

Л.И. Калюжная, О.Н. Харкевич,  
А.А. Шмидт, О.В. Протасов

## Регенераторные свойства внеэмбриональных органов человека в тканевой инженерии

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Приведены данные, обеспечивающие регенераторные особенности пуповины в свете их потенциального использования для тканевой инженерии. К настоящему времени в научной литературе накоплены знания о регенераторных свойствах тканей провизорных органов (пуповина, амниотическая мембрана) млекопитающих. Молекулы, экспрессированные клетками внеэмбриональных структур и фиксированные на внеклеточном матриксе, способны обеспечивать процессы регенерации при трансплантации матрикса в поврежденные ткани взрослых организмов. Развитие тканевой инженерии предполагает использование внеклеточного матрикса как основы, к которой мигрируют и прикрепляются клетки для размножения, дифференцировки и продолжительного функционирования. Матрикссы благодаря своей структуре интегрируются в ткань пациента перед трансплантацией конструкции, либо резидентные клетки, рекрутированные в трансплантированный внеклеточный матрикс, а также клеточно-матриксные взаимодействия – необходимые компоненты тканевой инженерии. Существующие коммерческие биоинженерные продукты, созданные из тканей млекопитающих, имеют ряд преимуществ и существенных недостатков из-за рисков иммунологических реакций и передачи прионных инфекций. Трансплантация человеку продуктов из ксеногенных материалов в Российской Федерации законодательно запрещена. Лимитированность донорского прижизненного материала и длительность юридического оформления при получении кадаверного биоматериала, пагубно отражающегося на его сохранности, требуют поиска подходящего гомологичного биоматериала.

Внеэмбриональные ткани провизорных органов благодаря особенностям эмбрионального фенотипа имеют особые биологические свойства, проявляющиеся способностью к безрубцовому заживлению ран. Низкая иммуногенность, оптимальные механические свойства внеклеточного матрикса, присутствие в нем молекул клеточной адгезии и способствующих регенерации факторов роста клеток обеспечивают тканеинженерным конструкциям из пуповины и амниотической мембраны противовоспалительные, антифибротические, антирубцовые свойства. Провизорные органы благодаря доступности и неинвазивности получения у здоровых молодых доноров видятся превосходным источником гомологичного биоматериала для получения матриксов, клеток и гидрогелей для нужд тканевой инженерии и регенеративной медицины.

**Ключевые слова:** безрубцовое заживление, биоматериалы; Вартонов студень пуповины человека; внеклеточный матрикс; децеллюляризация, скаффолд, тканевая инженерия, регенеративная медицина.

**Введение.** Тканевая инженерия как междисциплинарная область применяет принципы биоинженерии и биотехнологии для создания биологических трансплантатов. Ключевые составляющие, ответственные за успех тканевой инженерии, – это матрикс, обеспечивающий структурную поддержку клеток; клетки, продуцирующие матриксные компоненты, и клеточно-матриксные взаимодействия, направляющие функционирование клеток для дальнейшего ремоделирования поврежденной ткани.

Внеклеточный матрикс (ВКМ) является физической пространственной конструкцией, которая во время своего существования помогает прикрепляться клеткам и поддерживает их рост во время развития тканей. В нем сохранены структурные и функциональные молекулы, достаточные и необходимые для функционирования и фенотипической пластичности резидентных клеток. Тканеспецифичный, биосовместимый, биоразлагаемый неиммуногенный матрикс может быть изготовлен на заказ и храним в стериль-

ных условиях. Стать тканеинженерным трансплантатом он может после предварительного заселения его клетками в биореакторе либо остаться бесклеточным трансплантатом для временного функционирования, во время которого он заселяется резидентными клетками пациента. Результатом жизнедеятельности клеток являются процессы деградации выполнившего свою функцию трансплантированного матрикса и синтез ими компонентов собственных тканей.

Биоматериалом для получения матриксов могут быть ксеногенные и донорские ткани, а также их отдельные компоненты – биополимеры. Матрикс может быть создан из природных органических материалов (хитозан, фиброин шелка, гиалуронан (НА), фибрин, коллаген), неорганических материалов (гидроксипапатит), синтетических полимеров (полилактиды, силикон), биокерамики. Синтетические полимеры имеют ряд преимуществ – отсутствие иммуногенности, легкая обрабатываемость и управляемые механические свойства. Матриksam из природных материалов

присущи биоактивность, биоразлагаемость и наличие поверхностных лигандов для адгезии клеток. Поэтому децеллюляризованные матриксы донорских тканей можно рассматривать как наиболее привлекательную конструкцию для тканевой инженерии.

