



---

Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова

# **ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОДЕГРАДАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО ПРОДУКТА ИЗ ПУПОВИНЫ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН**

А.А. Кондратенко, Д.В. Товпеко, Л.И. Калюжная, А.В. Нащекин, Е.А. Никитин

# Актуальность



Экспериментальные и клинические исследования новых методов терапии повреждений мягких тканей и кожных покровов на сегодняшний день все еще являются актуальными. При значительной утрате тканей традиционная тактика лечения не всегда позволяет предотвратить инфицирование раневой поверхности и создать условия для скорейшего ее заживления.

## Изготовление миметиков внеклеточного матрикса методом децеллюляризации



- Альтернативным путем тканевой инженерии является имплантация бесклеточного матрикса, способного обеспечить миграцию к нему собственных клеток реципиента и стимуляцию их пролиферации с последующим замещением повреждения функционально активной тканью.
- Децеллюляризация – освобождение ткани или органа от клеток и клеточного детрита при сохранении внеклеточного матрикса. Сохранившиеся компоненты внеклеточного матрикса обеспечивают для мигрирующих клеток наиболее биохимически и функционально адекватное микроокружение.

# Источники получения матриксов на основе децеллюляризованных тканей



Бесклеточный матрикс



## Особенности фетальных и провизорных тканей



- Факторы роста
- TGF $\beta$  1, 2, 3
- VEGF, PDGF
- Клеточный состав

- Коллаген III, I типов
- Гиалуроновая кислота  
высокого молекулярного веса
- IL-10, IL-6,8

# Получение бесклеточного матрикса из пуповины человека



Пуповина человека



## Децеллюляризация:

- несколько циклов замораживания и оттаивания
- 3% перекись водорода
- удаление сосудов, фрагментация, гомогенизация
- 0,05% SDS, шейкер 140 оборотов в минуту
- промывание

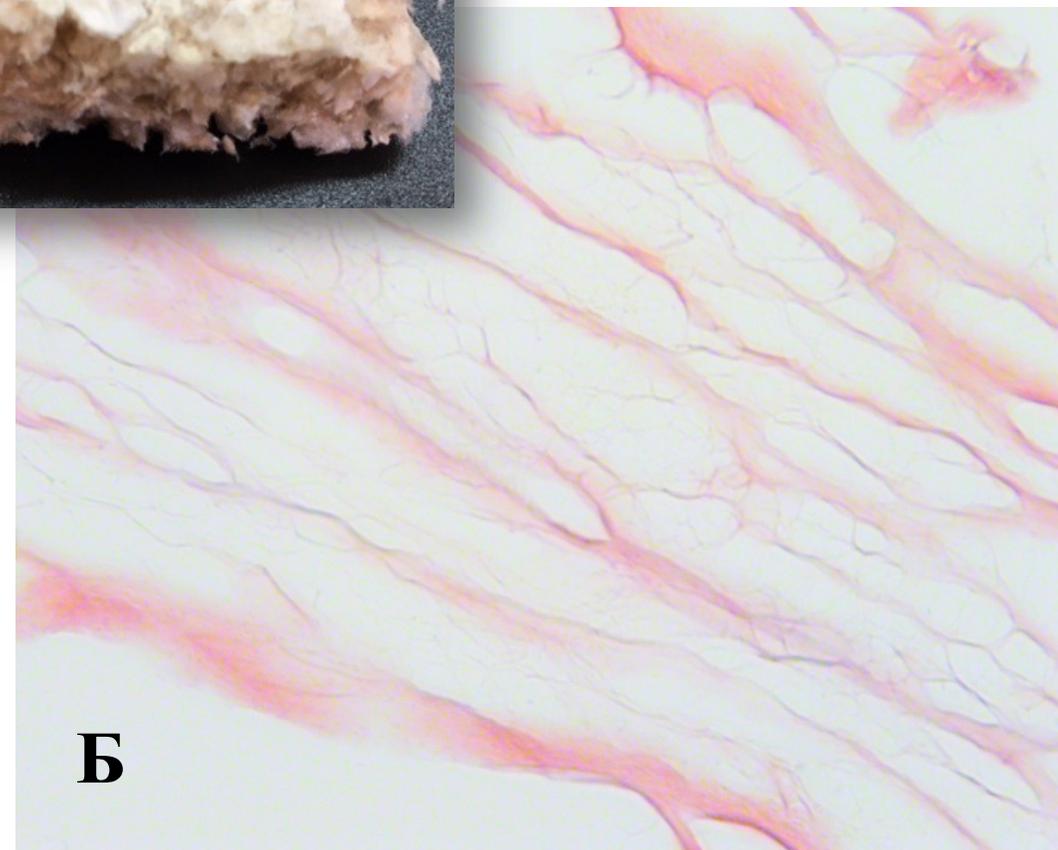


Бесклеточный матрикс

## Лиофилизация

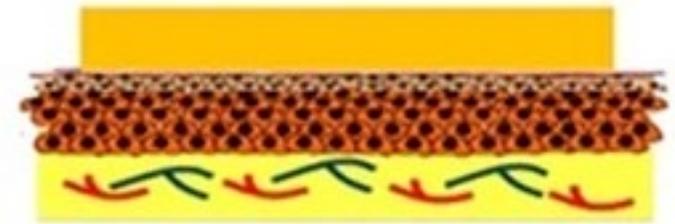


# Тканеинженерный продукт (матрикс) из пуповины человека



Окрашивание гематоксилином и эозином препаратов нативной пуповины (А) и бесклеточного матрикса из пуповины человека (Б),  $\times 400$

# Биодеградация матрикса и замена его собственной тканью реципиента



Healing ↑ Degradation



Healing ↑ Degradation



# Цель исследования

- **оценить способность бесклеточного матрикса из пуповины человека к биодegradации**

