УДК 611.013.8:611.018.002.2:(03D)655.222:655.3.003.02(100)

АНАЛИЗ МИРОВОГО ОПЫТА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАТЕРИАЛОВ ПУПОВИНЫ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И 3D-БИОПЕЧАТИ

© Лидия Ивановна Калюжная[1], Дмитрий Алексеевич Земляной[2], Дмитрий Викторович Товпеко[1], Сергей Валерьевич Чеботарев[1]

[1] ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» МО РФ. 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.6

[2] ФГБВОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

Контактная информация: Лидия Ивановна Калюжная — доктор медицинских наук, старший научный сотрудник НИО (медико-биологических исследований) научно-исследовательского центра. E-mail: terrestra@mail.ru

РЕЗЮМЕ: Целью обзора является изучение мирового опыта использования биоматериалов пуповины в тканевой инженерии и 3D-биопечати. Важнейший компонент тканевой инженерии — матрикс (каркас, скаффолд), в него мигрируют, прикрепляются и функционируют клетки. Матриксы благодаря своей тканеспецифичной структуре интегрируются в ткань пациента, предоставляя факторы роста и молекулы клеточной адгезии для прикрепления, размножения, дифференцировки и функционирования клеток. Клетки, которыми заселяют матрикс в биореакторе перед трансплантацией конструкции, либо резидентные клетки, рекрутированные в трансплантированный внеклеточный матрикс, и клеточно-матриксные взаимодействия — столь же необходимые компоненты тканевой инженерии. Помимо трехмерных конструкций на основе бесклеточных матриксов, для создания органов и тканей *ex vivo* разрабатываются программные комплексы 3D-биопечати — инновационного метода создания тканей на основе гидрогеля и клеток, заселяемых с помощью компьютерного биопринтера. Требования к гидрогелю в целом близки к требованиям для тканеинженерных матриксов и заключаются в неиммуногенности, биоразлагаемости в прогнозируемое время, нецитотоксичности, способности предоставлять клеткам факторы роста. Из-за ограниченности донорского прижизненного материала, сложности оформления кадаверного биоматериала и законодательного запрещения трансплантации ксеногенных тканей и органов человеку, поиск подходящего гомологичного биоматериала для изготовления тканеинженерных матриксов и гидрогелей для биопринтирования продолжается. Гомологичным доступным биоматериалом с сохранным регенеративным потенциалом является пуповина человека. Будучи экстраэмбриональной тканью, пуповина лишена недостатков, присущих матриксам постнатальных тканей. Регенераторные факторы пуповины обсуждаются в свете их потенциального использования для тканевой инженерии и регенеративной медицины. 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: биоматериалы; внеклеточный матрикс; Вартонов студень пуповины человека; скаффолд; гидрогель.

ANALYSIS OF THE WORLD EXPERIENCE IN THE USE OF UMBILICAL CORD BIOMATERIAL IN TISSUE ENGINEERING AND 3D BIOPRINTING

© *Lidia I. Kalyuzhnaya[1], Dmytry A. Zemlyanoy[2], Dmitriy V. Tovpeko[1], Sergei V. Chebotarev[1]*

[1] S.M. Kirov Military Medical Academy. Akademika Lebedeva str., 6. Saint-Petersburg, Russia, 194044
[2] Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. Litovskaya str., 2. Saint-Petersburg, Russia, 194100

Contact Information: Lidia I. Kalyuzhnaya — MD, D.Sc. (Medicine), Senior researcher, Biomedical department, Science Research Center. E-mail: terrestra@mail.ru

ABSTRACT: The purpose of this review is to study the world experience in the use of umbilical cord biomaterials in tissue engineering and 3D-bioprinting. The most important component of tissue engineering is matrix (frame, scaffold), cells migrate, attach to it and function there. Due to their tissue-specific structure, matrices are integrated into the patient's tissue, providing growth factors and cell adhesion molecules for cell attachment, reproduction, differentiation and functioning. The cells that inhabit the matrix in the bioreactor before the transplantation, or resident cells recruited into the transplanted extracellular matrix, and cell-matrix interactions are equally necessary components of tissue engineering. In addition to three-dimensional structures based on acellular matrices for the creation of organs and tissues *ex vivo*, developed systems 3D-bioprinting as an innovative method of creating tissues based on hydrogel and cells populated by a computer bioprinter. The requirements for hydrogel are generally close to the requirements for tissue-engineered matrices, and consist in non-immunogenicity, biodegradability in the predicted time, non-cytotoxicity, the ability to provide growth factors to cells. Due to the limited availability of donor *in vivo* material, the difficulty of obtaining of cadaveric biomaterial, and the legal prohibition of human xenogenic tissue and organ transplantation, the search for a suitable homologous biomaterial for the manufacture of tissue-engineered matrices and hydrogels for bioprinting continues. Homologous available biomaterial with preserved regenerative potential is the human umbilical cord. Being an extraembryonic tissue, the umbilical cord is devoid of defects inherent in postnatal tissue matrices. The regenerative factors of the umbilical cord are discussed in light of their potential use for tissue engineering and regenerative medicine. Due to the availability and noninvasiveness of obtaining from healthy young donors, umbilical cord is seen as an excellent source of homologous biomaterial for the production of matrices, cells and hydrogels for the needs of tissue engineering and regenerative medicine.

KEY WORDS: biomaterials; extracellular matrix; Wharton's jelly human umbilical cord; scaffold; hydrogel.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантационная медицина — это динамично развивающаяся область прикладных медицинских исследований, трансплантация — эффективный метод лечения тяжелых заболеваний и повреждений тканей и органов. Несмотря на успехи трансплантологии, большое число пациентов продолжают нуждаться в спасительной операции, и их число растет. Нехватка доступных донорских органов для пересадки приводит к гибели пациентов, ожидающих подходящего донора. Даже считающаяся «золотым стандартом» аутодермопластика зависит от лимитированности донорского материала. Поэтому возникла концепция тканевой инженерии и трехмерной биопечати как универсального способа создания в лабораторных условиях функционирующих тканей с использованием биоматериалов, называемых «матриксами» («скаффолдами», «каркасами») и гидрогелями, а также клеток с регенераторными возможностями.

Ключевые компоненты, ответственные за успех тканевой инженерии — это матрикс как пространственная трехмерная структура для прикрепления клеток; клетки, продуцирующие собственные матриксные компоненты, и клеточно-матриксные взаимодействия, направляющие поведение клеток для дальнейшего ремоделирования поврежденной ткани.

Матрикс во время своего существования в организме реципиента помогает прикрепляться собственным пациент-специфическим 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 стерильных 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 [20]. Результатом жизнедеятельности заселенных в трансплантированный матрикс клеток являются процессы его деградации и синтез клетками компонентов собственных тканей, или ремоделирование ткани.

Матриксы могут быть изготовлены из ксеногенных и донорских тканей, а также из компонентов — биополимеров: природных органических материалов (хитозан, фиброин шелка, гиалуронан, фибрин, коллаген), неорганических материалов (гидроксиапатит), синтетических полимеров (полилактиды, силикон), биокерамики [26]. Синтетические полимеры неиммуногенны, легко обрабатываемы и управляемы в своих механических свойствах. Матриксам из природных материалов присущи биоактивность, биоразлагаемость и наличие поверхностных лигандов для адгезии клеток [47]. Утратив клетки, ткань сохраняет компоненты нативного внеклеточного матрикса (ВКМ) с фиксированными на нем факторами роста. Поэтому децеллюляризированные матриксы донорских тканей можно рассматривать как наиболее привлекательную конструкцию для тканевой инженерии.

Гидрогели для 3D-биопечати — это вязкоупругие сохраняющие заданную форму материалы, в которые заселяют пациент-специфические или аллогенные клетки для их прикрепления, пролиферации и функционирования. Принято считать, что гидрогели должны обладать, помимо биологически важных характеристик (нецитотоксичность, биоразлагаемость и т.д.) и способностью к отвердению.

Существующие 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; Lyoplant® — 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 [39]. Протезы из ксеногенных тканей создают проблемы из-за иммунологических реакций и риска передачи прионов [23, 45]. В соответствии с Федеральным Законом №180 РФ (ФЗ №180) «О биомедицинских клеточных продуктах» ксеногенные биоматериалы запрещены к трансплантации. Поиск оптимального биоматериала для изготовления трансплантатов на основе тканеинженерных конструкций и гидрогелей, сохраняющего регенераторные потенции и гомологичного по происхождению, остается чрезвычайно актуальным для науки. Таким этически и законодательно приемлемым, а самое главное — сохраняющим регенераторные молекулы в своем составе биоматериалом, на наш взгляд, является внеэмбриональный орган — пуповина.