Коммерческие продукты на основе ВКМ, используемые в тканевой инженерии, получены из тканей млекопитающих (Epic™, Prima™ Plus, Hancock® II, Mosaic®, Freestyle®, Perimount® – протезы клапанов сердца; CopiOs® – протез для регенерации костей, Zimmer Collagen Repair Patch™, MatriStem®, Oasis®, Restore™, FortaFlex®, Strattice™, TissueMend®, CorMatrix™, Meso BioMatrix™, Permacol, Synergraft® – протезы для регенерации мягких тканей из биоматериала свиньи; Lyoplast® – протез твердой мозговой оболочки из тканей крупного рогатого скота, OrthAdapt® – протез для восстановления хронических ран из тканей лошади) или трупных тканей (дермальные конструкты Alloderm, Karoderm, SureDerm для восстановления мягких тканей, IOPatch™ – имплант для применения в офтальмологии). В экспериментах исследуют биоматериал хитозан, фиброин шелка – продукты деятельности насекомых; изучают бесклеточный матрикс кожи рыб как покрытие для ран [41]. Протезы из ксеногенных тканей создают проблемы из-за иммунологических реакций и риска передачи прионов [10]. В Российской Федерации (РФ) медицинские продукты ксеногенного происхождения запрещены к трансплантации.

**Цель исследования.** Изучение мирового опыта использования провизорных тканей человека в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

**Задача исследования.** Обобщение известных к настоящему времени фактов, подтверждающих регенеративные свойства внеэмбриональных органов для обоснования возможности использования их внеклеточных структур в тканевой инженерии.

**Материалы и методы.** Анализируются опубликованные результаты по использованию пуповины человека как биоматериала для тканевой инженерии и гидрогелей для 3D-биопечати.

**Результаты и их обсуждение.** *Оптимальный биоматериал для матриксов и гидрогелей.* Биополимерным молекулам во внеклеточном пространстве исторически отводили роль пассивной механической поддержки для клеток. Природная жесткость и 3D-структура ВКМ могут быть важными факторами клеточной адгезии. В идеале для изготовления будущего трансплантата необходим биоматериал той ткани, для восстановления которой он предусмотрен. Сохранность тканеспецифичной пространственной архитектуры матрикса, состава, наличия пор – необходимые условия для заселения его клетками, их распространения и дифференцировки в функционирующие элементы. Однако прижизненный донорский биоматериал крайне ограничен; юридические

и этические сложности оформления документов при посмертном донорстве занимают много времени [2], что неблагоприятно отражается на сохранности биоматериала. Поэтому поиск оптимального биоматериала для изготовления тканеинженерных конструкций как никогда значим для науки и медицины РФ.

В течение жизни человека состав и структура тканей существенно изменяются. Пороки развития, перенесенные болезни, возрастные изменения, последствия приема лекарств, влияния стрессов, вредных условий труда и иные обстоятельства влияют на состав и строение тканей. Накапливаются сшивки коллагена из-за его неферментного гликозилирования в тканях человека, содержание веществ, удерживающих воду в межклеточном пространстве, снижается. В результате действия металлопротеиназ, расщепляющих коллагены, протеогликаны и гликозаминогликаны (GAG), и увеличения поперечных сшивок коллагена, ткани становятся менее эластичными. Уровни фибронектина увеличиваются с возрастом, нарушая связывание клеток посредством интегринных рецепторов с ВКМ. Совершенно очевидно, что качественные и количественные изменения донорских тканей, возникшие в процессе жизни, неизбежно приводят к ухудшению характеристик матрикса. Этот аргумент подвигнул многих исследователей пренебречь негативными особенностями матриксов ксеногенных тканей именно потому, что предельный возраст крупных млекопитающих – потенциальных доноров биологического материала – существенно меньше, чем человека.

Биоматериалы для тканевой инженерии, полученные от взрослых доноров, имеют не только измененные возрастом и болезнями исходную структуру и состав, но и утрачивают регенераторные потенции, присущие эмбриональному биоматериалу. Известно, что ткани эмбриона и провизорных органов имеют особые компоненты, обеспечивающие на этапах гестации процессы регенераторного восстановления, сходные с онтогенетическими процессами развития плода. В тканях плода, пуповине и плаценте присутствует незрелый коллаген с меньшими сшивками. Провизорные органы лишены возрастных особенностей – последствий патологического ремоделирования, фиброза, окислительного стресса и других негативных изменений [12]. Поэтому можно предположить, что ВКМ из плодных или внеэмбриональных тканей обеспечит более конструктивное ремоделирование тканей в сравнении с ВКМ постнатальных тканей.