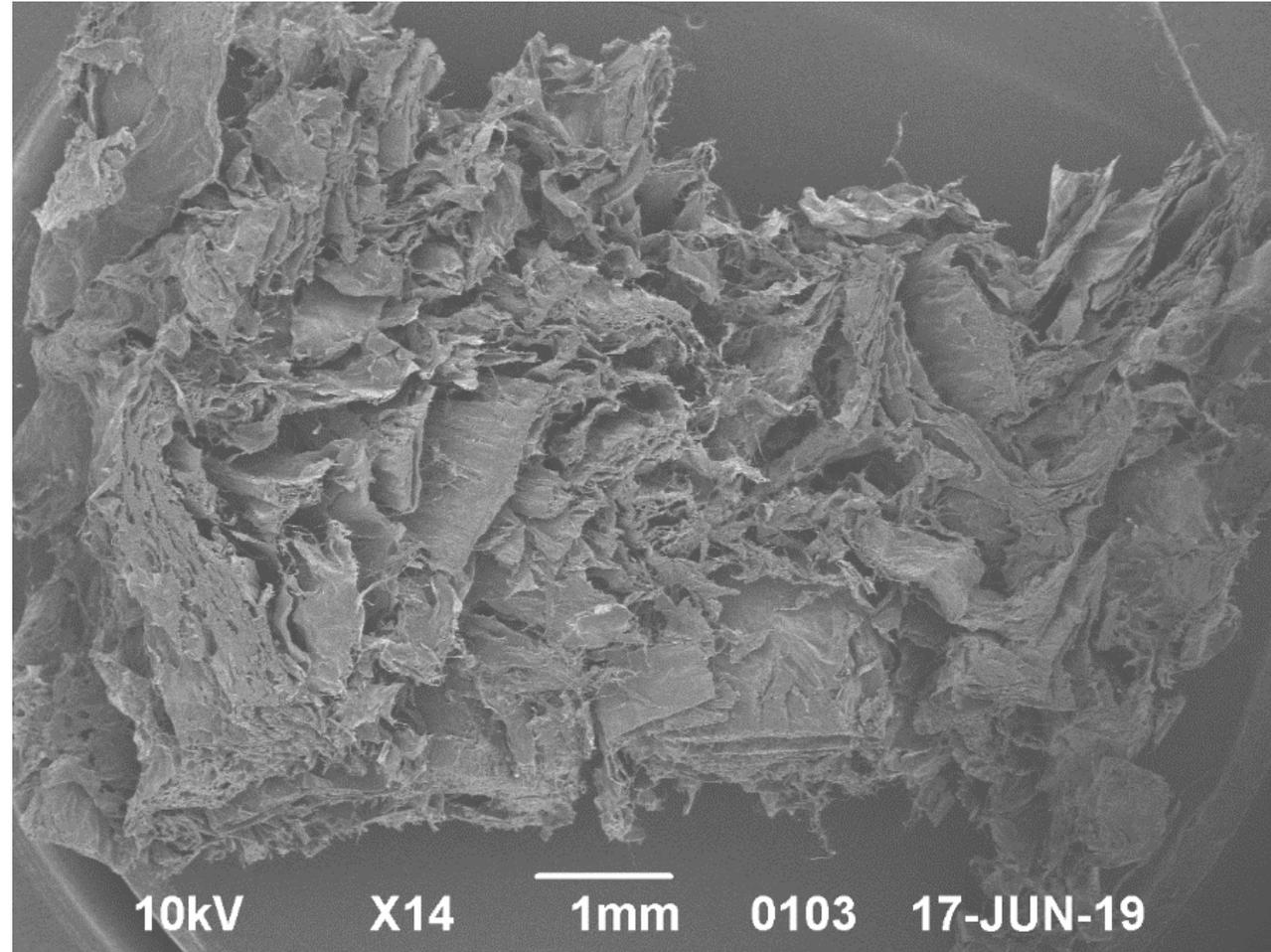
- **Исследования морфологии и состава матрикса:**
  - Электронная микроскопия;
  - Гистохимическое окрашивание;
  - Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием (ИКСФП);
  - Иммуногистохимическое окрашивание (коллаген IV типа, ламинин, фибронектин, трансформирующий фактор роста  $\beta 3$  (TGF  $\beta 3$ )).
- **Исследование способности матрикса к биодegradации:**
  - Исследования *in vitro*. Инкубация образцов матрикса в растворах ферментов с регистрацией потери массы и исследованиями методами электронной микроскопии и ИКСФП;
  - Исследования *in vivo*. Подкожная имплантация образцом матрикса лабораторным мышам и анализ гистологических препаратов.

