

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ БЕСКЛЕТОЧНЫЙ НЕИММУНОГЕННЫЙ ПРОДУКТ СОХРАНЯЕТ ОСНОВНЫЕ РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Д. В. Товпеко^{1, *}, А. А. Кондратенко¹, Л. И. Калужная¹, В. Е. Чернов¹, Д. А. Земляной², А. И. Полосков¹, А. В. Нащекин³, В. А. Сениченков³

¹ФГБОУ ВО “Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова”

Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, 194044 Россия

²ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет”

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 194100 Россия

³ФГБУН “Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе”

Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194021 Россия

*e-mail: tovpeko.dmitry@gmail.com

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

После доработки 24.10.2022 г.

Принята к публикации 08.11.2022 г.

Описана технология изготовления тканеинженерной бесклеточной конструкции из внеклеточного матрикса Вартонова студня пуповины человека для тканевой инженерии и регенеративной медицины способом детергентной децеллюляризации. Изучено влияние двух разных концентраций додецилсульфата натрия на эффективность процесса децеллюляризации методом флуоресцентного окрашивания клеточных ядер и количественного определения ДНК. Исследована структура и сохранность важнейших функциональных компонентов полученного материала с использованием инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. В бесклеточном продукте масс-спектрометрическим анализом оценено остаточное количество детергента и колориметрическим методом окрашиванием альциановым синим количество сульфатированных и несульфатированных гликозаминогликанов. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности удаления клеточного и генетического материала, сохранности структуры внеклеточного матрикса при обеих использованных концентрациях детергента. При этом более низкое его остаточное присутствие и более высокую сохранность гликозаминогликанов в продукте обеспечивает меньшая использованная концентрация. Изготовленный из биоматериала гомологичного происхождения бесклеточный продукт является потенциально неиммуногенным и нетоксичным, сохраняет основные структурные и функциональные компоненты нативной пуповины, важные для процессов регенерации и заживления ран.

Ключевые слова: Вартонов студень, пуповина человека, бесклеточный продукт, децеллюляризация, детергент, тканевая инженерия, регенеративная медицина, биосовместимый материал

DOI: 10.56304/S0234275823010118

Заживление ран – сложный динамический и строго регулируемый биологический процесс, в котором активную роль играют компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ), различные типы клеток и регуляторные факторы [1, 2]. Нарушение выраженности и длительности фаз раневого процесса часто приводит к развитию хронических ран и/или формированию патологических руб-

цов, которые в зависимости от локализации могут стать причиной функциональных, физиологических и серьезных косметических дефектов, снижая качество жизни пациентов [1]. Поиск новых высокофункциональных биосовместимых материалов и разработка на их основе тканеинженерных продуктов, способствующих улучшению условий естественного течения раневого процесса и сокращению сроков заживления ран, остается актуальной задачей для тканевой инженерии и регенеративной медицины [1, 2].

Децеллюляризованный ВКМ рассматривается как наиболее привлекательный материал в качестве основы тканеинженерного продукта для лечения ран [1–5], поскольку сохраняет в своем

Список сокращений: (по алфавиту) ВКМ – внеклеточный матрикс; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндолил; EGF – эпидермальный фактор роста; FGF – фактор роста фибробластов; FTIR – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье; IL – интерлейкин; SDS – додецилсульфат натрия; TGF – трансформирующий фактор роста; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

составе важнейшие структурные и функциональные компоненты нативной ткани. ВКМ представляет собой тканеспецифичную трехмерную сеть, основными макромолекулярными составляющими которой являются коллагены, фибронектин, ламинины, эластин, протеогликаны и гликозаминогликаны [3]. Участие компонентов ВКМ в процессе заживления ран подтверждено несколькими исследованиями [6–8]. Известно, что различные типы коллагена прямо или косвенно влияют на течение раневого процесса. Так, коллаген III типа появляется в начальной фазе раневого процесса, выступая в качестве основной структуры в матриксе ран, позднее замещаясь коллагеном I типа. Коллаген I типа стимулирует миграцию кератиноцитов во время эпителизации, коллаген IV типа преимущественно участвует в сборке и стабилизации базальной мембраны вместе с ламинином, а коллаген V типа модулирует поведение фибробластов, способствуя их пролиферации, миграции и прикреплению к ВКМ [1, 6, 7]. Протеолиз ВКМ в ответ на сигналы от микроокружения приводит к локальному высвобождению различных факторов роста, иммобилизованных и изолированных внутри протеогликанов ВКМ и белковой сети включая фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF), тем самым модулируя процесс заживления ран. Кроме того, белки ВКМ являются ключевыми компонентами в формировании ниши для стволовых клеток [7].

Активное участие во всех фазах заживления ран также принимают гликозаминогликаны. Они выполняют множество функций, включая поддержание оптимального баланса между синтезом и разрушением коллагена, а также функционируют как сигнальные молекулы [8]. Известно, что гликозаминогликаны способны связываться с различными факторами роста и цитокинами, увеличивая их локальную концентрацию и регулируя активность [4, 8–11]. Например, сульфатированные гликозаминогликаны хондроитин- и дерматансульфат могут регулировать активность FGF и стимулировать выработку оксида азота, что, в свою очередь, может модулировать ангиогенез, тогда как гепарансульфат может стимулировать высвобождение интерлейкинов (IL-1, IL-6), простагландина E2 и TGF- β и способствовать модуляции их проангиогенных эффектов в тканях [10, 12]. Несульфатированный гликозаминогликан — гиалуроновая кислота принимает активное участие во многих процессах заживления ран и регенерации тканей. Ее биологическая активность и функции зависят от молекулярной массы [8]. Известно, что кожные раны плодов млекопитающих на ранних сроках гестации заживают без признаков рубцевания и с полным восстановлением

нормальной архитектуры кожи, что связано с высоким общим уровнем гиалуроновой кислоты [12].

Состав и компоненты ВКМ играют ключевую роль в регулировании адгезии, миграции, дифференцировки, пролиферации и роста клеток, обеспечивая им структурную и биохимическую поддержку, необходимые для морфогенеза и гомеостаза тканей [3, 13]. Эти аспекты особенно важны для восстановления глубоких повреждений кожи, поскольку для регенерации ее различных слоев требуются разные компоненты матрикса и типы клеток [1, 2]. К тому же сохранение состава и архитектоники естественного ВКМ, образование и высвобождение биологически активных веществ в процессе его биодеградации в зоне имплантации позволяет использовать такой материал в качестве самостоятельного бесклеточного продукта [1, 3, 5].

