

Л.И. Калюжная¹, В.Е. Чернов¹, А.С. Фрумкина¹,
С.В. Чеботарев¹, Д.А. Земляной²,
Д.В. Товпеко¹, А.В. Косулин²

Изготовление тканеинженерного бесклеточного матрикса пуповины человека

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

Резюме. Развитие тканевой инженерии основано на использовании внеклеточного матрикса как конструкта, к которому мигрируют и прикрепляются клетки для пролиферации, дифференцировки и продолжительного функционирования. Получение матрикса – одна из важнейших задач, поскольку он должен быть неиммуногенным, иметь оптимальные механические свойства, содержать молекулы клеточной адгезии и факторы роста и деградировать в прогнозируемое время. Поиск биоматериала для изготовления матрикса ограничен рядом обстоятельств. Тканеспецифичный для матрикса прижизненный биоматериал лимитирован, кадаверный – мало приемлем по причине возрастных изменений или болезней, снижающих регенераторные способности тканей; синтетические материалы лишены молекул клеточной адгезии либо недеградируемы. Пуповина – доступный гомологичный биоматериал внеэмбрионального происхождения, сохраняющий особенности эмбрионального фенотипа. Обосновывается оптимальная методика децеллюляризации Вартонова студня пуповины человека при изготовлении полнокомпонентного бесклеточного матрикса. Децеллюляризацию пуповины осуществляли используя детергентную методику с 0,05% раствором додецилсульфата натрия в течение 24 ч. Качество децеллюляризации оценивали микроскопически при окрашивании флуоресцентным красителем и количественной оценкой нуклеиновых кислот. Использованный щадящий способ удаления клеток из ткани Вартонова студня удовлетворяет существующим критериям эффективности децеллюляризации, поскольку в обработанном биоматериале остаются лишь единичные клетки и малое количество дезоксирибонуклеиновой кислоты. Методика не предусматривает центрифугирования при высоких скоростях, при котором из матрикса теряются гликозаминогликаны и протеоглики, ферментативного воздействия, разрушающего фибриллярные коллагеновые структуры, нефизиологических условий децеллюляризации. Терапевтический успех тканеинженерных конструкций на основе внеклеточного матрикса будет зависеть не только от биоактивности пуповины, но и от сохранности состава, структуры и механических характеристик матрикса. Провизорные органы благодаря доступности и неинвазивности получения у здоровых молодых доноров являются превосходным источником гомологичного биоматериала для получения матриксов.

Ключевые слова: биоматериалы, внеклеточный матрикс, пуповина человека, Вартонов студень, скаффолд, гидрогель, децеллюляризация, тканевая инженерия, регенеративная медицина.

Введение. Создание *in vivo* функционирующих тканей для замены утраченных или поврежденных с целью трансплантации их пациенту – динамично развивающаяся область медицины, именуемая тканевой инженерией. В основе ее лежит получение бесклеточного матрикса, заселяемого клетками с регенераторными свойствами, итогом деятельности которых будет замена трансплантированных временно функционировавших структур вновь синтезированными компонентами собственных восстановленных тканей [4, 5].

Внеклеточный (бесклеточный) матрикс (ВКМ) – биологическая трехмерная конструкция, обладающая свойствами сохранять свою пространственную организацию и обеспечивающая транспорт клеток и различных биологических молекул [19]. Материал на основе естественного ВКМ должен быть биосовместимым, иммунологически инертным, способным к продолжительному функционированию и биodeградируемым в перспективе, предоставляя засеянными

перед трансплантацией или резидентным клеткам сайты для прикрепления, пролиферации, созревания и функционирования [14, 18, 21].

Одним из вариантов создания биомиметической, неиммуногенной, безопасной и эффективной конструкции на основе ВКМ является процесс децеллюляризации, заключающийся в удалении клеточных компонентов из соответствующих тканей [4, 7, 10]. Наиболее труднопреодолимым препятствием на пути создания тканеспецифичных конструкций является ограниченность донорского материала.