# Сканирующая электронная микроскопия



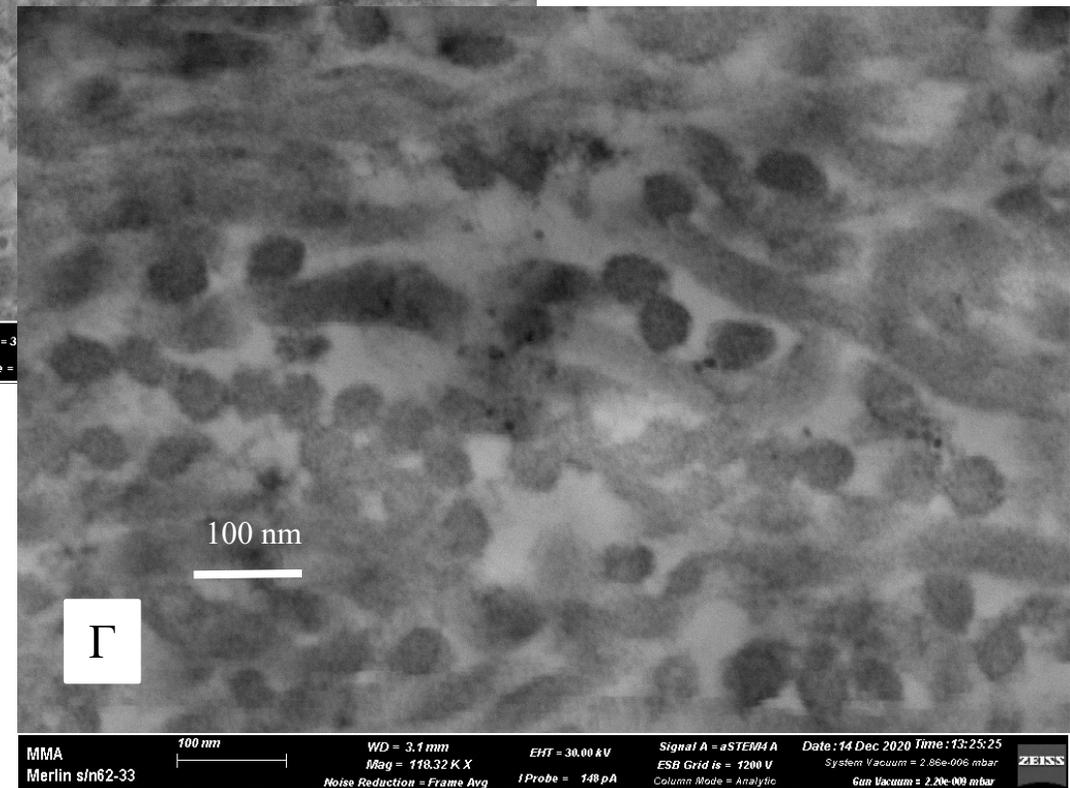
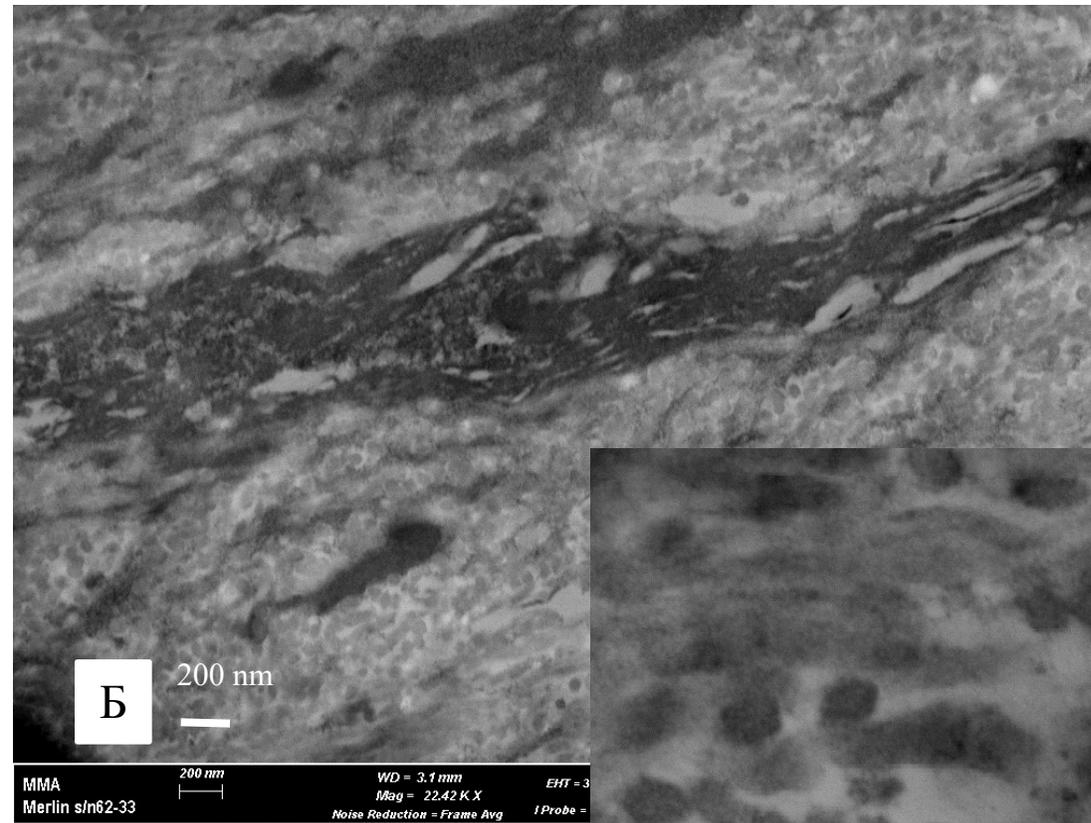
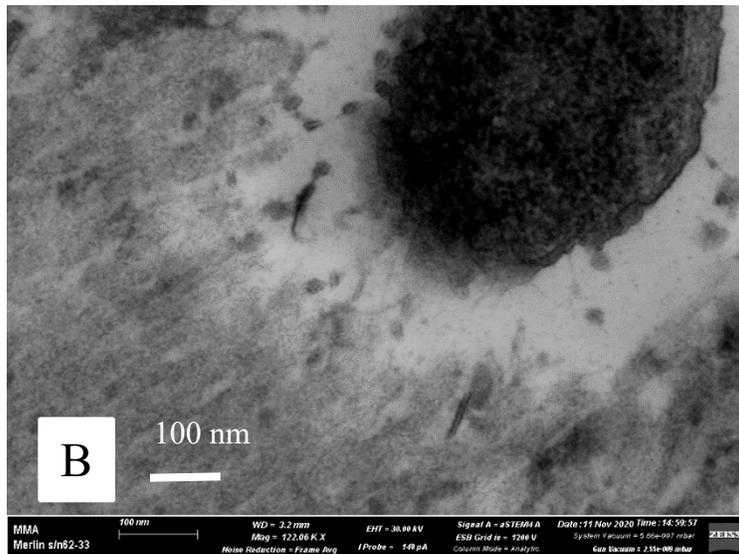
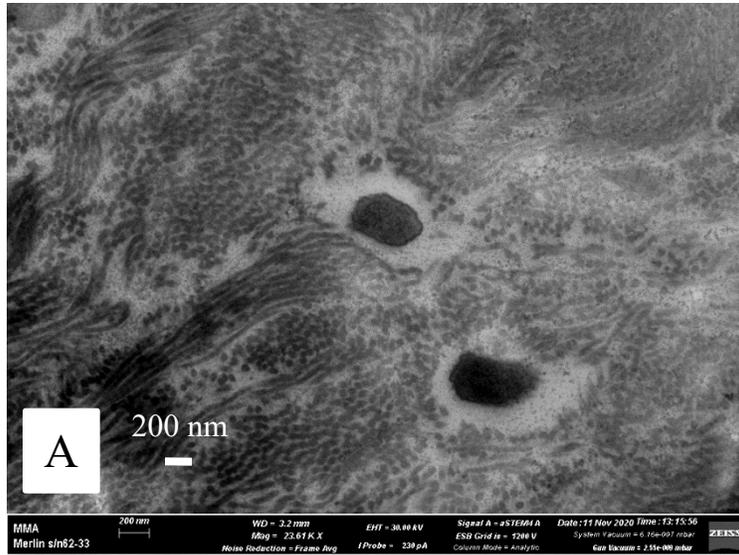
А - внешний вид матрикса на основе децеллюляризованной пуповины.