Целью исследования был анализ мирового опыта использования внеэмбриональных тканей человека в тканевой инженерии и 3D-биопечати. Задачей было обобщение известных к настоящему времени фактов, подтверждающих регенеративные свойства внеэмбриональных тканей, в том числе пуповины, для обоснования возможности использования их внеклеточных структур в тканевой инженерии и регенеративной медицине, а также 3D-биопечати.

БИОМАТЕРИАЛ ДЛЯ МАТРИКСОВ И ГИДРОГЕЛЕЙ

Сложные природные молекулы биополимеров, как считалось ранее, обеспечивают пассивную механическую поддержку тканевых клеток. Работы последних лет показали, что природная жесткость и трехмерность ВКМ может быть существенным фактором клеточной адгезии [54]. ВКМ для тканеинженерной конструкции в идеале должен быть изготовлен из той же ткани, для восстановления которой он предусмотрен. Тканеспецифичность матрикса, трехмерность, композиция, пористость — не-

обходимые условия для заселения его клетками, их распространения и дифференцировки в функционирующие элементы. Тканеспецифичный донорский биоматериал для изготовления матрикса чрезвычайно ограничен; юридические и этические сложности оформления документов при посмертном донорстве (ФЗ №180) удлиняют время получения биоматериала в ущерб его жизнеспособности. Действовавшая ранее на территории РФ Директива Начальника ГВМУ МО РФ «Об организации заготовки и трансплантации донорских органов в военных лечебных учреждениях» в настоящее время не актуальна [3]. Поэтому поиск оптимального биоматериала для создания трансплантатов продолжается.

В течение жизни человека состав, структура его тканей подвергаются изменениям. Перенесенные болезни, пороки развития, возрастные изменения, последствия стрессов, приема лекарств, влияния вредных условий труда или области обитания существенно изменяют компоненты и архитектуру тканей. С возрастом накапливаются сшивки коллагена из-за его неферментного гликозилирования в тканях человека, уменьшается содержание веществ, удерживающих воду в межклеточном пространстве. Металлопротеиназы, расщепляющие основные составляющие ВКМ коллагены I и III, протеогликаны и гликозаминогликаны (GAG), приводят к снижению упругости тканей. Потеря компонентов ВКМ вместе с увеличением поперечных сшивок коллагена приводит к ухудшению биомеханических свойств ткани. Уровни фибронектина увеличиваются с возрастом [32], ухудшая связывание клеток через интегриновые рецепторы с ВКМ. Возрастные изменения донорских тканей неизбежно ухудшают свойства матрикса. На определенном этапе развития тканевой инженерии этот аргумент подвигнул многих исследователей пренебречь негативными особенностями ксеногенных тканей именно потому, что максимальный возраст крупных животных — потенциальных доноров биологического материала — существенно меньше, чем человека [34].

Кадаверные и аллогенные биоматериалы неоптимальны для тканевой инженерии еще и по причинам утраты тканями после рождения регенераторных потенций. Ткани эмбриона и провизорных органов имеют особые компоненты, обеспечивающие на этапах гестации процессы регенераторного восстановления, сходные с онтогенетическими процессами развития плода. ВКМ тканей плода и внеэмбриональных органов состоит из незрелого коллагена с меньшими сшивками, что способствует эффективному ремоделированию ткани [7, 34]. Поэтому можно предположить, что ВКМ из плодных или внеэмбриональных тканей обеспечит более конструктивное тканеобразование, чем ВКМ постнатальных тканей. Внеэмбриональные органы лишены возрастных особенностей — последствий патологического ремоделирования, фиброза, окислительного стресса и других негативных изменений [31].

Амнион и пуповина после рождения ребенка уничтожаются как биологический отход. Они представляют собой подходящий гомологичный источник внеэмбриональной ткани, доступный в достаточном количестве без каких-либо этических ограничений после родов у здоровых обследованных женщин, сохраняющий в своей структуре молекулы, способствующие регенерации, а также совершенно незатратный [28, 35].

В нашем исследовании мы сосредоточились на использовании пуповины человека как биоматериала для создания ВКМ и гидрогелей для 3D-биопечати. Согласно опубликованным данным, биоматериал пуповины обладает доказанными регенераторными свойствами. Это проявляется в безрубцовом восстановлении повреждений кожи и эпителиальных тканей плода на средних сроках гестации, и в ускоренном заживлении ран плода в конце беременности [35, 37]. Фетальный фенотип внеклеточного матрикса несет в своем составе факторы роста и молекулы клеточной адгезии, что способствует миграции клеток в бесклеточную конструкцию, помещенную в зону повреждения [31].

ВКМ из пуповины способен к продолжительному функционированию, биоразлагаем, нецитотоксичен, благодаря составу близок к компонентам кожных покровов. Это делает пуповину превосходным биоматериалом для получения матрикса, способным предоставить факторы регенерации, и гидрогеля для 3D-биопечати.

РЕГЕНЕРАТОРНЫЕ СВОЙСТВА ТКАНЕЙ ПУПОВИНЫ

Конкретизированы пять клеточных и молекулярных аспектов механизмов регенеративного заживления ран плода: факторы роста, воспалительная реакция и цитокины, ВКМ, его механические характеристики, стволовые клетки [58].

Трансформирующий фактор роста TGF-β3 у плода доминирует над TGF-β1 и TGF-β2, у взрослых наблюдается относительное увеличе-

ние экспрессии TGF-β1 и TGF-β2 в ранах по сравнению с TGF-β3. Повышенные уровни TGF-β3 и более высокое отношение TGF-β3/TGF-β1 могут быть решающими для образования более эластичных рубцов [43].

Нейтрофилов в ранах плода мало, они имеют малые размеры, содержат мало гранул, потому и синтез провоспалительных цитокинов низкий. Особенность клеточного ответа на повреждение в ранах плода является результатом снижения рекрутинга, а не самого дефицита клеток. Особенности клеточных реакций при воспалении у плода состоят в невыраженности клеточной инфильтрации, а также специфической экспрессии цитокинов. Активированные макрофаги играют большую роль в заживлении ран у взрослых, но они, очевидно, отсутствуют в ранах плодов мышей на середине гестации [50]. Причины этого — более низкие уровни профибротического тромбоцитарного фактора роста PDGF, объясняющие низкий рекрутинг моноцитов в рану плода; низкие уровни экспрессии молекул семейства TGF-β1 в фетальной ткани, из-за чего не происходит превращения моноцитов в макрофаги; и роль TGF-β3 как стоп-сигнала для терминальной дифференцировки моноцитов [8]. Малочисленность тучных клеток в ранах плода в середине беременности, их меньшая зрелость (в них меньше гранул), неспособность к дегрануляции при повреждении объясняют слабовыраженную сосудистую реакцию в ответ на травму; по сравнению с мастоцитами взрослых они высвобождают более низкие уровни гистамина, TGF-β1 и TNF-α [56].

В ранах, сыворотке крови и околоплодных водах плода в ранние сроки беременности выявлены высокие уровни IL-10, и в сопоставлении с уровнями взрослых снижены провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8. Гиперэкспрессия IL-10 с помощью вирусных векторов приводила к регенеративному заживлению ран плода со снижением клеточной инфильтрации, характерной для плода депозиции коллагена, регенерации кожных придатков, и полному заживлению ран, неотличимых от окружающей кожи [27]. Эти результаты показывают, что ранняя экспрессия противовоспалительного IL-10 инициирует каскад событий, который приводит к фенотипу безрубцового заживления раны. Таким образом, в феномене безрубцового заживления ран плода важную роль играет клеточный состав ткани и специфика синтеза клетками цитокинов.

Коллагены I, III типа и обилие гиалуронана (HA) — не просто ключевые компоненты матрикса, они определяют безрубцовое заживление фетальных ран. Коллаген в ранах плода откладывается в виде тонкой сетки, неотличимой от окружающей неповрежденной ткани, в постнатальных ранах — в виде плотно расположенных параллельных пучков [17]. Соотношение коллагена III типа и I типа выше в ранах плода, чем в постнатальных ранах. Одиночная субъединица коллагена III может способствовать хемотаксису множественных прогениторных типов клеток *in vitro* и способна рекрутировать клетки с маркерами мультипотентности при инъекции *in vivo* [5]. Небольшое количество поперечных сшивок коллагена ассоциируется с более эластичной структурой безрубцового восстановления.