Коммерческие продукты, представленные в настоящее время на мировом рынке клеточных технологий и тканевой инженерии, в большинстве своем изготовлены из тканей животных или трупных тканей человека [18]. В эксперименте исследуют биоматериал хитозан, фиброин шелка (продукты деятельности насекомых) и бесклеточную кожу рыб для создания тканеинженерных конструкций. Но ксеногенные биоматериалы создают проблемы из-за иммунологиче-

ских реакций и риска передачи возбудителя, в том числе прионной инфекции [5, 11]. В Российской Федерации в соответствии с Федеральным законом № 180 [3] для трансплантации разрешены биомедицинские продукты из биоматериала человека, полученного как при жизни, так и после его смерти.

Однако ни прижизненный, ни кадаверный биоматериал взрослого донора не оптимален, поскольку его состав, структура тканей и органов подвергались изменениям в течение его жизни, в том числе и из-за заболеваний [11, 19]. Процедура удаления клеток из тканей взрослого донора может еще более усугубить повреждение матрикса. Итогом влияний факторов внешней и внутренней среды на ткани донора может оказаться утрата важных молекул, необходимых для прикрепления, расселения и функционирования клеток. В отличие от взрослой ткани, ВКМ из ткани плода или новорожденного содержит больше незрелого коллагена с небольшим количеством сшивок, что способствует более эффективному ремоделированию ткани. Поэтому ожидаемо, что ВКМ, полученный из ткани плода или новорожденного, будет индуцировать более эффективную и конструктивную ткань [11].

Пуповина, происходящая из внезародышевой мезодермы, содержит особую твердую слизистую соединительную ткань, так называемый Вартонов студень, который окружает сосуды плода и, как полагают, предотвращает сжатие, скручивание и сгибание. Вартонов студень характеризуется различными типами коллагена и аморфной массой вещества, компонентами которой являются гликозаминогликаны (гиалуронан, хондроитин сульфат, гепарин, гепаран сульфат) и протеогликаны [5, 15, 21]. Доказательством критической роли этих молекул в онтогенезе является то, что пуповина в своем благополучном развитии выполняет важнейшую функцию предотвращения сдавления сосудов пуповины и угрозы гипоксии плода даже при образовании узлов (рис. 1).

Мутации с утратой белков ВКМ, таких как фибронектин, ламинин, или коллаген, являются летальными для эмбриона [2]. В отличие от узлов пуповины, де-



Рис. 1. Двойной узел пуповины. 29-летняя женщина с неосложненной беременностью в срок родила младенца массой 3,7 кг, шкала Апгар составила 8 и 9 баллов на первую и пятую минуты. Пуповина имела сложный узел. Узлы, подобные этому, редки, и их связь с асфиксией плода не доказана. Младенец находился в хорошем состоянии, без каких-либо проявлений асфиксии (цит. по: [6])

фекты пуповины с нарушением структуры и состава Вартонова студня приводят к нежизнеспособности плода и новорожденного (рис. 2).

Провизорные органы – пуповина и плацента, имея мезодермальное внеэмбриональное происхождение, сохраняют особенности эмбрионального фенотипа, проявляющиеся в быстрой регенерации поврежденной ткани. Эта способность обеспечена ростовыми факторами, среди которых доминируют молекулы трансформирующего фактора роста TGF- β над присутствующими в тканях взрослого организма TGF-1, 2; преобладанием незрелого коллагена над зрелым с малым количеством коллагеновых сшивок; гиалуронаном высокой молекулярной массы в противовес низкомолекулярному постнатальных тканей; особенностями цитокиновой регуляции (доминирование у плода противовоспалительного интерлейкина-10 над провоспалительными интерлейкинами-6, -8); особенностями клеточных популяций в фетальных тканях: преобладанием фибробластов над миофибробластами, малым количеством тучных клеток и макрофагов [13].

Упомянутые особенности тканей плода дают основание предполагать, что матрикс, полученный из ВКМ провизорных органов, сможет обеспечить индуктивное микроокружение для образования тканей в месте его трансплантации. Сохранность в децеллюляризованном матриксе всех его компонентов – фибриллярных и неструктурных коллагенов, гликозаминогликанов, протеогликанов – представляется необычайно важной. Поэтому пристальному анализу были подвергнуты описанные в литературе протоколы, в которых применены жесткие физические (центрифугирование на больших скоростях) и химические



Рис. 2. Младенец массой тела 2500 г родился на 38 неделе беременности в среднетяжелом состоянии (оценка по шкале Апгар на 1 и 5 минутах составляла 4 и 5 баллов соответственно). Осмотр пуповины показал отсутствие Вартонова студня вокруг пупочных артерий. В течение часа с момента рождения у ребенка развился дистресс-синдром, он умер вскоре после рождения. Четыре случая отсутствия Вартонова студня вокруг артерий пуповины, упомянутые в этом исследовании, сопровождалась компрессией незащищенных сосудов и перинатальной смертью (цит. по: [12])

методики получения матрикса (использование агрессивных органических кислот, химического сшивания коллагена, а также нефизиологических параметров ферментативного гидролиза) [9, 16].