Б



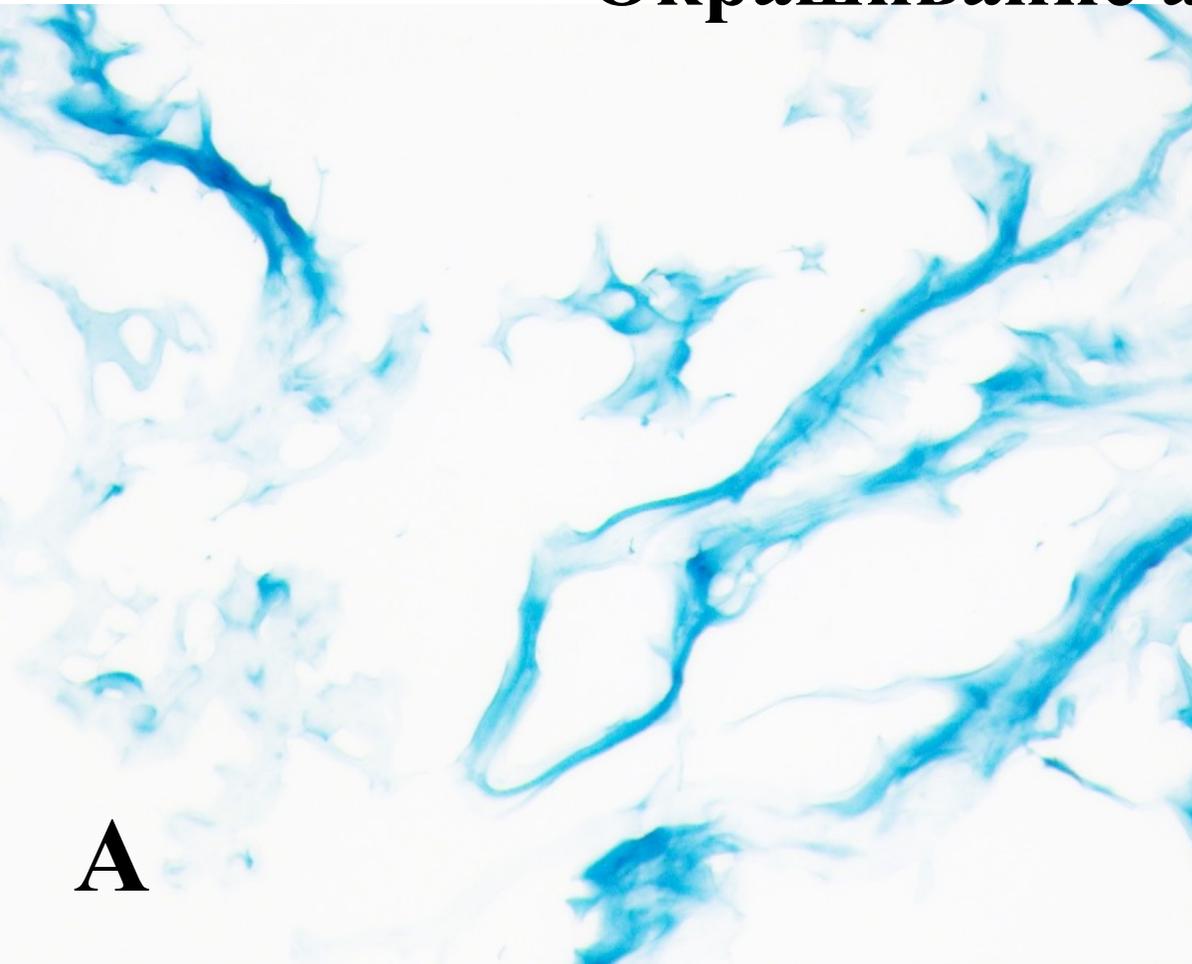
Пористая структура бесклеточного матрикса из пуповины человека (Б)

# Трансмиссионная электронная микроскопия



Нативная пуповина (А, В), матрикс (Б, Г)

