2. Татаренко, И. Г. Особенности тупых травм глаз, полученных пробкой от шампанского ("брызги шампанского") / И. Г. Татаренко // Ерошевские чтения : Труды Всероссийской конференции "Геронтологические аспекты офтальмологии" и VI Международного семинара по вопросам пожилых "Самарские лекции", посвященные 100-летию со дня рождения Героя Социалистического Труда, лауреата Государственной премии СССР, заслуженного деятеля науки РСФСР, члена-корреспондента АМН СССР, профессора Тихона Ивановича Ерошевского, Самара, 26–27 июня 2002 года. – Самара: Офорт, 2002. – С. 359-361. – EDN TUCGIU.
3. Крылова, Н. В. Анатомия органов чувств (глаз, ухо) в схемах и рисунках : Учеб. пособие для студентов мед. вузов / Н. В. Крылова, Л. В. Наумец ; Н. В. Крылова, Л. В. Наумец. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : МИА, 2003. – ISBN 5-89481-212-7. – EDN QKMYWF.

МАТРИКС ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОВИНЫ КАК ИНТЕГРАТИВНО-РЕЗЕРВУАРНАЯ СРЕДА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Околитенко М.С., Руснак М.В., Товпеко Д.В., Калюжная-Землянская Л.И., Кондратенко А.А.
Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова
Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова
Научные руководители – д.м.н., доцент, старший научный сотрудник НИО МБИ Калюжная-Земляная Л. И., к. б. н., младший научный сотрудник НИО МБИ Кондратенко А. А.

Введение. Для военного и гражданского здравоохранения весьма значимо располагать медицинскими изделиями, способными ускорять заживление ран. Создание таких изделий технологиями тканевой инженерии требует выбора гомологичного биоматериала, имеющего в составе регенеративные компоненты. Таким биоматериалом является внеэмбрионального происхождения пуповина человек. Изучение состава бесклеточных матриксов из пуповины человека способствует разработке эффективных тканеинженерных продуктов, предназначенных для стимуляции регенерации. Цель. Оценить сохранность регенеративных компонентов стромы Вартонова студня пуповины человека после ее децеллюляризации. Материалы и методы. Для изготовления матрикса методом децеллюляризации использовали ткани пуповины человека. Для получения хранимой формы продукта бесклеточный матрикс пуповины лиофилизировали. Образцы матриксов и нативной пуповины подвергали стандартной методике изготовления микропрепаратов. Количество ДНК оценивали с помощью спектрофотометрии. Для иммуногистохимического исследования ткани инкубировали с различными антителами, направленными против человеческого ламинина, коллагена IV типа, фибронектина, TGF-β3 и VEGF. Результаты. Содержание остаточного ДНК в матриксе составило 21,8±5,0 нг/мг, что значительно ниже значений ДНК в нативной пуповине (506,8±39,1 нг/мг). Выявлено присутствие таких биологически активных веществ, как коллаген IV типа, ламинин, фибронектин, а также факторов роста TGF-β3 и VEGF, играющих важную роль в процессах регенерации. Выводы. Децеллюляризация ткани Вартонова студня пуповины 0,05% раствором додецилсульфата натрия в течение 24 часов эффективно удаляет клетки и ДНК и сохраняет регенеративные компоненты, что может быть использовано для разработки тканеинженерных бесклеточных продуктов.

Ключевые слова: регенеративная медицина; децеллюляризация тканей пуповины; внеклеточный матрикс; молекулы клеточной адгезии; факторы роста