Механические свойства получаемых матриксов пуповины зависят от сохранности структур ВКМ, это еще один фактор регенеративного фенотипа плода. Повышенная жесткость матрикса *in vitro* приводит к увеличению превращения дермальных фибробластов в фенотип миофибробластов и усилению экспрессии ими генов синтеза коллагенов COL1A1, профибротических факторов роста TGF-1 и TGF-2, экспрессии альфа-гладкомышечного актина – то есть спектра факторов роста и структурных волокон матрикса, присущего постнатальному фенотипу. Особые механические свойства и композиция каркаса внеэмбриональных структур могут быть решающими характеристиками при создании бесклеточной тканеинженерной конструкции. Процедура удаления клеток из ткани пуповины в идеале должна сохранять все многообразие структурных и неструктурных молекул и минимальное количество сшивок между волокнами коллагена.

Применяемые методики децеллюляризации классифицируются на физические, химические, биологические/ферментативные или сочетающие эти подходы [13], в основе которых лежит общий принцип разрушения клеточной мембраны и удаления клеточного содержимого [4, 7]. Физическими методиками являются центрифугирование, циклы замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком [10, 20]. Химические методики – использование кислот и щелочей, гипертонических и гипотонических растворов, ионных, неионных и цвиттерионных детергентов, хелатирующих агентов [11, 17]. Наиболее часто используют додецилсульфат натрия (SDS), дезоксихолат натрия и тритон X-100 или X-200 [2]. При ферментативной децеллюляризации используют пепсин, трипсин, эндо- и экзонуклеазы [8].

Выбор действующего агента, метода децеллюляризации и продолжительности воздействия зависит от ряда факторов, в частности от характеристики ткани (количественное содержание клеток и различных биологических молекул, ее плотность и толщина) и клинических целей [7]. Так, для удаления клеток в образцах толщиной до нескольких миллиметров ткань подвергается кратковременному воздействию гипотонических или гипертонических растворов, ферментов и/или детергентов, последующему отмыванию в сопровождении разнообразных физических процессов [4, 5]. Более толстые ткани (например, хрящевые) требуют более энергичного биохимического воздействия и многократной отмывки от нескольких часов до нескольких дней [1]. Действующий агент, методика и продолжительность процесса удаления клеток влияют на состав ВКМ и вызывают некоторую степень разрушения ультраструктуры [10].

ВКМ тканей плода и новорожденного, включая пуповину, содержит значительно большее количество

сульфатированных гликозаминогликанов, чем любые постнатальные ткани. Хондроитин сульфат, гепарин, гепаран сульфат и нессульфатированный гиалуронан фиксируют цитокины и факторы роста. Поэтому протокол децеллюляризации пуповины должен быть оптимизирован для сохранения важных регенераторных молекул с учетом высокой гидрофильности гликозаминогликанов, требующей существенного увеличения продолжительности отмывки материала от агентов.

Эффективное удаление внутриклеточных компонентов и антигенных эпитопов стало решающим вопросом из-за необходимости минимизации негативных иммунных реакций реципиента, порожденных аллогенными скаффолдами. Минимальными критериями качественной децеллюляризации, которым следуют во всем мире, являются: 1) количественное содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) менее 50 нг/мг в сухой ткани; 2) содержание фрагментов ДНК размером менее 200 пар нуклеотидов; 3) отсутствие ядерного материала в тканевых срезах при окрашивании 4,6-диамидино-2-фенилиндолом или гематоксилином и эозином. Соблюдение этих критериев приводит к эффективности скаффолдов в модельных системах *in vivo* [7].

Физические методики – дифференцированное центрифугирование при разных скоростях – оказываются эффективными для выделения отдельных компонентов ВКМ, так исследователи получали гликозаминогликаны, при этом клетки оказывались вместе с коллагенами в удаляемом осадке [20].