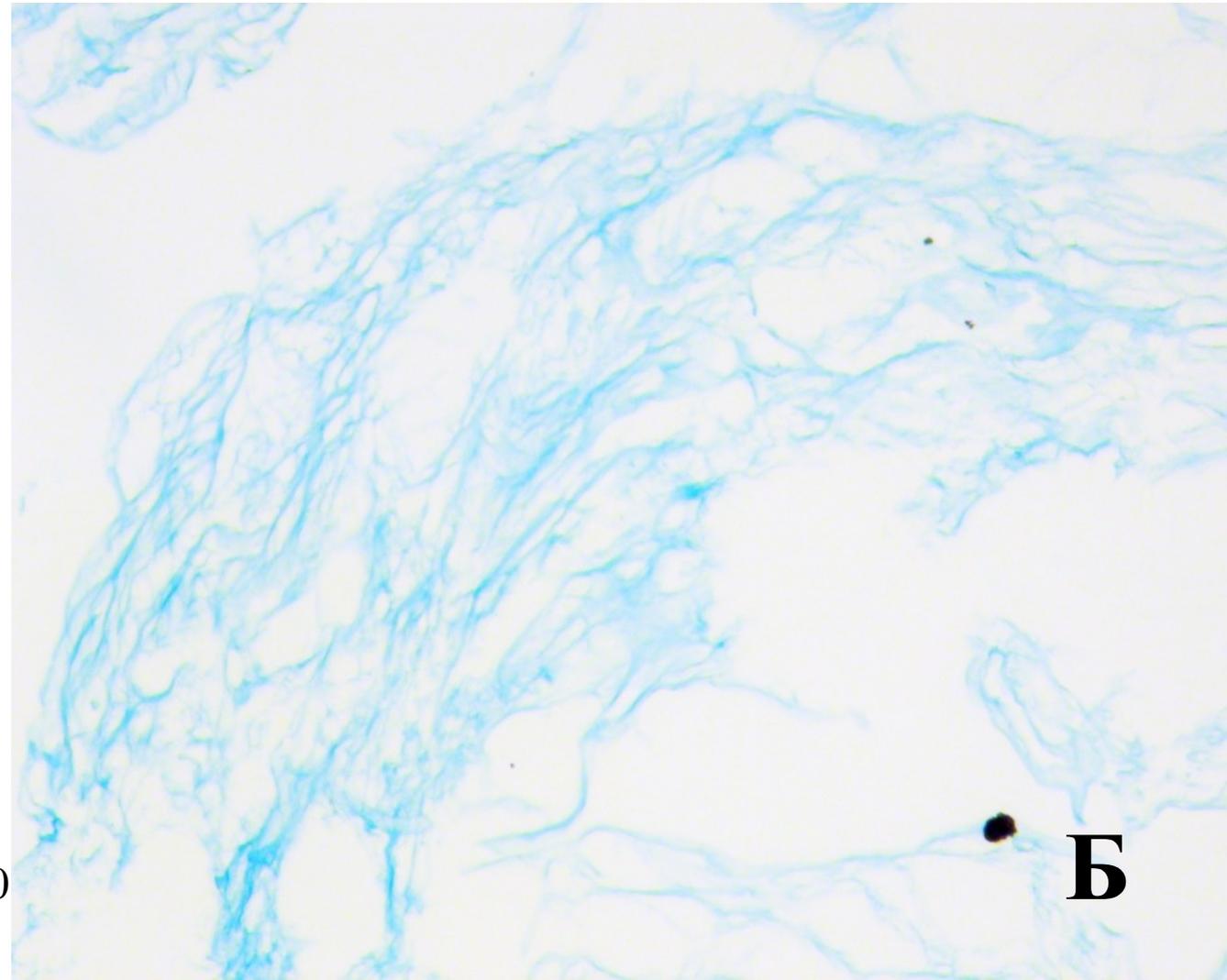
# Окрашивание альциановым синим



**А**

А – нативная пуповина человека

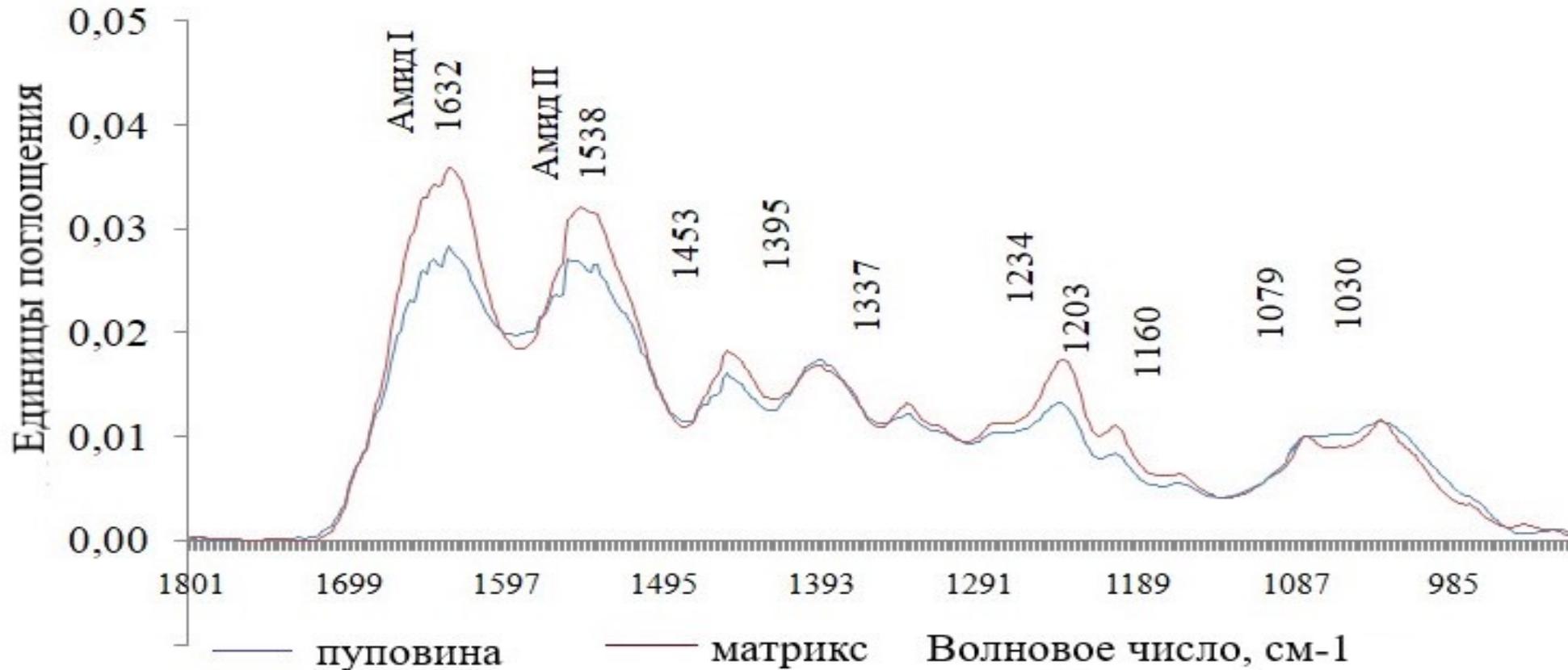
Б – бесклеточный матрикс из пуповины человека, ×200



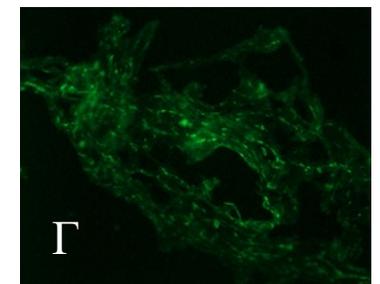
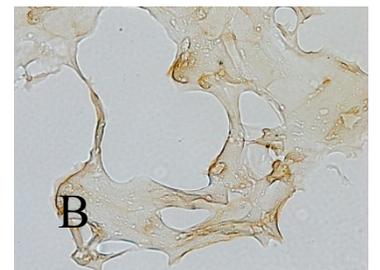
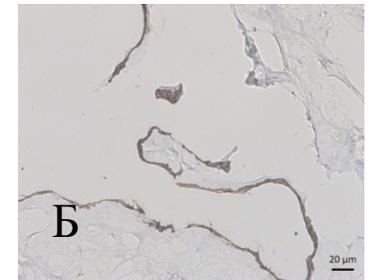
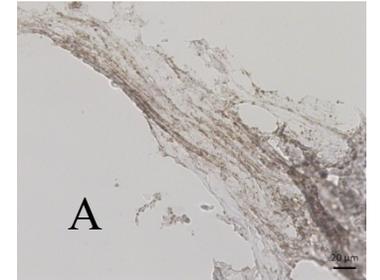
**Б**