Пуповина и плацента представляют собой ценнейший гомологичный источник внеэмбриональной ткани, доступный в достаточном количестве без этических ограничений после родов у здоровых обследованных женщин. Он сохраняет в своей структуре молекулы, способствующие регенерации. Провизорные органы после рождения ребенка уничтожаются как биологический отход, поэтому биоматериал незатрачен.

Биоматериал пуповины обладает доказанными регенераторными свойствами, проявляющимися в

безрубцовом восстановлении повреждений кожи и эпителиальных тканей плода на средних сроках гестации, и в ускоренном заживлении ран плода в поздних сроках беременности [25]. Фетальный фенотип ВКМ содержит факторы роста и молекулы клеточной адгезии, которые способствуют миграции клеток в бесклеточную конструкцию, помещенную в зону повреждения [12], способен к продолжительному функционированию, биоразлагаем, нецитотоксичен, благодаря составу близок к компонентам кожных покровов. Это делает пуповину превосходным биоматериалом для получения матрикса, сходного с матриксом кожи (в условиях дефицита донорского материала кожи), способным предоставить факторы регенерации, и гидрогеля для 3D-биопечати.

*Регенераторные особенности фетальных и внеэмбриональных тканей.* В постнатальном периоде восстановление повреждений ткани завершается образованием рубцовой ткани. У плода раны заживают без рубца путем регенерации нормальной кожной архитектуры, включая восстановление дермальных придатков, нервных и сосудистых структур. У всех видов млекопитающих (людей, мышей, крыс, овец, обезьян) особенность регенерации обнаружена в середине гестационного периода. В дальнейшем период регенеративного заживления сменяется периодом, в котором раны заживают с полной регенерацией ВКМ, но без регенерации кожных придатков. В конце беременности появляется постнатальный фенотип заживления ран с отложением коллагена в ВКМ, утратой дермальных придатков и уплощенным эпидермисом, но с высокой степенью эластичности восстановленных тканей [25].

Долгое время факторы внутриутробной среды в процессе заживления ран плода считали определяющими. Стерильная, богатая питательными веществами амниотическая жидкость, которая непрерывно омывает кожу плода, играет действительно важную роль в фенотипе раны плода. Исследования Акита [4] показали, что основной фактор роста фибробластов (bFGF) из околоплодных вод ускоряет заживление пролежней, ожогов, язв стопы и диабетических язв. Однако регенеративное восстановление ранений плода не зависит от внутриматочной окружающей среды. У сумчатых животных при отсутствии околоплодных вод раны плода в период развития внутри материнской сумки заживают безрубцово [5]. Раны кожи плода в середине беременности после ксенографтинга иммунокомпрометированным взрослым мышам заживали без рубцов. Наоборот, иссеченные раны кожи взрослых овец, пересаженные плодам ягнят, возвращенных во внутриутробную среду, заживали рубцеванием [15]. Эти данные свидетельствуют о внутреннем свойстве ткани плода заживать без рубцов, не зависящем от внутриутробной среды.

Выявление фундаментальных механизмов заживления ран плода позволяет предложить пути ускорения заживления глубоких повреждений кожи и минимизировать образование рубцов у взрослых

пациентов. Помимо заживления ран, стимуляция регенераторного заживления может быть полезна в лечении заболеваний, сопровождающихся усиленным фиброзированием – спаек брюшины, келоидов, склеродермии, легочного и почечного фиброза и цирроза печени.

Важнейшее преимущество пуповины и плаценты как источников ВКМ заключается в их внеэмбриональном происхождении с сохранением особенностей эмбрионального фенотипа: факторов роста, воспалительной реакции и цитокинового профиля, специфики ВКМ, механических характеристик, спектра стволовых клеток.

*Факторы роста в матриксе эмбриональных и провизорных тканей.* В заживлении ран играют роль молекулы семейства трансформирующего фактора роста TGF. У взрослых доминирует экспрессия TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 в ложе ран, тогда как у плода – экспрессия TGF- $\beta$ 3. Подавление экспрессии TGF- $\beta$ 1 у взрослых существенно уменьшает рубцевание, добавление рекомбинантного TGF- $\beta$ 1 в раны плода в середине беременности приводит к образованию рубцовой ткани. Эти данные показывают, что низкие уровни TGF- $\beta$ 1 ассоциированы со снижением рубцевания. Повышенные уровни TGF- $\beta$ 3 и более высокое отношение TGF- $\beta$ 3/TGF- $\beta$ 1 имеют решающее значение для уменьшения образования рубцов. Добавление рекомбинантного TGF- $\beta$ 3 уменьшает рубцевание. Помимо управления процессом коллагенообразования, TGF- $\beta$ 3 усиливает миграцию постнатальных фибробластов, что свойственно фибробластам плода [25].

