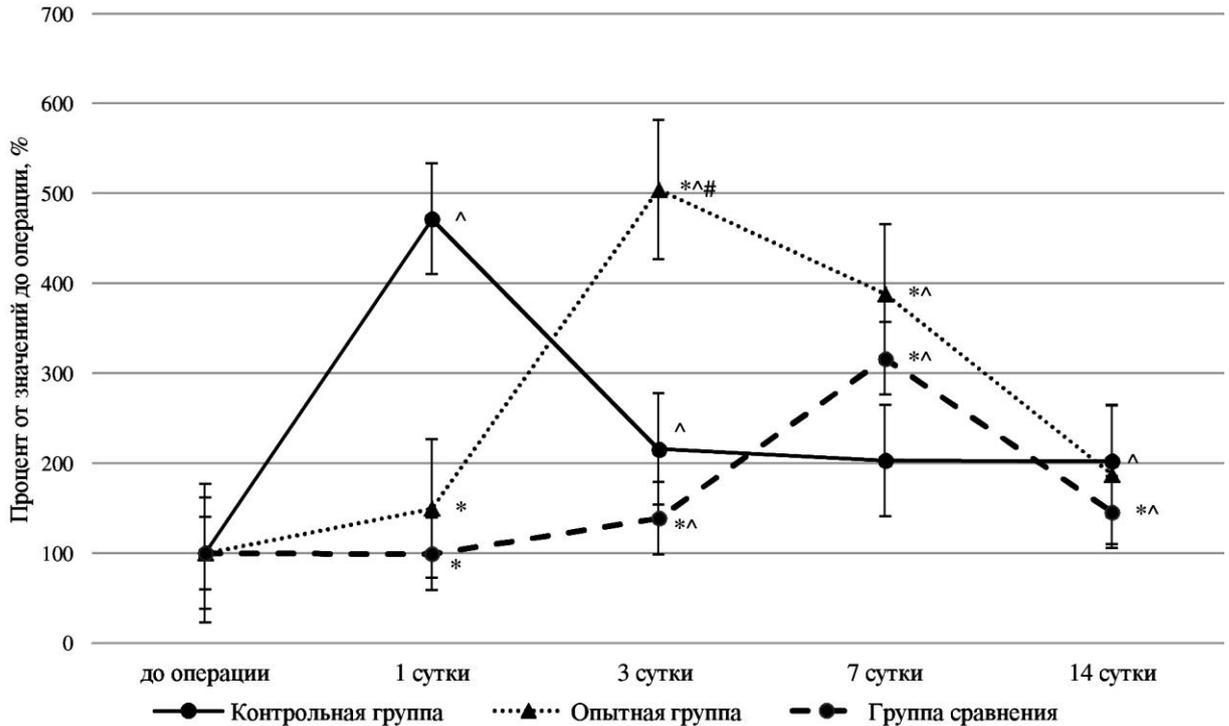


Рисунок 79 – Относительное изменение уровней IL4 при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента приняты за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

IL10

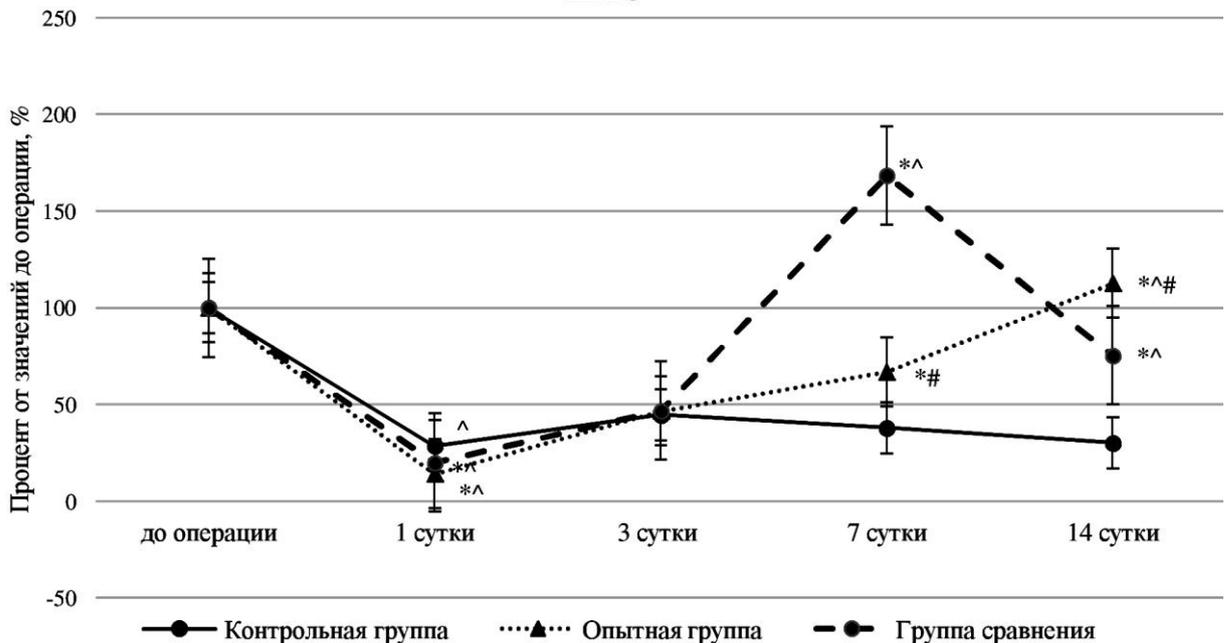


Рисунок 80 – Относительное изменение уровней IL10 при лечении ожоговых ран крыс в динамике (значения до эксперимента приняты за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Дополнительное внесение дермального гидрогеля позволило значительно улучшить количество синтеза IL4 на 3-и сутки, но не способствовало процессам заживления на 14-е сутки, так как наблюдалась отрицательная динамика изменения его концентрации, как и в группе сравнения, при этом относительные значения не отличались от контрольной группы на 14-е сутки эксперимента.

Таким образом, в ходе сравнительного анализа уровней провоспалительных цитокинов (IL1 β , IL8) были показаны выраженные противовоспалительным эффекты компонентов дермального гидрогеля. Внесение экзогенных биологических компонентов ВКМ-коллагена и его гидролизатов, гиалуроновой кислоты и др. оказали значительное влияние на регуляцию синтеза противовоспалительных цитокинов, что, вероятно, способствовало оптимизации сроков успешной эпителизации и заживления раны.

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

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

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

При проведении сравнительного анализа изменения уровня PDGF было выявлено, что под действием провоспалительных цитокинов его концентрации во

всех группах снижались, причём наиболее выраженное снижение на 1-е сутки наблюдалось в контрольной группе (рисунок 81).

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 дермального гидрогеля и мази «Левомеколь».

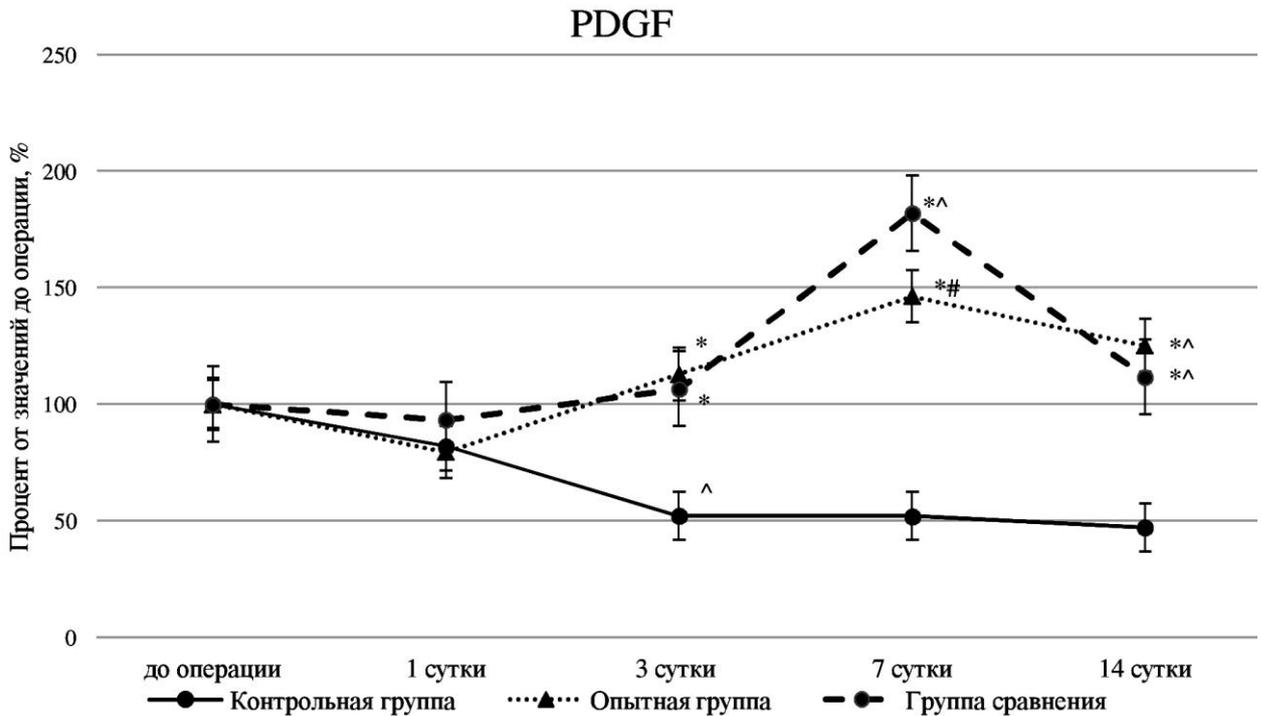


Рисунок 81 – Относительное изменение уровней PDGF при лечении поверхностных ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

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 отсутствию 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; $p < 0,05$).

При определении уровня VEGF наблюдался пик его повышения в группе лечения дермальным гидрогелем и мазью «Левомеколь» на 1-е сутки эксперимента в отличие от контрольной группы ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно) (рисунок 82). Повышение уровня VEGF ассоциировано с активным ангиогенезом и согласуется с динамикой увеличения уровня PDGF на 3-и сутки экспериментального лечения. Кроме того, наблюдалась схожая тенденция в контрольной группе, где не было выявлено периодов активного синтеза VEGF, как и PDGF.

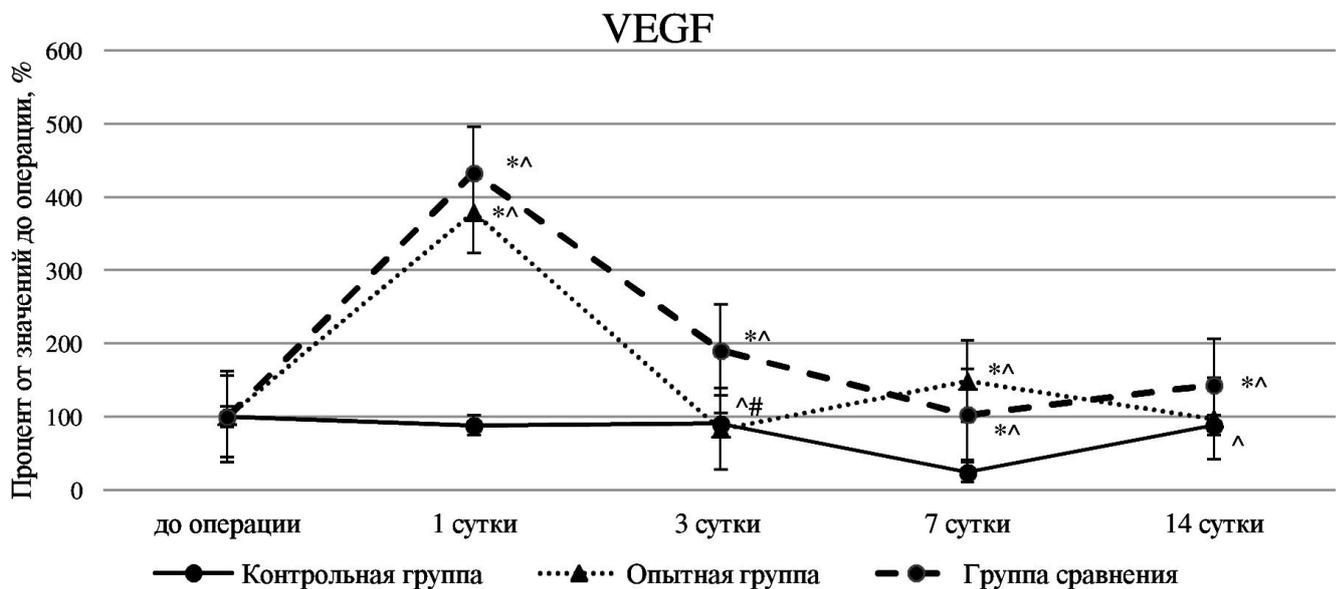


Рисунок 82 – Относительное изменение уровней VEGF при лечении поверхностных ран крыс в динамике (значения до эксперимента приняты за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

На 14-е сутки процесс неоангиогенеза был завершён, что демонстрировали уровни VEGF, которые в опытной группе не отличались от значений, полученных до начала эксперимента, а в группе были незначительно выше (на 44 %; $p < 0,05$).

Анализ профилей TGF β 1 продемонстрировал значительное влияние внесения экзогенных биополимеров на процесс репарации (рисунок 83).

TGFβ1

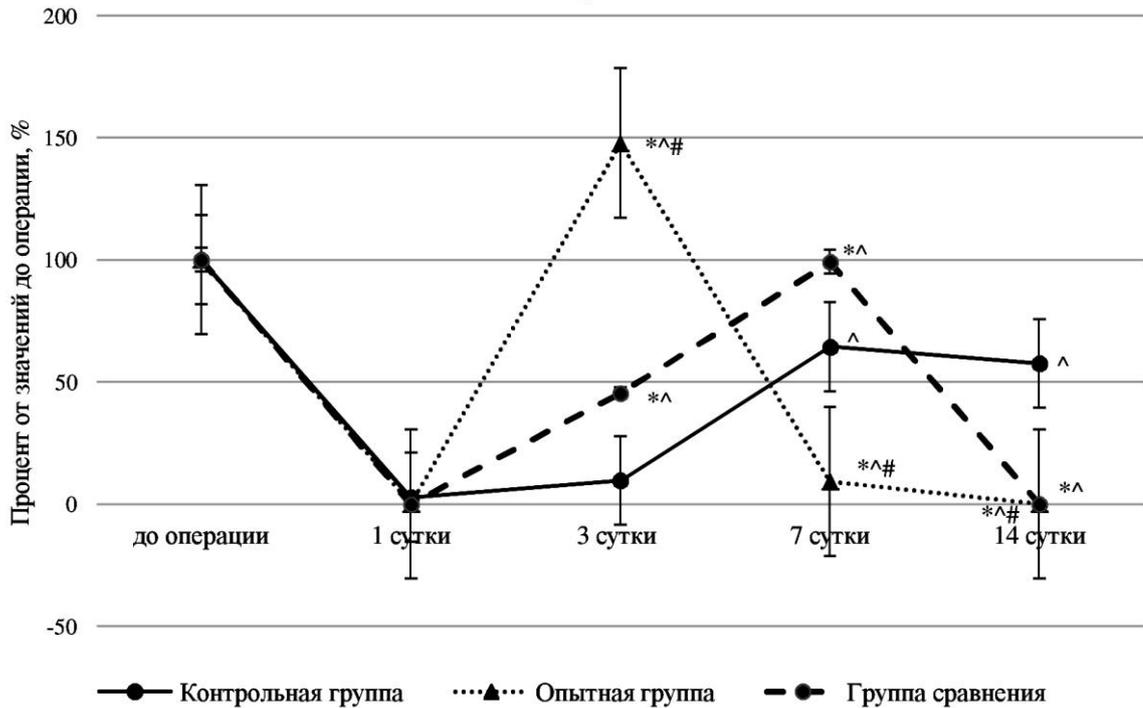


Рисунок 83 – Относительное изменение уровней TGFβ1 при лечении поверхностных ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Мы наблюдали 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 на 7-е сутки происходила активация синтеза TGFβ1 по сравнению с опытной группой, где пик синтеза наблюдался через трое суток экспериментального лечения, однако отличий группы сравнения с контрольной группой не наблюдалось, что может свидетельствовать о положительном влиянии внесения продуктов частичного гидролиза коллагена на процесс заживления раны.