Ранее в литературе было продемонстрировано, что децеллюляризованный матрикс из соединительной ткани пуповины человека способствует восстановлению и регенерации хрящей [14], печени [15], нервной ткани [4] и ран кожи [2]. Вартонов студень пуповины человека представляет собой твердую слизистую соединительную ткань внеэмбрионального происхождения, сохраняющую особенности эмбрионального фенотипа, которые проявляются в быстрой регенерации поврежденной ткани и безрубцовом заживлении ран плода. В составе этой ткани присутствуют различные типы коллагена (I, III, IV и V), гиалуроновая кислота высокой молекулярной массы и обилие разнообразных регуляторных факторов [2, 4, 14–17]. Таким образом, пуповина человека является наиболее подходящим высокорегенеративным и доступным биоматериалом гомологичного происхождения. Учитывая этот потенциал пуповины, мы поставили себе целью разработать шадящую эффективную технологию изготовления из нее бесклеточного продукта для максимальной сохранности ее компонентного состава при максимальном удалении ядерного материала.

Основной целью процесса децеллюляризации является удаление клеточного и ядерного содержимого при сохранении присущей ультраструктуры и биохимического состава нативного ВКМ [1, 3, 5, 18, 19]. Децеллюляризованный матрикс должен способствовать прикреплению и пролиферации клеток реципиента, чтобы в конечном итоге создать в месте повреждения специфическую для пациента функциональную ткань [5, 17]. Додецилсульфат натрия (SDS) является сильным анионным поверхностно-активным веществом [18, 21], широко используемым в протоколах децеллюляризации. SDS содержит гидрофильную полярную “головку” и гидрофобный “хвост”, так что при растворении в воде он самособирается в сферические мицеллярные структуры и проникает в бислой фосфолипидов, что приводит к разрушению кле-

точной мембраны и разрыву их связей с матриксом и цитоплазматическими белками. По сравнению с другими агентами децеллюляризации, этот детергент способствует более полному удалению клеточного и антигенного содержимого [5, 22]. Однако в ряде исследований сообщалось, что применение SDS может привести к уменьшению количества некоторых факторов роста и гликозаминогликанов [21, 22], а также разрушить ультраструктуру ВКМ, что потенциально может вызывать иммунный ответ [5]. Запуск иммунного ответа предположительно связан с тем фактом, что применение SDS обнажает концевые телопептиды молекул коллагена, которые являются “глубинными”, или скрытыми, антигенными детерминантами. Ответная продукция молекул иммуноглобулина G лимфоцитами реципиента опсонизирует тканеинженерный матрикс для инициации фагоцитоза и инкапсуляции гигантских клеток инородных тел [5]. Поэтому применение наименьшей эффективной концентрации детергента во время процесса децеллюляризации позволит избежать этих негативных воздействий.

Известно, что качество удаления клеточного и генетического материала может быть достигнуто растворами SDS в концентрациях от 0.01 до 1% при децеллюляризации разных тканей и органов (подкожных вен человека [18], суставного хряща птицы [19], подслизистой основы тонкой кишки овцы [23], почки кролика [21]), требующих специфических и часто многоступенчатых протоколов. В доступной литературе есть информация об использовании для децеллюляризации Вартонова студня пуповины концентрации 0.03% SDS совместно с ДНКазой [2]. В нашем протоколе не используются ферменты и другие реагенты, способные в составе продукта влиять на его биосовместимость и провоцировать воспаление [18]. Кроме того, присутствие некоторого количества сохранившихся после децеллюляризации клеток и ДНК в уже применяемых коммерческих тканеинженерных продуктах из аллогенных биоматериалов не препятствует их трансляции/клиническому применению [18]. Поэтому в нашем исследовании сделана попытка использования меньшей концентрации SDS для получения децеллюляризованного в достаточной мере продукта, содержащего меньшее остаточное количество детергента.

Целью данного исследования является поиск оптимального протокола создания биосовместимого продукта из пуповины человека для регенеративной медицины и оценка сохранности в нем структурных и функциональных компонентов нативной пуповины.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение донорского материала

Для изготовления бесклеточного матрикса при информированном согласии доноров использовали пуповины человека, полученные от здоровых доношенных новорожденных после самопроизвольных родов. Все манипуляции с материалом осуществляли в соответствии с руководящими принципами, утвержденными локальным этическим комитетом Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (протокол № 230 от 17.12.2019). Все доноры исследованы на наличие инфицирования вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом гепатита типа А и В, цитомегаловирусом и сифилисом. Полученные образцы пуповин транспортировали в стерильном физиологическом растворе и замораживали при температуре -20°C .

Процесс децеллюляризации

Образцы пуповины человека перед процессом децеллюляризации несколько раз промывали деионизованной водой (“Аквафор”, Россия) для удаления компонентов крови, стерилизовали 6%-ным раствором перекиси водорода и препарировали в ламинарном шкафу с соблюдением правил асептики, извлекая вену и артерии. Затем Вартонов студень пуповины человека вместе с покрывающей его оболочкой подвергали механическому фрагментированию и гомогенизации (gentle-MACSTM Dissociator, Milteniy Biotech, Германия). Децеллюляризацию осуществляли детергентным методом с использованием стерильных растворов с содержанием SDS (“ЛенРеактив”, Россия) 0.01 и 0.05% в течение 24 ч при комнатной температуре в шейкере ES-20/60 (Biosan, Латвия) при скорости вращения 180 об/мин. По окончании процесса образцы подвергали многократной отмывке деионизованной водой и фосфатным буферным раствором (pH 7.4) с целью удаления детергента и открепившихся клеток. Полученный материал лиофилизировали (VaCo 5-II, ZIRBUS Technology, Германия), дезинфицировали УФ-облучением в боксе микробиологической безопасности БМБ-II-“Ламинар-С”-1,5 NEOTERIC (“Lamsystems”, Россия) мощностью потока UV-C излучения 12 Вт в течение 15 мин и хранили герметично упакованным при температуре -20°C .