Ультразвук, воздействовавший на биоматериал в процессе оттаивания, приводит к значительному уменьшению клеток в матриксе гортани, однако вызывает структурные повреждения скаффолда [10].

Химические методики [17] применяют для получения коллагенов I и IV типов из плаценты путем деструктивного воздействия на биоматериал органических кислот, не только разрушающих клетки, но и гидролизующих белки матрикса.

Высокая концентрация гликозаминогликанов в биоматериале пуповины не только требует оптимизации протокола децеллюляризации, но и изменяет механические свойства полученных жидких форм ВКМ [14]. Действительно, ВКМ пуповины выявил высокую скорость гелеобразования по сравнению с ВКМ из постнатальных органов свиньи с низким содержанием гликозаминогликанов [11]. При центрифугировании на больших скоростях низкомолекулярный гиалуронан оказывается в отбрасываемом супернатанте, поэтому методика используется для получения гликозаминогликанов низкой молекулярной массы [4, 16, 21].

Существенной особенностью ВКМ из постнатальных тканей является их сжатие при фибробластоподобном культивировании. Сокращение гелеобразного ВКМ пуповины человека при культивировании фибробластов происходит существенно медленнее, чем ВКМ тканей животных [18]. Это наблюдение согласуется с тем, что трехмерный матрикс Вартонова студня имеет меньшую жесткость пространственной

структуры, чем жесткость постнатального матрикса.

ВКМ пуповины избирательно способствует распространению мезенхимальных стволовых клеток (МСК) по сравнению с другими типами ВКМ, является превосходным фидером для культивирования МСК для нужд рецеллюляризации тканеинженерных конструкций таргетных органов или клеточной терапии [18].

Dan P. et al. [8] представили ферментативный способ получения ВКМ из Вартонова студня трипсином, а трипсиновую реакцию ингибировали бычьей сывороткой. Однако применение сывороток животного происхождения при работе с пуповиной человека может стать источником прионных инфекций, а потому не применимо при создании тканеинженерных конструкций для трансплантации человеку [3].

Альтернативным вариантом получения внеклеточного матрикса является непосредственное его создание клетками Вартонова студня с последующим удалением клеток-продуцентов. В течение 7–9 дней на стеклянных планшетах в ростовой среде, дополненной аскорбиновой кислотой для стимулирования образования ВКМ, были культивированы МСК пуповины человека. Для децеллюляризации материала образцы обработали растворами неионных детергентов (тритон X-100) и ферментов (дезоксирибонуклеаза) [19]. Однако в литературе не найдено описаний создания *in vitro* трехмерного матрикса пуповины путем культивирования клеток-продуцентов.

Наиболее часто целью исследователей является получение отдельных компонентов ВКМ пуповины [16, 20]. Испанские изобретатели Perez J.F. et al. [16] извлекали из ВКМ пуповины сульфатированные и несulfатированные гликозаминогликаны с помощью продолжительного ферментативного расщепления, затем их подвергали химическому сшиванию. Матрикс приобретал твердую трехмерную пористую структуру. При всей привлекательности описанного протокола многие его этапы не физиологичны и не сохраняют в итоге природных свойств исходного материала, в частности, способствуют созданию монокомпонентного бесколлагенового матрикса большей жесткости. Xiao T. et al. [20] после пятикратного замораживания-оттаивания гомогената подвергали его дифференциальному и градиентному центрифугированию, а полученный супернатант содержал преимущественно гликозаминогликаны. В других исследованиях описана процедура получения только коллагенов определенного типа [17].

Цель исследования. Обосновать и воспроизвести оптимальный протокол удаления клеточного материала из Вартонова студня пуповины человека для создания тканеинженерного бесклеточного матрикса.

Материалы и методы. Для децеллюляризации пуповины и подготовки внеклеточных матриксов брали пуповины человека от здоровых доношенных новорожденных после самопроизвольных родов с информированным согласием доноров и с использованием

руководящих принципов, утвержденных этическим комитетом при Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, № 203. Все доноры пуповины проходили серологические исследования на наличие инфицирования вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), цитомегаловирусом, вирусом гепатита типа А, В, и сифилисом. Фрагменты пуповины замораживали (>16 ч при –20°C), асептически переносили в лабораторию, размораживали и ажитировали в 0,1 М фосфатном буферном растворе (PBS) фирмы «Биолот» (Россия) при 120 об/мин и комнатной температуре. PBS меняли от трех до пяти раз, прежде чем пуповину препарировали в ламинарном шкафу для удаления сосудов. Вартонов студень пуповины измельчали, а затем гомогенизировали с помощью прибора «gentleMACS™ Dissociator» фирмы «Milteniy Biotec» (Германия).