*Клеточный воспалительный ответ у плода.* Раны плода характеризуются невыраженной клеточной инфильтрацией, слабыми сосудистыми реакциями и специфической экспрессией цитокинов. Нейтрофилов в ранах плода существенно меньше, чем у взрослых, и они имеют меньшие размеры и количество гранул. Из-за низкого синтеза провоспалительных цитокинов рекрутинг лейкоцитов в рану незначительный, однако клетки реагируют на соответствующие сигналы *in vitro*. Эта особенность клеточного ответа на повреждение в ранах плода является результатом снижения рекрутинга, а не самого дефицита клеток.

Моноциты в очаг воспаления постнатальных тканей приходят под влиянием тромбоцитарного фактора роста (PDGF), а под влиянием TGF- $\beta$ 1 моноциты становятся фагоцитирующими макрофагами, продуцируя многочисленные цитокины и ростовые факторы. Активированные макрофаги, играющие большую роль в заживлении ран у взрослых, отсутствуют в ранах плодов мышей на середине гестации [18]. Это объясняют тем, что тромбоциты плода производят меньше профибротического тромбоцитарного фактора роста PDGF, потому и рекрутинг моноцитов в рану плода неактивный. Низкие уровни экспрессии TGF- $\beta$ 1 в фетальной ткани не способствуют превращению моноцитов в макрофаги; описана роль TGF- $\beta$ 3 плода как стоп-сигнала для терминальной дифференцировки моноцитов [6].

Тучные клетки в ранах плода в середине беременности малочисленны, менее зрелые и не способны к дегрануляции; по сравнению со зрелыми мастоцитами они высвобождают более низкие уровни гистамина, TGF- $\beta$ 1 и фактора некроза опухоли TNF- $\alpha$  [24]. Это приводит к невыраженности сосудистых и клеточных воспалительных реакций в ложе ран плода.

**Цитокины.** В ранние сроки беременности в коже плода, сыворотке крови и околоплодных водах высокие уровни интерлейкина (IL)-10 и низкие уровни IL-6 и IL-8. Исследования ран плода середины беременности, созданных у трансгенных мышей с нокаутом IL-10, показали повышенные уровни IL-6 и IL-8; раны заживали с рубцеванием в том гестационном возрасте, при котором у нормальных животных раны излечивались без рубцов. Гиперэкспрессия IL-10 с помощью вирусных векторов в эксперименте приводила к снижению клеточной инфильтрации, отложению коллагена, характерному для плода, регенерации кожных придатков, и полному заживлению ран [25]. Таким образом, в феномене безрубцового заживления ран плода важную роль играет клеточный состав ткани и специфика синтеза клетками цитокинов.

**Компоненты фетального внеклеточного матрикса.** В ранах плода коллаген откладывается в виде тонкой сетки, не отличимой от окружающей неповрежденной ткани, в постнатальных ранах – плотно расположенными параллельными пучками. Коллагены I, III типа и обилие HA – ключевые компоненты матрикса, обеспечивающие безрубцовое заживление фетальных ран, облегчающие миграцию клеток и экспрессию ими рецепторов. И фетальные, и постнатальные раны заживают с преобладанием коллагена I типа, но соотношение коллагена III типа и I типа выше в ранах плода. Одиночная субъединица коллагена III может способствовать хемотаксису множественных прогениторных типов клеток *in vitro* и способна рекрутировать клетки с маркерами мультипотентности при инъекции *in vivo*. Фетальная эластичная коллагеновая структура характеризуется небольшим количеством поперечных сшивок.

HA, стимулируя миграцию, дифференцировку и пролиферацию клеток, играет существенную роль в заживлении ран на всех этапах онтогенеза, оставаясь при этом еще и обильным структурным компонентом. Тканям плода присущ HA высокого молекулярного веса, его повышенный уровень отмечают в течение 3 недель после травмы. В ранах взрослых уровень HA преходяще быстро повышается, и преобладает низкомолекулярный HA. HA усиливает выработку клетками и TGF- $\beta$  3, и коллагена III типа; влияет на скорость миграции фибробластов плода, которые экспрессируют в 2–4 раза больше гиалуроновых рецепторов. HA подавляет агрегацию тромбоцитов и высвобождение тромбоцитарных факторов роста, а через них и клеточную воспалительную инфильтрацию ран.

Упомянутые особенности тканей плода позволяют предположить, что биоматрикс, созданный из ВКМ провизорных органов, сможет обеспечить структур-

ное и индуктивное микроокружение для регенерации тканей в постнатальном периоде онтогенеза.