Выявление присутствия клеточных ядер методом окрашивания DAPI

Образцы лиофилизированных продуктов, приготовленных с использованием детергентов разной концентрации, а также лиофилизированный материал нативной пуповины заливали в парафин (станция для заливки биологических тканей парафином HistoStar, Thermo Fisher Scientific, США) и

изготавливали срезы толщиной 0.5 мкм (автоматический ротационный микротом в комплекте с системой переноса срезов STS HM 355S Thermo Fisher Scientific). Эффективность протоколов децеллюляризации подтверждали окрашиванием флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Invitrogen, Paisley, Великобритания). Депарафинированные срезы инкубировали с DAPI в разведении 1:1000 в течение 5 мин. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM-880 (Carl Zeiss, Германия).

Количественное определение ДНК

Количественную оценку содержания ДНК в нативных и децеллюляризованных тканях проводили с использованием коммерческого набора для выделения ДНК DU-250 (“Биолабмикс”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Исследование материала осуществлялось на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Для измерения содержания ДНК было использовано по 5 образцов из каждой группы.

Количественное определение SDS масс-спектрометрическим способом

Количественно SDS определяли масс-спектрометрически методом внешнего стандарта. К навескам исследуемых образцов (10–20 мг) добавляли 1 мл деионизованной воды (Milli-Q, Millipore, США) и обрабатывали 20 мкл протеиназы К (“Диаэм”, Россия) в течение 1 ч при 56°C до полного растворения. Для построения калибровочной кривой готовили стандартные растворы с заданными концентрациями детергента (0; 0.00015625; 0.0003125; 0.000625; 0.00125; 0.0025; 0.005; 0.01 и 0.05%). Аликвоты стандартов и исследуемых образцов вводили в масс-спектрометр последовательно при помощи стеклянного шприца Гамильтон со скоростью 180 мкл/ч. Масс-спектры регистрировали с использованием масс-спектрометра maXis impact (Bruker, Германия) с масс-анализатором на основе времяпролетной трубы и источником ионов Apollo (ESI), оснащенный системой ионизации электроспреем при атмосферном давлении. Масс-спектры записывали в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов в диапазоне m/z 50–1300. Пик при m/z 265 может быть отнесен к молекулярному иону SDS ($C_{12}H_{25}SO_4^-$). Использовали оптимальные параметры ионного источника, обеспечивающие максимальную интенсивность масс-спектров исследуемых препаратов на наличие ионов SDS и установленные в результате предварительных экспериментов: напряжение на капилляре 4500 В; давление газа-распылителя 2.0 бар; температура газа-осушителя 220°C; скорость потока газа-осушителя 8 л/мин.

Управление масс-спектрометром, сбор и обработку данных осуществляли, используя программное обеспечение otofControl (Bruker).

Количественное определение гликозаминогликанов

Сульфатированные и несulfатированные гликозаминогликаны количественно определяли в образцах с использованием колориметрического метода окрашиванием альциановым синим. К образцам добавляли 1 мл 0.5% (масса/объем) альцианового синего 8GX (PanReac AppliChem, Испания) в 0.1М HCl (pH 1.5 или 2.5) и инкубировали в течение ночи на шейкере ES-20/60 (Biosan, Латвия) (250 об/мин). После центрифугирования (10 мин при 12000 g Avanti JXN-30, Beckman Coulter, США) супернатант удаляли и к образцам добавляли 250 мкл 6М HCl. Инкубировали при комнатной температуре в течение ночи на шейкере при скорости вращения 250 об/мин и измеряли оптическую плотность экстрагированного альцианового синего при 600 нм на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония). Количество сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов определяли по калибровочной кривой, построенной с помощью стандартных растворов известной концентрации хондроитина сульфата натрия (Sigma-Aldrich, Германия) и гиалуроната натрия (Thermo Fisher Scientific) с использованием растворов красителя при pH 1.5 и 2.5 соответственно. Содержание гликозаминогликанов нормализовали по массе сухого образца (мкг/мг сухого веса ткани).

Сканирующая электронная микроскопия

Исследование морфологии поверхности образцов произведено с помощью растрового электронного микроскопа JSM-7001F (Jeol, Япония) в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 5 кВ и токе пучка 10 нА. Для обеспечения стока заряда методом магнетронного распыления на установке Emitech K950 (Quorum Technologies, Великобритания) наносили слой золота толщиной 30 нм.

Методика инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье

Регистрацию инфракрасных спектров нативной пуповины и бесклеточных продуктов из пуповины осуществляли на инфракрасном спектрометре с преобразованием Фурье (FTIR) IR Prestige-21 (Shimadzu), в режиме пропускания и усреднением 100 сканирований в диапазоне 4500–650 cm^{-1} , со спектральным разрешением 2 cm^{-1} .

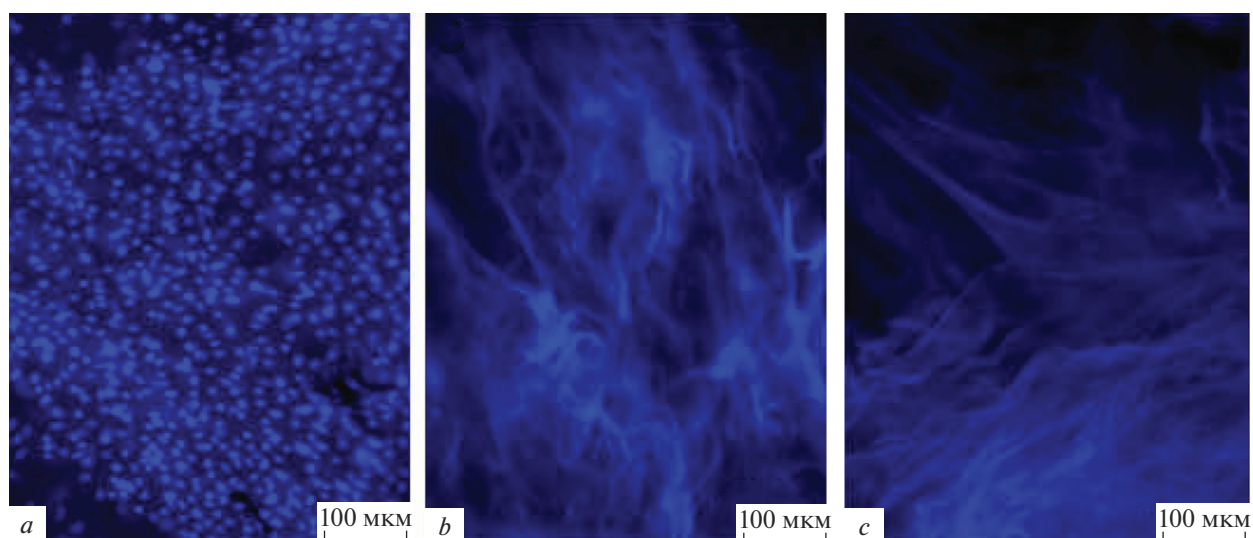


Рис. 1. Результаты окрашивания DAPI образцов нативного биоматериала пуповины (a) и после обработки с использованием растворов SDS с концентрацией 0.01 (b) и 0.05% (c). Шкала: 100 мкм.