Для демонстрации процессов синтеза и созревания коллагена в области ожоговой раны в ходе репарации был проведён сравнительный анализ изменения содержания уровней IGF1 (рисунок 84).

В группах с лечением происходил значительный рост его синтеза с 1-х по 3-е 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.

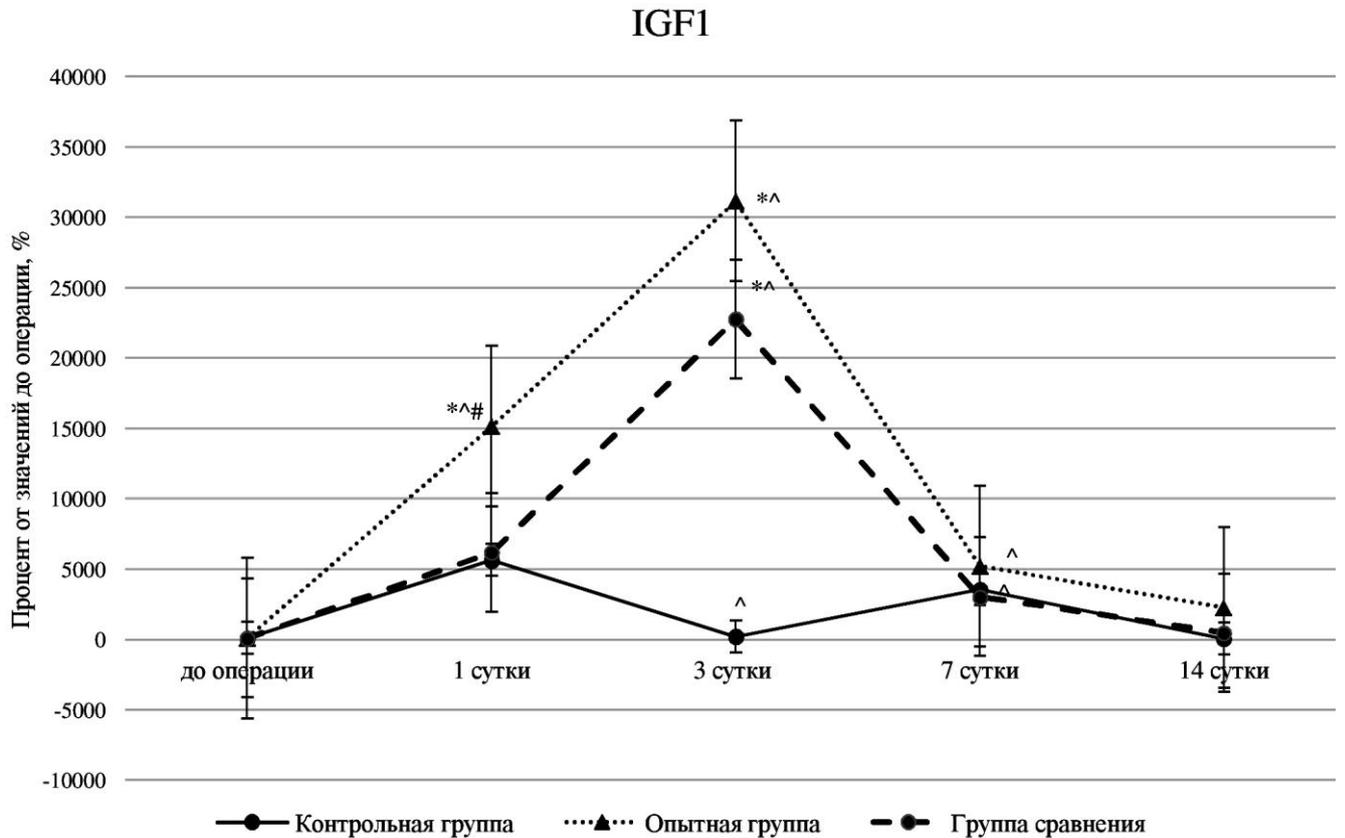


Рисунок 84 – Относительное изменение уровней IGF1 при лечении поверхностных ран крыс в динамике (значения до эксперимента принято за 100 %): * – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям контрольной группы; # – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к соответствующим значениям в группе сравнения; ^ – $p < 0,05$, различия значимы по отношению к значениям на предыдущем сроке в данной группе

Резюме

В проведенном исследовании была продемонстрирована эффективность использования дермального гидрогеля на основе внеклеточного матрикса дермы свиньи при экспериментальном лечении поверхностных ожоговых ран. При использовании дермального гидрогеля на ожоговых ранах животных в более краткие сроки наблюдалось полное восстановление кожи в поражённой области, было зарегистрировано большее количество фибробластов, а эпидермис был заметно утолщён относительно группы без лечения.

В ходе сравнительного анализа уровней провоспалительных цитокинов (IL1 β , IL8) были показаны выраженные противовоспалительным эффектами компонентов дермального гидрогеля. Внесение экзогенных биологических компонентов ВКМ-коллагена и его гидролизатов, гиалуроновой кислоты и др. оказали значительное влияние на регуляцию синтеза противовоспалительных цитокинов, что, вероятно, способствовало оптимизации сроков успешной эпителизации и заживления раны. Было выявлено потенциальное положительное влияние коллагенов на процессы эпителизации и их негативное влияние на формирование келлоидных рубцов по динамике изменения уровней факторов роста, контролирующих процессы синтеза и созревания коллагена в области ожоговой раны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Стоит отметить, что децеллюляризация может осуществляться по различным технологиям – с помощью физических, биологических и химических методов [D. Choudhury et al., 2020; M. Rabbani et al., 2021]. К физическим относятся методики с применением экстремальных температур (замораживание/оттаивание), механического давления, критических концентраций CO₂ и механического воздействия (перемешивания, измельчения). Эти методы в основном используются в качестве дополнительных методов для первичной обработки клеток, улучшения проникновения в ткань химических агентов децеллюляризации и облегчения удаления остаточных клеточных компонентов. К биологическим методам относится использование ферментов: дезоксирибонуклеаз, эндонуклеаз или трипсина [R.H. Fu et al., 2014]. К химическим – обработка тканей различными химическими агентами: ионными (додецилсульфатом натрия (ДСН)), неионными (тритоном X100) и цвиттер-ионными (CHAPS (сульфонатом 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-

1-пропана)) детергентами, кислотами (перуксусная кислота) и/или щелочами (гидроксид аммония, сульфид натрия, гидроксид натрия), хелатирующими агентами (ЭДТА), гипотоническими или гипертоническими растворами, спиртами (этанол, метанол) и растворителями [А.Н.А. Zahmati et al., 2017]. При этом все эти вещества по-разному влияют на ткани – кислоты разрушают нуклеиновые кислоты и солюбилизируют компоненты цитоплазмы, спирты дегидратируют клетки и удаляют остаточные нуклеиновые кислоты и липиды, щёлочи денатурируют ДНК, хелатирующие агенты нарушают взаимодействие ВКМ с интегринами, а детергенты – липидно-липидные и липидно-белковые взаимодействия в клеточных мембранах (ионные детергенты могут удалять ГАГ и факторы роста из ВКМ и оставлять в тканях остаточные ПАВ, поэтому предпочтение отдается неионным детергентам) [Н. Hrebikova et. al., 2015].

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

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

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

- 1) замораживание образцов при температуре -80°C на 72 часа, затем образец размораживали;
- 2) обработка раствором трипсин-Версена (в отношении масса образца к массе раствора 1 : 10) при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 6–18 часов;
- 3) последовательное циклическое воздействие растворами детергентов: 1 % раствора Тритона X-100 в течение 2–3 часов и 4 % раствора дезоксихолата натрия в течение 2–3 часов (количество и продолжительность циклов зависели от конечного применения биопластических материалов);
- 4) обработка раствором свиной панкреатической ДНКазы I 2000 ЕД в фосфатном буфере с кальцием и при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 4 часов.

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

Заживление ран представляет собой сложный динамический процесс, в котором взаимодействие между клетками, секреторными факторами и

компонентами ВКМ определяет судьбу процесса восстановления. В связи с этим разрабатываемые материалы для ухода за ранами обязательно должны обладать множеством функций и обеспечивать подходящую микросреду, обладая противомикробными, кровоостанавливающими, биореактивными и биомиметическими свойствами. Существует несколько подходов к решению данной проблемы. Традиционно используются биополимеры различного происхождения из-за их превосходной биосовместимости и биоактивности. Целлюлоза, альгинат, гиалуронат, коллаген и хитозан являются наиболее часто используемыми биополимерами, которые доминируют в современной индустрии ухода за ранами. Современные подходы включают разработки в области регенеративной медицины, которые предполагают использование каркасов на основе биополимеров, трехмерной искусственной кожи или эквивалентных заменителей, перевязочных материалов, содержащих лекарственные препараты или факторы роста и т.д. [H. Sha et al., 2010]. Кроме того, достижения в области нанотехнологий и биоинженерных методов, такие как биопечать и трехмерный электроспиннинг, позволяют создавать трехмерные каркасы или матрицы, имитирующие кожу с желаемым размером пор и пределом прочности [Y. Zhang et al., 2019; X. Zhang et al., 2015]. Это обеспечивает быстрое прикрепление и вращение клеток, адекватный обмен питательными веществами и факторами роста.

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

Недостатком применения синтетических материалов является их микропористость и связанная с этим опасность инфицирования. В них легко попадают микроорганизмы (диаметр стафилококка порядка 1 мкм) и не могут

попасть макрофаги (диаметр 18–35 мкм) и лейкоциты (15–20 мкм). Поэтому фагоцитоз внутри таких эксплантатов затруднен, что создает опасность их нагноения и отторжения. Также использование синтетических материалов может приводить к значительному увеличению интенсивности и продолжительности болевого синдрома, чувства дискомфорта и ограничению двигательной активности пациента в отдаленном послеоперационном периоде.

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

Полученные нами результаты позволили дать характеристику разработанному биопластическому материалу – АДМ. Децеллюляризованный матрикс обладал биосовместимостью на тканевом уровне, вызывал слабую воспалительную реакцию, при этом не образовывалась соединительнотканная капсула, отграничивающая матрикс от окружающих тканей. Полученные данные продемонстрировали, что толщина вновь сформированной дермы была сопоставима в участках закрытых исследуемым раневым покрытием (АДМ, засеянный аллогенными дермальными фибробластами) и аутодермопластикой – $1962,1 \pm 56,3$ мкм и $1738 \pm 67,9$ мкм соответственно ($p > 0,05$). Результаты

проведенного исследования эффективности применения АДМ, засеянного аллогенными фибробластами свиньи соответствуют литературным данным о том, что клеточная терапия с использованием аллогенных клеток имеет высокую терапевтическую ценность при заживлении ожоговых ран. Первоначально существовала некоторая путаница в отношении того, как проявляются ранозаживляющие эффекты аллогенных клеток. Стало ясно, что аллогенные клетки не прикрепляются и не покрывают рану постоянно, а вскоре замещаются собственными клетками реципиента. В частности, аллогенные клетки способствуют миграции и пролиферации клеток из ложа и краев раны, где они высвобождают факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса и базальной мембраны. В конечном счете, роль аллогенных клеток в процессе заживления раны заключается в ускорении эпителизации краев раны и содействии образованию грануляций из раневого ложа [H.J. You et al., 2014; А.И. Зорина и соавт., 2011; Е.И. Шишацкая и соавт., 2013].

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

[N. Poornejad et al., 2016, N. Li et al., 2018; G. Broderick et al., 2012; R.N. Chen et al., 2004]. В процессе децеллюляризации тканей получают лишенные антигенов каркасы, состоящие из внеклеточного матрикса (ВКМ), основу которого составляют коллагены, эластин, сульфатированные и несulfатированные гликозаминогликаны [N. Poornejad et al., 2016]. Коллаген содержится во всех соединительных тканях организма более чем в 27 идентифицируемых типах [Z. Liu et al., 2010]. Типы I, II, III, V и XI образуют фибриллы и обнаруживаются в тканях, которые должны выдерживать механические нагрузки, таких как сухожилия, дерма, хрящи и кости [A.M. Eetema et al., 2004; L. Sen et al., 2008]. Стоит отметить, что молекулы коллагенов очень эластичны и прочны (предел прочности порядка 1×10^9 Н/м²), а их волокна принимают на себя основную нагрузку, и, как следствие, существенно влияют на механические характеристики децеллюляризованных тканей [J.C. Coburn et al., 2007]. Изменение диаметра волокон, длины и молекулярной упаковки позволяет максимально использовать прочность коллагена, при этом изменять общие свойства ткани в соответствии с требованиями применения [M.J. Buehler et al., 2006, C.N. Grover et al., 2012]. Соединительным тканям свойственно изменять биомеханические характеристики в зависимости от стадии и исхода процесса заживления: рубцовая ткань, представляющая собой толстые коллагеновые волокна, сложенные в оформленные тяжи, обладает худшими прочностными характеристиками по сравнению со здоровой тканью [И.М. Петрова и соавт., 2022; D.T. Corr et al., 2009; 2013]. Таким образом, различные методы обработки дермы могут привести к различным изменениям биомеханических свойств, что было показано в данном исследовании.

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

2012]. Тем не менее, вследствие разрыхления коллагеновых пучков и, тем самым, нарушения их структурированности, значения всех биомеханических характеристик снижались, так как известно, что, пока площадь поперечного сечения волокна будет практически неизменной, предел прочности при растяжении будет постоянным [J.C. Coburn et al., 2007]. Полученные нами данные о биомеханических характеристиках дермы соответствуют литературным данным о прочностных характеристиках ткани белой линии живота у человека, при этом значения параметра деформация на разрыв были выше, чем установлено для передней брюшной стенки *ex vivo* (~16 %) [C.R. Deeken et al., 2017]. Гистологический анализ образцов Permacol™ показал, что они имели более плотную упаковку коллагеновых волокон, чем в нативной дерме, и меньшую площадь коллагеновых пучков, что делало его менее упругим, однако более устойчивым к применяемым в его отношении биомеханическим тестам, вследствие химической сшивки гексаметилендиизоцианатом [K.E. Mulier et al., 2011]. Таким образом, невозможно сделать однозначный вывод о позитивном влиянии использования сшивающего агента при создании дермальных материалов.

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

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

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

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

Наиболее перспективным материалом для лечения ран являются раневые повязки на основе гидрогелей, чья высокая терапевтическая эффективность в качестве ранозаживляющих средств доказывается положительными результатами многих исследований [K. Vott, 2010]. Известно, что гидрогели играют ключевую роль в доставке биоактивных молекул и клеточных продуктов в зону повреждения в отличие от других типов современных раневых покрытий, способствуют аутолизу некротических тканей, а их главное свойство заключается в их высокой степени гидратации, способствующей своевременному введению раны во влажную среду для обеспечения бактерицидного действия и создания оптимального микроклимата для ее заживления [G. Gainz et al., 2015; C.D. Bourke et al., 2015; A. Das et al., 2019; S.O. Ebhodaghe et al., 2022].