В прошлом считавшийся пассивным структурным компонентом, HA играет значительную роль в заживлении ран, стимулируя миграцию, дифференцировку и пролиферацию клеток. HA высокого молекулярного веса присущ тканям плода, его повышенный уровень отмечают в течение 3 недель после травмы. В ранах взрослых преобладает низкомолекулярный HA, его уровень преходяще быстро повышается после повреждения. HA усиливает выработку клетками и TGF-β3, и коллагена III типа [6].

Биодеградация и ремоделирование ВКМ необходимы для восстановления ткани после повреждения [53]. Имплантированные бесклеточные биоматериалы после заселения клетками также должны быть разрушены и заменены собственными структурными элементами; ВКМ — чрезвычайно динамичная среда.

Известны клеточные и ферментные механизмы деградации ВКМ. Нейтрофилы в очаге воспаления разрушают матриксные структуры кислородзависимыми пероксидазами; макрофаги — протеолитическими ферментами. Матриксные металлопротеиназы — адамализины — нацелены на широкий спектр компонентов ВКМ; идентифицированы более 41 MMP у человека [53].

Результатом разрушения ВКМ являются пептидные фрагменты с мощной биоактивностью. Например, деградация фибронектина приводит к образованию факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста фибробластов FGF-β, TGF-β [52]. Пептид Arg-Gly-Asp (RGD) присутствует в фибронектине, коллагене, витронектине, остеопонтине и является одним из самых хорошо известных продуктов деградации ВКМ. RGD-последовательность — это сайт клеточного прикрепления интегринов. Специалисты тканевой инженерии пользуются пептидом RGD для создания полимеров с улучшенными свойствами клеточной адгезии [22].

Тканеобразующие процессы идут параллельно с явлениями деградации ВКМ. Фибробласты плода обеспечивают раннюю депозицию коллагена в ложе раны, что отличает ответ фибробластов взрослого на TGF-β1. Эти особенности говорят о том, что фибробласты плода запрограммированы на образование более регенеративного ВКМ [35].

Мутации с утратой некоторых белков ВКМ, таких как фибронектин, ламинин или коллаген, являются летальными для эмбриона [4], это свидетельствует о том, что роль белков ВКМ во время развития эмбриона критическая. Дефекты пуповины с нарушением структуры и состава Вартонова студня также приводят к нежизнеспособности плода и новорожденного [33].

Описанные особенности тканей плода позволяют предположить, что ВКМ, созданный из провизорных органов, способен обеспечить благоприятную среду для миграции, обитания и функционирования клеток с образованием ими тканей взрослого реципиента.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

Понимание биологической основы фенотипа плода позволяет использовать особенности строения и регенераторные потенции экстраэмбриональных тканей для восстановления тканей в постнатальном периоде путем создания тканеинженерной конструкции, способной как минимум ускорить заживление повреждений, либо даже полностью их регенерировать.

Бесклеточные матриксы пуповины выполняют функции обеспечения механической прочности благодаря коллагеновым волокнам, растяжимости — волокнам эластина, функции гидратации микроокружения — благодаря 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 внеэмбриональных тканей указывают на их потенциал в организации таргетных органов.

Применяемые методы удаления клеток их тканей, классифицирующиеся на физические, химические, биологические и ферментативные, или сочетающие эти подходы, опираются на общий принцип разрушения клеточной мембраны для удаления всего клеточного содержимого [25, 48]. ВКМ тканей плода, включая пуповину, содержит значительно большее количество сульфатированных GAG, чем любые постнатальные ткани. Поэтому протокол удаления клеток должен быть оптимизирован для сохранения важных регенераторных молекул (хондроитин сульфат, гепарин, гепаран сульфат).

Эффективное удаление внутриклеточных компонентов и антигенных эпитопов необходимо для минимизации негативных иммунных реакций. Минимальными критериями, которым следуют во всем мире, являются: (а) <50 ng двухцепочечной ДНК/мг сухого веса ВКМ; (б) <200 пар нуклеотидов фрагмента ДНК; (в) отсутствие видимого ядерного материала в тканевых срезах, окрашенных 4,6-диамидино-2-фениндолом или гематоксилином и эозином. Следование этим критериям приводит к эффективности матриксов в модельных системах *in vivo* [16]. Ткани пуповины содержат существенно меньше клеток в сравнении с постнатальными тканями, особенно в Вартоновом студне. Это позволяет оптимизировать протокол удаления клеток из тканей пуповины, делая его максимально щадящим для структурных компонентов.

ТРЕХМЕРНАЯ ПОРИСТАЯ, ГИДРОГЕЛЕВАЯ И ИНЪЕКЦИОННАЯ ФОРМЫ БЕСКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ИЗ ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

Экспериментальные исследования показывают, что инъекции ВКМ в место повреждения в виде гидрогеля более целесообразны, чем импланты волокнистого ВКМ, так как вязкие материалы способны подстраиваться под неравномерность зоны поражения с минимальным повреждением тканей во время инъекции [31]. Для придания формы инъецируемым гидрогелям ВКМ ферментативно солюбилизируют в жидкую форму, которая самособирается в гидрогель при физиологических pH и температуре [28]. Высокая концентрация GAG в биоматериале пуповины определяет высокую скорость гелеобразования по сравнению с ВКМ из постнатальных органов свиньи с низким содержанием гликозаминогликанов [31].

Сжатие при культивировании — существенная особенность гидрогелей ВКМ из постнатальных тканей. Этот феномен характерен для коллагеновых гелей, засеянных фибробластами, производящими напряжение матрикса во время выдвижения и втягивания псевдоподий [10]. Гидрогели из нервной ткани и мочевого пузыря свиньи значительно сокращались при 3D-культивировании мезенхимальных стволо-

вых клеток (MSC) из Вартонова студня пуповины человека. Сокращение гидрогеля ВКМ пуповины человека при культивировании фибробластов происходит существенно медленнее, чем в тканях животных [31]. Совершенно очевидно, что компоненты ВКМ пуповины, благодаря меньшей контрактильности матрикса, наряду с клетками вносят свой вклад в фетальный фенотип заживления.

Пуповина является не только превосходным биоматериалом для получения матриксов, 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, внеэмбриональный биоматериал — перспективный объект криохранения для нужд культивирования MSC и применения их для рецеллюляризации тканеинженерных конструкций таргетных органов.

СФЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПУПОВИНЫ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Бесклеточные каркасы сосудов пуповины исторически раньше всего использовались для создания тканеинженерных графтов сосудов. В настоящее время ВКМ инвертированных сосудов пуповины исследуют при восстановлении голосовых связок [11], как материал для имплантации на место поврежденных клапанов сердца [21], как кондуит для регенерации нервных волокон [31, 57]. Трансплантация нативного Вартонова студня улучшала неврологические функции при повреждении головного мозга в эксперименте [13]. Трехмерный губчатый матрикс пуповины в виде лиофилизированных пластин с высокой гигроскопичностью оказался эффективным поглотителем раневого экссудата [9] (рис. 1).

Амниотическую мембрану в обработанном и необработанном виде с успехом применяли как временное покрытие для ран [2, 14, 49] (рис. 2), а также в офтальмологии. ВКМ Вартонова студня оказался превосходным фидером для культивирования клеток [18, 40].

Клетки со свойствами стволовых из амниотического эпителия, Вартонова студня и эндотелий сосудов пуповины уже используются в клеточной терапии в клинической практике [1, 49]. Мембраны, состоящие из фибриллярных и нефибриллярных компонентов ВКМ, произведенные MSC Вартонова студня пуповины человека, предложены в качестве биоинженерных тканеподобных конструкций [30]. 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.