Fig. 1. Results of DAPI staining of samples of native umbilical cord biomaterial (a) and after treatment with SDS solutions at a concentration of 0.01 (b) and 0.05% (c). Scale: 100 μm .

Статистический анализ

Для статистической обработки данных использовали пакет SPSS v.23. В случае распределения признака, отличного от нормального, результаты представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей (Me [IQR]), минимального и максимального значений (Min–Max). Парные сравнения для независимых выборок проводили с помощью критерия Манна–Уитни, за уровень статистической значимости принимали $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Минимальными критериями качественной децеллюляризации считают: количественное содержание двухцепочечной ДНК менее 50 нг/мг сухого веса ВКМ; содержание фрагментов ДНК длиной менее 200 пар нуклеотидов; отсутствие видимого ядерного материала в тканевых срезах при окрашивании DAPI и/или гематоксилином и эозином [22].

Важной особенностью децеллюляризации с применением SDS также является его остаточное содержание, способное обусловить цитотоксичность продукта [3, 21, 24]. Удаление детергентов, особенно анионных, из бесклеточных каркасов, как известно, затруднено [3, 5, 24], и, возможно, требует не только более тщательного промывания образцов после окончания децеллюляризации, но и применения меньших концентраций детергента, использования дополнительных реактивов для его устранения и изменения продолжительности процесса. Однако из научной литературы известно, что промывки дистиллированной во-

дой [25], фосфатным буфером [18, 20] и спиртом [20] не обеспечивают полное удаление этого реактива из продукта. Было бы логично ожидать, что многократная отмывка приведет к большему удалению детергента, но это также может привести к нарушению целостности ВКМ или потере компонентов матрикса, включая связанные с ними факторы роста [21, 24]. Наш опыт показал, что с каждым шагом отмывки бесклеточного продукта деионизованной водой происходит повышение вязкости промывных вод, предположительно, из-за потери гликозаминогликанов. Чтобы минимизировать негативные эффекты остаточных количеств детергента в продукте, и избежать потерь гликозаминогликанов, мы решили снизить исходную концентрацию детергента и провели децеллюляризацию Вартонова студня раствором SDS с концентрацией 0.01%.

Анализ окрашенных DAPI образцов тканеинженерных продуктов, изготовленных с помощью растворов разных концентраций, показал отсутствие клеточных ядер по сравнению с материалом нативной пуповины (рис. 1).

Количественное определение содержания ДНК в тканеинженерных продуктах соответствовало минимальным критериям качественной децеллюляризации (рис. 2).

Предложенная нами процедура децеллюляризации независимо от примененных концентраций детергента соответствует общепринятым критериям, минимизирующим риск возникновения нежелательных иммунных реакций. Однако преимущество использования 0.01% раствора SDS перед 0.05% раствором становится очевидным при срав-

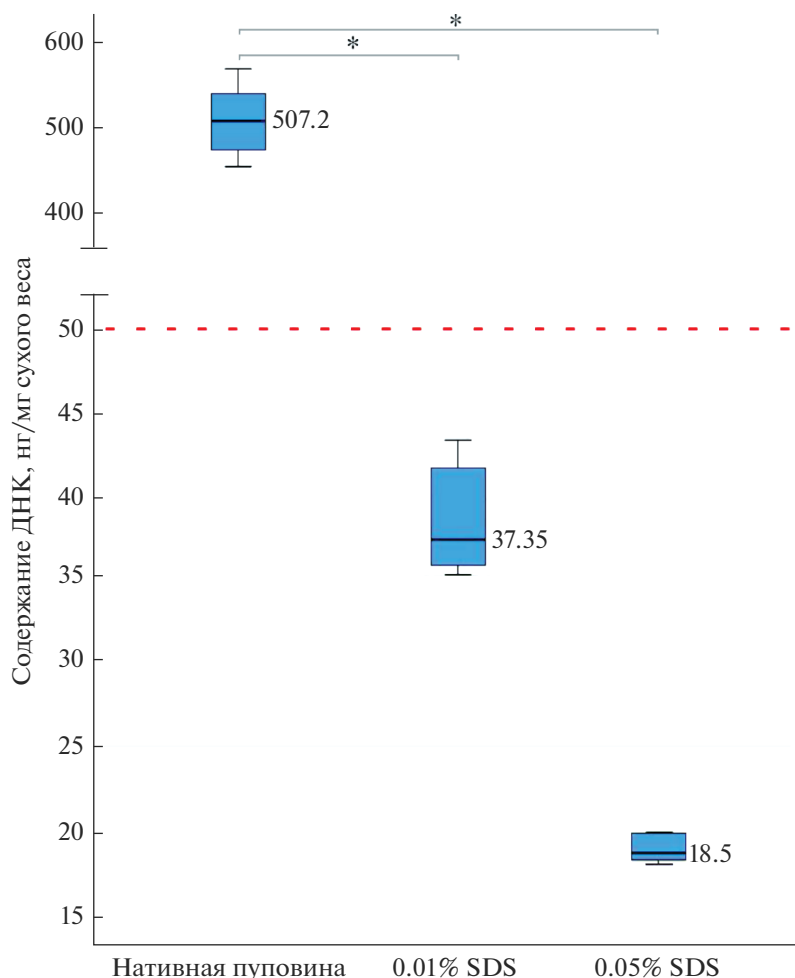


Рис. 2. Содержание ДНК в образцах нативной пуповины и после обработки с использованием растворов SDS с концентрацией 0.01 и 0.05%. * – различия статистически значимы, $p = 0.005$. Пунктирная линия указывает на порог успешной децеллюляризации – 50 нг/мг сухого веса.