В настоящее время ведётся активный поиск наиболее «совершенного» коллагенсодержащего гидрогелевого покрытия, в связи с чем проводятся многочисленные исследования и разработки методик получения гидрогелей из различных типов тканей. Наиболее близким к разрабатываемому нами дермальному гидрогелю являлось исследование Калмыковой и соавт. [Н.В. Калмыкова и соавт., 2016], в котором получали внеклеточный матрикс из дермы крупного рогатого скота по нескольким методикам – обработкой с помощью 1М раствора NaOH и с помощью NaOH в меньшей концентрации с добавлением растворов Na_2SO_4 и H_3BO_3 с последующей лиофилизацией полученного материала. В результате обработки дермы получали лиофилизированный внеклеточный матрикс с высоким содержанием коллагена, однако для получения его гидрогелевой формы была необходима дополнительная стадия обработки. В другом исследовании Rodriguez F.T. et al. [F.T. Rodrigez et al., 2010] разрабатывали ранозаживляющий материал на основе дермы свиньи, обрабатываемой растворами концентрированных солей щелочных и

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

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

В проведенном исследовании при использовании дермального гидрогеля при лечении ожоговых ран на 14-е сутки наблюдалось полное восстановление кожи в поражённой области, было зарегистрировано большое количество фибробластов, а эпидермис был заметно утолщён относительно группы без лечения. Это подтверждается и данными других исследователей, например, H. Fujisaki et al. [H. Fujisaki et al., 2008], которые отмечали, что коллагеновые гидрогели, в основном коллаген IV и коллаген I, поддерживают адгезию, пролиферацию и рост фибробластов. Известно, коллаген оказывает положительное влияние на ранние этапы заживления ран, так как способствует агрегации тромбоцитов, стимулирует образование грануляционной ткани на месте

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

В проведенном исследовании была продемонстрирована эффективность использования дермального гидрогеля на основе внеклеточного матрикса дермы свиньи. Разработанный дермальный гидрогель позволяет эффективно защитить рану от бактериальной микрофлоры, ускорить заживление раны, а также создать оптимальные условия для активной регенерации в поражённой области. Дальнейшие исследования применения дермального гидрогеля в качестве терапевтического препарата для ран различной типологии позволит создать высокоэффективное ранозаживляющее средство, обладающее значительными преимуществами среди раневых покрытий.

Таким образом, по классическим представлениям ВКМ рассматривался как поддерживающая структура для стабилизации расположения клеток в тканях и сохранения архитектуры тканей. Эта концепция резко изменилась за последние несколько десятилетий с открытием того, что протеолитические фрагменты ВКМ оказывают глубокое влияние на структуру, жизнеспособность и функции клеток. Классические примеры взаимодействия ВКМ с клетками включают семейство рецепторов клеточной поверхности интегринов [V. Adorno-Cruz et al., 2019; L.E. de Castro Bras et al., 2020]. Однако существуют также взаимодействия, не основанные на интегине, так как домен лиганда в компоненте ВКМ может становиться биологически активным только после модификации ВКМ. Эти биоактивные домены получили название «матрикриптины», при этом

протеолитически высвобожденные фрагменты ВКМ с биологической активностью называются «матрикинами» [T.L. Adair-Kirk et al., 2008]. Считается, что многие свойства биологических матриксов на основе ВКМ обусловлены небольшими остатками скрытых пептидов в молекулах коллагена, которые вступают в действие после биodeградации или биосорбции исходной молекулы. Эти пептидные области называются криптическими пептидами, или криптидами. Протеолитический гидролиз белка ВКМ высвобождает криптические пептиды, которые включают ангиогенные, антимикробные, митогенные и хемотаксические свойства [P. Banerjee et al., 2016; J. Kumai et al., 2019].

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

Таким образом, биоимплантаты, получаемые из донорского материала животного (свиной ксенографт), представляют собой внеклеточный матрикс, включающий комплекс структурных и функциональных белков, объединенных в уникальную тканеспецифичную архитектуру. Помимо его ведущей роли в поддержании «каркаса» ткани он участвует в процессах передачи сигнала, регуляции роста клеток и их дифференцировки [Е.С. Новоселецкая и соавт., 2019]. При этом биопластические материалы на основе внеклеточного матрикса дермы способны индуцировать процесс, называемый «конструктивное ремоделирование» – формирование функциональной ткани соответственно в зоне имплантации. Однако, способность активизировать конструктивное ремоделирование во многом зависит от методов, применяемых для получения внеклеточного матрикса. Полученные в ходе нашего исследования результаты позволяют утверждать, что детергентно-энзиматическая обработка материала является универсальной, экономически целесообразной и доступной техникой децеллюляризации. Полученные биопластические материалы соответствуют таким характеристикам как биологическая совместимость, стимулирование коллагеногенеза и ангиогенеза, возможность прорасти окружающими тканями, быть гистологически инертными, сохранять мягкость и эластичность и не деформироваться в процессе заживления.

Выводы

1. Разработана оптимальная методика обработки дермы последовательным воздействием растворов детергентов (дезоксихолат натрия, тритон-Х100) и ферментов (трипсин, ДНКаза), позволяющая сохранить гистоархитектонику ВКМ плотной соединительной ткани. Коллагеновые пучки АДМ и нативной дермы достоверно не отличались друг от друга по толщине ($12,06 \pm 0,03$ против $12,02 \pm 0,02$ мкм) и упорядоченности; площадь коллагеновых пучков в образцах АДМ была ниже значений нативной дермы ($78,2 \pm 2,4$ против $89,2 \pm 1,9$ %).

2. Комплексная оценка АДМ показала, что остаточная концентрация ГК и сГАГ после детергентно-энзиматической обработки дермы составила $- 0,13 \pm 0,06$ и $37,6 \pm 2,1$ мкг/мг ткани соответственно. Разработанный биоматериал не обладает цитотоксичностью и иммуногенностью. Прочность на разрыв составила $9,1 \pm 0,6$ МПа, удлинение при разрыве $- 21,1 \pm 2,3$ %, модуль жесткости $- 50,0 \pm 1,6$ МПа, что соответствует данным коммерческих аналогов и нативной дермы.

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 различных раневых покрытий как при раннем, так и при этапном хирургическом лечении.

4. Оценка клиничко-гистологической картины позволила установить, что использование АДМ в качестве раневого покрытия при ожоговых ранах создает оптимальные условия для регенерации кожи, при этом были определены биохимические особенности динамики восстановления компонентов ВКМ кожи, обусловившие миграцию фибробластов, раннюю эпителизацию и отсутствие келоидных рубцов – высокие уровни виментина, цитокератина и низкие темпы ресинтеза коллагена I типа, отсутствие динамики в уровнях коллагена IV типа и фибронектина.

5. Морфологические особенности биоинтеграции АДМ заключались в формировании в месте имплантации плотной соединительной ткани, содержащей

коллаген I типа, фибробластоподобные клетки и эндотелиоциты и в отсутствии воспалительных изменений, что подтверждает целесообразность его использования в качестве фиксирующего материала в реконструктивной пластической хирургии.

6. Разработана оптимальная методика химической обработки дермы 5 % раствором гидроксида натрия, позволяющая получить гидрогелевый материал на основе гидролизованного коллагена внеклеточного матрикса дермы.

7. Оценка биологических характеристик полученного гидрогелевого материала показала отсутствие цитотоксичности, общей и местной токсичности при гетеротопических имплантациях, а также возможность адгезии и пролиферации клеток при инкубации *in vitro*.

8. Определены биохимические особенности динамики восстановления компонентов ВКМ кожи при внесении дермального гидрогеля: ранняя эпителизация, накопление цитокератина на 7-е сутки после нанесения раны было в 2 раза выше (0,7 [0,4; 1,2] против 1,4 [1,3; 1,6]), чем в контрольной группе, темпы ресинтеза коллагена I типа были ниже, чем в группе животных без лечения; отсутствие влияния на динамику уровней коллагена IV типа и фибронектина.

9. При нанесении дермального гидрогеля в зону альтерации ожоговой раны в сыворотке крови на 1-е сутки был отмечен рост концентраций IL1 β и TNF α , на 3-и и 7-е сутки – IL6, уровни IL8 значимо не изменялись на протяжении всего эксперимента, в отношении противовоспалительных факторов наблюдалась уменьшение концентрации IL10 на 1-е и 7-е сутки, рост количества IL4 на 3-и сутки по сравнению с группой без лечения. С 1-х суток после нанесения раны происходил рост уровней VEGF, с 3-их суток – уровня PDGF в группах с экспериментальным лечением, снижение уровня TGF β 1 на 1-е сутки раневого процесса во всех группах, а также повышение уровня VEGF и PDGF на 3-и сутки экспериментального лечения.

Практические рекомендации

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

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

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2D – двумерный

3D – трехмерный

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

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

IGF – инсулиноподобный фактор роста (insulinelike growth factor)

NTIRE – нетермическая необратимая электропорация

PCL – поликапролактон

PDGF – фактор роста тромбоцитов (platelet derived growth factor)

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

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

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

АДМ – ацеллюлярный дермальный матрикс

БАВ – биологически активные вещества

БПМ – биопластический материал

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГАГ – гликозаминогликаны

ГК/ГА – гиалуроновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – додецилсульфат натрия

ДМСО – диметилсульфоксид

КПО – коэффициент площади окрашивания

КРС – крупный рогатый скот

ММП – матриксная металлопротеиназа

ППС – полная питательная среда

ПЭГ – полиэтиленгликоль

С-ГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

СД – степень дегрануляции;

ТИК – тканеинженерная конструкция

ТИМП/ТИМР – тканевой ингибитор металлопротеиназ

ТК – тучные клетки

УГТ – уровень готовности технологии

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алмазов, И.А. Патогенетическое обоснование выполнения хирургической дермабразии при ожогах: специальность 14.03.03 – патологическая физиология : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Алмазов Илья Алексеевич // Воен.-мед. акад. им. С.М. Кирова. – Санкт-Петербург, 2017. – 21 с.
2. Аутогенные фибриновые матриксы: перспективы использования в хирургии / С.А. Епифанов, С.А. Матвеев, П.Е. Крайнюков [и др.] // Гены и клетки. – 2021 – Т. 16 (2). – С. 71–4.
3. Богдан, В.Г. Выбор внеклеточной матрицы многокомпонентного биологического трансплантата с мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани для пластики обширных дефектов передней брюшной стенки / В.Г. Богдан, М.М. Зафранская, Ю.М. Гаин // Военная медицина. – 2014. – № 1. – С. 88–93.
4. Внеклеточный матрикс в регуляции дифференцировки стволовых клеток / Е.С. Новоселецкая, О.А. Григорьева, А.Ю. Ефименко [и др.] // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 3. – С. 343–353.
5. Волкова, И.М. Трехмерные матриксы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии / И.М. Волкова, Д.Г. Коровина // Биотехнология. – 2015. – Т. 31. – № 2. – С. 8–26.
6. Жуковский, В.А. Полимерные имплантаты для реконструктивной хирургии / В.А. Жуковский // Innova. – 2016. – Т. 3. – № 2. – С. 51–9.
7. Иванова, В.П. Фибронектины: структурно-функциональные связи / В.П. Иванова // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2017. – Т. 53. – № 6. – С. 398–410.
8. Использование биологических и синтетических материалов в реконструктивной хирургии при раке молочной железы (обзор литературы) / А.Д. Зикиряходжаев, И.М. Широких, Н.В. Аблицова [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2018. – Т. 14. – № 1. – С. 28–37.

9. Использование клеточных технологий для восстановления повреждений кожи при ожоговой травме / Д.Я. Алейник, В.Л. Зорин, И.И. Еремин [и др.]. – Текст: электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – URL : <https://science-education.ru/ru/article/view?id = 20750> (дата обращения: 19.04.2023).
10. Использование раневых покрытий на основе хитозана «ХитоПран» в лечении больных с ожоговой травмой / А.В. Поляков, С.Б. Богданов, И.М. Афанасов [и др.] // Инновационная медицина Кубани. – 2019. – № 3. – С. 25–31.
11. Использование трупной кожи в лечении ран / А.В. Сачков, Н.В. Боровкова, Е.А. Жиркова [и др.] // Трансплантология. – 2018. – Т. 4. – № 10. – С. 327–35.
12. Использование современных раневых покрытий в местном лечении ран различной этиологии / А.М. Морозов, А.Н. Сергеев, Н.А. Сергеев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 2. – С. 167.
13. Клеточные технологии и тканевая инженерия в лечении длительно незаживающих ран / Ю.С. Винник, А.Б. Салмина, А.И. Дробушевская, О. В. Теплякова // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2011. – Т. 4. – № 2. – С. 392–394.
14. Клиническая эффективность биопластического коллагенового материала «Коллост» у детей с термической травмой (многоцентровое исследование) / Л.И. Будкевич, В.И. Ковальчук, А.В. Глуткин [и др.] // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 34–44.
15. Ксеноперикардальная герниопластика: возможности и перспективы / А.В. Баулин, С.А. Середин, А.Е. Квасов [и др.] // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2011. – Т. 1. – № 5. – С. 11–15.
16. Кузнецова, С.А. Иммунорегуляторные свойства тромбоспондина-1, компонента внеклеточного матрикса и ингибитора ангиогенеза / С.А. Кузнецова, А.В. Крылов, Е.П. Киселева // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10. – № 6. – С. 499–506.

17. Культивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга на носителях из резорбируемого биопластотана / Е.И. Шишацкая, Е.Д. Николаева, А.А. Шумилова [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8. – № 1. – С. 57–65.

18. Макропористые биodeградируемые матрицы на основе хитозана и гиалуроновой кислоты для тканевой инженерии / М.Г. Дроздова, М. Водякова, Т.С. Демина [и др.] // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Т. 3 (1). – С. 33–35.

19. Морфология коллагеновых матриц для тканевой инженерии (биосовместимость, биodeградация, тканевая реакция) / А.Б. Шехтер, А.Е. Гуллер, Л.П. Истранов [и др.] // Архив патологии. – 2015. – Т. 77. – № 6. – С. 29–38.

20. Оболенский, В.Н. Применение тромбоцитарных факторов роста и коллагеновых биопрепаратов в лечении больных с хроническими трофическими язвами различной этиологии / В.Н. Оболенский, Д.А. Ермолова // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2012. – Т. 5 – С. 42–7.

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

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

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

24. Опыт применения импланта Permacol в эксперименте и в клинике / Д.А. Хубезов, С.Н. Трушин, А.Ю. Огорельцев [и др.] // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. – № 1. – С. 114–120.

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

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

27. Поливанова, Т.В. Морфо-функциональные параметры коллагена в норме и при патологии / Т.В. Поливанова, В.Т. Манчук // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 2. – С. 25–30.

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

29. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций / Д.С. Барановский, А.Г. Демченко, Р.В. Оганесян [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72. – № 4. – С. 254–260.

30. Потехина, Ю.П. Структура и функции коллагена / Ю.П. Потехина // Российский остеопатический журнал. – 2016. – № 1–2. – С. 87–99.

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

32. Применение тканеинженерных конструкций на основе пластов клеток для восстановления тканей и органов / К.В. Дергилев, П.И. Макаревич, М.Ю. Меньшиков, Е.В. Парфёнова // Гены и клетки. – 2016. – Т. 11. – № 3. – С. 23–32.

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

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

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

36. Рахматуллин, Р.Р. Биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты: биофизические аспекты фармакологических свойств / Р.Р. Рахматуллин // Фармация. – 2011. – № 4. – С. 36–39.

37. Результаты применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для реконструкции передней брюшной стенки в отдаленные сроки эксперимента / Р.М. Бадыров, Н.Т. Абатов, М.М. Тусупбекова [и др.] // Наука и здравоохранение. – 2018. – № 1. – С. 24–35.

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

39. Светозарский, Н.Л. Фактор роста эндотелия сосудов: биологические свойства и практическое значение (обзор литературы) / Н.Л. Светозарский, А.А. Артифексова, С.Н. Светозарский // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2015. – № 5. – С. 24.