Децеллюляризацию гомогенизированного Вартонова студня осуществляли детергентным способом с использованием стерильного 0,05% раствора SDS фирмы «Unger» (Норвегия) в течение 24 ч при комнатной температуре и шейкировании при 120 об/мин. По окончании децеллюляризации образцы подвергали многократной отмывке PBS (pH=7,42) с целью удаления SDS и открепившихся клеток. Децеллюляризованный матрикс хранили в растворе пенициллина-стрептомицина (100 МЕ/мл и 100 мкг/мл соответственно) фирмы «Биолот» (Россия).

Для предварительного и быстрого выявления клеток препараты окрашивали 2% раствором ацетоорсеина. Препараты анализировали и документировали в видимом проходящем свете на микроскопе «AxioImager 2M, объективы EC Plan Neofluar, камера цветная Аxiocam MRC5 фирмы «Carl Zeiss» (Германия). В соответствии с общепринятыми методиками отсутствие ядер клеток в децеллюляризованных тканях документировали окрашиванием с помощью флуоресцентного красителя 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, 1:1000 Invitrogen) фирмы «Paisley» (Украина). Концентрация DAPI в рабочем растворе – 0,01 мг/мл. Препараты анализировали и документировали с использованием флуоресцентного микроскопа «AxioImager 2M» фирмы «Carl Zeiss» (Германия).

Количественный анализ ДНК проводили с использованием коммерческого экстрактивного набора «InstaGene matrix» фирмы «BioRad» (Соединенные Штаты Америки). Двухцепочечную ДНК выделяли из нативных и децеллюляризованных тканей в соответствии с инструкциями производителя. Оптическую плотность экстракта ДНК измеряли путем абсорбции при 260 нм на спектрофотометре «Implen NanoPhotometer NP80 Touch» фирмы «GmbH» (Германия). Для каждого нативного и децеллюляризованного образцов анализ повторяли 3 раза.

Для статистической обработки данных использовали пакет StatSoft Statistica 6.1. В случае распределения признака, отличного от нормального, результаты представляли в виде медианы, 25 и 75 перцентилей: Me (P₂₅–P₇₅). Анализ достоверности различий уровня концентрации ДНК в нативном биоматериале и после

проведения децеллюляризации ткани осуществляли с использованием непараметрической статистики (критерий Вилкоксона), за критический уровень значимости принимали значение $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В проведенном исследовании сделана попытка получить полнокомпонентный внеклеточный матрикс из ткани пуповины, не прибегая к изоляции гликозаминогликанов и/или коллагенов, а лишь удаляя клеточный материал.

Пуповины (рис. 3) препарировали в ламинарном шкафу с соблюдением правил асептики с удалением вены и артерий.

Вартонов студень вместе с мембраной подвергали размельчению и гомогенизации, а затем шейкировали в растворе SDS в течение 24 ч.

Качество децеллюляризации оценивали с помощью световой микроскопии (рис. 4, 5).

Гистологические исследования показали, что после децеллюляризации ядер в биоматериале почти не наблюдается.

С целью оценки качества отмывки открепленных клеток и ядерного материала из ткани определяли содержание ДНК в нативном биоматериале пуповины и после его децеллюляризации. Среднее содержание

ДНК в гомогенизированном биоматериале нативной пуповины составило 468,75 (453,65–475,15) нг/мкл, после децеллюляризации – 29,2 (27,8–30,7) нг/мкл. После децеллюляризации содержание ДНК достоверно снижено, $p < 0,001$ (рис. 6).

Как следует из рисунков 4–6, примененный в нашем исследовании щадящий способ удаления клеток раствором SDS в той концентрации, при которой не происходит разрушения матриксных белков, является весьма эффективным, поскольку полученный биоматериал содержит крайне мало клеток и минимальное количество ДНК.

Использованный способ устранения клеток из ткани пуповины, очевидно, не единственный, и, помимо критерия бесклеточности, эффективность наиболее оптимальной методики будет определяться также сохранностью состава ВКМ (фибрилярные и неструктурные типы коллагена, сульфатированные и несulfатированные протеогликаны, факторы роста). Выявление характеристик, свидетельствующих о сохранности бесклеточного матрикса, – предмет дальнейших экспериментов.