Fig. 2. DNA content in native umbilical cord samples and after treatment with 0.01 and 0.05% SDS solutions. * – differences are statistically significant, $p = 0.005$. The dashed red line indicate the threshold for successful decellularization of 50 ng/mg dry weight.

нении остаточного содержания детергента и количества сульфатированных и несульфатированных гликозаминогликанов в конечном продукте.

Различие остаточного содержания SDS в полученных продуктах при использовании растворов с концентрацией SDS 0.01 и 0.05%, определенное методом масс-спектрометрического анализа, было статистически значимо (рис. 3). Установлено, что эффективность удаления клеток при применении 0.01% раствора SDS в течение 24 ч и 0.05% раствора сопоставимы при существенно меньшем остаточном содержании детергента.

Сообщалось, что разные типы клеток могут иметь разные пороги концентрации индуцированной детергентом цитотоксичности [21, 24]. Пороговое значение составляет 0.002% для клеток бронхиального эпителия, фибробластов легких и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека

и 0.00012% для клеток эндотелия легочных сосудов человека [24]. Концентрации SDS, превышающие 0.003%, были токсичными для мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани кролика, и их жизнеспособность составляла всего 49.4%. В то же время жизнеспособность линии клеток эмбриональной почки человека HEK 293 при концентрациях SDS 0.003 и 0.001% составляла 87.4 и 85.4% соответственно [21]. Полученное нами остаточное количество детергента значительно ниже описанных для различных клеточных линий порогов, что позволяет ожидать отсутствие токсичности бесклеточных продуктов из пуповины человека. Согласно нашим предыдущим исследованиям, продукт, изготовленный с использованием раствора SDS с концентрацией 0.05%, нецитотоксичен для фибробластов кожи человека, а также способствует в различной степени уси-

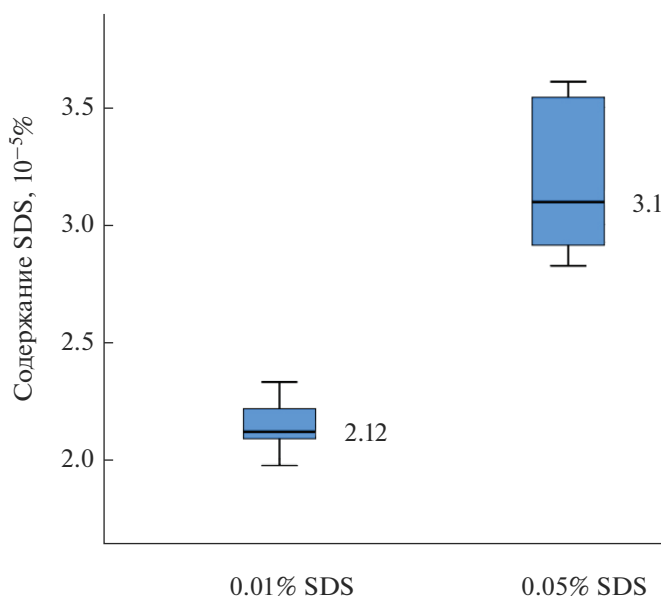


Рис. 3. Количественная характеристика содержания SDS в бесклеточных продуктах, изготовленных с использованием растворов SDS с концентрацией 0.01 и 0.05%, $p = 0.002$.

Fig. 3. Quantitative characterization of SDS content in cell-free products prepared using 0.01 and 0.05% SDS solutions, $p = 0.002$.

лению миграции, динамике роста и жизнеспособности клеток из эксплантов тканей разных органов ряда лабораторных животных [26]. Несмотря на это, мы предприняли попытку оптимизировать процесс децеллюляризации, используя наименьшую концентрацию SDS, с целью сохранности гликозаминогликанов и снижения остаточных количеств детергента в изготовленном продукте.

Сохранность и стабильность структурных и функциональных компонентов после процедуры децеллюляризации тканей оценивали методом FTIR-спектроскопического анализа (рис. 4).

Соответствие характеристических частот поглощения в спектрах определенным связям и химическим группам выполняли на основании анализа литературных данных [9, 16, 27]. Общий вид полученных спектров хорошо согласуется с литературными данными для коллагена [27]. Действительно, в спектрах бесклеточного продукта и нативного Вартонова студня пуповины человека присутствуют основные полосы поглощения при 3300–3280 см⁻¹ (амид А – валентные колебания NH-связей), 1645–1630 см⁻¹ (амид I – валентные колебания связей C=O), 1550–1535 см⁻¹ (амид II – составные частоты деформационных колебаний NH-связей и валентных колебаний CN-связей) и 1250–1230 см⁻¹ (амид III – валентные колебания связей CN и плоскостные деформационные колебания связей NH), свойственные колебаниям функциональных групп, присутствующих в молекулах коллагенов. Перераспределение относительных интенсивностей, чувствительных к вто-

ричной структуре коллагена полос амида I и II, может свидетельствовать о потенциальном изменении исходной структуры молекул коллагенов при децеллюляризации [16]. Спектры также демонстрируют полосы поглощения между 1100 и 1005 см⁻¹, которые возникают в основном из-за валентных колебаний связей C–O и C–O–C, характерных для молекул коллагенов и гликозаминогликанов [9, 16, 27]. Более низкая их относительная интенсивность поглощения в спектрах продуктов, децеллюляризованных растворами разных концентраций детергента, по сравнению со спектрами нативного биоматериала, предположительно указывает на некоторое снижение содержания гликозаминогликанов, что нам удалось подтвердить количественно. Содержание сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов было проанализировано колориметрическим методом. Статистически значимого снижения содержания сульфатированных гликозаминогликанов при обработке раствором SDS в концентрации 0.01% выявлено не было ($p = 0.07$), но снижение было значимым при обработке 0.05% раствором SDS ($p = 0.013$). Выявлено статистически значимое снижение содержания несulfатированных гликозаминогликанов при обработке растворами 0.01% SDS ($p = 0.049$) и 0.05% ($p = 0.009$). В то же время содержание несulfатированных гликозаминогликанов при обработке раствором SDS в концентрации 0.01% оказалось статистически значимо выше ($p = 0.003$), чем при обработке раствором SDS в концентрации 0.05% (табл. 1).