Для реконструкции нервных и мягких тканей применение ВКМ в форме гидрогелей клинически более приемлемо, поскольку эти

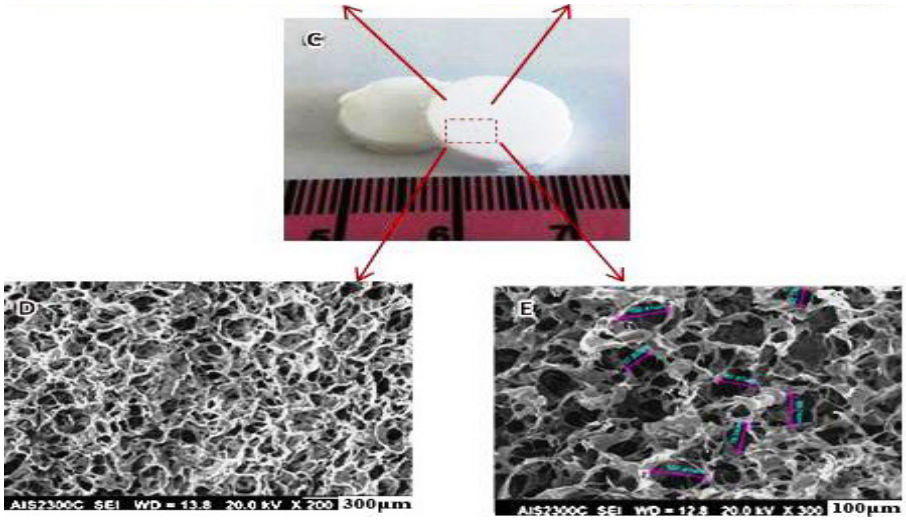

Рис. 1. С-пористый бесклеточный матрикс пуповины. Электронная микроскопия поверхности (D) и поперечного сечения (E) скаффолда. Высокая пористость и взаимосвязанность компонентов скаффолда очевидны (цит. по: [9])

Рис. 2. Опыт применения необработанной амниотической мембраны для лечения ран (цит. по: [2])

материалы сохраняют биологическую активность с преимуществом *in situ* полимеризации, которое предполагает минимально инвазивную методику доставки. Инъекционные гидрогели, полученные из ВКМ Вартонова студня, в эксперименте были применены для лечения инсульта [31].

3D-БИОПЕЧАТЬ — ИИНОВАЦИОННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

Метод послойного нанесения материалов, отвердевающих под действием ультрафиолетовых лучей, и названный Ч. Халлом в 1986 году стереолитографией [41], стал прообразом системы трехмерной (3D) печати [29]. Печатающая головка 3D-принтера выдавливает, переносит или преобразовывает через специальное сопло исходные материалы в двухмерной плоскости. По затвердевании каждого слоя начинается печать следующего. 3D-печать в последнее время применяют в пищевой промышленности, архитектуре, машиностроении, искусстве, фармацевтике, строительстве. Конструктивная идея технологии создания пространственного объекта проникла и в медицину, сначала в протезирование и имплантацию, а позднее и в трансплантологию, где для создания биологического объекта используют трехмерные конструкции из биоактивных молекул и клетки. Технология получила название 3D-биопечати [29, 60].

Немедицинское применение 3D-биопечати — это создание трехмерных функциональных моделей человеческих органов и тканей для токсикологоических, фармакологических и радиологических исследований, а также для моделирования заболеваний человека *in vitro* и *in vivo*. Технология биопечати может быть использована для нового индустриального метода производства мяса, кожи, в отличие от традиционных сельскохозяйственных, пищевых, аграрных и индустриальных технологий.

Программное обеспечение и механические устройства подачи материала в 3D — биопечати аналогичны классической 3D-печати и включают в себя биопринтер, выступающий аналогом печатного пресса, клетки, которые, подобно чернилам, наносят на основу конструкции — гидрогель (биобумага), находящийся в пространстве компьютерно смоделированной нужной формы.

Гидрогель представляет собой аналог природного внеклеточного матрикса (ВКМ) создаваемой ткани — трехмерную конструкцию из белков и протеогликанов. Благодаря архитектуре и механическим свойствам, наличию молекул клеточной адгезии и факторов роста, эта конструкция поддерживает прикрепление, расселение и дифференцировку клеток, передачу сигналов взаимодействия клеток между собою и матриксом.

Регенеративная медицина последних десятилетий сделала огромный скачок в технологиях выделения, накопления клеток, их направ-

ленной дифференцировки, в исследовании свойств клеточных популяций. Энергично развивается и область медико-биологических исследований по получению гидрогелей для 3D-биопечати.

Гидрогели могут быть как природного (естественного), так и синтетического происхождения. В основе природных гидрогелей — полисахаридные, белковые и полипептидные соединения. Примерами гидрогелей на основе природных полисахаридов, исследуемых в настоящее время в регенеративной медицине, являются альгинат [24], целлюлоза [12], хитин, хитозан [15], декстран, агароза, гиалуроновая кислота [28], пектин [38], крахмал, ксантановая камедь. Гидрогели на основе белковых соединений получены из коллагена [44], фибрина, шелка, кератина, эластина [51], желатина. Синтетического происхождения гидрогели получают из поливинилового спирта, полиакриламида, полиэтиленоксида (полиоксиэтилен), полиэтиленгликоля [59].

Основные требования к материалу гидрогеля для биопечати — его неиммуногенность, биосовместимость, нецитотоксичность, прогнозируемая биодеградируемость, тканеспецифичность и определенные механические характеристики. Таблица 1 демонстрирует отдельные свойства природных гидрогелей, некоторые из них неприемлемы для регенеративной медицины по биологическим или физическим характеристикам (например, отсутствие биодеградации или плохие механические свойства), большинство — из-за ксеногенной природы биоматериала.

Природные гидрогели обладают более высокой биосовместимостью по сравнению с синтетическими. Они легче подвергаются биоразложению в присутствии различных ферментов (металлопротеиназ, лизоцима, плазмина, гиа-

Таблица 1

Некоторые свойства гидрогелей, используемых в биопечати [41]

Основа гидрогеля	Происхождение (источники получения)	Механизм гелеобразования	Механизм биодеградации	Биологические и механические свойства
Коллаген I	Природный пептид (млекопитающие)	• Под воздействием pH. • Под воздействием температуры (37 °C). • В присутствии фибрина	• Ферментативный (ММП)	• Превосходная биосовместимость. • Плохие механические свойства
Желатин	Природный пептид (млекопитающие)	• Температурный. • Ферментативный. • Фотополимеризационный. • В присутствии альгината. • В присутствии альгината/фибриногена. • В присутствии фибриногена	• Растворение при 37 °C. • Ферментативный (ММП)	• Отлично биосовместим. • Низкая скорость гелеобразования. • Плохие механические свойства
Фибрин	Природный пептид (млекопитающие)	• Ферментативный (тромбин)	• Ферментативный (плазмин)	• Отлично биосовместим. • Быстрая скорость гелеобразования. • Быстрая скорость деградации. • Плохие механические свойства
Гиалуронан	Натуральный полисахарид (млекопитающие)	• Фотополимеризационный. • Химический. • Золотые наночастицы	• Ферментативный (гиалуронидаза)	• Хорошо биосовместим. • Низкая скорость гелеобразования. • Плохие механические свойства
Альгинат	Натуральный полисахарид (морские водоросли)	• Ионный (в присутствии Ca^{2+})	• Ионное смещение (Na^{+} для Ca^{2+})	• Биосовместим. • Быстрая скорость гелеобразования. • Прост в использовании. • Высокая приспособляемость
Агароза	Натуральный полисахарид (морские водоросли)	• Под воздействием температуры (32 °C)	• Не биодеградируемый	• Умеренно биосовместим • Сложен для печати

луронидазы), образуя при этом биосовместимые продукты метаболизма, быстро выводимые из организма. Синтетические гидрогели механически более прочные, чем природные, и имеют более низкую скорость деградации.

Применимость гидрогеля для биопечати определяют такие физико-химические параметры, как его реологические свойства (вязкость и разжижение при сдвиге) и сшивающие механизмы (механизм гелеобразования). Физическое сшивание включает в себя ионные взаимодействия и водородные связи; химическое сшивание состоит в образовании ковалентных связей под влиянием фотоинициирования или ферментативного катализа). Существует четыре основных класса гидрогелей по механизму сшивания: термочувствительные гидрогели; гидрогели, сшиваемые ионным путем; гидрогели с ферментативным сшиванием и фотополимеризуемые гидрогели [41].