Разные типы коллагенов, составляющие 75–80% матрикса пуповины и определяющие его пространственную структуру, обладают той специфической

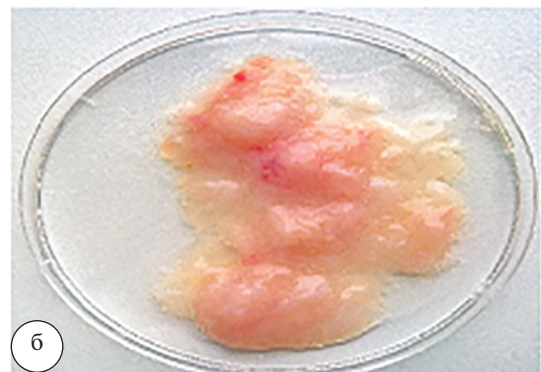


Рис. 3. Пуповина (а), выделение Вартонова студня (б)

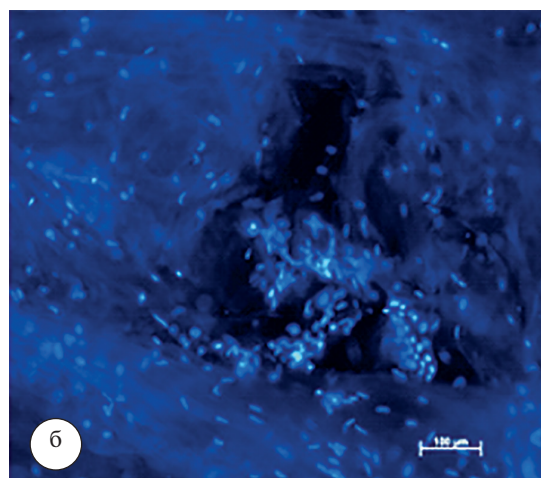
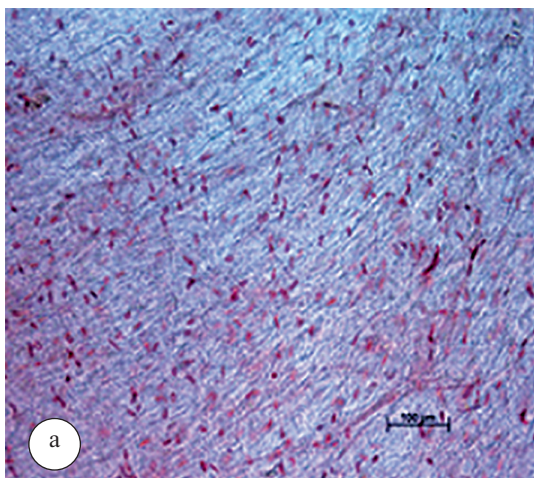


Рис. 4. Нативная пуповина: а – окраска ацетоорсеином; б – окраска DAPI, для всех ок. Р1 10×/23, об. EC Plan Neofluar 10×/0,3, шкала 100 мкм