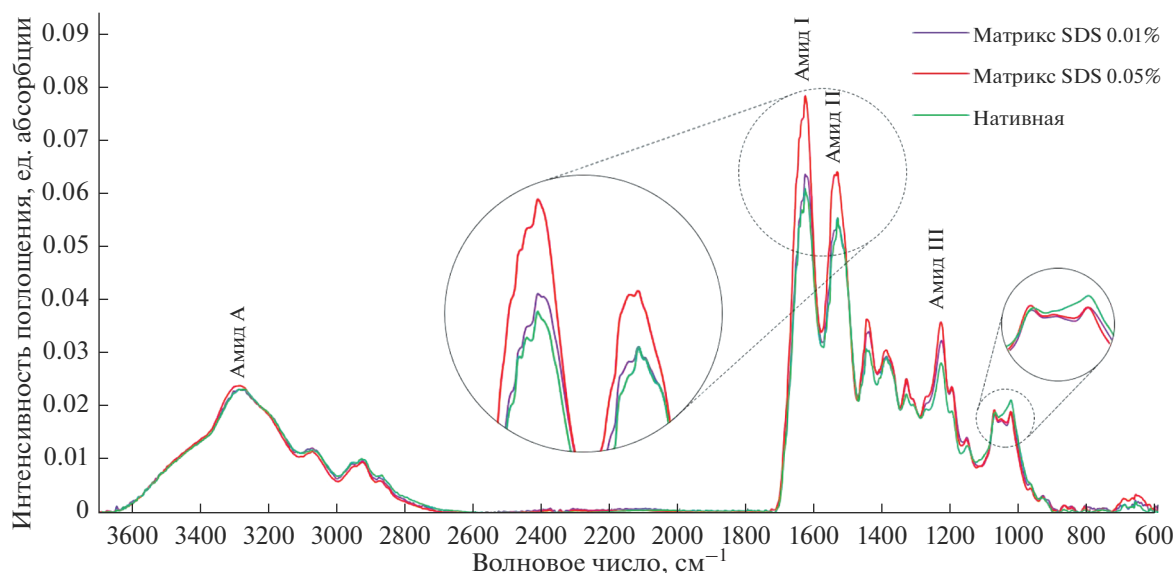


Рис. 4. Спектры FTIR нативной и децеллюляризованной пуповины (матрикса) после обработки растворами SDS разных концентраций.

Fig. 4. FTIR spectra of native and decellularized umbilical cord (matrix) after treatment with SDS solutions of different concentrations.

Обнаруженное увеличение вязкости промывных вод при отмывке образцов от детергента, связано, предположительно, с частичной потерей низкомолекулярного гиалуронана. Таким образом, применение наименьшей концентрации SDS позволило сохранить важные с точки зрения их регенеративного потенциала гликозаминогликаны в полученном продукте.

Рельеф поверхностей и структуру полученного продукта исследовали с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 5). Различий в структуре волокон, числе и размерах

пор матриц, изготовленных разными концентрациями детергента, выявить не удалось.

Лиофилизированный матрикс обладает гетерогенной пористостью. Измеренные с помощью программного обеспечения для обработки изображений (ImageJ) размеры пор варьировали от 50 до 800 мкм, что выявило микро- и макропористость материала. Это важная характеристика, поскольку поры диаметром от 20 до 125 мкм обеспечивают оптимальные условия для миграции в матрикс клеток и их последующей адгезии и дифференцировки, тогда как поры диаметром более 140 мкм важны для стимуляции ангиогенеза, образования

Таблица 1. Содержание сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов
Table 1. Content of sulfated and non-sulfated glycosaminoglycans

Этапы измерения	Концентрация сульфатированных гликозаминогликанов, мкг/мг сухого веса		Концентрация несulfатированных гликозаминогликанов, мкг/мг сухого веса	
	Me [IQR]	min–max	Me [IQR]	min–max
1. Нативная пуповина	8.09 [7.01–9.12]	6.42–10.64	21.46 [18.92–22.46]	16.1–24.37
2. При обработке 0.01% SDS	7.32 [#] [6.54–7.83]	4.80–8.85	19.22 ^{#, *} [16.83–21.33]	15.13–21.84
3. При обработке 0.05% SDS	5.82* [5.22–6.10]	4.80–7.44	15.1* [13.23–16.86]	12.56–18.06

Примечание. [#] – различие содержания гликозаминогликанов при обработке разными концентрациями детергента статистически значимо ($p < 0.05$), * – различие содержания гликозаминогликанов при обработке разными концентрациями детергента относительно нативного биоматериала статистически значимо ($p < 0.05$).

Note. [#] – difference in the amount of glycosaminoglycans when treated with different concentrations of detergent is statistically significant ($p < 0.05$), * – difference in the amount of glycosaminoglycans when treated with different concentrations of detergent relative to the native biomaterial is statistically significant ($p < 0.05$).