Введение. В современной реконструктивной и восстановительной хирургии все чаще применяются биотехнологические материалы на основе тканевых структур млекопитающих и человека. Внеклеточный матрикс (ВКМ), полученный методом децеллюляризации гистологических элементов фетального фенотипа, таких как Вартонов студень пуповины человека, представляет собой каркасную основу для поврежденных тканей. Подобная процедура получения матриксов путем удаления клеточного компонента эффективна для снижения иммунногенного потенциала имплантатов аллогенного происхождения за счет исключения возможности попадания антигенов донора в организм реципиента [1]. Технология изготовления бесклеточных матриксов (биомиметиков/скаффолдов) из тканевых компонентов внезародышевых органов может предоставить беспрецедентную возможность оптимизации репаративных процессов в поврежденных участках и лечения раневых дефектов, что подчеркивает необходимость изучения их восстановительного потенциала [2]. Характеристика компонентного состава и пролиферативных свойств стромы пуповины человека может быть использована в качестве теоретического обоснования разработки и применения тканеинженерных бесклеточных продуктов.

Цель работы – оценить наличие и сохранность компонентного состава стромы Вартонова студня пуповины человека после ее децеллюляризации.

Материалы и методы исследования. Бесклеточный матрикс изготавливался с использованием пуповины человека, полученной от здоровых доношенных новорожденных после срочных родов через естественные родовые пути с информированным согласием

доноров. При работе неукоснительно соблюдались руководящие принципы, утвержденные локальным этическим комитетом Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова. Извлеченные образцы пуповин транспортировали в стерильном физиологическом растворе и замораживали при температуре -20.

После хирургического удаления сосудов в стерильных условиях ткань пуповины механически измельчали и гомогенизировали. Децеллюляризацию ткани пуповины проводили 0,05% раствором додецилсульфата натрия (24 ч). После промывания матрикс лиофилизировали (Zirbus VaCo5 II, Германия).

Из предварительно взвешенных образцов лиофильно высушенных матрикса и измельченной пуповины (n=5, m=2 мг) молекулы ДНК выделяли с помощью набора ДНК-DU-250 (Биолабмикс, Россия) согласно протоколу производителя. Далее экстрагированный генетический материал анализировали на спектрофотометре Nanodrop (Thermo Scientific, США) с коэффициентом поглощения 260/280 нм. Концентрацию ДНК определяли в соответствии с массой ткани (нг ДНК/ мг сухой ткани).

Образцы лиофилизированных матриксов и нативной пуповины заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 1-2 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и альциановым синим (pH 2,5) в соответствии с инструкциями производителя (Biovitrum, Россия). После обезвоживания препараты закрывали покровными стеклами (Thermo Fisher Scientific). Результаты окрашивания оценивали на разных увеличениях на микроскопе Carl Zeiss Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия).

Для иммуногистохимического исследования образцы инкубировали с помощью специфических мышиных антител, направленных против человеческого ламинина (1/50; LAM-89, Leica, Германия), коллагена IV типа (1/25; CIV22, DAKO, Дания). Затем определяли специфическую экспрессию антигена с помощью системы EnVision на основе пероксидазы (Dako, Дания) согласно инструкции производителя.

Для идентификации в матриксе трансформирующего фактора роста (TGF-β3) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) использовали моноклональные мышиные антитела (1/30; MAB949Hu22 и 1/30 MHD12601; Cloud-clone Corp., Китай) и набор вспомогательных реагентов для иммуногистохимии (IS086; Cloud-clone Corp., Китай) по инструкциям производителей.

С целью идентификации в матриксе фибронектина использовали поликлональные кроличьи антитела (1/50; AF0738; Affinity Biosciences, Китай). Для визуализации применяли поликлональные анти-кроличьи антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (1/1000; SAA544Rb11; Cloud-clone Corp., Китай).

Обработку полученных морфологических данных осуществляли с помощью программы Exel. Попарные сравнения для независимых выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни, за уровень статистической значимости для данных критериев принимали $p < 0,05$.