Совершенно очевидно, что идеальный гель будет, скорее всего, композитным, его биологические характеристики будут обеспечены природными полимерами человека, а механические свойства гидрогеля будут созданы с помощью синтетических полимеров, биоразлагаемых со скоростью, сопоставимой со скоростью ремоделирования, и технологий сшивания [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активно продолжаются поиски биоматериала для изготовления гидрогеля [41]. Отдельные компоненты природных биополимеров (например, коллаген или НА) не являются идеальными для сложных процессов жизнедеятельности заселяющих их клеток. Избыток коллагена в среде тормозит выработку фибробластами нового коллагена и потому неоптимален для ремоделирования ткани. Лишь сбалансированный композиционный состав ВКМ тканей человека, обладающий к тому же и факторами регенерации, сможет быть благоприятной средой для функционирования клеток. Даже при несовершенстве механических свойств гидрогеля из гомологичного биоматериала он явится важнейшей композиционной частью среды, в которой механические свойства будут усилены с помощью технологических процессов обработки биоматериала или применения синтетических полимеров. Совершенно очевидно, что гомологичное происхождение биоматериала пуповины для производства гидрогеля окажется приоритетным, так же как и его регенераторные характеристики. Биоматериал пуповины доступен, процедура его получения неинвазивна, технология изготовления гидрогеля достаточно проста.

В настоящее время активно разрабатываются так называемые смарт-гидрогели [36, 42, 55]. В сравнении с традиционными, интеллектуальные гидрогели обладают уникальными характеристиками контролируемого золь-гель перехода, имеют определенную форму памяти, способность к самосборке. Свойство солюбилизированного бесклеточного каркаса Вартонова студня пуповины полимеризоваться в гель при температуре 37 °С и pH 7,40 позволяет применять его в инъекционной форме [31, 46] и дает основания рассматривать его как важную часть композитного гидрогеля для 3D-биопечати. Таким образом, пуповина человека является превосходным природным материалом для создания тканеинженерных трансплантатов и гидрогелей для 3D-биопечати.

3D биопечать — это инновационная и перспективная область современной медицины. По мере того как области инженерии, материаловедения, биологии и медицины сходятся, станет возможным разработать более точные и более сложные тканеспецифичные конструкции с использованием 3D-биопринтера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян И.В., Макаров А.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пупочного канатика: биологические свойства и клиническое применение. Гены & Клетки. 2015; 10(2): 30–38.
2. Гаин Ю.М., Киселева Е.П., Шахрай С.В. Обоснование применения комплексного трансплантата на основе амниотической мембраны и мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани для восстановления целостности кожных покровов. Новости хирургии. 2012; 20: 9–16.
3. Ивашкин А.И. Восстановление эпителиальных тканей с использованием криоконсервированных жизнеспособных дермотрансплантатов и живого эквивалента кожи. Автореф. дисс. … докт. мед. наук. М.; 2009.
4. Строев Ю.И., Чурилов Л.П., ред. Системная патология соединительной ткани: Руководство для врачей. СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2014.
5. Agrawal V., Siu B.F., Chao H., Hirschi K.K., Raborn E., Johnson S.A., Tottey S., Hurley K.B., Medberry C.J., Badylak S.F. Partial characterization of the Sox2þcell population in an adult murine model of digit amputation. Tissue Eng. Part A. 2012; 18:1454–1463.
6. Alaish S.M., Yager D., Diegelmann R.F., Cohen K. Biology of fetal wound healing: hyaluronate receptor expression in fetal fibroblasts. J. Pediatr. Surg. 1994; 29:1040–1043.

7. Badylak S.F. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response. Ann. Biomed. Eng. 2014; 42:1517–1524. Available at: https://doi.org/10.1007/s10439–013–0963–7 (accessed: 07.02.2019).
8. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen. 2008; 16:585–601. Available at: DOI:10.1111/j.1524–475X.2008.00410.x (accessed: 07.02.2019).
9. Beiki B., Zeynali B., Seyedjafari E. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing. Materials science & Engineering C. Materials For Biological Applications. 2017; 78: 627–638.
10. Brown R.A. In the beginning there were soft collagen-cell gels: towards better 3D connective tissue models? Exp. Cell Res. 2013. (319): 2460. Available at: DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.07.001 (accessed: 07.02.2019).
11. Chan R.W., Rodriguez M.L., McFetridge P.S. The Human Umbilical Vein with Wharton's Jelly as an Allogeneic, Acellular Construct for Vocal Fold Restoration. Tissue engineering: Part A. 2009; 15(11): 3537–3546.
12. Chang C., Zhang L. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. Carbohydr Polym. 2011; 84: 40–53. Available at: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.023 (accessed: 07.02.2019).
13. Cheng T., Yang B., Li D., Ma S., Tian Y., Qu R., Zhang W., Zhang Y., Hu K., Guan F., Wang J. Wharton's Jelly Transplantation Improves Neurologic Function in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. Cellular and Molecular Neurobiology. 2015; 35(5): 641–649. Available at: https://doi.org/10.1007/s10571–015–0159–9 (accessed: 07.02.2019).
14. Choi J.S., Kim J.D., Yoon H.S., Cho Y.W. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. Tissue engineering: Part A. 2013; 19: 329–339. Available at: DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0738 (accessed: 07.02.2019).
15. Coviello T., Matricardi P., Marianecci C., Alhaique F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. J. Control. Release. 2007; 119: 5–24. Available at: DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.01.004 (accessed: 07.02.2019).
16. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011; 32: 3233–3243. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057 (accessed: 07.02.2019).
17. Cuttle L., Nataatmadja M., Fraser J.F., Kempf M., Kimble R.M., Hayes M.T. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picrosirius-polarization. Wound Repair Regen. 2005; 13: 198–204. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1067–1927.2005.130211.x (accessed: 07.02.2019).
18. Dan P., Velot E., Francius G., Menu P., Decot V. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: an untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. Acta Biomaterialia. 2016. Available at: DOI:10.1016/j.actbio.2016.10.018 (accessed: 07.02.2019).
19. De Mori, A., Peña Fernández, M., Blunn, G., Tozzi, G., Roldo, M. 3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. Polymers. 2018; 10(3): 285. Available at: DOI: 10.3390/polym10030285 (accessed: 07.02.2019).
20. Eweida A.M., Marei M.K. Naturally Occurring Extracellular Matrix Scaffolds for Dermal Regeneration: Do They Really Need Cells? Biomed. Res. Int. 2015; 2015:839694. Available at: DOI: 10.1155/2015/839694 (accessed: 07.02.2019).
21. Francisco J.C., Cunha R.C., Cardoso M.A., Baggio Simeoni R., Mogharbel B.F., Picharski G.L., Silva Moreira Dziedzica D., Guarita-Souza L.C., Carvalho K.A.T. Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. Transplantation Proceedings. 2016; 48(8): 2845–2849. Available at: https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2016.07.026 (accessed: 07.02.2019).
22. Furth M.E., Atala A., Van Dyke M.E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. Biomaterials. 2007; 28:5068–5073. Available at: DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.042 (accessed: 07.02.2019).
23. Galili U. Avoiding detrimental human immune response against Mammalian extracellular matrix implants. Tissue. Eng. Part B Rev. 2015; 21. (2): 231–241. Available at: http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0392 (accessed: 07.02.2019).
24. Gao C, Liu M, Chen J, Zhang X. Preparation and controlled degradation of oxidized sodium alginatehydrogel. Polym Degrad Stabil. 2009; 94:1405–1410. Available at: https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.05.011 (accessed: 07.02.2019).
25. Gilbert T.W. Strategies for tissue and organ decellularization. J. Cell Biochem. 2012; 113: 2217–2222. Available at: https://doi.org/10.1002/jcb.24130 (accessed: 07.02.2019).
26. Glowacki J., Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. Biopolymers. 2008; 89:338–344. Available at: DOI: 10.1002/bip.20871 (accessed: 07.02.2019).
27. Gordon A., Kozin E.D., Keswani S.G. Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation. Wound Repair Regen. 2008; (16): 70–79. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1524–475X.2007.00326.x (accessed: 07.02.2019).
28. Herrero-Mendez A., Palomares T., Castro B., Herrero J., Granado M. H., Bejar J. M., Alonso-Varona A. HR007: a family of biomaterials based on glycosaminoglycans for tissue repair. J. Tissue Eng Regen Med. 2017; 11(4):989–