40. Сравнительный анализ эффективности простого и многокомпонентного методов щелочной децеллюляризации на примере очистки волокнистого внеклеточного матрикса дермы / Н.В. Калмыкова, И.А. Демьяненко, Н.В. Шевлягина [и др.] // Морфологические ведомости. – 2016. – Т. 24. – № 4. – С. 36–45.

41. Токмакова, А. Ю. Особенности хронических ран у больных сахарным диабетом и пути их коррекции // А.Ю. Токмакова, Г.Ю. Страхова, М.И. Арбузова // Эндокринная хирургия. – 2007. – Т. 1. – С. 38–42.

42. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения / А.И. Зорина, И.Я. Бозо, В.Л. Зорин [и др.] // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6. – № 2. – С. 15–26.

43. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, Н.И. Аюшинова [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 110. – № 3. – С. 8–12.

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

45. Черноиваненко, И.С. Роль виментина в миграции клеток / И.С. Черноиваненко, А.А. Минин, А.А. Минин // Онтогенез. – 2013. – Т. 44. – № 3. – С. 186–202.

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

47. A histological and immunohistochemical study of the subsynovial connective tissue in idiopathic carpal tunnel syndrome / A.M. Ettema, P.C. Amadio, C. Zhao [et al.] // JBJS. – 2004. – Vol. 86(7) – P. 1458–66.

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

49. A novel collagen matricryptin reduces left ventricular dilation post-myocardial infarction by promoting scar formation and angiogenesis / M.L. Lindsey, R.P. Iyer, R. Zamilpa [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2015. – Vol. 66(12). – P. 1364–74.

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

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

52. Adair-Kirk, T.L. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation / T.L. Adair-Kirk, R.M. Senior // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2008. – Vol. 40(6-7). – P. 1101–10.
53. Aderibigbe, B.A. Alginate in wound dressings / B.A. Aderibigbe, B. Buyana // *Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 10(2). – P. 42.
54. Adorno-Cruz, V. Regulation and functions of integrin $\alpha 2$ in cell adhesion and disease / V. Adorno-Cruz, H. Liu // *Genes & diseases*. – 2019. – Vol. 6(1). – P. 16–24.
55. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair / R.F. Pereira, C.C. Barrias, P.L. Granja [et al.] // *Nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8(4). – P. 603–21.
56. Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine / K. Lin, D. Zhang, M.H. Macedo [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2018. – Vol. 29. – P. 1–16.
57. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration / G. Gainza, S. Villullas, J. L. Pedraz [et al.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 11(6). – P. 1551–73.
58. Advances in electrospinning of natural biomaterials for wound dressing / F. Wang, S. Hu, Q. Jia [et al.] // *Journal of Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1–14.
59. Ahmed, E.M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review / E.M. Ahmed // *Journal of advanced research*. – 2015. – Vol. 6(2). – P. 105–21.
60. Ahmed, S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing / S. Ahmed, S. Ikram // *Achiev Life Sci*. – 2016. – Vol. 10. – P. 27–37.
61. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer / Z.L. Liu, H.H. Chen, L.L. Zheng [et al.] // *Sig Transduct Target Ther*. – 2023. – Vol. 8. – P. 198.
62. Angiogenesis in tissue engineering: as nature intended? / V. Mastrullo, W. Cathery, E. Velliou [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2020. – Vol. 8. – P. 188.

63. Are agricultural and natural sources of bio-products important for modern regenerative medicine? A review / M. Nowacki, K. Nowacka, T. Kloskowski [et al.] // *Ann Agric Environ Med.* – 2017. – Vol. 11(24). – P. 207–12.
64. Aumailley, M. Laminins and interaction partners in the architecture of the basement membrane at the dermal-epidermal junction / M. Aumailley // *Experimental dermatology.* – 2021. – Vol. 30(1). – P. 17–24.
65. Avishai, E. Impaired wound healing: facts and hypotheses for multi-professional considerations in predictive, preventive and personalised medicine / E. Avishai, K. Yeghiazaryan, O. Golubnitschaja // *EPMA Journal.* – 2017. – Vol. 8. – P. 23–33.
66. Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / S.F. Badylak, P.M. Crapo, T.W. Gilbert // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32(12). – P. 3233–43.
67. Badylak, S.F. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function / S.F. Badylak, D.O. Freytes, T.W. Gilbert // *Acta biomaterialia.* – 2009. – Vol. 5(1). – P. 1–13.
68. Badylak, S.F. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds / S.F. Badylak, D. Taylor, K. Uygun // *Annual review of biomedical engineering.* – 2011. – Vol. 13. – P. 27–53.
69. Baker, E.A. Profiles of matrix metalloproteinase and their tissue inhibitors in intraperitoneal drainage fluid: relationship to healing / E.A. Baker, D.J. Leaper // *Wound Rep Reg.* – 2003. – Vol. 11(4). – P. 268–74.
70. Banerjee, P. Cryptic peptides from collagen: a critical review / P. Banerjee, C. Shanthi // *Protein and peptide letters.* – 2016. – Vol. 23(7). – P. 664–72.
71. Bellis, S.L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials / S.L. Bellis // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32. – P. 4205–10.
72. Bioactive scaffolds based on elastin-like materials for wound healing / J.C. Rodríguez-Cabello, I.G. De Torre, A. Ibañez-Fonseca [et al.] // *Advanced drug delivery reviews.* – 2018. – Vol. 129. – P. 118–133.

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

74. Bioengineered self-assembled skin as an alternative to skin grafts / M. Klimov, E. Medeiros, E.A. Farkash [et al.] / *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*. – 2016. – Vol. 4. – № 6. – P. e731.

75. Biological Scaffolds for Abdominal Wall Repair: Future in Clinical Application? / A. Costa, S. Adamo, F. Gossetti [et al.] // *Materials*. – 2019. – Vol. 12(15). – P. 2375.

76. Biomaterials as carrier, barrier and reactor for cell-based regenerative medicine / C. Qi, X. Yan, C. Huang [et al.] // *Protein Cell*. – 2015. – Vol. 6. – P. 638–53.

77. Biomechanical behavior of scar tissue and uninjured skin in a porcine model / D.T. Corr, C.L. Gallant-Behm, N.G. Shrive [et al.] // *Wound Repair and Regeneration*. – 2009. – Vol. 17(2). – P. 250–9.

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

79. Biomimetic elastomeric polypeptide-based nanofibrous matrix for overcoming multidrug-resistant bacteria and enhancing full-thickness wound healing/skin regeneration / Y. Xi, J. Ge, Y. Guo [et al.] // *ACS nano*. – 2018. – Vol. 12. – № 11. – P. 10772–84.

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

81. Boateng, J. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing – a review / J. Boateng, O. Catanzano // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2015. – Vol. 104(11). – P. 3653–80.

82. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management / G. Fernandez de Grado, L. Keller, Y. Idoux-Gillet [et al.] // *J. Tissue Eng*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2041731418776819.

83. Bott, K. The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels / K. Bott // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31(32). – P. 8454–64.
84. Brett, D. A review of collagen and collagen-based wound dressings / D. Brett // *Wounds*. – 2008. – Vol. 20(12). – P. 347–56.
85. Buehler, M. J. Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils / M.J. Buehler // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103(33). – P. 12285–90.
86. Buenafe A.A. Lateral release in the repair of large ventral hernia / A.A. Buenafe, A. Lee-Ong // *Annals of laparoscopic and endoscopic surgery*. – 2019. – Vol. 4. – P. 24–33.
87. Cady, E. Micropatterning decellularized ECM as a bioactive surface to guide cell alignment, proliferation, and migration / E. Cady, J.A. Orkwis, R. Weaver // *Bioengineering*. – 2020. – Vol. 79(3). – P. 102.
88. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment / H. Harjunpää, M. Lloret Asens, C. Guenther [et al.] // *Front Immunol*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1078.
89. Chalimidi, K.R. Efficacy of collagen particles in chronic non healing ulcers / K.R. Chalimidi, Y. Kumar, U.A. Kini // *J Clin Diagn Res*. – 2015. – Vol. 9(6). – P. PC01–PC03.
90. Chattopadhyay, S. Review collagen based biomaterials for wound healing / S. Chattopadhyay, R.T. Raines // *Biopolymers* – 2014. – Vol. 101(8). – P. 821–33.
91. Chemical decellularization methods and its effects on extracellular matrix / A.H.A. Zahmati, R. Alipoor, A.R. Shahmirzadi [at al.] // *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*. – 2017. – Vol. 2(3). – P. 76–83.
92. Chitosan based hydrogels and their use in medicine / G.K. Abilova, D.N. Makhayeva, G.S. Irmukhametova [et al.] // *Chemical Bulletin of Kazakh National University*. – 2020. – Vol. 97(2). – P. 16–28.
93. Cloning, expression and purification of human PDGF-BB gene in *Escherichia coli*: New approach in PDGF-BB protein production / Y. Ghasemi, M.B. Ghoshoon, M. Taheri [et al.] // *Gene Reports*. – 2020. – Vol. 19. – P. 100653.

94. Coburn, J.C. Development of naturally-derived biomaterials and optimization of their biomechanical properties / J.C. Coburn, A. Pandit // Topics in Tissue Engineering. – 2007. – Vol. 3. – P. 1–14.

95. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering / L. Ma, C. Gao, Z. Mao [et al.] // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24(26). – P. 4833–41.

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

97. Collagen fibril network and elastic system remodeling in a reconstructed skin transplanted on nude mice / F. Berthod, L. Germain, H. Li [et al.] // Matrix Biol. – 2001 – Vol. 20. – P. 463–73.

98. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications / L. Cen, W.E.I. Liu, L.E.I. Cui [et al.] // Pediatric Research. – 2008. – Vol. 63(5). – P. 492–96.

99. Comment on: Comparative analysis biologic versus synthetic mesh outcomes in contaminated hernia repairs / F. Gossetti, M.R. Grimaldi, F. Ceci [et al.] // Surgery. – 2017. – Vol. 161(5). – P. 1467–8.

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

101. Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture / H. Lu, T. Hoshiba, N. Kawazoe [et al.] // Journal of Biomedical Materials Research. – 2012. – Vol. 100(9). – P. 2507–16.

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

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

104. Comparison of the efficacy of silver-based antimicrobial burn dressings in a porcine model of burn wounds / J.A. Ross, N. Allan, M. Olson [et al.] // *Burns*. – 2020. – Vol. 46(7). – P. 1632–40.
105. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics / N. Davidenko, C.F. Schuster, D.V. Bax [et al.] // *Acta Biomaterial* – 2015. – Vol. 25. – P. 131–42.
106. Corr, D.T. Biomechanics of scar tissue and uninjured skin / D.T. Corr, D.A. Hart // *Advances in Wound Care*. – 2013. – Vol. 2(2). – P. 37–43.
107. Costa, F. Fibrous protein-based biomaterials (silk, keratin, elastin, and resilin proteins) for tissue regeneration and repair / F. Costa, R. Silva, A. Boccaccini // *Peptides and proteins as biomaterials for tissue regeneration and repair*. – 2018. – P. 175–204.
108. Cramer, M.C. Extracellular matrix-based biomaterials and their influence upon cell behavior / M.C. Cramer, S.F. Badylak // *Annals of biomedical engineering*. – 2020. – Vol. 48(7). – P. 2132–53.
109. Crapo, P.M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32(12). – P. 3233–43.
110. Cross-linked collagen-chondroitin sulfate-hyaluronic acid imitating extracellular matrix as scaffold for dermal tissue engineering / W. Wang, M. Zhang, W. Lu [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2010. – Vol. 16(2). – P. 269–79.
111. Cui, H. Progress in developing decellularized bioscaffolds for enhancing skin construction / H. Cui, Y. Chai, Y. Yu // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2019. – Vol. 107(8). – P. 1849–59.
112. Cytokines and interferons: types and functions / V.L. Ferreira, H.H. Borba, A.D.F. Bonetti [et al.] // *Autoantibodies and cytokines*. – 2018. – P. 13.
113. Davies, M.J. Protein oxidation and peroxidation / M.J. Davies // *Biochemical Journal*. – 2016. – Vol. 473(7). – P. 805–25.
114. de Castro Bras, L. E. Extracellular matrix-derived peptides in tissue remodeling and fibrosis / L.E. de Castro Bras, N.G. Frangogiannis // *Matrix Biology*. – 2020. – Vol. 91. – P. 176–87.

115. Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery / P.B. Milan, A. Pazouki, M.T. Joghataei [et al.] // *Methods*. – 2020. – Vol. 171. – P. 62–67.

116. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering / R.H. Fu, Y.C. Wang, S.P. Liu [et al.] // *Cell transplantation*. – 2014. – Vol. 23(4-5). – P. 621–30.

117. Decellularized diaphragmatic muscle drives a constructive angiogenic response in vivo / M.E. Alvarèz Fallas, M. Piccoli [et al.] // *Franzin Int J Mol Sci*. – 2018. – Vol. 19(5). – P. 1319.

118. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration / C. Liu, M. Pei, Q. Li [et al.] // *Frontiers of Medicine*. – 2022. – Vol. 16(1). – P. 56–82.

119. Decellularized human amniotic membrane: more is needed for an efficient dressing for protection of burns against antibiotic-resistant bacteria isolated from burn patients / M. Gholipourmalekabadi, M. Bandehpour, M. Mozafari [et al.] // *Burns*. – 2015. – Vol. 41(7). – P. 1488–97.

120. Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: evaluation, modification, and application methods / A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol*. – 2022. – Vol. 10. – P. 805299.

121. Decellularization of the mouse ovary: comparison of different scaffold generation protocols for future ovarian bioengineering / A.B. Alshaikh, A.M. Padma, M. Dehlin [et al.] // *J. Ovarian Res*. – 2019. – Vol. 12(1). – P. 58–9.

122. Decellularized matrices for tissue engineering / T. Hoshiba, H. Lu., N. Kawazoe [et al.] // *Expert opinion on biological therapy*. – 2010. – Vol. 10(12). – P. 1717–28.

123. Decellularization Systems and Devices: State-of-the-art / D. Choudhury, M. Yee, Z.L.J. Sheng [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2020. – Vol. 15. – P. 51–9.

124. Deeken C.R., Lake S.P. Mechanical properties of the abdominal wall and biomaterials utilized for hernia repair / C.R. Deeken, S.P. Lake // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2017. – Vol. 74. – P. 411–27.

125. Degradation of intracellular TGF- β 1 by PROTACs efficiently reverses M2 macrophage induced malignant pathological events / Y. Feng, H. Su, Y. Li [et al.] // *Chemical Communications*. – 2020. – Vol. 56(19). – P. 2881–4.
126. Denis, C.V. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor / C.V. Denis // *Int J Hematol*. – 2002. – Vol. 75(1). – P. 3–8.
127. Dermal collagen matrices for ventral hernia repair: comparative analysis in a rat model / G. Broderick, J. McIntyre, M. Noury [et al.] // *Hernia*. – 2012. – Vol. 16. – P. 333–43.
128. Dermal wound healing processes with curcumi incorporated collagen films / D. Gopinath, M.R. Ahmed, K. Gomathi [et al.] // *Biomaterials*. – 2004 – Vol. 25. – P.1911–17.
129. Development of hydrogels for regenerative engineering / X. Guan, M. Avci-Adali, E Alarçin [et al.] // *Biotechnology journal*. – 2017. – Vol. 12(5). – P. 1600394.
130. Diniz-Fernandes, T. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and (MMP-8) gene polymorphisms promote increase and remodeling of the collagen III and V in posterior tibial tendinopathy / T. Diniz-Fernandes, A.L. Godoy-Santos, M.C. Santos // *Histol Histopathol*. – 2018. – Vol. 33(9). – P. 929–36.
131. Ebhodaghe, S.O. Hydrogel-based biopolymers for regenerative medicine applications: a critical review / S.O. Ebhodaghe // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2022. – Vol. 71(3). – P. 155–72.
132. Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility / N. Li, Y. Li, D. Gong [et al.] // *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*. – 2018. – Vol. 26(5). – P. 768–76.
133. Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers / A.M. Coenen, K.V. Bernaerts, J.A. Harings [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2018. – Vol. 79. – P. 60–82.
134. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing / K.S. Rho, L. Jeong, G. Lee [et al.] // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27. – P. 1452–61.