Результаты исследования. Пуповина (пупочный канатик) – это уникальный внезародышевый орган млекопитающих и человека, соединяющий эмбрион, а затем плод с плацентой. Снаружи пупочный канатик покрыт амниотической оболочкой, состоящей из однослойного эпителия. В состав стромы пуповины входит особый вид соединительной ткани со специальными свойствами – студенистая/слизистая соединительная ткань [3]. В ней содержатся кровеносные сосуды (две пупочные артерии и пупочная вена), протоки аллантоиса и желточного мешка (Рис. 1). Слизистая ткань пупочного канатика, или Вартонов студень, включает в себя незначительное количество звездчатой формы фибробластических клеток и соединительнотканных волокон, а также внушительный объем аморфного вещества с большим содержанием протеогликанов и гликопротеинов. Основным волокнистым белком является коллаген I типа, а также коллагены III, IV, V и VI типов. Углеводные части протеогликанов – гликозаминогликаны – представлены гиалуроновой кислотой, хондроитинсульфатами, гепарансульфатами, дерматансульфатами и др. Роль молекулы клеточной адгезии принадлежит главному поверхностному гликопротеину фибробластов –

фибронектину. Кроме вышеуказанных компонентов, в состав осно́вного вещества входят многочисленные факторы роста, которые регулируют пролиферацию, дифференцировку и специализацию клеток [4].

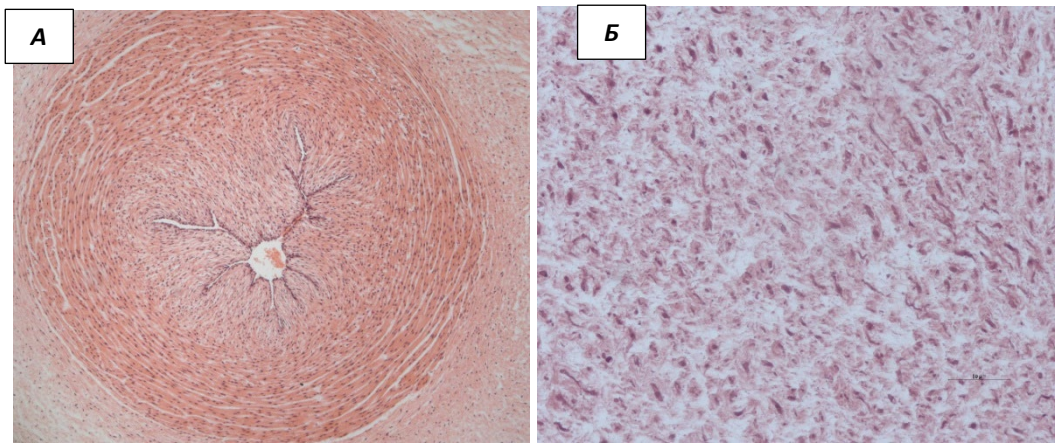

Рисунок 1. А – пупочная артерия пуповины человека (×50). Окраска гематоксилин и эозин; Б – слизистая соединительная ткань пуповины человека (×200). Окраска гематоксилин и эозин

Выбранный режим децеллюляризации стромы пуповины обеспечил качественное удаление клеточного и ядерного материала. Содержание остаточного ДНК в полученном матриксе составило 21,8±5,0 нг/мг, что значительно ниже по сравнению с значениями ДНК в нативной пуповине (506,8±39,1 нг/мг). Это свидетельствует о практически полном удалении клеточных антигенов и других иммуногенных компонентов из приготовленного продукта, что подтверждает его биосовместимость в условиях in vivo [5].

Окрашивание препаратов альциановым синим (pH=2,5), связывающим карбоксильные и сульфорадикалы кислых гликозаминогликанов, обеспечило ярко-голубое окрашивание, что свидетельствует о присутствии в децеллюляризованном продукте значительного количества гликозаминогликанов (Рис. 2,А). Данный компонент ВКМ участвует в межклеточных взаимодействиях, поддерживает гидратацию и осмотическое равновесие тканей, формируя тургор тканей, а также является модулятором активности многих факторов роста.