**Ремоделирование ВКМ.** Замещение поврежденных тканей новыми структурами во время регенерации, которое принято называть «конструктивным ремоделированием» [20], осуществляют активированные клетки-резиденты, например фибробласты и миобласты. ВКМ – динамичная среда, клеточное и ферментативное разрушение компонентов ВКМ, и появление их фрагментов во время ремоделирования обеспечивают регуляцию синтеза, состава и структуры нового ВКМ через высвобождение при деградации матрикса факторов роста.

Нейтрофилы фагоцитируют матриксные структуры в очаге воспаления и лизируют кислородзависимыми пероксидазами. Макрофаги разрушают ВКМ протеолитическими ферментами лизосом. Матриксные металлопротеиназы (MMP) – адамализины (ADAM, a disintegrin and metalloproteinase; ADAMT, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) – расщепляют множество компонентов ВКМ. К настоящему времени у человека идентифицированы 23 MMP, 22 ADAM, и 19 ADAMT [20].

Итогом деградации ВКМ являются небольшие пептиды, называемые матрикриптинами или криптопептидами с мощной биоактивностью. Они регулируют ангиогенез, антиангиогенез, миграцию, адгезию, дифференциацию и антимикробную активность [9]. Не являясь структурными, они играют существенную роль в сборке ВКМ путем формирования комплексов факторов роста. Например, деградация белка фибронектина приводит к образованию фактора роста эндотелия сосудов VEGF, фибробластов FGF- $\beta$ , трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$  [20], способствуя ангиогенезу и другим клеточным реакциям в сайте повреждения. Пептид Arg-Gly-Asp (RGD) – один из самых хорошо изученных матрикриптических пептидов, к нему прикрепляются матриксные и клеточные белки-интегрины. Специалисты тканевой инженерии пользуются пептидом RGD для создания полимеров с улучшенными свойствами клеточной адгезии [19]. Синтез новых молекул матрикса происходит во времени параллельно с процессами деградации ВКМ. Фибробласты плода обеспечивают более раннюю депозицию коллагена в ложе раны, в отличие от ответа фибробластов взрослого на TGF- $\beta$  1.

Мутации с утратой некоторых белков ВКМ, таких как фибронектин, ламинин или коллаген, являются летальными для эмбриона, роль белков ВКМ во время развития критическая. Дефекты пуповины с нарушением структуры и состава Вартонова студня также приводят к нежизнеспособности плода и новорожденного [14].

**Механическое напряжение фетальных тканей в зоне повреждения.** Обширная фетальная рана, как и рана взрослого, характеризуется ростом механического натяжения. Размер раны существенно определяет исход ее заживления, и в том гестационном периоде, когда более мелкие раны заживают без

рубцов, протяженные раны рубцуются. Очевидно, что биомеханические силы могут быть важным фактором регенеративного фенотипа плода. Повышенная жесткость постнатального внеклеточного матрикса *in vitro* приводит к ускорению превращения дермальных фибробластов в фенотип миофибробластов и усилению экспрессии ими генов синтеза коллагенов COL1A1 и факторов роста TGF [3].

Сигналы натяжения матрикса реализуются различными путями. Увеличение силы сдвига индуцирует локальное производство профибротических факторов роста, таких как TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2. Механическое напряжение в ране инициирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты, продукт которых проявляет сократительные свойства. Миофибробласты в фетальных ранах середины гестации отсутствуют на 14 день после повреждения. В обширных ранах позднего гестационного возраста, при котором формируется рубцовая ткань, в избытке присутствуют миофибробласты. Изучен механизм механотрансдукции через фокальную киназу адгезии (FAK), инициированной интегринами, она активирует дермальные фибробласты к запуску рубцевания. Ингибирование внутриклеточного компонента рецепторов FAK приводит к неспособности клеток мигрировать в очаг повреждения и, превращаясь в миофибробласты, функционировать с образованием рубцовых волокон [23]. Таким образом, специфические для провизорных органов механические характеристики ВКМ могут обеспечить успешность функционирования тканеинженерных конструкций на основе матрикса пуповины.

*Стволовые клетки эмбриональных и внеэмбриональных тканей.* В регенеративном заживлении фетальных ран играют важную роль эпителиальные стволовые клетки (ESCs), мезенхимальные стволовые клетки (MSCs) и маленькие «точечные» стволовые клетки («dot cells») диаметром до 7 мкм, экспрессирующие маркеры, характерные для стволовых клеток – E-кадгерин, интегрин-b1 и CD34. Доля таких клеток у плодов крыс более чем в 20 раз превышает долю их в тканях взрослых животных. Мигрируя в рану, они дифференцируются в дермальные клетки, высвобождающие меньше интерстициального коллагена, чем миофибробласты, и уменьшают рубцевание [13].