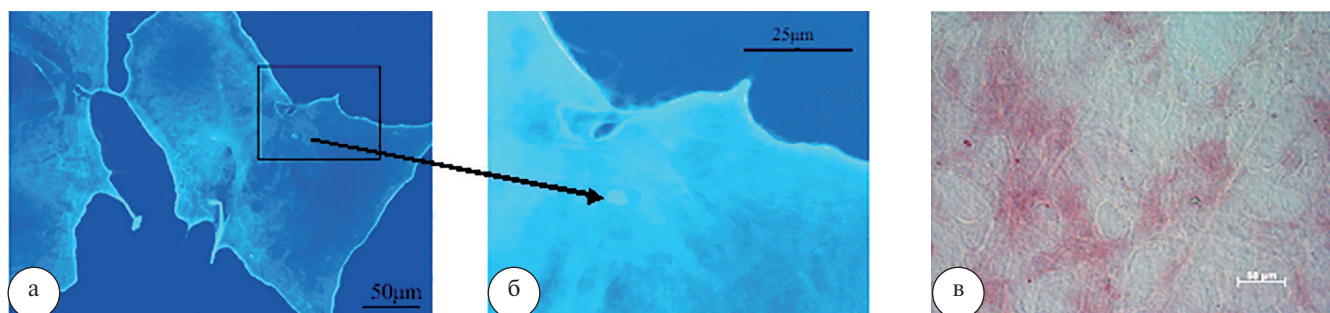


Рис. 5. Децеллюляризованная пуповина: а – окраска DAPI, ок. Р1 10×/23, об. EC Plan Neofluar 10×/0,75; шкала 100 мкм; б – окраска DAPI, ок. Р1 10×/23, об. EC Plan Neofluar 40×/0,3; в – окраска орсеином, ок. Р1 10×/23, об. 20/050, шкала 50 мкм

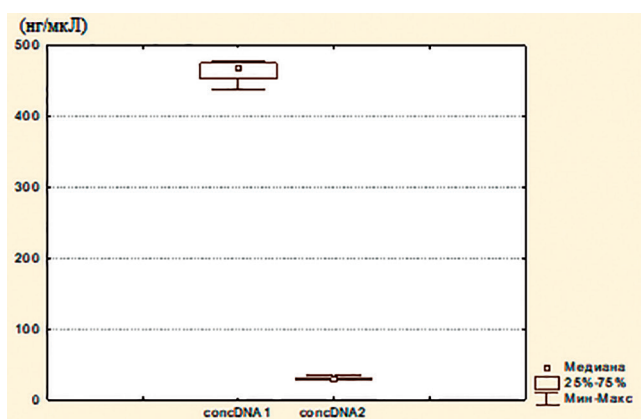


Рис. 6. Содержание ДНК в нативном (вверху) и децеллюляризованном (внизу) Вартоновом студне пуповины человека

особенностью, что они лишены поперечных швов, и в этом их, на наш взгляд, ценность. Поэтому основной научный интерес нашего исследования заключен в поиске оптимального протокола децеллюляризации, позволяющего сохранить состав нативного ВКМ пуповины.

Заключение. Терапевтический успех тканеинженерных конструкций на основе ВКМ будет зависеть не только от биоактивности, но и от сохранности структурных и механических характеристик биоматериала. В процедурах децеллюляризации провизорных тканей человека важны щадящие по отношению к компонентам ВКМ этапы удаления клеток, использование для иммобилизации ферментов нексеногенных сывороток, тщательная отмывка клеточного дебриса, качественный процесс удаления использованных реактивов, применение антибиотиков на этапах децеллюляризации и надежная стерилизация полученного продукта, а также возможность хранения конечного продукта. Ограничения этого исследования заключаются в том, что протокол не был оценен в отношении сохранности структур бесклеточного матрикса. Тем не менее, результаты, представленные в нашем исследовании, обнадеживают, и эту методику можно считать полезной основой для многих других процедур децеллюляризации.

Литература

1. Александров, В.Н. Тканевая инженерия трахеи / В.Н. Александров [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2016. – № 3 (55). – С. 212–219.
2. Строев, Ю.И. Системная патология соединительной ткани: руководство для врачей / Ю.И. Строев, Л.П. Чурилов. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2014. – 368 с.
3. Федеральный закон от 23.06.2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» // Росс. газета. – 2016. – № 139. – 28 июн.
4. Basiri, A. A silk fibroin/decellularized extract of Wharton's jelly hydrogel intended for cartilage tissue engineering / A. Basiri [et al.] // Progress in Biomaterials. – 2019. – № 8. – P. 31–42.
5. 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.
6. Camann, W. Complex Umbilical-Cord Knot / W. Camann [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2003. – № 349. – P. 2.
7. Crapo, P.M. An overview of tissue and whole organ decellularization processes / P.M. Crapo [et al.] // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, № 12. – P. 3233–3243.
8. Dan, P. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: an untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering / P. Dan [et al.] // Acta Biomaterialia. – 2017. – Vol. 48. – P. 227–237.
9. Herrero-Mendez, A. HR007: a family of biomaterials based on glycosaminoglycans for tissue repair / A. Herrero-Mendez [et al.] // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2017. – Vol. 11, № 4. – P. 989–1001.
10. Hung, S.H. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method / S.H. Hung [et al.] // J. Voice. – 2013. – Vol. 27, № 3. – P. 289–294.
11. Kočí, 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. Kočí [et al.] // Tissue Engineering Part C – Methods. – 2017. – Vol. 23, № 6. – P. 333–345.
12. 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.
13. Leung, A. Fetal wound healing: implications for minimal scar formation / A. Leung [et al.] // Curr. Opin. Pediatr. – 2015. – Vol. 24, № 3. – P. 371–378.
14. Medberry, C.J. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix / C.J. Medberry [et al.] // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34, № 4. – P. 1033–1040.
15. Nanaev, A.K. Stromal Differentiation and Architecture of the Human Umbilical Cord / A.K. Nanaev [et al.] // Placenta. – 1997. – Vol. 18, № 1. – P. 53–64.