135. Endostatin in renal and cardiovascular diseases / M. Li, Z. Popovic, C. Chu [et al.] // *Kidney Dis (Basel)*. – 2021. – Vol. 7(6). – P. 468–81.
136. Endothelial response to pathophysiological stress / Z. Peng, B. Shu, Y. Zhang [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2019. – Vol. 39(11). – P. e233–e43.
137. Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing / N. Annabi, D. Rana, E.S. Sani [et al.] // *Biomaterials*. – 2017. – Vol. 139. – P. 229–43.
138. Engineering bioactive self-healing antibacterial exosomes hydrogel for promoting chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration / C. Wang, M. Wang, T. Xu [et al.] // *Theranostics*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 65–85.
139. Enhanced wound healing in diabetic rats by nanofibrous scaffolds mimicking the basket weave pattern of collagen fibrils in native skin / L. Sun, W. Gao, X. Fu [et al.] // *Biomater Sci*. – 2018 – Vol. 6. – P. 340–49.
140. Epidermal keratinocytes initiate wound healing and pro-inflammatory immune responses following percutaneous schistosome infection / C.D. Bourke, C.T. Prendergast, D.E. Sanin [et al.] // *International journal for parasitology*. – 2015. – Vol. 45(4). – P. 215–24.
141. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review / I. Pastar, O. Stojadinovic, N.C. Yin [et al.] // *Adv Wound Care*. – 2014. – Vol. 7. – P. 445–64.
142. Evaluation of bone regeneration potential of injectable extracellular matrix (ECM) from porcine dermis loaded with biphasic calcium phosphate (BCP) powder / R.D. Ventura, A.R. Padalhin, B. Kim [et al.] // *Materials Science and Engineering*. – 2020. – Vol. 110. – P. 110663.
143. Evaluation of porcine dermal collagen (Permacol) used in abdominal wall reconstruction / P.W. Hsu, C.J. Salgado, K. Kent [et al.] // *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*. – 2009. – Vol. 62(11). – P. 1484–9.
144. Evaluation methods for mechanical biocompatibility of hernia repair meshes: respective characteristics, application scope and future perspectives / W. He, G. Cao, X. Gan [et al.] // *Journal of materials research and technology*. – 2021. – Vol. 13. – P. 1826–40.

145. Fabrication and in vitro characterization of electrochemically compacted collagen/sulfated xylorhamnoglycuronan matrix for wound healing applications / L. Kang, X. Liu, Z. Yue [et al.] // *Polymers*. – 2018 – Vol. 10. – P. 1–13.

146. Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO₂ / C. Ji, N. Annabi, A. Khademhosseini [et al.] // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7. – P. 1653–64.

147. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses / A.J. Schwartz, D.A. Wilson, K.G. Keegan [et al.] // *Am J Vet Res.* – 2002. – Vol. 11. – P. 1564–70.

148. Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot / V. Falanga // *Lancet*. – 2005. – Vol. 366. – P. 1736–43.

149. Fibronectin deposition participates in extracellular matrix assembly and vascular morphogenesis / A. Hielscher, K. Ellis, C. Qiu [et al.] // *PloS one*. – 2016. – Vol. 11(1). – P. e0147600.

150. Fish scale collagen preparation, characterization and its application in wound healing / M. Shalaby, M. Agwa, H. Saeed [et al.] // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2020. – Vol. 28(1). – P. 166–78.

151. Fujisaki, H. Keratinocyte differentiation and proliferation are regulated by adhesion to the three-dimensional meshwork structure of type IV collagen / H. Fujisaki, E. Adachi, S. Hattori // *Connect Tissue Res.* – 2008. – Vol. 49(6). – P. 426–436.

152. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review / M.C. Gomez-Guillen, B. Gimenez, M.A. Lopez-Caballero [et al.] // *Food hydrocolloids*. – 2011. – Vol. 25(8). – P. 1813–27.

153. Functional and morphological comparison of extracellular matrices derived from porcine small intestinal submucosa and porcine dermis to support rabbit uterus regeneration / P. Niespielak, K. Pazdzior-Czapula, A. Czerski [et al.] // *J Physiol Pharmacol*. – 2021. – Vol. 72(2). – P. e10.26402.

154. Galkowska, H. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in margin of chronic diabetic foot ulcers / H. Galkowska, U. Wojewodzka, W.L. Olszewski // *Wound Repair Regen*. – 2006. – Vol. 14. – P. 558–65.

155. Gaspar-Pintilieșcu, A. Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review / A. Gaspar-Pintilieșcu, A.M. Stanciuc, O. Craciunescu // *International journal of biological macromolecules*. – 2019. – Vol. 138. – P. 854–65.
156. Gelatin-based hybrid scaffolds: promising wound dressings / S.P. Ndlovu, K. Ngece, S. Alven [et al.] // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13(17). – P. 2959.
157. Gelatin-based hydrogels blended with gellan as an injectable wound dressing / Y. Zheng, Y. Liang, D. Zhang [et al.] // *ACS omega*. – 2018. – Vol. 3. – № 5. – P. 4766–75.
158. Giblin, S.P. Tenascin-C: form versus function / S.P. Giblin, K.S. Midwood // *Cell adhesion & migration*. – 2015. – Vol. 9(1-2). – P. 48–82.
159. Gilbert, T.W. Decellularization of tissues and organs / T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27(19). – P. 3675–83.
160. Gilbert, T.W. Strategies for tissue and organ decellularization / T.W. Gilbert // *Journal of cellular biochemistry*. – 2012. – Vol. 113(7). – P. 2217–22.
161. Gilpin, A. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications / A. Gilpin, Y. Yang // *Biomed. Res. Int.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 9831534.
162. Glasberg, S.B. AlloDerm and Strattice in breast reconstruction: a comparison and techniques for optimizing outcomes / S. B. Glasberg, D. Light // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2012. – Vol. 129(6). – P. 1223–33.
163. Gómez-Gil, V. Biomaterial implants in abdominal wall hernia repair: a review on the importance of the peritoneal interface / V. Gómez-Gil, G. Pascual, J.M. Bellón // *Processes*. – 2019. – Vol. 7(2). – P. 105.
164. Grover, C.N. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering / C.N. Grover, R.E. Cameron, S.M. Best // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. – 2012. – Vol. 10. – P. 62–74.
165. Gun'ko, V.M. Properties of water bound in hydrogels / V.M. Gun'ko, I.N. Savina, S.V. Mikhalovsky // *Gels*. – 2017. – Vol. 3(4) – P. 37.

166. Halper, J. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins / J. Halper, M. Kjaer // *Progress in heritable soft connective tissue diseases*. – 2014. – P. 31–47.

167. Harma, B. The efficacy of five different wound dressings on some histological parameters in children with partial-thickness burns/ B. Harma, M. Gül, M. Demircan // *Journal of Burn Care & Research*. – 2020. – Vol. 41(6). – P.1179–87.

168. Heath, D.E. A review of decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative engineering applications / D.E. Heath // *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 5(2). – P. 155–66.

169. Helkin, A. Thrombospondin-1,-2 and-5 have differential effects on vascular smooth muscle cell physiology / A. Helkin, K.G. Maier, V. Gahtan // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2015. – Vol. 464(4). – P. 1022–7.

170. Hinderer, S. ECM and ECM-like materials – biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy / S. Hinderer, S.L. Layland, K. Schenke-Layland // *Advanced drug delivery reviews*. – 2016. – Vol. 97. – P. 260–69.

171. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications / A.S. Hoffman // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – Vol. 64. – P. 18–23.

172. Hrebikova, H. Chemical decellularization: a promising approach for preparation of extracellular matrix / H. Hrebikova, D. Diaz, J. Mokry // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. – 2015. – Vol. 159(1). – P. 12–7.

173. Hussey, G.S. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine / G.S. Hussey, J.L. Dziki, S.F. Badylak // *Nature Reviews Materials*. – 2018. – Vol. 3(7). – P. 159–173.

174. Hyaluronic acid – based wound dressings: A review / M. F. Graça, S.P. Miguel, C.S. Cabral [et al.] // *Carbohydrate polymers*. – 2020. – Vol. 241. – P. 116364.

175. Hyaluronic acid: redefining its role / G. Abatangelo, V. Vindigni, G. Avruscio [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9(7). – P. 1743.

176. Hydrogels as antibacterial biomaterials / W. Xu, S. Dong, Y. Han [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. – 2018. – Vol. 24. – № 8. – P. 843–54.

177. Hydrogel from acellular porcine adipose tissue accelerates wound healing by inducing intradermal adipocyte regeneration / Q.W. Tan, S.L. Tang, Y. Zhang [et al.] // *J Invest Dermatol.* – 2019. – Vol. 139 (2). – P. 455–63.

178. Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: structural, mechanical and biological characteristics / M.N. Egorikhina, D.Y. Aleynik, Y.P. Rubtsova [et al.] // *Bioactive Materials.* – 2019. – Vol. 29. – P. 334–45.

179. Identification of active sequences in human laminin $\alpha 5$ G domain / J. Kumai, Y. Yamada, K. Hamada [et al.] // *Journal of Peptide Science.* – 2019. – Vol. 25(12). – P. e3218.

180. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers / Y. Liu, D. Min, T. Bolton [et al.] // *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32(1). – P. 117–9.

181. IL-6 and IL-1 synergistically enhanced the production of MMPs from synovial cells by up-regulating IL-6 production and IL-1 receptor I expression / M. Suzuki, M. Hashizume, H. Yoshida [et al.] // *Cytokine.* – 2010. – Vol. 51(2). – P. 178–83.

182. Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions / B. Struecker, A. Butter, K. Hillebrandt [et al.] // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2017. – Vol. 11(2). – P. 531–41.

183. Influence of pH on extracellular matrix preservation during lung decellularization / T. Tsuchiya, J.L. Balestrini, J. Mendez [et al.] // *Tissue Eng. Part C: Methods.* – 2014. – Vol. 20(12). – P. 1028–36.

184. Injectable polysaccharide hydrogels reinforced with cellulose nanocrystals: morphology, rheology, degradation, and cytotoxicity / X. Yang, E. Bakaic, T. Hoare [et al.] // *Biomacromolecules.* – 2013. – Vol. 14. – № 12. – P. 4447–55.

185. Integrin and dystroglycan compensate each other to mediate laminin-dependent basement membrane assembly and epiblast polarization / S. Li, Y. Qi, K. McKee [et al.] // *Matrix Biology.* – 2017. – Vol. 57. – P. 272–84.

186. Increased ratio of serum matrix metalloproteinase-9 against TIMP-1 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers / S. Guo, F. Yao, Y. Zhang [et al.] // *J Diabet Complicat.* – 2013. – Vol. 27. – P. 380–2.

187. Initial binding and recellularization of decellularized mouse lung scaffolds with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells / A.B. Daly, J.M. Wallis., Z.D. Borg [et al.] // *Tissue Engineering Part A.* – 2012. – Vol. 18(1-2). – P. 1–16.

188. Injectable hybrid poly (ϵ -caprolactone)-b-poly (ethylene glycol)-b-poly (ϵ -caprolactone) porous microspheres/alginate hydrogel cross-linked by calcium gluconate crystals deposited in the pores of microspheres improved skin wound healing / J. Liao, Y. Jia, B. Wang, K. Shi [et al.] // *ACS Biomaterials Science & Engineering.* – 2018. – Vol. 4. – № 3. – P. 1029–36.

189. Injectable methylcellulose hydrogel containing silver oxide nanoparticles for burn wound healing / M.H. Kim, H. Park, H.C. Nam [et al.] // *Carbohydr Polym.* – 2018. – Vol. 181. – P. 579–86.

190. Inflammation after ischemic stroke: the role of leukocytes and glial cells / J.Y. Kim, J. Park, J.Y. Chang [et al.] // *Experimental neurobiology.* – 2016. – Vol. 25(5). – P. 241.

191. Interleukin 6 function in the skin and isolated keratinocytes is modulated by hyperglycemia / E.G. Lee, L.R. Lockett-Chastain, K.N. Calhoun [et al.] // *Journal of immunology research.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 5087847.

192. Immune responses to implants—a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials / S. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber [et al.] // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32(28). – P. 6692–709.

193. In vitro effects of PDGF isoforms (AA, BB, AB and CC) on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts and on migration of human osteoblasts / A. Colciago, F. Celotti, L. Casati [et al.] // *International journal of biomedical science: IJBS.* – 2009. – Vol. 5(4). – P. 380.

194. Ishii, M. Imaging of inflammation and regeneration: a novel trend dissecting dynamic features of biological phenomena in vivo / M. Ishii // *Inflamm Regen.* – 2017. – Vol. 37. – P. 26.

195. Jabłońska-Trypuć, A. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs / A. Jabłońska-Trypuć, M. Matejczyk, S. Rosochacki // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. – 2016. – Vol. 31(s1). – P. 177–83.
196. Ji, S. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs / S. Ji, M. Guvendiren // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2017. – Vol. 5. – P. 23–36.
197. Keane, T.J. The host response to allogeneic and xenogeneic biological scaffold materials / T.J. Keane, S.F. Badylak // *J Tissue Eng Regen Med*. – 2015. – Vol. 9(5). – P. 504–11.
198. Kechagia, J.Z. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment / J.Z. Kechagia, J. Ivaska, P. Roca-Cusachs // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. – Vol. 20(8). – P. 457–73.
199. Khew, S.T. Enzymatically crosslinked collagen-mimetic dendrimers that promote integrin-targeted cell adhesion / S.T. Khew, Q.J. Yang, Y.W. Tong // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29. – P. 3034–45.
200. Kim, J.I. Harnessing nanotopography of PCL / collagen nanocomposite membrane and changes in cell morphology coordinated with wound healing activity / J.I. Kim, C.S. Kim // *Mater Sci Eng C*. – 2018. – Vol. 91. – P. 824–37.
201. Laparoscopic versus open umbilical or paraumbilical hernia repair: a systematic review and meta-analysis / S. Hajibandeh, S. Hajibandeh, A. Sreh [et al.] // *Hernia*. – 2017. – Vol. 21(6). – P. 905–16.
202. Lenselink, E.A. Role of fibronectin in normal wound healing / E.A. Lenselink // *International wound journal*. – 2015. – Vol. 12(3). – P. 313–16.
203. Litwiniuk, M. Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration / M. Litwiniuk, A. Krejner, M.S. Speyrer // *Wounds*. – 2016. – Vol. 28. – P. 78–88.
204. Liver bioengineering: recent trends/advances in decellularization and cell sheet technologies towards translation into the clinic / M. Asadi, M. Khalili, H. Lotfi [et al.] // *Life Sci*. – 2021. – Vol. 276. – P. 119373.

205. Lohrasbi, S. Collagen/cellulose nanofiber hydrogel scaffold: physical, mechanical and cell biocompatibility properties / S. Lohrasbi // *Cellulose*. – 2020. – Vol. 27(2). – P. 927–40.

206. Long-term outcomes of seromas after ventral hernia repair: a propensity score-matched analysis of the Abdominal Core Health Quality Collaborative / B.T. Miller, K.F. Baier, S.J. Zolin [et al.] // *Hernia*. – 2022. – P. 1–6.