Мультipotентные MSC пуповинно-плацентарного происхождения демонстрируют высокий пролиферативный потенциал *in vitro*. В присутствии 5% АВ-сыворотки человека при пересеве каждые 4 сут в концентрации  $3 \cdot 10^3$  кл/см<sup>2</sup> количество MSC пуповины увеличивалось, в среднем, в 16 раз за один пассаж, MSC плаценты – в 5 раз. В MSC пуповины в основном присутствуют клетки с минимальным количеством гемопоэтических поверхностных маркеров (CD33, CD34, CD45, CD117), в то время как 97–99% клеток популяции положительны по маркерам CD90, CD105 (эндоглин, белок рецептора к факторам роста семейства TGF-), CD73, CD44. MSC пуповины снабжены антигенами главного комплекса гистосовместимости первого класса HLA-ABC, а антигены HLA-DR отсут-

ствуют [1]. По совокупности свойств клетки из тканей пуповинно-плацентарного комплекса являются промежуточными между эмбриональными и постнатальными MSC. Подобно эмбриональным, они экспрессируют маркеры мультipotентности, но, в отличие от эмбриональных стволовых клеток, не осуществляют неопластической трансформации при трансплантации иммунодефицитным животным [17, 25].

Продуктом клеток Вартонова студня пуповины человека являются волокнистые тканеподобные структуры, содержащие структурные белки ВКМ, факторы роста и молекулы клеточной адгезии [11], и являющиеся по сути природной тканеинженерной конструкцией.

Таким образом, пуповина человека является источником мультipotентных MSC со свойствами фетальных и постнатальных клеточных фенотипов, высокой пролиферативной активностью и дифференцировочным потенциалом, отсутствием туморогенности, стабильностью кариотипа, иммуномодулирующими возможностями.

*Физические свойства матриксов пуповины.* Традиционные методики децеллюляризации удаляют клетки из тканей небольшой толщины. Плотные структуры Вартонова студня пуповины человека потребуют даже более энергичного биохимического воздействия и многократной отмычки от реагентов.

Децеллюляризованные матриксы пуповины выполняют функции обеспечения механической прочности благодаря коллагеновым волокнам, растяжимости – волокнам эластина, функции гидратации микроокружения – протеогликанам; сохраняют биоактивные молекулы для сигналинга факторов роста и протеинов, которые важны для межклеточных коммуникаций, взаимодействия клеток с матриксом и формирования нового ВКМ. Свойства бесклеточных матриксов провизорных органов указывают на их потенциал в организации таргетных органов.

Помимо трехмерного матрикса пуповины [7], возможно получение ВКМ пуповины в виде гидрогеля, придающего особые свойства продукту [12]. Вязкие материалы способны подстраиваться под неравномерность зоны поражения с минимальным повреждением тканей во время инъекции. Для придания формы инъекцируемому гидрогелям ВКМ их ферментативно солибилизируют в жидкую форму, которая самособирается в гидрогель при физиологическом pH 7,35–7,45 и температуре 38°C. Высокая концентрация GAG в биоматериале пуповины определяет высокую скорость гелеобразования по сравнению с ВКМ из постнатальных органов свиньи с низким содержанием гликозаминогликанов [12].

Существенной особенностью гидрогелей ВКМ из постнатальных тканей является их сжатие при культивировании. Этот феномен характерен для коллагеновых гелей, засеянных фибробластами, производящими напряжение матрикса во время выдвигания и втягивания псевдоподий [8]. Гидрогели из нервной ткани и мочевого пузыря свиньи значительно

сокращались при 3D-культивировании MSC из Вартонова студня пуповины человека [21]. Сокращение инъектабельного гидрогеля ВКМ пуповины человека при культивировании фибробластов происходит существенно медленнее, чем в тканях животных [12].

Совершенно очевидно, что компоненты ВКМ пуповины наряду с клетками, также вносят свой вклад в фетальный фенотип заживления. В виде гидрогелей они могут представлять особый интерес для 3D-биопечати [16]. Процесс биопечати требует доставки среды и клеток в пространство, характеристики которого созданы в результате компьютерного моделирования, и таких свойств материала, как биосовместимость, высокая механическая целостность и стабильность, нерастворимость в культуральной среде, биоразлагаемость, неиммуногенность. Задача напечатанной конструкции – сохранять сконструированную трехмерную архитектуру ткани и прочность в течение определенного периода времени после трансплантации и в прогнозируемое время деградировать, заменяясь ремоделированными тканями. Применение ВКМ в форме гидрогелей и для тканевой инженерии, и для 3D-биопечати предпочтительно, поскольку эти материалы предполагают минимально инвазивную методику доставки при сохранении биологической активности с преимуществом *in situ* полимеризации.