Процедура удаления клеточного компонента позволила сохранить в составе матрикса фактор роста эндотелия сосудов VEGF (Рис. 2,Б). Этот сигнальный белок вырабатывается клетками для стимулирования васкулогенеза (образование эмбриональной сосудистой системы) и ангиогенеза (рост новых сосудов в уже существующей сосудистой системе). Сосудистый компонент играет важную роль в раневом процессе, обеспечивая реорганизацию поврежденной ткани и оптимизацию гистогенетических механизмов ее заживления. Также VEGF участвует в ремоделировании костной ткани, формировании новых костей и индукции роста мышц после физических нагрузок [6].

Уникальная особенность тканей фетального фенотипа к ранозаживлению без рубцевания может быть связана с высоким содержанием в них противофибротической изоформы фактора роста TGF-β3, который также был диагностирован в разработанном бесклеточном продукте из пуповины человека (Рис. 2,В). Данный пептид стимулирует продукцию фибронектина и рост некоторых мезенхимальных клеток, обладает иммуносупрессорным эффектом и может секвестрировать и регламентировать презентацию растворимых сигнальных молекул [7].

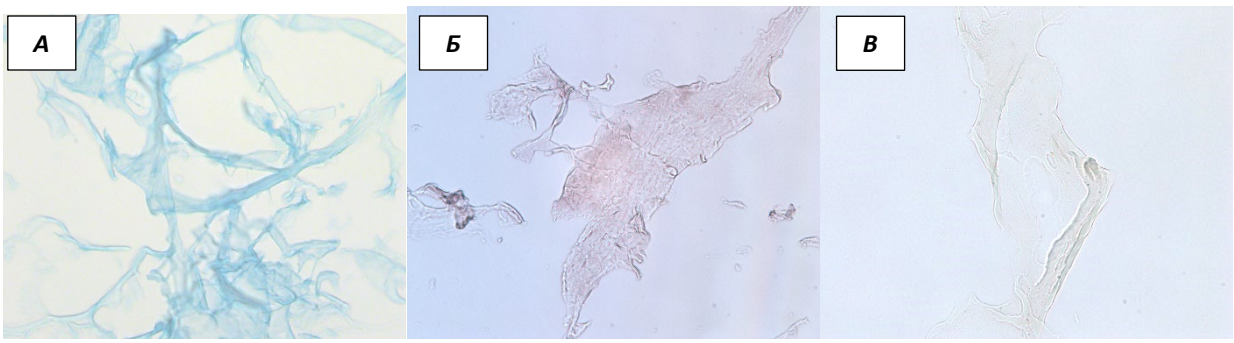

Рисунок 2. А – окрашивание бесклеточного матрикса альциановым синим, pH 2,5 (×200); Б – иммуногистохимическое маркирование фактора роста VEGF в бесклеточном матриксе (×200); В – иммуногистохимическое маркирование трансформирующего фактора роста TGF-β3 в бесклеточном матриксе (×200)

Иммуногистохимически выявлена сохранность коллагена IV типа и ламинина в матриксе после децеллюляризации исходного материала (Рис. 3,А). Известно, что эти протеины входят в состав базальной мембраны эпидермиса, способствуя тем самым адгезии кератиноцитов и других дифферонов кожи. Повышенная экспрессия коллагена IV типа во внезародышевых тканях плода может способствовать заживлению плода без рубцов благодаря стимулированию дифференцировки миофибробластов. Ламинин также участвует в формировании интегринов, функционирующих как клеточные рецепторы, что имеет принципиальное значение в процессе миграции, пролиферации, интеграции и адаптации клеток в месте повреждения [8].

Обнаруженный в изготовленном продукте фибронектин (Рис. 3,Б) – гомодимерный гликопротеин, способствующий миграции фибробластов путем связывания и стабилизации фибрина. Регенерация тканей предполагает заселение зоны дефекта клетками реципиента и формирование ими обновленного внеклеточного матрикса, достаточно прочного, чтобы выдержать функциональные нагрузки на тканевые структуры. Фибронектин способствует этому процессу, обеспечивая прикрепление клеток к матриксу, и модулируя активность фермента лизилоксидазы, ответственного за формирование поперечных сшивок новообразованного коллагена [9].