1001. Available at: DOI: 10.1002/term.1998 (accessed: 07.02.2019).
29. Huang Y., Zhang X., Gao G., Yonezawa T. and Cui X. (2017), 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. Biotechnol. J., 12(8): 1600734. Available at: DOI: 10.1002/biot.201600734 (accessed: 07.02.2019).
30. Jaimes-Parra B.D., Garson I., Carriel V., Durand-Herrera D., Martin-Piedra M.A., Garcia J.M., Sanchez-Quevedo M.C., Alaminos M., Campos A. Membranes derived from human umbilical cord Wharton's jelly stem cells as novel bioengineered tissue-like constructs. Histology and histopatology. 2018; 33(2): 147–156. Available at: DOI: 10.14670/HH-11–897 (accessed: 07.02.2019).
31. Koci Z., Vyborny K., Dubisova J., Vackova I., Jager A., Lunov O., Jirakova K., Kubinova S. Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues. Tissue Engineering Part C-Methods. 2017; 23(6): 333–345. Available at: http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0089 (accessed: 07.02.2019).
32. Kular J. K., Basu S., Sharma R.I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. Journal of Tissue Engineering. 2014; 5: 1–17. Available at: DOI: 10.1177/2041731414557112 (accessed: 07.02.2019).
33. Kulkarni M.L., Matadh P.S., Ashok C., Pradeep N., Avinash T., Kulkarni A.M. Absence of Wharton's jelly around the umbilical arteries. Indian J. Pediatr. 2007; 74(8): 787–789. Available at: https://doi.org/10.1007/s12098–007–0142–7 (accessed: 07.02.2019).
34. Kurtz A., Oh S.J. Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance. Prev. Med. 2012; 54:50. Available at: DOI: 10.1016/j.ypmed.2012.01.003 (accessed: 07.02.2019).
35. Leung A., Crombleholme T.M., Keswani S.G. Fetal wound healing: implications for minimal scar formation. Curr. Opin. Pediatr. 2015;24: (3):371–378. Available at: DOI: 10.1097/MOP.0b013e3283535790 (accessed: 07.02.2019).
36. Li X., Su, X. Multifunctional smart hydrogels: potential in tissue engineering and cancer therapy. Journal of Materials Chemistry B. 2018; 6(29): 4714–4730.
37. Lo D.D., Zimmermann A.S., Nauta A. Longaker M.T., Lorenz H.P. Scarless fetal skin wound healing update. Birth Defects Research. Part C. 2012; (96): 237–247. Available at: https://doi.org/10.1002/bdrc.21018 (accessed: 07.02.2019).
38. Ma X., Wei R, Cheng J., Cai J, Zhou J. Synthesis and characterization of pectin/poly (sodium acrylate) hydrogels. CarbohydrPolym. 2011; 86:313–319. Available at: DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.089 (accessed: 07.02.2019).
39. Magnusson S., Baldursson B.T., Kjartansson H., Rolfsson O., Sigurjonsson G. F. Regenerative and Antibacterial Properties of Acellular Fish Skin Grafts and Human Amnion/Chorion Membrane: Implications for Tissue Preservation in Combat Casualty Care. Military Medicine. 2017; 182: (3/4): 383–388. Available at: DOI: 10.7205/MILMED-D-16–00142 (accessed: 07.02.2019).
40. Medberry C.J., Crapo P.M., Siu B.F., Carruthers C.A., Wolf M.T., Nagarkar S.P., Agrawal V., Jones K.E., Kelly J., Johnson S.A., Velankar S.S., Watkins S.C., Modo M., Badylak S.F. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. Biomaterials. 2013; (34): 1033–1050. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.062 (accessed: 07.02.2019).
41. Merceron T.K., Murphy S.V. Hydrogels for 3D Bioprinting Applications. Chapter 14 — Essentials of 3D Biofabrication and Translation. 2015: 249–270.
42. Murphy S.V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. Nat. Biotechnol. 2014; 32: 773–785. Available at: DOI: 10.1038/nbt.2958 (accessed: 07.02.2019).
43. O'Kane S., Ferguson M.W. Transforming growth factor beta s and wound healing. Int. J. Biochem. Cell Biol. 1997; 29: 63–78.
44. Park J.W., Kang Y.D.S., Kim J.S., Lee J.H., Kim H.W. 3D microenvironment of collagen hydrogel enhances the release of neurotrophic factors from human umbilical cord blood cells and stimulates the neurite outgrowth of human neural precursor cells. BiochemBiophys Res Commun. 2014; 447:400–406. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.145 (accessed: 07.02.2019).
45. Rana D., Zreiqat H., Benkirane-Jessel N., Ramakrishna S., Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2017; 11. (4): 942–965. Available at: DOI: 10.1002/term.2061 (accessed: 07.02.2019).
46. Rapoport H.S., Sardon H., Herrero-Mendez A., Granado M.H., Castro B. Assessment of Histogel, a biomaterial derived from Wharton's jelly for tissue engineering product applications. 24th European Conference on Biomaterials. 2011; 2011: 15–20.
47. Ravindran S., Song Y., George A. Development of three-dimensional biomimetic scaffold to study epithelial-mesenchymal interactions. Tissue engineering. Part A. 2010; 16:327–342. Available at: DOI: 10.1089=ten.tea.2009.0110 (accessed: 07.02.2019).
48. Rodriguez-Rodriguez V.E., Martinez-Gonzalez B., Quiroga-Garza A., Reyes-Hernandez C.G., Fuente-Villareal D.D.L., Garza-Castro O.D.L., Guzman-Lopez S., Elizondo-Omana R.E. Human Umbilical Vessels: Choosing the Optimal Decellularization Method. (American Society of Artificial Internal Organs) ASAIO. Journal. 2017. Available at: DOI: 10.1097/MAT.0000000000000715 (accessed: 07.02.2019).
49. Sanluis-Verdes A., Sanluis-Verdes N., Manso-Revilla M.J., Castro-Castro A.M., Pombo-Otero J., Fraga-Marino

M., Sanchez-Ibanez J., Domenech N., Rendal-Vazquez M.E. Tissue engineering for neurodegenerative diseases using human amniotic membrane and umbilical cord. Cell Tissue Bank. 2016. Available at: DOI: 10.1007/s10561–016–9595–0 (accessed: 07.02.2019).
50. Satish L., Kathju S. Cellular and molecular characteristics of scarless versus fibrotic wound healing. Dermatol. Res. Pract. 2010: 790234. Available at: http://dx.doi.org/10.1155/2010/790234 (accessed: 07.02.2019).
51. Silva R., Fabry B., Boccaccini A. Fibrous proteinbased hydrogels for cell encapsulation. Biomaterials. 2014; 35: 6727–6738. Available at: DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.078 (accessed: 07.02.2019).
52. Snyman C., Niesler C.U. MMP-14 in skeletal muscle repair. J. Muscle Res. Cell Motil. 2015; 36: 215–225.
53. Swinehart I.T., Badylak S.F. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. Developmental Dynamics. 2016; 245: 351–360. Available at: https://doi.org/10.1002/dvdy.24379 (accessed: 07.02.2019).
54. Tracy L.E., Minasian R.A., Caterson E.J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. Advances in wound care. 2014. Available at: www.liebertpub.com/wound DOI: 10.1089/wound.2014.0561 (accessed: 07.02.2019).
55. Wang S., Lee J.M., Yeong W.Y. Smart hydrogels for 3D bioprinting. Int. J. Bioprinting. 2015; 1(1):3–14. Available at: DOI: 10.18063/IJB.2015.01.005 (accessed: 07.02.2019).
56. Wulff B.C., Parent A.E., Meleski M.A., DiPietro L.A., Schrementi M.E., Wilgus T.A. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. J Invest Dermatol. 2012; 132:458–465. Available at: DOI: https://doi.org/10.1038/jid.2011.324 (accessed: 07.02.2019).
57. Xiao B., Rao F., Guo Z.Y., Sun X., Wang Y.G., Liu S.Y., Wang A.Y., Guo Q.Y., Meng H.Y., Zhao Q., Peng J., Wang Y., Lu S.B. Extracellular matrix from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a scaffold for peripheral nerve regeneration. Neural Regen. Res. 2016; 11(7): 1172–1179. Available at: DOI: 10.4103/1673–5374.187061 (accessed: 07.02.2019).
58. Yagi L. H. Watanuki L. M., Isaac C., Gemperli R., Nakamura Y.M., Ladeira P.R.S. Human fetal wound healing: a review of molecular and cellular aspects. Eur. J. Plast. Surg. 2016; 39:239–246. Available at: https://doi.org/10.1007/s00238–016–1201-y (accessed: 07.02.2019).
59. Yoshimura T., Yoshimura R., Seki C., Fujioka R. Synthesis and characterization of biodegradable hydrogels based on starch and succinic anhydride. Carbohydr Polym. 2006; 64: 345–349.
60. Zhang S., Wang H. (2018). Current Progress in 3D Bioprinting of Tissue Analogs. SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation 1–9. Available at: https://doi.org/10.1177/2472630318799971 (accessed: 07.02.2019).