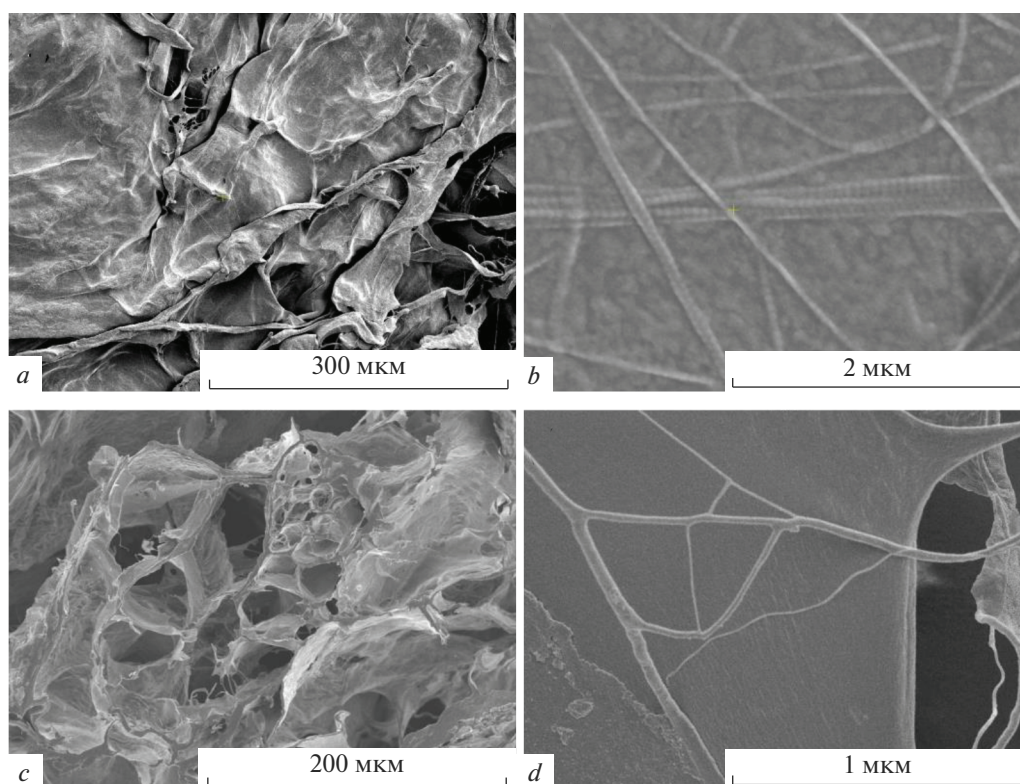


Рис. 5. СЭМ-изображения поверхности децеллюляризованных продуктов, полученных при обработке раствором SDS в концентрации 0.01 (a, b) и 0.05% (c, d). При большом увеличении видны коллагеновые фибриллы с ярко выраженной нативной структурой (b).

Fig. 5. SEM images of the surface of decellularized products after treatment with SDS solution of concentrations 0.01 (a, b) and 0.05% (c, d). Collagen fibrils with a pronounced native structure are shown at higher magnification (b).

структурированных тканей и диффузии внеклеточной жидкости [28, 29].

Ранее в нашей лаборатории в бесклеточном продукте из пуповины человека, полученном с использованием 0.05% раствора SDS, было иммуногистохимически выявлено присутствие коллагена IV типа и ламинина, которые особенно важны для процессов адгезии клеток и эпителизации раны [28].

Таким образом, изготовленный из природного биоматериала гомологичного происхождения бесклеточный продукт является потенциально неиммуногенным и нетоксичным, обладает гетерогенной пористостью и сохраняет присущие пуповине основные структурные и функциональные компоненты, важные для процессов регенерации глубоких полнослойных ран.

Ограничением этого исследования является отсутствие данных анализа прямой цитотоксичности разных концентраций детергента, поэтому нами запланировано исследование *in vitro* цитотоксичности для фибробластов человека, а также оценка биологической активности продукта из пуповины, изготовленного с применением раствора SDS в концентрации 0.01%, в заживлении глубоких дефектов кожи в эксперименте.

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Solarte David V.A., Güiza-Argüello V.R., Arango-Rodríguez M.L., Sossa C.L., Becerra-Bayona S.M. Decellularized tissues for wound healing: towards closing the gap between scaffold design and effective extracellular matrix remodeling. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10, 821852. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.821852>
2. Beiki B., Zeynali B., Seyedjafari E. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2017, 78, 627–638. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.074>
3. Cesur N.P., Yalman V., Laçın Türkoğlu N. Decellularization of tissues and organs. *Cumhuriyet Med. J.*, 2020,

- 42(2), 192–197.
<https://doi.org/10.7197/cmj.vi.609592>
4. Kočí Z., Výborný K., Dubišová J., Vacková I., Jäger A., Lunov O., Jiráková K., Kubinová Š. Extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord as a scaffold for neural tissue repair and its comparison with extracellular matrix from porcine tissues. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2017, 23(6), 333–345.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0089>
 5. Chakraborty J., Roy S., Ghosh S. Regulation of decellularized matrix mediated immune response. *Biomater. Sci.*, 2020, 8: 1194–1215.
<https://doi.org/10.1039/c9bm01780a>
 6. Rousselle P., Montmasson M., Garnier C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biol.*, 2019, 75–76, 12–26.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.002>
 7. Xue M., Jackson C.J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 2015, 4(3), 119–136.
<https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>
 8. Melrose J. Glycosaminoglycans in wound healing. *Bone Tissue Regen. Insights*, 2016:7 29–50.
<https://doi.org/10.4137/BTRIS38670>
 9. Dubus M., Scomazon L., Chevrier J., Montanede A., Baldit A., Terryn C., Quilès F., Thomachot-Schneider C., Gangloff S.C., Bouland N., Gindraux F., Rammal H., Mauprivez C., Kerdjoudj H. Decellularization of Wharton's jelly increases its bioactivity and antibacterial properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10, 828424.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.828424>
 10. Hachim D., Whittaker T.E., Kim H., Stevens M.M. Glycosaminoglycan-based biomaterials for growth factor and cytokine delivery: Making the right choices. *J. Control. Release*, 2019, 313, 131–147.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.018>
 11. Salbach J., Rachner T.D., Rauner M., Hempel U., Anderegg U., Franz S., Simon J.C., Hofbauer L.C. Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2012, 90(6), 625–635.
<https://doi.org/10.1007/s00109-011-0843-2>
 12. Ghatak S., Maytin E.V., Mack J.A., Hascall V.C., Atanelishvili I., Moreno Rodriguez R., Markwald R.R., Misra S. Roles of proteoglycans and glycosaminoglycans in wound healing and fibrosis. *Int. J. Cell Biol.*, 2015, 834893.
<https://doi.org/10.1155/2015/834893>
 13. Крюков Е.В., Брижань Л.К., Хоминец В.В., Давыдов Д.В., Чирва Ю.В., Севастьянов В.И., Перова Н.В., Бабич М.И. Опыт клинического применения тканеинженерных конструкций в лечении протяженных дефектов костной ткани. *Гений ортопедии*, 2019, 25(1), 49–57.
<https://doi.org/10.18019/1028-4427-2019-25-1-49-57>
 14. Penolazzi L., Pozzobon M., Bergamin L.S., D'Agostino S., Francescato R., Bonaccorsi G., De Bonis P., Cavallo M., Lambertini E., Piva R. Extracellular matrix from decellularized Wharton's jelly improves the behavior of cells from degenerated intervertebral disc. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, 8, 262.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00262>
 15. Kehtari M., Beiki B., Zeynali B., Hosseini F.S., Soleimanifar F., Kaabi M., Soleimani M., Enderami S.E., Kabiri M., Mahboudi H. Decellularized Wharton's jelly extracellular matrix as a promising scaffold for promoting hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Biochem.*, 2019, 120(4), 6683–6697.
<https://doi.org/10.1002/jcb.27965>
 16. Basiri A., Farokhi M., Azami M., Ebrahimi-Barough S., Mohamadnia A., Rashtbar M., Hasanzadeh E., Mahmoodi N., Baghaban Eslaminejad M., Ai J. A silk fibroin/decellularized extract of Wharton's jelly hydrogel intended for cartilage tissue engineering. *Prog. Biomater.*, 2019, 8(1), 31–42.
<https://doi.org/10.1007/s40204-019-0108-7>
 17. Fayon A., Helle D., Francius G., Vincourt J.B., Regnault V., Dumas D., Menu P., El Omar R. Characterization of an innovative biomaterial derived from human Wharton's jelly as a new promising coating for tissue engineering applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10, 884069.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.884069>
 18. Sulaiman N.S., Bond A.R., Bruno V.D., Joseph J., Johnson J.L., Suleiman M.S., George S.J., Ascione R. Effective decellularisation of human saphenous veins for bio-compatible arterial tissue engineering applications: Bench optimisation and feasibility in vivo testing. *J. Tissue Eng.*, 2021, 12, 2041731420987529.
<https://doi.org/10.1177/2041731420987529>
 19. Ayariga J.A., Huang H., Dean D. Decellularized avian cartilage, a promising alternative for human cartilage tissue regeneration. *Materials*, 2022, 15(5), 1974.
<https://doi.org/10.3390/ma15051974>
 20. Kim H.P., Choi K.H., Sung S.C., Kim Y.S. Effect of ethanol washing on porcine pulmonary artery wall decellularization using sodium dodecyl sulfate. *Artif. Organs*, 2022, 46, 1281–1293.
<https://doi.org/10.1111/aor.14192>
 21. Ghorbani F., Ekhtiari M., Moeini Chaghervand B., Moradi L., Mohammadi B., Kajbafzadeh A.M. Detection of the residual concentration of sodium dodecyl sulfate in the decellularized whole rabbit kidney extracellular matrix. *Cell Tissue Bank*, 2022, 23(1), 119–128.
<https://doi.org/10.1007/s10561-021-09921-z>
 22. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 2011, 32(12), 3233–3243.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
 23. Rashtbar M., Hadjati J., Ai J., Jahanzad I., Azami M., Shirian S., Ebrahimi-Barough S., Sadroddiny E. Characterization of decellularized ovine small intestine submucosal layer as extracellular matrix-based scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2018, 106(3), 933–944.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.33899>
 24. Zvarova B., Uhl F.E., Uriarte J.J., Borg Z.D., Coffey A.L., Bonenfant N.R., Weiss D.J., Wagner D.E. Residual detergent detection method for nondestructive cytocompatibility evaluation of decellularized whole lung scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods.*, 2016, 22, 418–428.
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0439>
 25. Zanardo T.É.C., Amorim F.G., Taufner G.H., Pereira R.H.A., Baiense I.M., Destefani A.C., Iwai L.K., Maranhão R.C.,