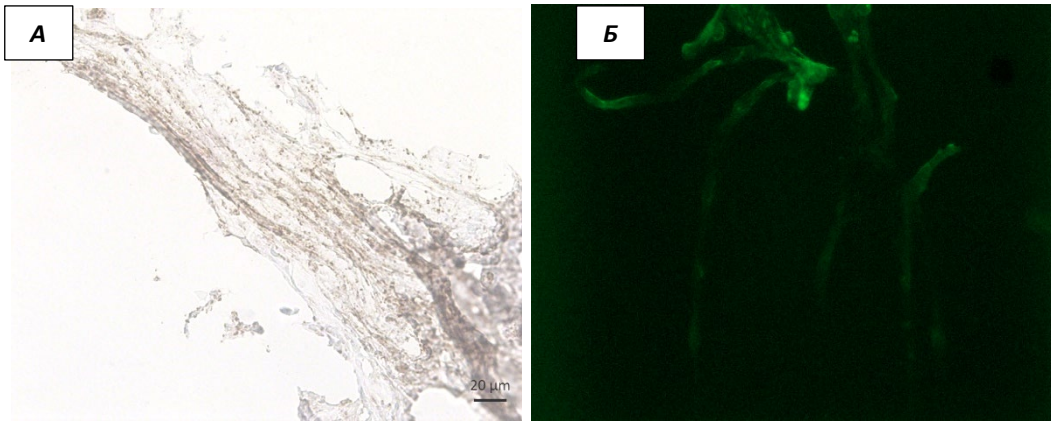

Рисунок 3. А – иммуногистохимическое окрашивание коллагена IV типа в бесклеточном матриксе (×400); Б – иммуногистохимическое маркирование фибронектина в бесклеточном матриксе (×200)

Заключение. В результате проведенного эксперимента в децеллюляризированном биомиметическом продукте на основе Вартонова студня пуповины обнаружена сохранность многочисленных биологически активных веществ, в том числе коллагенов, ламинина, фибронектина, гликозаминогликанов, фактора роста эндотелия сосудов и трансформирующего фактора роста β3. Благодаря гистохимическому сходству с нативной тканью, наличию специфических белков, молекул клеточной адгезии и факторов роста,

необходимых для первичной клеточной миграции и пролиферации, компоненты полученного низкоиммуногенного ВКМ могут быть персонифицированными за счет улучшенной биосовместимости и пространственной архитектуры, способности к росту и ремоделированию вместе с телом пациента. Возможно использования матрикса в качестве основы для разработки многокомпонентных тканеинженерных продуктов, дополненных аутологичными стволовыми клетками и антибактериальными агентами, а также использован в бесклеточной форме, поскольку потенциально может быть заселен пациент-специфическими клетками.