REFERENCES

1. Arutyunyan I.V, Makarov A.V, Elchaninov A.V, Fatkhudinov T.H. Mul'tipotentnye mezenkhimal'nye stromal'nye kletki pupochnogo kanatika: biologicheskie svoystva i klinicheskoe primenenie. [Umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells: biological properties and clinical applications]. Genes & Cells. 2015; 10(2): 30–38. (In Russian).
2. Gain Yu.M., Kiseleva E.P, Shakhray S.V. Obosnovanie primeneniya kompleksnogo transplantata na osnove amnioticheskoy membrany i mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok iz zhirovoy tkani dlya vosstanovleniya tselostnosti kozhnykh pokrovov. [Substantiation of complex transplant application on the basis of amniotic membrane and mesenchymal stem cells from the adipose tissue to restore the cutaneous integrity]. Novosti Khirurgii. 2012; 20: 9–16. (In Russian).
3. Ivashkin A.I. Vosstanovlenie epitelial'nykh tkaney s ispol'zovaniem kriokonservirovannykh zhiznesposobnykh dermotransplantatov i zhivogo ekvivalenta kozhi. Avtoref. diss. … dokt. med. nauk. [Recovery of epithelial tissues using cryopreserved viable dermotransplants and a living equivalent of skin]. PhD thesis. M.; 2009. (In Russian)
4. Stroev Yu.I., Churilov L.P., ed. Sistemnaya patologiya soedinitel'noy tkani: Rukovodstvo dlya vrachey. [Systemic pathology of connective tissue: A guide for physicians]. Spb.: ELBI-SPB; 2014. (In Russian).
5. Agrawal V., Siu B.F., Chao H., Hirschi K.K., Raborn E., Johnson S.A., Tottey S., Hurley K.B., Medberry C.J., Badylak S.F. Partial characterization of the Sox2þcell population in an adult murine model of digit amputation. Tissue Eng. Part A. 2012; 18:1454–1463.
6. Alaish S.M., Yager D., Diegelmann R.F., Cohen K. Biology of fetal wound healing: hyaluronate receptor expression in fetal fibroblasts. J. Pediatr. Surg. 1994; 29:1040–1043.
7. Badylak S.F. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response. Ann. Biomed. Eng. 2014; 42:1517–1524. Available at: https://doi.org/10.1007/s10439–013–0963–7 (accessed: 07.02.2019).
8. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen. 2008; 16:585–601. Available at: DOI:10.1111/j.1524–475X.2008.00410.x (accessed: 07.02.2019).
9. Beiki B., Zeynali B., Seyedjafari E. Fabrication of a three dimensional spongy scaffold using human Wharton's jelly derived extra cellular matrix for wound healing. Materials science & Engineering C. Materials For Biological Applications. 2017; 78: 627–638.

10. Brown R.A. In the beginning there were soft collagen-cell gels: towards better 3D connective tissue models? Exp. Cell Res. 2013. (319): 2460. Available at: DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.07.001 (accessed: 07.02.2019).
11. Chan R.W., Rodriguez M.L., McFetridge P.S. The Human Umbilical Vein with Wharton's Jelly as an Allogeneic, Acellular Construct for Vocal Fold Restoration. Tissue engineering: Part A. 2009; 15(11): 3537–3546.
12. Chang C., Zhang L. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. Carbohydr Polym. 2011; 84: 40–53. Available at: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.023 (accessed: 07.02.2019).
13. Cheng T., Yang B., Li D., Ma S., Tian Y., Qu R., Zhang W., Zhang Y., Hu K., Guan F., Wang J. Wharton's Jelly Transplantation Improves Neurologic Function in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. Cellular and Molecular Neurobiology. 2015; 35(5): 641–649. Available at: https://doi.org/10.1007/s10571–015–0159–9 (accessed: 07.02.2019).
14. Choi J.S., Kim J.D., Yoon H.S., Cho Y.W. Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules. Tissue engineering: Part A. 2013; 19: 329–339. Available at: DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0738 (accessed: 07.02.2019).
15. Coviello T., Matricardi P., Marianecci C., Alhaique F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. J. Control. Release. 2007; 119: 5–24. Available at: DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.01.004 (accessed: 07.02.2019).
16. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011; 32: 3233–3243. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057 (accessed: 07.02.2019).
17. Cuttle L., Nataatmadja M., Fraser J.F., Kempf M., Kimble R.M., Hayes M.T. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picrosirius-polarization. Wound Repair Regen. 2005; 13: 198–204. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1067–1927.2005.130211.x (accessed: 07.02.2019).
18. Dan P., Velot E., Francius G., Menu P., Decot V. Human-derived extracellular matrix from Wharton's jelly: an untapped substrate to build up a standardized and homogeneous coating for vascular engineering. Acta Biomaterialia. 2016. Available at: DOI:10.1016/j.actbio.2016.10.018 (accessed: 07.02.2019).
19. De Mori, A., Peña Fernández, M., Blunn, G., Tozzi, G., Roldo, M. 3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. Polymers. 2018; 10(3): 285. Available at: DOI: 10.3390/polym10030285 (accessed: 07.02.2019).
20. Eweida A.M., Marei M.K. Naturally Occurring Extracellular Matrix Scaffolds for Dermal Regeneration: Do They Really Need Cells? Biomed. Res. Int. 2015; 2015:839694. Available at: DOI: 10.1155/2015/839694 (accessed: 07.02.2019).
21. Francisco J.C., Cunha R.C., Cardoso M.A., Baggio Simeoni R., Mogharbel B.F., Picharski G.L., Silva Moreira Dziedzica D., Guarita-Souza L.C., Carvalho K.A.T. Decellularized Amniotic Membrane Scaffold as a Pericardial Substitute: An In Vivo Study. Transplantation Proceedings. 2016; 48(8): 2845–2849. Available at: https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2016.07.026 (accessed: 07.02.2019).
22. Furth M.E., Atala A., Van Dyke M.E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. Biomaterials. 2007; 28:5068–5073. Available at: DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.042 (accessed: 07.02.2019).
23. Galili U. Avoiding detrimental human immune response against Mammalian extracellular matrix implants. Tissue. Eng. Part B Rev. 2015; 21. (2): 231–241. Available at: http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0392 (accessed: 07.02.2019).
24. Gao C, Liu M, Chen J, Zhang X. Preparation and controlled degradation of oxidized sodium alginatehydrogel. Polym Degrad Stabil. 2009; 94:1405–1410. Available at: https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.05.011 (accessed: 07.02.2019).
25. Gilbert T.W. Strategies for tissue and organ decellularization. J. Cell Biochem. 2012; 113: 2217–2222. Available at: https://doi.org/10.1002/jcb.24130 (accessed: 07.02.2019).
26. Glowacki J., Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. Biopolymers. 2008; 89:338–344. Available at: DOI: 10.1002/bip.20871 (accessed: 07.02.2019).
27. Gordon A., Kozin E.D., Keswani S.G. Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation. Wound Repair Regen. 2008; (16): 70–79. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1524–475X.2007.00326.x (accessed: 07.02.2019).
28. Herrero-Mendez A., Palomares T., Castro B., Herrero J., Granado M. H., Bejar J. M., Alonso-Varona A. HR007: a family of biomaterials based on glycosaminoglycans for tissue repair. J. Tissue Eng Regen Med. 2017; 11(4):989–1001. Available at: DOI: 10.1002/term.1998 (accessed: 07.02.2019).
29. Huang Y., Zhang X., Gao G., Yonezawa T. and Cui X. (2017), 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. Biotechnol. J., 12(8): 1600734. Available at: DOI: 10.1002/biot.201600734 (accessed: 07.02.2019).
30. Jaimes-Parra B.D., Garson I., Carriel V., Durand-Herrera D., Martin-Piedra M.A., Garcia J.M., Sanchez-Quevedo M.C., Alaminos M., Campos A. Membranes derived from human umbilical cord Wharton's jelly stem cells as novel bioengineered tissue-like constructs. Histology