207. Lucey, P. Complications of collagen fillers / P. Lucey, D.J. Goldberg // *Facial Plast Surg*. – 2014. – Vol. 30(6). – P. 615–22.

208. Macadam, S.A. Acellular dermal matrices: economic considerations in reconstructive and aesthetic breast surgery / S.A. Macadam, P.A. Lennox // *Clinics in plastic surgery*. – 2012. – Vol. 39(2). – P. 187–216.

209. Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials / Z. Sheikh, P.J. Brooks, O. Barzilay [et al.] // *Materials*. – 2015. – V. 8(9). – P. 5671–701.

210. Mak, K.M. Basement membrane type IV collagen and laminin: an overview of their biology and value as fibrosis biomarkers of liver disease / K.M. Mak, R. Mei // *The Anatomical Record*. – 2017. – Vol. 300(8). – P. 1371–90.

211. Mandal, A. Collagen as biomaterial for medical application-drug delivery and scaffolds for tissue regeneration: a review / A. Mandal, S. Panigrahi, C. Zhang // *Biological Engineering Transactions*. – 2010. – Vol. 2(2). – P. 63–88.

212. Manon-Jensen, T. Collagen-mediated hemostasis / T. Manon-Jensen, N.G. Kjeld, M.A. Karsdal // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2016. – Vol. 14(3). – P. 438–48.

213. Maquart, F.X. Extracellular matrix and wound healing / F.X. Maquart, J.C. Monboisse // *Pathologie Biologie*. – 2014. – Vol. 62(2). – P. 91–5.

214. Marzec, E. Efficacy evaluation of electric field frequency and temperature on dielectric properties of collagen cross-linked by glutaraldehyde / E. Marzec, K. Pietrucha // *Colloids Surf B*. – 2018. – Vol. 162. – P. 345–50.

215. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during

human dermal wound healing / J. Gillard, M.W.R. Reed, D. Buttle [et al.] // *Wound Rep Reg.* – 2004. – Vol. 12(3). – P. 295–304.

216. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing / M. Muller, C. Trocme, B. Lardy [et al.] // *Diabetic Med.* – 2008. – Vol. 25(4). – P. 419–26.

217. Mechanically active small intestinal submucosa hydrogel for accelerating chronic wound healing / X.Y. Chen, Y. Wang, S.Q. Ma [et al.] // *J. Mater. Chem. B.* – 2022. – Vol. 10. – P. 6279–86.

218. Mechanisms of action of molecules with anti-TNF-alpha activity on intestinal barrier inflammation: A systematic review protocol / M.S.R. Lima, V.C.O. de Lima, G. Piuvezam [et al.] // *Medicine.* – 2019. – Vol. 98(39). – P. e17285.

219. Mechanisms underlying heterologous skin scaffold-mediated tissue remodeling / K. Mimura, A. Moraes, A. Miranda [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 35074.

220. Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes / A.R. Gillies, L.R. Smith, R.L. Lieber [et al.] // *Tissue engineering. Part C, Methods.* – 2011. – Vol. 17(4). – P. 383–9.

221. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate / C.R. Deeken, A.K.White, S.L. Bachman [et al.] // *J Biomed Mater Res Part B.* – 2011. – Vol. 96 – P. 199–206.

222. Mimicking the hierarchical organization of natural collagen: toward the development of ideal scaffolding material for tissue regeneration / L. Salvatore, N. Gallo, M.L. Natali [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2021. – Vol. 9. – P. 644595.

223. Mini Review on Hydrogels Classification and Recent Developments in Miscellaneous Applications. / K. Varaprasad, G.M. Raghavendra, T. Jayaramudu [et al.] // *Materials Science and Engineering.* – 2017. – Vol. 79. – P. 958–71.

224. Modifying hernia mesh design to improve device mechanical performance and promote tension-free repair / M.M. Ibrahim, L.P. Poveromo, R.R. Glisson [et al.] // *Journal of Biomechanics.* – 2018. – Vol. 71. – P. 43–51.

225. Modification of collagen for biomedical applications: a review of physical and chemical methods / X. Yu, C. Tang, S. Xiong [et al.] // *Current Organic Chemistry*. – 2016. – Vol. 20. – № 17. – P. 1797–812.

226. Miller, E.J. Collagen types: structure, distribution, and functions / E.J. Miller // *In Collagen*. – 2018. – P. 139–56.

227. Mitura, S. Biopolymers for hydrogels in cosmetics / S. Mitura, A. Sionkowska, A. Jaiswal // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2020. – Vol. 31(6). – P. 1–14.

228. Moffat, D. Decellularization for the retention of tissue niches / D. Moffat, K. Ye, S. Jin // *J Tissue Eng*. – 2022. – Vol. 13. – P. 20417314221101151.

229. Mogoşanu, G.D. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing / G.D. Mogoşanu, A.M. Grumezescu // *International journal of pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 463 (2). – P. 127–36.

230. Morris, A.H. The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials / A.H. Morris, D.K. Stamer, T.R. Kyriakides // *In Seminars in immunology*. – 2017. – Vol. 29. – P. 72–91.

231. Nanotechnology-driven therapeutic interventions in wound healing: potential uses and applications / S. Hamdan, I. Pastar, S. Drakulich [et al.] // *ACS Cent Sci*. – 2017. – Vol. 3. – P. 163–75.

232. Nerve repair using decellularized nerve grafts in rat models. A review of the literature / A.B. Lovati, D. D'Arrigo, S. Odella [et al.] // *Front Cell Neurosci*. – 2018. – Vol. 12. – P. 427.

233. Nguyen, J.T. Use of human acellular dermal matrix in implant-based breast reconstruction: evaluating the evidence / J.T. Nguyen, J.N. Carey, A.K. Wong // *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. – 2011. – Vol. 64(12). – P. 1553–61.

234. Novel utilization of serum in tissue decellularization / L. Gui, S.A. Chan, C.K. Breuer [et al.] // *Tissue Eng Part C Methods*. – 2010. – Vol. 16(2). – P.173–84.

235. Omranifard, M. Combined alloplastic implant and autologous dermis graft for nasal augmentation rhinoplasty in Asians / M. Omranifard // *Aesthetic Plastic Surgery*. – 2014. – Vol. 38(5). – P. 876–77.

236. Overview of silk fibroin use in wound dressings / M. Farokhi, F. Mottaghitlab, Y. Fatahi [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2018. – Vol. 36(9). – P. 907–22.
237. Past, present and future of surgical meshes: a review / K. Baylón, P. Rodríguez-Camarillo, A. Elías-Zúñiga [et al.] // *Membranes.* – 2017. – Vol. 7(3). – P. 47.
238. Patel, S. Biomarkers for wound healing and their evaluation / S. Patel, A. Maheshwari, A. Chandra // *Journal of Wound Care.* – 2016. – Vol. 25(1). – P. 46–55.
239. Patil, J.S. Hydrogel system: An approach for drug delivery modulation / J.S. Patil // *Adv. Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* – 2015. – Vol. 4(5). – P. 135–55.
240. Patterns of recurrence and mechanisms of failure after open ventral hernia repair with mesh / J.A. Warren, S.P. McGrath, A.L. Hale [et al.] // *The American Surgeon.* – 2017. – Vol. 83(11). – P. 1275–82.
241. PEGylated graphene oxide-mediated quercetin-modified collagen hybrid scaffold for enhancement of MSCs differentiation potential and diabetic wound healing / J. Chu, P. Shi, W. Yan [et al.] // *Nanoscale.* – 2018 – Vol. 10. – P. 9547–60.
242. Pei, Y.A. The essential anti-angiogenic strategies in cartilage engineering and osteoarthritic cartilage repair / Y.A. Pei, S. Chen, M. Pei // *Cell Mol Life Sci.* – 2022. – Vol. 79(1). – P. 71.
243. Peluzzo, A.M. Challenging the paradigm: anti-inflammatory interleukins and angiogenesis / A.M. Peluzzo, M.V. Autieri // *Cells.* – 2022. – Vol. 11(3). – P. 587.
244. Peptide-based nanoparticles mimic fibrillogenesis of laminin in tumor vessels for precise embolization / K. Zhang, P.P. Yang, P.P. He [et al.] // *ACS nano.* – 2020. – Vol. 14(6). – P. 7170–80.
245. Petrof, G. Cell therapy in dermatology / G. Petrof, A. Abdul-Wahab, J.A. McGrath // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* – 2014. – Vol. 4(6). – P. a015156.
246. Phillips, M. Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization / M. Phillips, E. Maor, B. Rubinsky // *J Biomech Eng.* – 2010. – Vol. 132(9). – P. 091003.

247. Photo-inspired antibacterial activity and wound healing acceleration by hydrogel embedded with Ag/Ag@ AgCl/ZnO nanostructures / C. Mao, Y. Xiang, X. Liu [et al.] // *ACS nano*. – 2017. – Vol. 11. – № 9. – P. 9010–21.

248. Platelet von Willebrand factor – structure, function and biological importance / R.T. McGrath, E. McRae, O.P. Smith [et al.] // *Br J Haematol*. – 2010. – Vol. 148(6). – P. 834–43.

249. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering / Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31(14). – P. 3941–8.

250. Probing the effect of glycosaminoglycan depletion on integrin interactions with collagen I fibrils in the native extracellular matrix environment / J. Roth, C.L. Hoop, J.K. Williams [et al.] // *Protein Sci*. – 2023. – Vol. 32(1). – P. e4508.

251. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications / R.N. Chen, H.O. Ho, Y.T. Tsai [et al.] // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25(13). – P. 2679–86.

252. Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant red sea cucumber (*Parastichopus californicus*) / Z. Liu, A.C.M. Oliveira, Y.C. Su // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 58(2). – P. 1270–74.

253. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat / K. Gomathi, D. Gopinath, M.R. Ahmed [et al.] // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 2767–72.

254. Rabbani, M. Contribution of physical methods in decellularization of animal tissues / M. Rabbani, N. Zakian, N. Alimoradi // *Journal of Medical Signals and Sensors*. – 2021. – Vol. 11(1). – P. 1–11.

255. Rahimnejad, M. Biomaterials and tissue engineering for scar management in wound care / M. Rahimnejad, S. Derakhshanfar, W. Zhong // *Burns & trauma*. – 2017. – Vol. 5(1). – P. 1–9.

256. Recent advances in cellulose-based structures as the wound-healing biomaterials: a clinically oriented review / M.F. Abazari, S. Gholizadeh, S.Z. Karizi [et al.] // *Applied Sciences*. – 2021. – Vol. 11(17). – P. 7769.

257. Recent progress of collagen, chitosan, alginate and other hydrogels in skin repair and wound dressing applications / W. Peng, D. Li, K. Dai [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 208. – P. 400–8.

258. Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold / Y. Fu, X. Fan, P. Chen [et al.] // *Cells Tissues Organs*. – 2010. – Vol. 191 (3). – P. 193–202.

259. Regeneration of partially decellularized tracheal scaffolds in a mouse model of orthotopic tracheal replacement / L. Liu, S. Dharmadhikari, K.M. Shontz [et al.] // *J Tissue Eng*. – 2021. – Vol. 12. – P.20417314211017417.

260. Regenerative immunology: the immunological reaction to biomaterials / P. Cravedi, S. Farouk, A. Angeletti [et al.] // *Transplant International*. – 2017. – Vol. 30(12). – P. 1199–208.

261. Regulation of fibronectin and metalloproteinase expression by Wnt signaling in rheumatoid arthritis synoviocytes / M. Sen, J. Reifert, K. Lauterbach [et al.] // *Arthrit Rheum*. – 2002. – Vol. 46(11). – P. 2867–77.

262. Retro-rectus placement of bioabsorbable mesh improves patient outcomes / J.E. Cho, M.C. Helm, J.H. Helm [et al.] // *Surgical endoscopy*. – 2019. – Vol. 33(8). – P. 2629–34.

263. Rodrigues, F.T. Porcine skin as a source of biodegradable matrices: alkaline treatment and glutaraldehyde crosslinking / F.T. Rodrigues, V.C.A. Martins, A.M.G. Plepis // *Polimeros*. – 2010. – Vol. 20. – P. 25–68.

264. Rodrigues, F.T. Porcine skin as a source of biodegradable matrices: alkaline treatment and glutaraldehyde crosslinking / F.T. Rodrigues, V.C.A. Martins, A.M.G. Plepis // *Polímeros*. – 2010. – Vol. 20. – P. 92–7.

265. Rodríguez, D. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics / D. Rodríguez, C.J. Morrison, C.M. Overall // *Biochimica et biophysica acta*. – 2010. – Vol. 1803(1). – P. 39–54.

266. Sack, K.D. The angiotensin-Tie2 pathway in critical illness / K.D. Sack, J.A. Kellum, S.M. Parikh // *Crit Care Clin*. – 2020. – Vol. 36(2). – P. 201–16.

267. Sahana, T.G. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering / T.G. Sahana, P. Rekha // *Molecular biology reports*. – 2018. – Vol. 45(6). – P. 2857–67.
268. Sajith, S. Comparative study of two decellularization protocols on a biomaterial for tissue engineering / S. Sajith // *J Clin Exp Cardiol*. – 2017. – Vol. 08. – P. 1000523.
269. Schultz, G.S. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing / G.S. Schultz, A. Wysocki // *Wound Rep Reg*. – 2009. – Vol. 17. – P. 153–62.
270. Senger, D.R. Angiogenesis / D.R. Senger, G.E. Davis // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. – Vol. 3(8). – P. a005090.
271. Sha, H. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration / H. Sha, X. Fu // *Journal of Controlled Release*. – 2010. – Vol. 142 (2). – P. 149–59.
272. Sharifzadeh, G. Biomolecule-responsive hydrogels in medicine / G. Sharifzadeh, H. Hosseinkhani // *Advanced healthcare materials*. – 2017. – Vol. 6(24). – P. 170–7.
273. Shekhter, A.B. Medical applications of collagen and collagen-based materials / A.B. Shekhter, A.L. Fayzullin, M.N. Vukolova [et al.] // *Current medicinal chemistry*. – 2019. – Vol. 26 (3). – P. 506–16.
274. Shoulders, M.D. Collagen structure and stability / M.D. Shoulders, R.T. Raines // *Annu Rev Biochem*. – 2009. – Vol. 78. – P. 929–58.
275. Sionkowska, A. Collagen blended with natural polymers: Recent advances and trends / A. Sionkowska // *Progress in Polymer Science*. – 2021. – Vol. 122. – P. 101452.
276. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications / A.W.C. Chua, Y.C. Khoo, B.K. Tan [et al.] // *Burns & trauma*. – 2016. – Vol. 4. – № 1. – P. 3.
277. Smandri, A. Natural 3D-printed bioinks for skin regeneration and wound healing: A systematic review / A. Smandri, A. Nordin, N.M. Hwei // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12/ – № 8. – P. 17–42.