Список литературы

1. Clark R. A. F., Ghosh K., Tonnesen M. G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. Journal of Investigative Dermatology. 2007. Vol. 127. P. 1018-1029. https://doi. org/10. 1038/sj. jid. 5700715
2. Liu S., Yu J-M., Gan Y-C., Qiu X-Z. et al. Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications. Military Medical Research. 2023. Vol. 10 (16). P. 1-30. https://mmrjournal. biomedcentral. com/articles/10. 1186/s40779-023-00448-w
3. Данилов Р. К., Боровая Т. Г. Курс эмбриологии с основами тератологии. СПб. : ВМедА, 2016. 315 с. ISBN 978-5-94277-046-4.
4. Sobolewski K., Malkowski A., Bankowski E., Jaworski S. Wharton's Jelly as a Reservoir of Peptide Growth Factors. Placenta. 2005. Vol. 26. P. 747-752. https://doi. org/10. 1016/j. placenta. 2004. 10. 008
5. Способ изготовления бесклеточного гидрогеля из Вартонова студня пуповины человека для внутрисуставного применения: пат. 2745995 Рос. Федерация / Калюжная-Земляная Л. И., Чернов В. Е., Чеботарев С. В., Земляной Д. А. ; опубл. 16. 09. 2020.
6. Gupta A., Maffulli N., Levy H. J., Sze-Tu R. et al. Umbilical cord-derived Wharton's jelly for regenerative medicine applications. Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 2020. Vol. 15 (49). P. 1-9. https://doi. org/10. 3390/ph14111090
7. Taylor-Weiner H., Schwarzbauer J. E., Engler A. J. Defined Extracellular Matrix Components are necessary for Definitive Endoderm Induction. Stem Cells. 2013. Vol. 31 (10). P. 2084-2094. https://doi. org/10. 1002/stem. 1453
8. Zagris N., Chung A. E., Stavridis V. Entactin and laminin gamma 1-chain gene expression in the early chick embryo. Int. J. Dev. Biol. 2005. Vol. 48. P. 65-70. https://doi: 10. 1387/ijdb. 041812nz
9. Rodriguez C., Rodríguez-Sinovas A., Martinez-Gonzalez J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. Drug News & Perspectives. 2008. Vol. 21 (4). P. 218–224. https://doi: 10. 1358/dnp. 2008. 21. 4. 1213351

ПОИСК НОВЫХ ВАРИАНТОВ УЛУЧШЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА ПРИ ОГНЕСТРЕЛЬНЫХ РАНЕНИЯХ ГРАЖДАНСКОГО НАСЕЛЕНИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНОГО ВООРУЖЕННОГО КОНФЛИКТА

Полиданов М. А., Волков К. А., Масляков В.В., Сидельников С.А.

Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского

Саратовский медицинский университет «Реавиз»

Научные руководители – д.м.н., профессор кафедры мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф; д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней Масляков В. В., д.м.н., заведующий кафедрой мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф Сидельников С.А.

Введение. К сожалению, в современном мире всё ещё не перестают возникать вооруженные конфликты. Несомненным остается факт того, что при таких условиях ранения получают не только военнослужащие, непосредственно участвующие в военных действиях, но гражданское население. Целью исследования стал поиск новых вариантов улучшения лечения повреждений органов малого таза при огнестрельных ранениях гражданского населения, полученных в условиях локального вооруженного конфликта. Материалы и методы. В исследование были включены 112 раненых и числа гражданского населения, получивших огнестрельные ранения в область малого таза. Включались пострадавшие в различные периоды вооруженных конфликтов: на территории г. Грозного (Чеченская Республика) в период с 2000 по 2003 гг. и на территории Луганской Народной Республики, Донецкой Народной Республики, Запорожской и Херсонской областей в период проведения специальной военной операции. Из общего количества раненых мужчин было 64 (57,1%) человек, женщин – 48 (42,8%). Для математической обработки использовались методы описательной статистики. В качестве критерия использовался критерий согласия χ2. Результаты. Все ранения в область малого таза условно можно разделить на три группы: ранения наружных половых органов, ранения внутренних органов малого таза и ранения наружных половых органов и внутренних органов. Осложнения при ранениях в данную анатомическую область встречаются в 34,8%, а летальность на уровне 18,7%. Выводы. Проведенный анализ показал, что мероприятия, направленные на оказание первой помощи раненым женского пола в область малого таза в полном объеме оказывались врачебными бригадами, при этом ошибок в выполнении данных мероприятий не было зарегистрировано, что свидетельствует о хорошей подготовке врачей скорой медицинской помощи.

Ключевые слова: локальный вооруженный конфликт; органы малого таза; огнестрельные ранения; ближайший послеоперационный период; осложнения; летальность.

Введение. К сожалению, в современном мире всё ещё не перестают возникать вооруженные конфликты. Несомненным остается тот факт, что при таких условиях ранения получают не только военнослужащие, непосредственно участвующие в военных действиях,