16. Pat. № US 8,685,732 B2 United States. Biomaterial based on Wharton Jelly from the human umbilical cord / J.F. Perez [et al.]; Pub. Date: 20.10.2011.
17. Pat. № 5,436,135 United States. New preparation of placenta collagen, their extraction method and their applications / J.-L. Tayot, M. Tardy; Pub. Date: 25.07.1995.
18. Tukmachev, D. Injectable Extracellular Matrix Hydrogels as Scaffolds for Spinal Cord Injury Repair / D. Tukmachev [et al.] // Tissue Eng. – 2016. – Vol. 22, № 3–4. – P. 306–317.
19. Xiao, B. Extracellular matrix from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a scaffold for peripheral nerve regeneration / B. Xiao [et al.] // Neural Regen. Res. – 2016. – Vol. 11, № 7. – P. 1172–1179.
20. Xiao, T. Fabrication and In Vitro Study of Tissue-Engineered Cartilage Scaffold Derived from Wharton's Jelly Extracellular Matrix / T. Xiao [et al.] // Hindawi BioMed. Research International. – 2017. – 12 p.
21. Zhao, P. hWJECM-derived oriented scaffolds with autologous chondrocytes for rabbit cartilage defect repairing / P. Zhao [et al.] // Tissue Eng. – Vol. 24, № 11–12. – P. 905–914.

L.I. Kalyuzhnaya, V.E. Chernov, A.S. Frumkina, S.V. Chebotarev, D.A. Zemlyanoy, D.V. Товпеко, A.V. Kosulin

Fabrication of human Wharton's jelly extra cellular matrix for tissue engineering

Abstract. *The development of tissue engineering is based on the use of the extracellular matrix as a construct to which cells migrate and attach for proliferation, differentiation, and long-term functioning. The preparation of the matrix is one of the most important tasks, since it must be non-immunogenic, have optimal mechanical properties, contain cell adhesion molecules and growth factors and degrade at the predicted time. The search for biomaterial for the manufacture of the matrix is limited by a number of circumstances. Tissue-specific for the matrix intravital biomaterial is limited, cadaveric is not acceptable due to age-related changes or diseases that reduce the regenerative capacity of tissues; synthetic materials lack cell adhesion molecules or are not degraded. The umbilical cord is an accessible homologous biomaterial of non-embryonic origin, preserving the features of the embryonic phenotype. The optimal method of decellularization of the Wharton jelly of the human umbilical cord in the manufacture of a full-component cell-free matrix is substantiated. Umbilical cord decellularization was carried out using a detergent method with a 0.05% sodium dodecyl sulfate solution for 24 hours. The quality of the decellularization was evaluated microscopically by staining with fluorescent dye and quantification of nucleic acids. The gentle method used to remove cells from the Wharton jelly tissue meets the existing criteria for the effectiveness of decellularization, since only single cells and a small amount of deoxyribonucleic acid remain in the processed biomaterial. The technique does not provide centrifugation at high speeds, in which glycosaminoglycans and proteoglycans are lost from the matrix, the enzymatic action that destroys fibrillar collagen structures, and non-physiological conditions of decellularization. The therapeutic success of tissue-engineering structures based on the extracellular matrix will depend not only on the bioactivity of the umbilical cord, but also on the safety of the composition, structure and mechanical characteristics of the matrix. Due to the availability and non-invasiveness of receiving from healthy young donors, provisional organs are an excellent source of homologous biomaterial for matrix production.*

Key words: biomaterials, extracellular matrix, human umbilical cord, Wharton, student, scaffold, hydrogel, decellularization, tissue engineering, regenerative medicine.

Контактный телефон: +7-981-724-46-51; e-mail: vmeda-nio@mil.ru