# Состав матрикса из пуповины человека

Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием

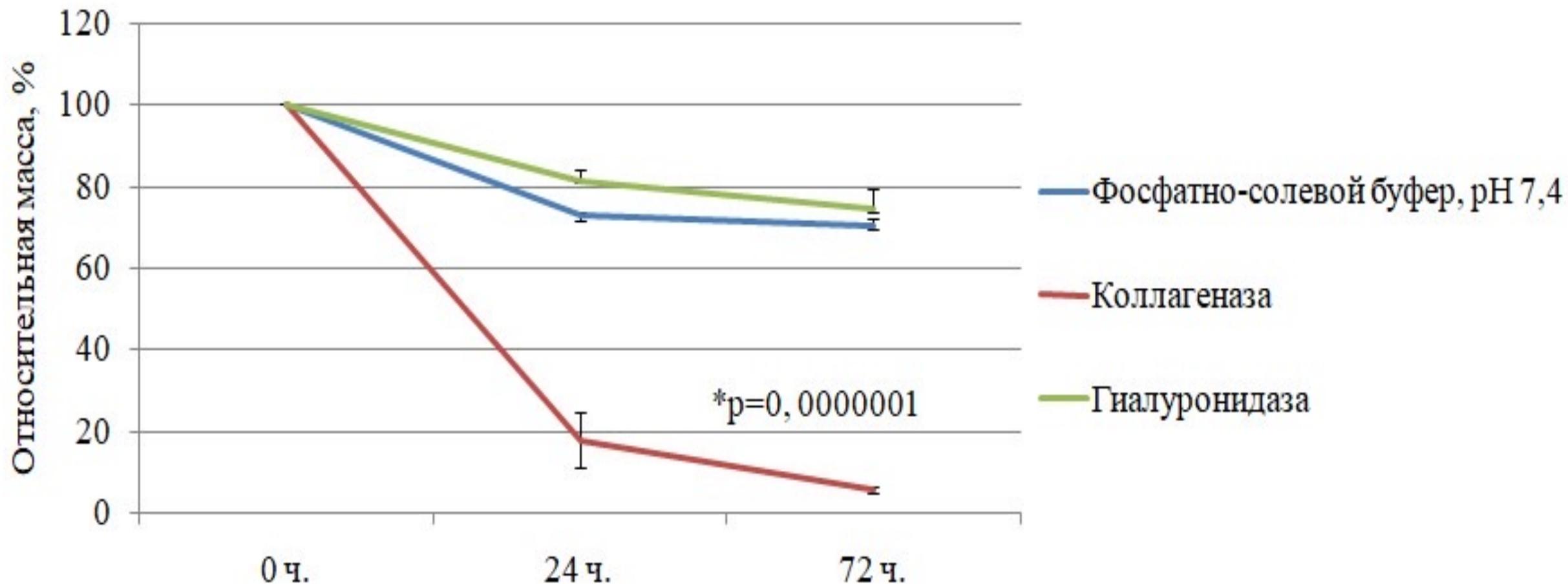


Иммуногистохимическое окрашивание матрикса к коллагену IV типа (А), ламинину (Б), TGFβ3 (В), фибронектину (Г)

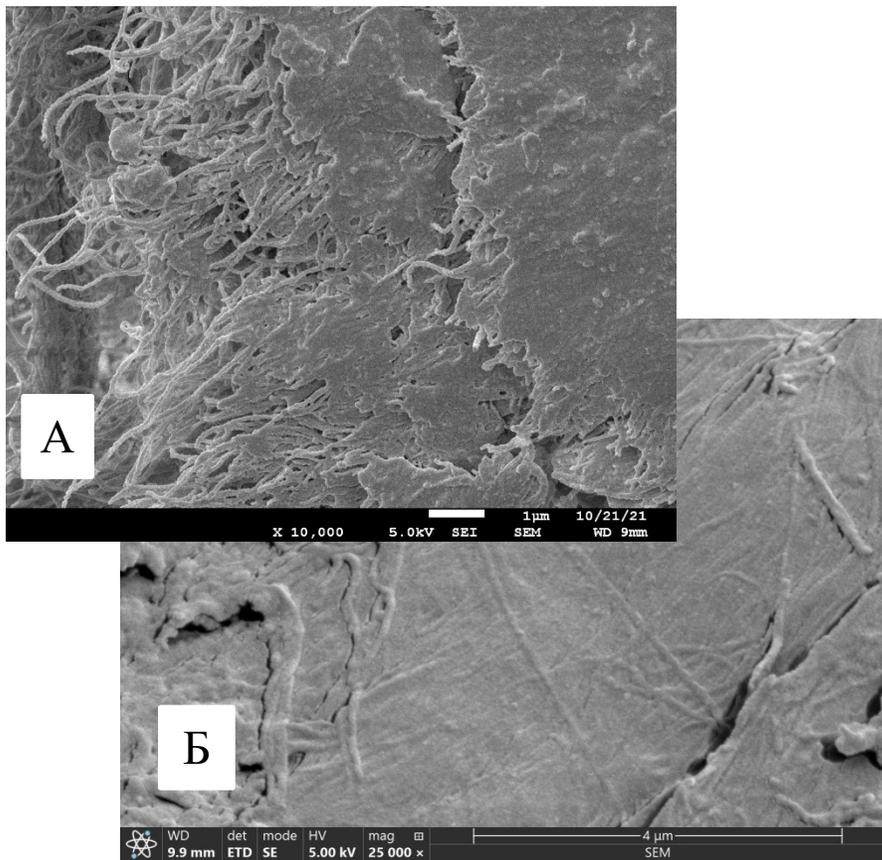


# Биодеградация бесклеточного матрикса из пуповины человека при инкубации в растворах ферментов *in vitro*

Биодеградация *in vitro*.