ВКМ внеэмбриональных тканей, главным образом пуповины, отвечает задачам, стоящим перед гидрогелями как средами для биопечати, которые будут заселены клетками. Ему присущи и особые свойства гелеобразования при физиологических значениях кислотно-основного состояния и температуре организма [12]. С полным основанием гидрогели из пуповины могут быть отнесены к категории смарт-гидрогелей [22]. Такие интеллектуальные гидрогели обладают уникальными характеристиками контролируемого золь-гель перехода, имеют определенную форму памяти, способность к самосборке. Например, альгинатные гидрогели, используемые в 3D-биопечати, обладают свойством фотоотвердевания, отвечая отдельным условиям сохранения формы. Однако нефизиологический способ отвердевания и иные недостатки альгината требуют поиска иных компонентов гидрогелей. Совершенно очевидно, что гомологичное происхождение биоматериала пуповины, его регенераторные характеристики окажутся приоритетными для производства гидрогелей и тканевой инженерии.

**Заключение.** Пуповина является не только превосходным биоматериалом для получения матриксов и гидрогелей, но и источником мультипотентных MSC, обладающих уникальным сочетанием свойств фетальных и постнатальных клеточных фенотипов, высокой пролиферативной активностью и дифференцировочным потенциалом, отсутствием туморогенности, стабильностью кариотипа, иммуномодулирующими возможностями, – по сути, перспективным объектом криохранения для нужд культивирования и применения для создания таргетных тканеинженерных конструкций

Пуповина и амнион, будучи доступными внеэмбриональными структурами, сохраняют особенности строения и регенераторные потенциалы внеклеточного матрикса, свойственные эмбриональным тканям. Понимание биологической основы фенотипа плода позволяет применить эти физиологические особенности для восстановления тканей в постнатальном периоде путем создания тканеинженерных конструкций из внеэмбрионального биоматериала с регенераторными потенциалами, способных как минимум ускорить заживление повреждений, либо даже полностью их регенерировать.

Внеклеточный матрикс незрелой пуповины середины гестации потенциально может быть использован в тканевой инженерии урологических и гинекологических конструкций, поскольку фетальный фенотип ткани этого срока развития позволяет получить матрикс, способствующий заживлению регенераторного типа, но без восстановления кожных придатков, что оптимально для этих областей медицины. Таким образом, пуповина человека является превосходным природным материалом для создания тканеинженерных трансплантатов и гидрогелей для 3D-биопечати.

#### Литература

1. Костюнина, В.С. Культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, пуповины и плаценты отличаются по уровню экспрессии генов цитокинов, подерживающих гемопоэз / В.С. Костюнина [и др.] // *Гены & Клетки*. – 2015. – Т. X. – № 1. – С. 61–68.
2. Федеральный закон от 23.06.2016 N 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» // *Росс. газета*. – 2016. – № 139. – 28 июня.
3. Achterberg, V.F. The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function / V.F. Achterberg [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2014. – Vol. 134, № 7. – P. 1862–72.
4. Akita, S. Basic fibroblast growth factor in scarless wound healing / S. Akita [et al.] // *Adv. Wound Care*. – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 44–49.
5. Armstrong, J.R. Ontogeny of the skin and the transition from scar-free to scarring phenotype during wound healing in the pouch young of a marsupial, *Monodelphis domestica* / J.R. Armstrong [et al.] // *Dev. Biol.* – 1995. – № 169. – P. 42–260.
6. Barrientos, S. Growth factors and cytokines in wound healing / S. Barrientos [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2008. – Vol. 16. – P. 585–601.
7. Beiki, B. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing / B. Beiki [et al.] // *Materials science & Engineering. Materials For Biological Applications*. – 2017. – Vol. 78. – P. 627–638.
8. Brown, R.A. In the beginning there were soft collagen cell gels: towards better 3D connective tissue models? / R.A. Brown // *Exp. Cell Res.* – 2013. – № 319. – P. 2460.
9. Davis, G.E. Matricryptic sites control tissue injury responses in the cardiovascular system: relationships to pattern recognition receptor regulated events / G.E. Davis // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2010. – Vol. 48. – P. 454–460.
10. Galili, U. Avoiding detrimental human immune response against Mammalian extracellular matrix implants / U. Galili // *Tissue Eng. Part B Rev.* – 2015. – Vol. 21, № 2. – P. 231–241.
11. Jaimes-Parra, B.D. Membranes derived from human umbilical cord Wharton's jelly stem cells as novel bioengineered tissue-like constructs / B.D. Jaimes-Parra [et al.] // *Histology and histopathology*. – 2018. – Vol. 33, № 2. – P. 147–156.