and histopatology. 2018; 33(2): 147–156. Available at: DOI: 10.14670/HH-11–897 (accessed: 07.02.2019).
31. Koci Z., Vyborny K., Dubisova J., Vackova I., Jager A., Lunov O., Jirakova K., Kubinova S. Extracellular Matrix Hydrogel Derived from Human Umbilical Cord as a Scaffold for Neural Tissue Repair and Its Comparison with Extracellular Matrix from Porcine Tissues. Tissue Engineering Part C-Methods. 2017; 23(6): 333–345. Available at: http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0089 (accessed: 07.02.2019).
32. Kular J. K., Basu S., Sharma R.I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. Journal of Tissue Engineering. 2014; 5: 1–17. Available at: DOI: 10.1177/2041731414557112 (accessed: 07.02.2019).
33. Kulkarni M.L., Matadh P.S., Ashok C., Pradeep N., Avinash T., Kulkarni A.M. Absence of Wharton's jelly around the umbilical arteries. Indian J. Pediatr. 2007; 74(8): 787–789. Available at: https://doi.org/10.1007/s12098–007–0142–7 (accessed: 07.02.2019).
34. Kurtz A., Oh S.J. Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance. Prev. Med. 2012; 54:50. Available at: DOI: 10.1016/j.ypmed.2012.01.003 (accessed: 07.02.2019).
35. Leung A., Crombleholme T.M., Keswani S.G. Fetal wound healing: implications for minimal scar formation. Curr. Opin. Pediatr. 2015;24: (3):371–378. Available at: DOI: 10.1097/MOP.0b013e3283535790 (accessed: 07.02.2019).
36. Li X., Su, X. Multifunctional smart hydrogels: potential in tissue engineering and cancer therapy. Journal of Materials Chemistry B. 2018; 6(29): 4714–4730.
37. Lo D.D., Zimmermann A.S., Nauta A. Longaker M.T., Lorenz H.P. Scarless fetal skin wound healing update. Birth Defects Research. Part C. 2012; (96): 237–247. Available at: https://doi.org/10.1002/bdrc.21018 (accessed: 07.02.2019).
38. Ma X., Wei R, Cheng J., Cai J, Zhou J. Synthesis and characterization of pectin/poly (sodium acrylate) hydrogels. CarbohydrPolym. 2011; 86:313–319. Available at: DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.089 (accessed: 07.02.2019).
39. Magnusson S., Baldursson B.T., Kjartansson H., Rolfsson O., Sigurjonsson G. F. Regenerative and Antibacterial Properties of Acellular Fish Skin Grafts and Human Amnion/Chorion Membrane: Implications for Tissue Preservation in Combat Casualty Care. Military Medicine. 2017; 182: (3/4): 383–388. Available at: DOI: 10.7205/MILMED-D-16–00142 (accessed: 07.02.2019).
40. Medberry C.J., Crapo P.M., Siu B.F., Carruthers C.A., Wolf M.T., Nagarkar S.P., Agrawal V., Jones K.E., Kelly J., Johnson S.A., Velankar S.S., Watkins S.C., Modo M., Badylak S.F. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. Biomaterials. 2013; (34): 1033–1050. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.062 (accessed: 07.02.2019).
41. Merceron T.K., Murphy S.V. Hydrogels for 3D Bioprinting Applications. Chapter 14 — Essentials of 3D Biofabrication and Translation. 2015: 249–270.
42. Murphy S.V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. Nat. Biotechnol. 2014; 32: 773–785. Available at: DOI: 10.1038/nbt.2958 (accessed: 07.02.2019).
43. O'Kane S., Ferguson M.W. Transforming growth factor beta s and wound healing. Int. J. Biochem. Cell Biol. 1997; 29: 63–78.
44. Park J.W., Kang Y.D.S., Kim J.S., Lee J.H., Kim H.W. 3D microenvironment of collagen hydrogel enhances the release of neurotrophic factors from human umbilical cord blood cells and stimulates the neurite outgrowth of human neural precursor cells. BiochemBiophys Res Commun. 2014; 447:400–406. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.145 (accessed: 07.02.2019).
45. Rana D., Zreiqat H., Benkirane-Jessel N., Ramakrishna S., Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2017; 11. (4): 942–965. Available at: DOI: 10.1002/term.2061 (accessed: 07.02.2019).
46. Rapoport H.S., Sardon H., Herrero-Mendez A., Granado M.H., Castro B. Assessment of Histogel, a biomaterial derived from Wharton's jelly for tissue engineering product applications. 24th European Conference on Biomaterials. 2011; 2011: 15–20.
47. Ravindran S., Song Y., George A. Development of three-dimensional biomimetic scaffold to study epithelial-mesenchymal interactions. Tissue engineering. Part A. 2010; 16:327–342. Available at: DOI: 10.1089=ten.tea.2009.0110 (accessed: 07.02.2019).
48. Rodriguez-Rodriguez V.E., Martinez-Gonzalez B., Quiroga-Garza A., Reyes-Hernandez C.G., Fuente-Villareal D.D.L., Garza-Castro O.D.L., Guzman-Lopez S., Elizondo-Omana R.E. Human Umbilical Vessels: Choosing the Optimal Decellularization Method. (American Society of Artificial Internal Organs) ASAIO. Journal. 2017. Available at: DOI: 10.1097/MAT.0000000000000715 (accessed: 07.02.2019).
49. Sanluis-Verdes A., Sanluis-Verdes N., Manso-Revilla M.J., Castro-Castro A.M., Pombo-Otero J., Fraga-Marino M., Sanchez-Ibanez J., Domenech N., Rendal-Vazquez M.E. Tissue engineering for neurodegenerative diseases using human amniotic membrane and umbilical cord. Cell Tissue Bank. 2016. Available at: DOI: 10.1007/s10561–016–9595–0 (accessed: 07.02.2019).
50. Satish L., Kathju S. Cellular and molecular characteristics of scarless versus fibrotic wound healing. Dermatol. Res. Pract. 2010: 790234. Available at: http://dx.doi.org/10.1155/2010/790234 (accessed: 07.02.2019).
51. Silva R., Fabry B., Boccaccini A. Fibrous proteinbased hydrogels for cell encapsulation. Biomaterials. 2014; 35: 6727–6738. Available at: DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.078 (accessed: 07.02.2019).

52. Snyman C., Niesler C.U. MMP-14 in skeletal muscle repair. J. Muscle Res. Cell Motil. 2015; 36: 215–225.
53. Swinehart I.T., Badylak S.F. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. Developmental Dynamics. 2016; 245: 351–360. Available at: https://doi.org/10.1002/dvdy.24379 (accessed: 07.02.2019).
54. Tracy L.E., Minasian R.A., Caterson E.J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. Advances in wound care. 2014. Available at: www.liebertpub.com/wound DOI: 10.1089/wound.2014.0561 (accessed: 07.02.2019).
55. Wang S., Lee J.M., Yeong W.Y. Smart hydrogels for 3D bioprinting. Int. J. Bioprinting. 2015; 1(1):3–14. Available at: DOI: 10.18063/IJB.2015.01.005 (accessed: 07.02.2019).
56. Wulff B.C., Parent A.E., Meleski M.A., DiPietro L.A., Schrementi M.E., Wilgus T.A. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. J Invest Dermatol. 2012; 132:458–465. Available at: DOI: https://doi.org/10.1038/jid.2011.324 (accessed: 07.02.2019).
57. Xiao B., Rao F., Guo Z.Y., Sun X., Wang Y.G., Liu S.Y., Wang A.Y., Guo Q.Y., Meng H.Y., Zhao Q., Peng J., Wang Y., Lu S.B. Extracellular matrix from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a scaffold for peripheral nerve regeneration. Neural Regen. Res. 2016; 11(7): 1172–1179. Available at: DOI: 10.4103/1673–5374.187061 (accessed: 07.02.2019).
58. Yagi L. H. Watanuki L. M., Isaac C., Gemperli R., Nakamura Y.M., Ladeira P.R.S. Human fetal wound healing: a review of molecular and cellular aspects. Eur. J. Plast. Surg. 2016; 39:239–246. Available at: https://doi.org/10.1007/s00238–016–1201-y (accessed: 07.02.2019).
59. Yoshimura T., Yoshimura R., Seki C., Fujioka R. Synthesis and characterization of biodegradable hydrogels based on starch and succinic anhydride. Carbohydr Polym. 2006; 64: 345–349.
60. Zhang S., Wang H. (2018). Current Progress in 3D Bioprinting of Tissue Analogs. SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation 1–9. Available at: https://doi.org/10.1177/2472630318799971 (accessed: 07.02.2019).