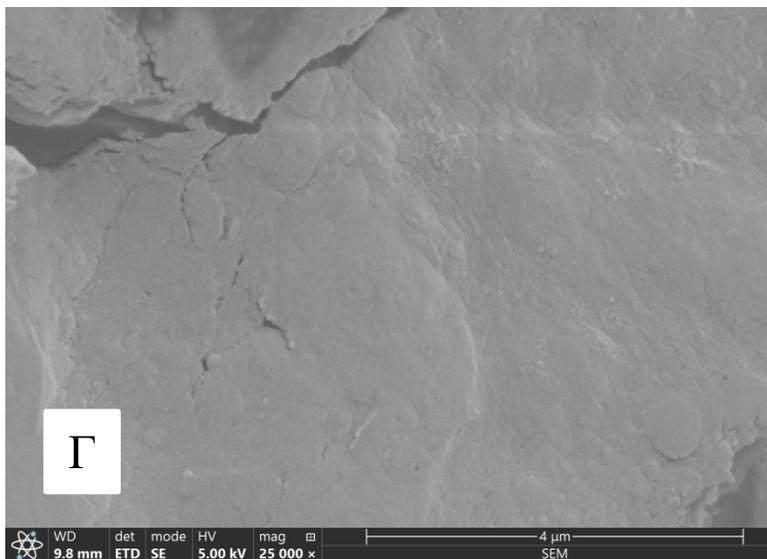
# Сканирующая электронная микроскопия



А, Б – бесклеточный матрикс из пуповины человека

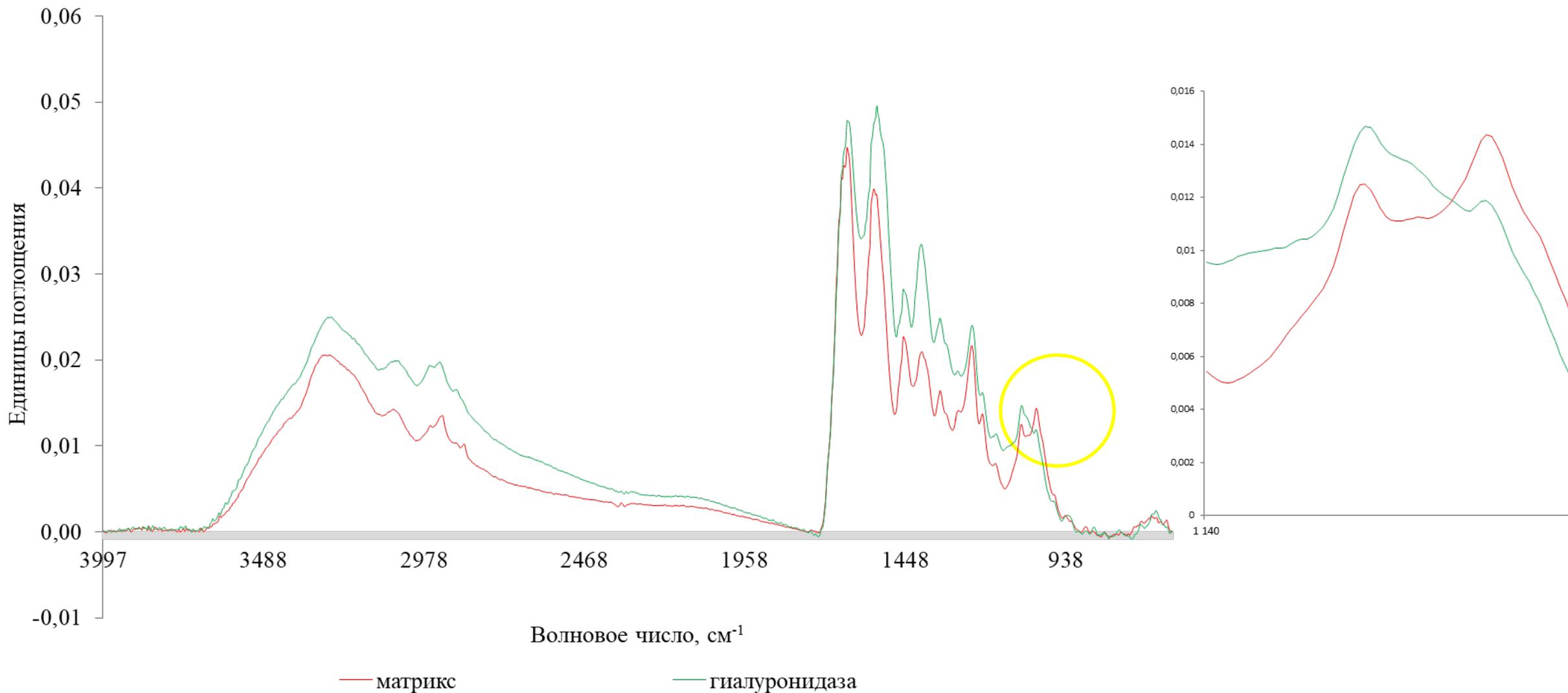


В – бесклеточный матрикс из пуповины человека после действия гиалуронидазы

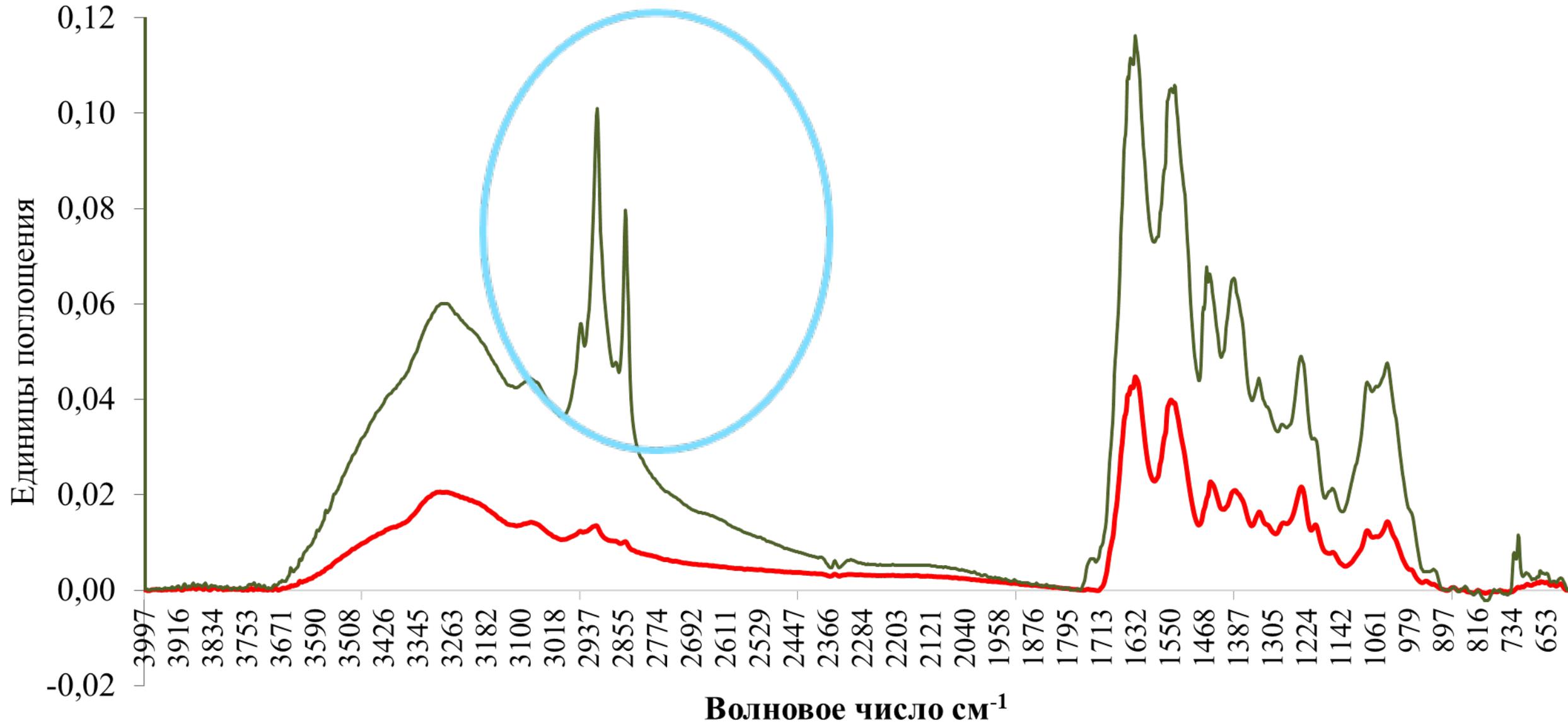


Г – бесклеточный матрикс из пуповины человека после действия коллагеназы

# Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием

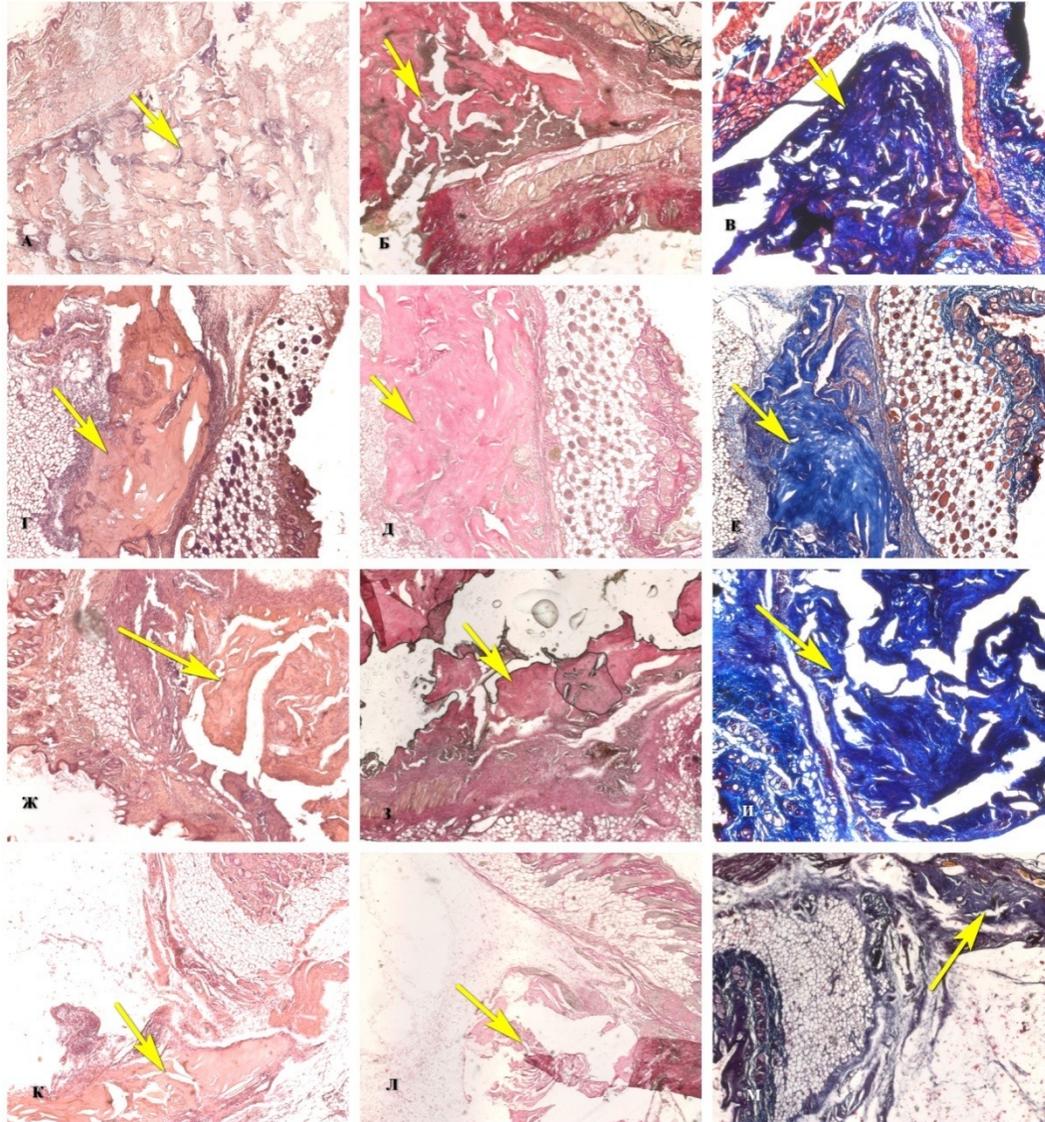


# Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием



Изменение ИК-спектра матрикса под действием коллагеназы

# Биодеградация бесклеточного матрикса из пуповины человека при подкожной имплантации мышам *in vivo*



Бесклеточный матрикс из пуповины человека под кожей мыши через 3 суток (А, Б, В), 7 суток (Г, Д, Е), 14 суток (Ж, З, И), 21 сутки (К, Л, М),  $\times 50$

*Матрикс указан желтыми стрелками*

*Окраска гематоксилин и эозин, по Ван Гизон, по Маллори*

# Заключение

Показано, что бесклеточный матрикс из пуповины человека, сохраняющий после децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека коллагены, гликозаминогликаны, коллаген IV типа, ламинин, фибронектин и TGF $\beta$ 3 является биodeградируемым.

В присутствии коллагеназы происходит потеря массы матрикса более 90% в течение 3 суток и стабильность при инкубации в растворе гиалуронидазы и в нейтральной среде.

С использованием метода инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием показано изменение внешнего вида спектров матрикса из пуповины человека при инкубации в растворах ферментов.

При имплантации под кожу мыши показана способность матрикса из пуповины человека к биodeградации *in vivo*. Через 21 сутки имплантации матрикс визуализируется под кожей мыши.

---

**Спасибо за внимание!**