12. Koci, Z. Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues / Z. Koci [et al.] // Tissue Engineering Part C – Methods. – 2017. – Vol. 23, № 6. – P. 333–345.
13. Kong, W. Germ plasm like Dot cells maintain their wound regenerative function after in vitro expansion / W. Kong [et al.] // Clin. Exp. Pharmacol. and Physiol. – 2010. – Vol. 37, № 4. – P. 136–144.
14. Kulkarni, M.L. Absence of Wharton's jelly around the umbilical arteries / M.L. Kulkarni [et al.] // Indian J. Pediatr. – 2007. – Vol. 74, № 8. – P. 787–789.
15. Longaker, M.T. Adult skin wounds in the fetal environment heal with scar formation / M.T. Longaker [et al.] // Ann Surg. – 1994. – № 219. – P. 65–72.
16. Murphy, S.V. 3D bioprinting of tissues and organs / S.V. Murphy // Nat. Biotechnol. – 2014. – Vol. 32. – P. 773–785.
17. Sabapathy, V. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells plasticity augments scar-free skin wound healing with hair growth / V. Sabapathy [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. 93726.
18. Satish, L. Cellular and molecular characteristics of scarless versus fibrotic wound healing / L. Satish [et al.] // Dermatol. Res. Pract. – 2010. – P. 790234.
19. Snyman, C. MMP-14 in skeletal muscle repair / C. Snyman [et al.] // J. Muscle Res Cell Motil. – 2015. – Vol. 36. – P. 215–225.
20. Swinehart, I.T. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis / I.T. Swinehart [et al.] // Developmental Dynamics. – 2016. – Vol. 245. – P. 351–360.
21. Tukmachev, D. Injectable Extracellular Matrix Hydrogels as Scaffolds for Spinal Cord Injury Repair / D. Tukmachev [et al.] // Tissue Eng. – 2016. – Vol. 22. – P. 306–320.
22. Wang, S. Smart hydrogels for 3D bioprinting / S. Wang [et al.] // Int. J. Bioprinting. – 2015. – Vol. 1, № 1. – P. 3–14.
23. Wong, V.W. Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling / V.W. Wong [et al.] // Nat. Med. – 2011. – Vol. 18. – P. 148–152.
24. Wulff, B.C. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing / B.C. Wulff [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2012. – Vol. 132. – P. 458–465.
25. Yagi, L.H. Human fetal wound healing: a review of molecular and cellular aspects / L.H. Yagi [et al.] // Eur. J. Plast. Surg. – 2016. – Vol. 39. – P. 239–246.

L.I. Kalyuzhnaya, O.N. Kharkevich, A.A. Schmidt, O.V. Protasov

### Regenerative properties of human extraembryonal organs in tissue engineering

**Abstract.** *The characteristics of the umbilical cord extracellular matrix are discussed relatively of their potential use for tissue engineering. The purpose of this review is to assess the current knowledge about using of homologous biomaterials with regenerative properties to create bioengineered structures. One of the most important components of tissue engineering – matrix (scaffold), resident cells can migrate, attach to it and function. Due to their structure, matrices should be easily integrated into the patient's tissue and provide conditions for cell growth and differentiation. The cells that populate the matrix in the bioreactor before the transplantation of this construction, or resident cells recruited into the transplanted extracellular matrix, and cell-matrix interactions are absolutely necessary components of tissue engineering. Available commercial bioengineering products made from mammalian tissues have certain advantages and significant disadvantages due to the risks of immunological reactions and transmission of infectious agents. The transplantation of products from xenogenic materials is prohibited by law in the Russian Federation. The donor material is limited, receipt of human cadaver material requires a long period of legal registration, which has a detrimental effect on the biomaterial. Therefore, finding a suitable homologous biomaterial is ongoing. Due to the peculiarities of the embryonic phenotype, extraembryonic tissues have special biological properties, one of which is the scarless healing of wounds. Low immunogenicity, optimal mechanical properties of extracellular matrix, presence of cell adhesion molecules and growth factors promoting regeneration provide anti-inflammatory, anti-fibrotic, anti-scarring properties for tissue engineering structures from umbilical cord and amniotic membrane. Umbilical cord and amnion due to the availability and non-invasiveness of obtaining from healthy young donors are an excellent source of homologous biomaterial for extracting matrices, cells and hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine.*

**Key words:** biomaterials; decellularization; extracellular matrix; Wharton's jelly human umbilical cord; scaffold; scarless healing; tissue engineering; regenerative medicine.

Контактный телефон: +7-906-248-23-83; e-mail: vmeda-nio@mail.ru