278. Smart, N. Supplemental cross-linking in tissue-based surgical implants for abdominal wall repair / N. Smart, I. Daniels, S. Marquez // *International journal of surgery*. – 2012. – Vol. 10(9). – P. 436–42.
279. Spang, M.T. Extracellular matrix hydrogel therapies: in vivo applications and development / M.T. Spang, K.L. Christman // *Acta biomaterialia*. – 2018. – Vol. 68. – P. 1–14.
280. Stern, D. Crafting polymeric and peptidic hydrogels for improved wound healing / D. Stern, H. Cui // *Advanced Healthcare Materials*. – 2019. – Vol. 8(9). – P. 1900104.
281. Sublay hernioplasty versus onlay hernioplasty in incisional hernia: A comparative study / F. Tahir, A.R. Alvi, A. Warraich [et al.] // *Pak J Surg*. – 2021. – Vol. 37(3). – P. 167–72.
282. Sun, B.K. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds / B.K. Sun, Z. Siprashvili, P.A. Khavari // *Science*. – 2014. – Vol. 346(6212). – P. 941–45.
283. Supramolecular polymer hydrogels for drug-induced tissue regeneration / J. Cheng, D. Amin, J. Latona [et al.] // *ACS nano*. – 2019. – Vol. 13(5). – P. 5493–501.
284. Syed, O. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering / O. Syed, N.J. Walters, R.M. Day // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10(12). – P. 5043–54.
285. Synthetic versus biologic mesh for complex open ventral hernia repair: a pilot randomized controlled trial / O.A. Olavarria, K. Bernardi, N.H. Dhanani [et al.] // *Surgical Infections*. – 2021. – Vol. 22(5). – P. 496–503.
286. Systematic review of the stage of innovation of biological mesh for complex or contaminated abdominal wall closure / S.K. Kamarajah, S.J. Chapman, J. Glasbey [et al.] // *BJS open*. – 2018. – Vol. 2(6). – P. 371–80.
287. The complex interplay between extracellular matrix and cells in tissues / D. Manou, I. Caon, P. Bouris [et al.] // *The Extracellular Matrix*. – 2019. – Vol. 1952. – P. 1–20.

288. The «dermal cage»: Inferiorly based dermal flap technique for breast reconstruction after mastectomy / Z. Vlajcic, K. Martic, S. Budi [et al.] // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2020. – Vol. 73(3). – P. 486–93.

289. The effect of acellular dermal matrix use on complication rates in tissue expander/implant breast reconstruction / S.T. Lanier, E.D. Wang, J.J.Chen [et al.] // *Annals of plastic surgery.* – 2010. – Vol. 64. – № 5. – P. 674–78.

290. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds / J.E. Reing, B.N. Brown, K.A. Daly [et al.] // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31(33). – P. 8626–33.

291. The evidence base for the acellular dermal matrix AlloDerm: a systematic review / L.A. Jansen, P. De Caigny, N.A. Guay [et al.] // *Ann Plast Surg.* – 2013. – Vol. 70(5). – P. 587–94.

292. The granulation tissue preservation technique in regenerative therapy of peri-implantitis—a treatment concept with case reports / H. Günay, I. Staufenbiel, W. Geurtsen [et al.] // *Dtsch Zahnärztl Z Int.* – 2019. – Vol. 1. – P. 4–15.

293. The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix / N. Poornejad, L.B. Schaumann, E.M. Buckmiller [et al.] // *Journal of Biomaterials Applications.* – 2016. – Vol. 31(4). – P. 521–33.

294. The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective / K. Ousey, K.F. Cutting, A.A. Rogers [et al.] // *Journal of wound care.* – 2016. – Vol. 25(3). – P. 122–30.

295. The metabolic microenvironment steers bone tissue regeneration / J. Loeffler, G.N. Duda, F.A. Sass [et al.] // *Trends in Endocrinology & Metabolism.* – 2018. – Vol. 29(2). – P. 99–110.

296. The plasminogen-activator plasmin system in physiological and pathophysiological angiogenesis / A.A. Ismail, B.T. Shaker, K. Bajou // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 23(1). – P. 337.

297. The retention of extracellular matrix proteins and angiogenic and mitogenic cytokines in a decellularized porcine dermis / D.M. Hoganson, E.M. O'Doherty, G.E. Owens [et al.] // *Biomaterials* – 2010. – Vol. 31(26). – P. 6730–7.

298. The use of human acellular dermal matrix for the correction of secondary deformities after breast augmentation: results and costs / T.L. Hartzell, A.H. Taghinia, J. Chang [et al.] // *Plastic and reconstructive surgery*. – 2010. – Vol. 126(5). – P. 1711–20.

299. Thermosensitive injectable decellularized nucleus pulposus hydrogel as an ideal biomaterial for nucleus pulposus regeneration / L. Yu, Z.J. Sun, Q.C. Tan [et al.] // *Journal of biomaterials applications*. – 2020. – Vol. 35. – № 2. – P. 45–55.

300. Tissue-engineered skin constructs and application of stem cells for creation of skin equivalents (review) / A. Meleshina, A. Bystrova, O. Rogovaya [et al.] // *Sovremennye tehnologii v medicine*. – 2017. – Vol. 9(1). – P. 198–218.

301. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels / T.J. Hinton, Q. Jallerat, R.N. Palchesko [et al.] // *Science advances*. – 2015. – Vol. 1(9). – P. 18–25.

302. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices / L. Delgado, Y. Bayon, A. Pandi [et al.] // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. – 2015. – Vol. 21(3). – P. 298–313.

303. Towards the creation of decellularized organ constructs using irreversible electroporation and active mechanical perfusion / M.B. Sano, R.E. Neal 2nd, P.A. Garcia [et al.] // *Biomed Eng Online*. – 2010. – Vol. 9(1). – P. 83.

304. Tracy, L.E. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound / L.E. Tracy, R.A. Minasian, E.J. Caterson // *Advances in wound care*. – 2016. – Vol. 5(3). – P. 119–36.

305. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology / D. Kajdaniuk, B. Marek, H. Borgiel-Marek [et al.] // *Endokrynologia Polska*. – 2013. – Vol 64(5). – P. 384–96.

306. Use of a bioartificial dermal regeneration template for skin restoration in combat casualty injuries / J.G. Seavey, Z.A. Masters, G.S. Balazs [et al.] // *Regenerative medicine*. – 2016. – Vol. 11(1). – P. 81–90.

307. Varma, S. Nanomechanics of type I collagen / S. Varma, J.P. Orgel, J.D. Schieber // *Biophysical journal*. – 2016. – Vol. 111(1). – P. 50–6.

308. Warth, R.J. Resorbable collagen scaffolds for the treatment of meniscus defects: a systematic review / R.J. Warth, W.G. Rodkey // *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. – 2015. – Vol. 31. – № 5. – P. 927–41.
309. Wen, Q. Elastin biomaterials in dermal repair / Q. Wen, S.M. Mithieux, A.S. Weiss // *Trends in biotechnology*. – 2020. – Vol. 38(3). – P. 280–91.
310. Werner, S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // *Physiol Rev*. – 2003. – Vol. 83. – P. 835–70.
311. Williams, D.F. Challenges with the development of biomaterials for sustainable tissue engineering / D.F. Williams // *Front. Bioeng. Biotechnol*. – 2019. – Vol. 7. – P. 127.
312. Wong, M.L. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization / M.L. Wong, L.G. Griffiths // *Acta Biomater*. – 2014. – Vol. 10(5). – P. 1806–16.
313. Wound repair: role of immune–epithelial interactions / G. Leoni, P.A. Neumann, R. Sumagin [et al.] // *Mucosal immunology*. – 2015. – Vol. 8(5). – P. 959–68.
314. Wu, S.C. Wound care: the role of advanced wound-healing technologies / S.C. Wu, W. Marston, D.G. Armstrong // *Journal of the American Podiatric Medical Association*. – 2010. – Vol. 100. – № 5. – P. 385–94.
315. Xu, J. Advances in the research of bioinks based on natural collagen, polysaccharide and their derivatives for skin 3D bioprinting / J. Xu, S. Zheng, X. Hu // *Polymers*. – 2020. – Vol. 12. – № 6. – P. 12–37.
316. Yannas, I.V. Surface biology of collagen scaffold explains blocking of wound contraction and regeneration of skin and peripheral nerves / I.V. Yannas, D. Tzeranis, P.T. So // *Biomedical Materials*. – 2015. – Vol. 11. – № 1. – P. 18–33.
317. You, H.J. Cell therapy for wound healing / H.J. You, S.K. Han // *Journal of Korean medical science*. – 2014. – Vol. 29. – № 3. – P. 311–19.
318. Zeng, H.Y. Basic fibroblast growth factor released from fucoidan-modified chitosan/alginate scaffolds for promoting fibroblasts migration / H.Y. Zeng, Y.C. Huang // *J Polym Res*. – 2018. – Vol. 25. – P. 83.

319. Zhang, X. Tissue engineering applications of three-dimensional bioprinting / X. Zhang, Y. Zhang // Cell biochemistry and biophysics. – 2015. – Vol. 72(3). – P. 777–82.

320. Zhu, D. Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration / D. Zhu, H. Wang, P. Trinh // Biomaterials. – 2017. – Vol. 127. – P. 132–40.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблица 1 – Разнообразие биополимеров и их биологическая роль в процессах заживления	18
Таблица 2 – Отдельные агенты и методы децеллюляризации тканей.....	34
Таблица 3 – Сравнительная характеристика различных методов децеллюляризации	49
Рисунок 1 – Забор лоскута дермы свиньи электрическим дерматомом ДЭ-100-01.....	51
Рисунок 2 – Результат фенотипирования клеток, выделенных из дермы свиньи на маркеры стволовых клеток CD90 и CD105	60
Таблица 4 – Алгоритмы детергентно-энзиматической обработки дермы.....	65
Рисунок 3 – Динамика последовательных изменений структуры ВКМ дермы в процессе децеллюляризации по алгоритму № 1	67
Рисунок 4 – Динамика последовательных изменений структуры ВКМ дермы в процессе децеллюляризации по алгоритму № 2.....	67
Рисунок 5 – Результаты определения наличия интактных ядер	68
Рисунок 6 – Внешний вид образца дермы А (до) и Б (после) обработки детергентно-энзиматическим способом по алгоритму № 1	68
Рисунок 7 – Результаты количественного анализа содержания ДНК в нативной и децеллюляризированной дерме свиньи.....	69
Рисунок 8 – Результаты цитотоксических тестов биопластических материалов на основе дермы свиньи.....	70
Рисунок 9 – Оценка цитотоксичности образцов АДМ методом Live/Dead через 24 часа после инкубации.....	70
Таблица 5 – Оценка пролиферативной активности и жизнеспособности клеток на образцах АДМ, полученных по различным алгоритмам обработки	71
Рисунок 10 – Моделирование раневой поверхности различной глубины с помощью электродерматома.....	73

Рисунок 11 – Внешний вид смоделированной раневой поверхности различной глубины	73
Рисунок 12 – Фиксация исследуемых раневых покрытий.....	76
Рисунок 13 – Вид раны в динамике.....	77
Рисунок 14 – Закрытие раневой поверхности свободной кожной аутопластикой на 20-е сутки эксперимента	77
Рисунок 15 – Вид раны на 30-е сутки после начала эксперимента.....	78
Рисунок 16 – Морфологический анализ результатов имплантации АДМ.....	79
Рисунок 17 – Морфологический анализ результатов имплантации рещеллюляризованного дермального матрикса	80
Рисунок 18 – Морфологический анализ результатов имплантации рещеллюляризованного дермального матрикса	81
Рисунок 19 – Морфологический анализ участка раны, закрытого толстой кожей через 5 месяцев после лечения.....	82
Рисунок 20 – Морфологический анализ участка раны, закрытого рещеллюляризованным дермальным матриксом, через 5 месяцев после лечения	82
Рисунок 21 – Морфологический анализ участка раны, закрытого с помощью расщеплённого лоскута, через 5 месяцев после лечения.....	83
Рисунок 22 – Забор эпидермального слоя с донорского участка дисковым электродерматомом.....	86
Рисунок 23 – Подготовленное операционное поле для получения образцов дермы не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см.....	86
Рисунок 24 – Полученные образцы дермы не менее чем $10 \pm 0,5 \times 20$ см толщиной 0,7 мм	86
Таблица 6 – Краткий алгоритм детергентно-энзиматической обработки больших лоскутов дермы для получения АДМ.....	89
Рисунок 25 – Ацеллюлярный дермальный матрикс	89
Рисунок 26 – Результаты определения содержания ДНК в образцах тканей дермы после детергентно-энзиматической обработки	90

Рисунок 27 – Результаты количественного анализа ДНК в образце нативной и децеллюляризированной дермы.....	90
Рисунок 28 – Гистологический анализ образцов дермы до обработки (А) и после обработки (Б)	91
Рисунок 29 – Анализ содержания сульфатированных гликозаминогликанов в АДМ и нативной дерме	92
Рисунок 30 – Анализ содержания гиалуроновой кислоты в АДМ и нативной дерме.....	92
Рисунок 31 – Оценка цитотоксичности децеллюляризированной дермы методом Live/Dead	93
Рисунок 32 – Гистологическая оценка препаратов АДМ и нативной дермы свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 7 сутки	94
Рисунок 33 – Гистологическая оценка препаратов АДМ и нативной дермы свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 14 сутки	96
Рисунок 34 – Гистологическая оценка препаратов АДМ и нативной дермы свиньи после подкожной имплантации экспериментальным животным на 60 сутки	97
Рисунок 35 – Содержание CD3+ – Т-лимфоцитов и CD68+ – макрофагов в области имплантации в различные сроки эксперимента.....	98
Таблица 7 – Механические показатели, полученные при растяжении биологических образцов.....	99
Рисунок 36 – Диаграммы растяжения образцов биоматериалов	100
Таблица 8 – Основные механические свойства биоматериалов	100
Рисунок 37 – Результаты испытаний образцов АДМ с помощью разрывной машины Instron 1122	101
Рисунок 38 – Результаты испытаний образцов Permascoll™ с помощью разрывной машины Instron 1122.....	101
Рисунок 39 – Результаты испытаний образцов нативной дермы с помощью разрывной машины Instron 1122.....	101

Рисунок 40 – Этапы экспериментальной герниопластики с использованием АДМ	105
Рисунок 41 – Внешний вид свиньи-грызеносителя.....	106
Рисунок 42 – Гистологическое исследование тканей из области имплантации АДМ.....	107
Рисунок 43 – Иммунофенотипирование соединительной ткани послеоперационного рубца	107
Рисунок 44 – Соединительная ткань в области послеоперационного рубца. Многочисленные капилляры (CD31-позитивные эндотелиоциты) на границе с жировой клетчаткой	108
Рисунок 45 – Область имплантации материала Permacol™.....	108
Рисунок 46 – Этапы имплантации АДМ без помещения грудного эндопротеза в сформированный карман.....	111
Рисунок 47 – Граница АДМ и апоневроза белой линии живота.....	112
Рисунок 48 – Коллагеновые волокна располагаются диффузно или в виде пучков относительно равномерно в поле зрения.....	112
Рисунок 49 – Отсутствие воспалительных элементов в месте имплантации АДМ	113
Рисунок 50 – Экспрессия CD31 в месте имплантации АДМ.....	114
Рисунок 51 – Граница Permacol™ и белой линии живота. Выраженный клеточный компонент в импланте.....	114
Рисунок 52 – Равномерное расположение коллагена I типа в месте имплантации Permacol™.....	115
Рисунок 53 – Иммуногистохимическое окрашивание в месте имплантации Permacol™.....	115
Таблица 9 – Результаты подбора оптимальной концентрации щелочного раствора для обработки дермы	117
Рисунок 54 – Внешний вид образца дермы до обработки щелочным раствором (А), после 6 ч обработки 5 % NaOH (Б), после 20 ч обработки 5 % NaOH (В).....	118