- Nogueira B.V.* Decellularized splenic matrix as a scaffold for spleen bioengineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, 8, 573461. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.573461>
26. *Калюжная Л.И., Соколова М.О., Чернов В.Е., Земляной Д.А., Чеботарев С.В., Чалисова Н.И., Кондратенко А.А., Гречаная Ю.С., Едоменко Н.В., Александр-Синклер Э.И.* Влияние бесклеточного матрикса пуповины человека на динамику роста и жизнеспособность культивируемых клеток человека и животных *ex vivo*. *Гены и клетки*, 2021, 16 (3), 72–79. <https://doi.org/10.23868/202110010>
27. *Nashchekina Y., Nikonov P., Mikhailova N., Nashchekin A.* Collagen scaffolds treated by hydrogen peroxide for cell cultivation. *Polymers*, 2021, 13(23), 4134. <https://doi.org/10.3390/polym13234134>
28. *Кондратенко А.А., Калюжная Л.И., Соколова М.О., Чернов В.Е.* Сохранность важнейших структурных компонентов пуповины человека после децеллюляризации как этапа изготовления высокорегенеративного раневого покрытия. *Биотехнология*, 2021, 37(5), 61–65. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-61-65>
29. *Vilela M.J.C., Colaço B.J.A., Ventura J., Monteiro F.J.M., Salgado C.L.* Translational research for orthopedic bone graft development. *Materials (Basel)*, 2021, 14(15), 4130. <https://doi.org/10.3390/ma14154130>

Biotechnological Cell-free Non-immunogenic Product Preserves the Main Regenerative Structural Components of the Human Umbilical Cord

**D. V. Tovpeko^{a, #}, A. A. Kondratenko^a, L. I. Kalyuzhnaya^a, V. E. Chernov^a,
D. A. Zemlyanoy^b, A. I. Poloskov^a, A. V. Nashchekin^c, and V. A. Senichenkov^c**

^a*S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044 Russia*

^b*Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, 194100 Russia*

^c*Ioffe Physical-Technical Institute, St. Petersburg, 194021 Russia*

[#]*e-mail: tovpeko.dmitry@gmail.com*

Abstract—A technology for manufacturing of a tissue-engineered cell-free construct from the extracellular matrix of Wharton’s jelly of the human umbilical cord for tissue engineering and regenerative medicine by the method of detergent decellularization is described. The effect of various concentrations of sodium dodecyl sulfate on the decellularization efficiency was studied using fluorescent staining of cell nuclei and DNA quantification. The structure and preservation of the most important functional components were analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy. The residual detergent in the resulting cell-free product was assessed by mass spectroscopic analysis, and the amount of sulfated and non-sulfated glycosaminoglycans was determined by colorimetric alcian blue staining. The results indicated a high efficiency of the removal of cellular and genetic material and the preservation of the extracellular matrix structure in both cases. The lower detergent concentration used resulted in its lower residual content and a higher proportion of glycosaminoglycans in the product. The cell-free product made from a natural biomaterial of homologous origin is potentially non-immunogenic and non-toxic and retains the main structural and functional components of the native umbilical cord, which are important for regeneration and wound healing.

Keywords: Wharton’s jelly, human umbilical cord, cell-free product, decellularization, detergent, tissue engineering, regenerative medicine, biocompatible material