Рисунок 55 – Результаты анализа содержания общего белка в дермальном гидрогеле.....	119
Рисунок 56 – Результаты анализа содержания нативного коллагена в дермальном гидрогеле	120
Рисунок 57 – Результаты анализа содержания гиалуроновой кислоты в дермальном гидрогеле	120
Рисунок 58 – Результаты анализа содержания сульфатированных гликозаминогликанов в дермальном гидрогеле.....	121
Рисунок 59 – Количественное содержание ДНК в дермальном гидрогеле	122
Рисунок 60 – Результаты окрашивания DAPI. Образцы (А) нативной дермы и (Б) после химической децеллюляризации.....	123
Таблица 10 – Степень жизнеспособности и пролиферативной активности дермальных фибробластов при инкубации с дермальным гидрогелем	123
Рисунок 61 – Морфология клеток DF-1 на дне лунок планшета при различных соотношениях питательной среды и дермального гидрогеля.....	124
Рисунок 62 – Данные ХТТ-анализа жизнеспособности дермальных фибробластов при инкубации в присутствии дермального гидрогеля	125
Рисунок 63 – Подкожная инъекция дермального гидрогеля лабораторным животными.....	125
Рисунок 64 Гистологический анализ образцов дермы в месте инъекции гидрогеля на 3-и сутки.....	126
Таблица 11 – Количественный анализ иммунофенотипирования образцов тканей ожоговых ран в экспериментальных группах	129
Рисунок 65 – Внешний вид животных после нанесения ожоговой раны	130
Рисунок 66 – Гистологическая картина ожоговой раны без лечения на 3-и сутки	131
Рисунок 67 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой мазью «Левомеколь», на 3 сутки.....	131
Рисунок 68 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой дермальным гидрогелем, на 3-и сутки.....	132

Рисунок 69 – Гистологическая картина ожоговой раны без лечения на 7-е сутки	133
Рисунок 70 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой мазью «Левомеколь», на 7-е сутки.....	134
Рисунок 71 – Гистологическая картина ожоговой раны, покрытой дермальным гидрогелем, на 7-е сутки	134
Рисунок 72 – Гистологическая картина ожоговых ран на 14-е сутки	135
Таблица 12 – Степень дегрануляции и количество тучных клеток в образцах тканей экспериментальных групп.....	136
Рисунок 73 – Тучные клетки в образцах тканей экспериментальных групп на 7-е сутки	136
Таблица 13 – Динамика восстановления компонентов ВКМ кожи в образцах тканей экспериментальных групп.....	137
Рисунок 74 – Динамика содержания цитокератина после нанесения ожоговой раны у экспериментальных животных	138
Рисунок 75 – Относительное изменение уровней IL1 β при лечении ожоговых ран крыс в динамике	140
Таблица 14 – Медианные значения концентраций про- и противовоспалительных цитокинов в динамике при экспериментальном лечении ожоговых ран крыс	140
Рисунок 76 – Относительное изменение уровней IL6 при лечении ожоговых ран крыс в динамике	143
Рисунок 77 – Относительное изменение уровней IL8 при лечении ожоговых ран крыс в динамике	144
Рисунок 78 – Относительное изменение уровней TNF α при лечении ожоговых ран крыс в динамике	145
Рисунок 79 – Относительное изменение уровней IL4 при лечении ожоговых ран крыс в динамике	147
Рисунок 80 – Относительное изменение уровней IL10 при лечении ожоговых ран крыс в динамике	147

Рисунок 81 – Относительное изменение уровней PDGF при лечении поверхностных ран крыс в динамике.....	149
Рисунок 82 – Относительное изменение уровней VEGF при лечении поверхностных ран крыс в динамике.....	150
Рисунок 83 – Относительное изменение уровней TGF β 1 при лечении поверхностных ран крыс в динамике.....	151
Рисунок 84 – Относительное изменение уровней IGF1 при лечении поверхностных ран крыс в динамике.....	152

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Патенты на изобретения

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2726600

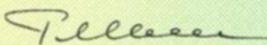
**СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ КОЖНОЙ РАНЫ У
СВИНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Патентообладатели: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Научно-исследовательский институт - краевая клиническая больница N1 имени профессора С.В. Очаповского" Министерства здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ "НИИ-ККБ N1 им. проф. Очаповского" Минздрава Краснодарского края) (RU), Богданов Сергей Борисович (RU), Каракулев Антон Владимирович (RU), Порханов Владимир Алексеевич (RU), Гилевич Ирина Валерьевна (RU), Сотниченко Александр Сергеевич (RU), Мелконян Карина Изгоревна (RU), Ушмаров Денис Изгоревич (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № **2019122965**
 Приоритет изобретения **16 июля 2019 г.**
 Дата государственной регистрации в
 Государственном реестре изобретений
 Российской Федерации **14 июля 2020 г.**
 Срок действия исключительного права
 на изобретение истекает **16 июля 2039 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 **Г.П. Ивлиев**



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2717088

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО
ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА

Патентообладатели: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Научно-исследовательский институт - Краевая клиническая больница N 1 имени профессора С.В. Очаповского" Министерства здравоохранения Краснодарского края (ГБУЗ "НИИ-ККБ N 1 им. проф. С.В. Очаповского" Минздрава Краснодарского края) (RU), Гилевич Ирина Валериевна (RU), Сотниченко Александр Сергеевич (RU), Мелконян Карина Игоревна (RU), Юцкевич Яна Андреевна (RU), Богданов Сергей Борисович (RU), Каракулев Антон Владимирович (RU), Порханов Владимир Алексеевич (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2019133278

Приоритет изобретения 18 октября 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 18 марта 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 18 октября 2039 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2768156

**СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ДЕРМЫ СВИНЬИ ДЛЯ
СОЗДАНИЯ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО
МАТРИКСА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Патентообладатели: *Мелконян Карина Игоревна (RU), Сотниченко Александр Сергеевич (RU), Русинова Татьяна Викторовна (RU), Козмай Яна Андреевна (RU)*

Авторы: *Мелконян Карина Игоревна (RU), Сотниченко Александр Сергеевич (RU), Веревкин Александр Александрович (RU), Русинова Татьяна Викторовна (RU), Асякина Алевтина Сергеевна (RU), Козмай Яна Андреевна (RU)*

Заявка № 2021115743

Приоритет изобретения 31 мая 2021 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 23 марта 2022 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 31 мая 2041 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2791987

СПОСОБ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ДЕРМЫ СВИНЬИ
ДЛЯ РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ПЛАСТИЧЕСКОЙ
ХИРУРГИИ

Патентообладатели: *Мелкоян Карина Игоревна (RU), Русинова
Татьяна Викторовна (RU), Козмай Яна Андреевна (RU),
Асякина Алевтина Сергеевна (RU)*

Авторы: *Мелкоян Карина Игоревна (RU), Веревкин Александр
Александрович (RU), Русинова Татьяна Викторовна (RU),
Асякина Алевтина Сергеевна (RU), Козмай Яна Андреевна
(RU)*

Заявка № 2022109499

Приоритет изобретения 08 апреля 2022 г.

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 15 марта 2023 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 08 апреля 2042 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



Акты об использовании предложений



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России)

350063, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4 тел. (861)268-36-84 факс (861)268-32-84

e-mail: corpus@ksma.ru

ИНН 2309023448

КПП 230901001

БИК 040349001

№ _____ от " ____ " _____ 2023 г.

на № _____ от " ____ " _____ 2023 г.



АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: Способ децеллюляризации дермы свиньи для реконструктивной пластической хирургии
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств»
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется в хирургическом отделении №2 с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: разработанный ацеллюлярный дермальный матрикс хорошо моделируется по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки, что существенно оптимизирует хирургические манипуляции при герниопластике. Благодаря биологической природе АДМ, тканевые и клеточные реакции в области его расположения протекают более физиологично, и происходит постепенное замещение материала вновь образованной соединительной тканью. Биоматериал обладает высокими прочностными характеристиками, позволяет надежно укреплять дефект передней брюшной стенки и устойчив к прорезыванию шовным материалом.

Зав. кафедрой факультетской и
госпитальной хирургии
ФГБОУ ВО КубГМУ
Минздрава России,
д.м.н.

/К.И. Попандопуло/

Автор предложения:
к.м.н., доцент

/К.И. Мелконян/

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница скорой медицинской помощи» министерства здравоохранения Краснодарского края
 ОГРН 1032305689217 ИНН 2310017921
 Россия, Краснодарский край, 350042, г. Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 14
 тел.: 257-04-26, факс: 252-24-7

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач
 ГБУЗ «Краевая клиническая больница скорой медицинской помощи» г. Краснодар МЗ КК
 И.В. Босак
 «31» 2023г.

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: Способ децеллюляризации дермы для реконструктивной пластической хирургии
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств»
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется в хирургическом отделении №2 ГБУЗ ККБ СМП МЗ КК с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: разработанный ацеллюлярный дермальный матрикс хорошо моделируется по размерам и форме дефекта передней брюшной стенки, что существенно оптимизирует хирургические манипуляции при герниопластике. Благодаря биологической природе АДМ, тканевые и клеточные реакции в области его расположения протекают более физиологично, и происходит постепенное замещение материала вновь образованной соединительной тканью. Биоматериал обладает высокими прочностными характеристиками, позволяет надежно укреплять дефект передней брюшной стенки и устойчив к прорезыванию шовным материалом.

Зав. хирургическим отделением №2
 ГБУЗ ККБ СМП
 г. Краснодара МЗ КК

Автор предложения:
 к.м.н., доцент



/М.Т. Дидигов/



/К.И. Мелконян/

ООО «АБ МЕДИКАЛ»

Юр. адрес: 115478 г. Москва, Каширское ш., д.24, стр. 4, 2 эт.
 ИНН 7724513948/КПП 772401001; р/с 40702810100000047079;
 к/с 30101810145250000411; БИК 044525411; ОКПО 73518584

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель учреждения

/Б.В. Шмелькин/

(подпись) (расшифровка подписи)

«29» _____ 2023 г.

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: Способ подготовки дермы свиньи для создания ацеллюлярного дермального матрикса в эксперименте (патент на изобретение RU 2768156 C1).
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств»
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется: в покрытии биологическом «Ксенодерм» с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: использование предварительно снятого кожного лоскута вместо забора образцов дермы непосредственно с боковой поверхности тела животного позволяет получать образцы точно заданной толщины и размера, так как нивелируется влияние подлежащих участков тела на качество забираемой дермы (неравномерный забор по толщине образца с реберных участков животного, а также отсутствие достаточного упора в области живота), что позволяет использовать дисковый нож большого диаметра на всей поверхности предварительно забранного лоскута.

Руководитель подразделения



/Б.В. Шмелькин/

Автор предложения:

к.м.н., доцент

/К.И. Мелконян/

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
**«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ - КРАЕВАЯ
КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА №1
ИМЕНИ ПРОФЕССОРА
С.В. ОЧАПОВСКОГО»**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
1 Мая ул., д. 167, г. Краснодар, 350086
тел: (861) 252-85-91, 252-73-02
факс: (861) 252-82-17, 215-35-12
e-mail:kkb1@mail.ru
ИНН 2311040088

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель учреждения

В.А. Порханов/

(подпись) (подтверждение подписи)

« _____ » 2023 г.



от _____ № _____

на № _____ от _____

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: методические рекомендации по применению ацеллюлярного дермального матрикса для лечения ожоговых ран в эксперименте
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств»
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется в ожоговом отделении с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: разработанный ацеллюлярный дермальный матрикс может быть использован в качестве временного покрытия ожоговой раны, он хорошо моделируется по размерам и форме дефекта, что существенно оптимизирует хирургические манипуляции. Благодаря биологической природе ацеллюлярный дермальный матрикс обладает биосовместимостью на тканевом уровне, не вызывает воспалительную реакцию и образование соединительнотканной капсулы, отграничивающей матрикс от окружающих тканей.

Заведующий ожоговым
отделением, д.м.н.

Автор предложения:
к.м.н., доцент

/С.Б. Богданов/

/К.И. Мелконян/

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
**«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ - КРАЕВАЯ
КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА №1
ИМЕНИ ПРОФЕССОРА
С.В. ОЧАПОВСКОГО»**
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
1 Мая ул., д. 167, г. Краснодар, 350086
тел: (861) 252-85-91, 252-73-02
факс: (861) 252-82-17, 215-35-12
e-mail:kkb1@mail.ru
ИНН 2311040088

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель учреждения
В.А. Порханов/

(подпись) *В.А. Порханов*
2023 г.



от _____ № _____
на № _____ от _____

АКТ

об использовании предложения

1. Наименование предложения: методические рекомендации по применению коллагенсодержащего гидрогеля на основе биополимеров дермы свиньи в эксперименте.
2. Наименование научно-исследовательской работы, в рамках которой разработано предложение: докторская диссертация «Разработка и применение биопластических материалов на основе внеклеточного матрикса дермы в качестве тканезамещающих и активирующих репарацию средств».
3. Автор предложения: зав. центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, к.м.н. Мелконян К.И.
4. Предложение используется: в лаборатории разработки и изучения новых технологий лечения заболеваний с 29 мая 2023 года.
5. Эффективность предложения: разработанный гидрогель на основе ВКМ дермы является удобной формой коллагенсодержащего биоматериала, полностью биосовместим и может быть использован в разных направлениях работы лаборатории, например, для создания природоподобных условий при культивировании дермальных фибробластов, в качестве основы для ранозаживляющих препаратов, биочернил для 3D-принтинга, среды для 3D-культивирования клеточных культур.

Зав. лабораторией разработки
и изучения новых технологий
лечения заболеваний, к.м.н.

И.В. Гилевич / И.В. Гилевич /

Автор предложения:
к.м.н., доцент

К.И. Мелконян / К.И. Мелконян /

Протокол

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(Минобрнауки России)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИНЦ РАН)

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,
эл. адрес: cellbio@incras.ru; http://www.cytspb.rssi.ru/

18.06.2021 № 1-1-599

На № _____ от _____

Паспорт коллекционной клеточной линии DF-1

Происхождение: человек, дермальные фибробласты (мезенхимные стволовые клетки) из кожи век 37-летнего донора женского пола.

Цитология. 2016. 57 (11): 850-864.

Морфология: фибробластоподобная

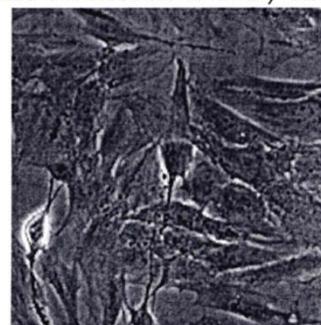
Способ культивирования: монослойный

Условия культивирования: среда - DMEM/F12

сыворотка - эмбриональная бычья 10%

процедура посева - снятие клеток, используя трипсин 0.25%: версен 0.02% (1:3), кратность посева 1:3, оптимальная плотность $4.0 - 5.0 \times 10^4$ клеток/см²

криоконсервация - ростовая среда, 10 % DMSO, $1.0 - 1.5 \times 10^6$ клеток/мл в ампуле



Жизнеспособность после криоконсервации: 85 % (окраска трипановым синим на нулевом пассаже)

Контроль контаминации: бактерии, грибы и микопlasма не обнаружены

Контроль видовой идентичности: кариологический анализ.

Кариология: $2n = 46$, модальное число хромосом 46 (98.0 %), нормальный кариотип человека (46, XX), обнаружены неклональные структурные хромосомные перестройки (13.3 %), количество полиплоидов 0.8 %.

ДНК профиль (STR):

Amelogenin:	X,	X
CSF1PO:	11,	11
D13S317:	11,	11
D16S539:	10,	12
D5S818:	9,	13
D7S820:	10,	12
THO1:	9.3,	9.3
TPOX:	8,	9
vWA:	15,	19

Эффективность клонирования: 34.5 %

Другие характеристики: среднее время одного удвоения клеточной популяции 40.0 ч; время активной (логарифмической) фазы роста на 6-м пассаже составляет 72 ч.

Линия с ограниченным сроком жизни; фаза активного репликативного старения наступает на 25 пассаже, что соответствует более 50 удвоениям клеточной популяции.

Экспрессия поверхностных антигенов, характерных для мезенхимных стволовых клеток: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC; отсутствие экспрессии антигенов CD34, CD45 и HLA-DR.

Направленная дифференцировка в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.

Область применения: клеточная биология, биотехнология.

Коллекции: КККП ИНЦ РАН.

Рук. Биоресурсной коллекции культур клеток позвоночных ИНЦ РАН

д.б.н

Г.Г. Полянская
Тамара Павловна П