

МАЦЕВИЧ Л.Л., **ПАПУГА О.Є.**, **РУБАН Т.П.**, **ЛУКАШ Л.Л.***Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,**Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua*✉ *l.l.macewicz@imbg.org.ua*

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ КЛІТИН ТА ЇХ ПОХІДНИХ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ВАЖКИХ ОПІКОВИХ РАН

У наш час існує велика кількість робіт, присвячених лікуванню глибоких масивних опікових ран шкіри [1]. Головним підходом до лікування таких опікових ран на сьогоднішній час є рання некректомія з наступною ауто дермопластиком [2]. Але якщо загальна площа рани перевищує 30–40 % поверхні тіла, то така рана не може бути своєчасно повністю закрита навіть за допомогою перфорованих аутодермопластиків. У таких випадках для тимчасового закриття раневого ложа можуть використовуватися штучні замінники шкіри у вигляді гнучких плівок або у вигляді м'яких фармацевтичних композицій. Останні можуть бути створені на основі гелеутворювачів природного (колаген, желатин, пектин та ін.) або штучного (поліакриламід та ін.) походження [3, 4].

Досі не винайдено ідеальних тимчасових еквівалентів шкіри, і зусилля біотехнологів спрямовані на пошук нових шляхів до вирішення цього важливого завдання сучасної біомедицини [5].

Живі клітини, що були вилучені із здорових тканин людини (пацієнта або здорового донора), використовуються як важлива складова частина штучного раневого покриття. Клітинним компонентом є фібробласти чи кератиноцити або поєднання двох типів клітин шкіри людини. На сьогодні перспективним напрямом вважається використання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) [6]. Штучні замінники шкіри з життєздатними клітинами у своєму складі можуть слугувати для раневої поверхні джерелом компонентів екстрацелюлярного матрикса, цитокінів і факторів росту (колаген, глікозаміноглікани, вітронектин, тенасцин, інтерлейкіни 1, 6, 8, інтерферони α і β , PDGF, FGF-1, KGF-1, PDGF, VEGF, TGF- α) [1]. Завдяки цьому відбувається стимуляція регенеративних процесів: стовбурові і прогеніторні клітини організму мігрують до рани і активно проліферують. Це веде до «кондиці-

онування» раневої поверхні і відновлення дерми, що позитивно впливає на приживлення фрагментів шкіри після наступної ауто трансплантації. У тих випадках, коли можна уникнути трансплантації шкіри, надходження вищезгаданих біоактивних субстанцій у рану може прискорити процеси регенерації дермального шару шкіри і реепітелізації рани.

Матеріали і методи

У роботі використовували дорослих самців миші лінії ICR (сублінія (ICR-IMBG) віком 3 місяці. Моделювання опікової хвороби здійснювали таким чином: після премедикації (0,2 мг/кг 2 % розчину ксилазину гідрохлориду внутрішньом'язово) тваринам вводили інтраперитонеально 1% розчин натрію тіопенталу з розрахунку 60 мг/кг маси тіла тварини. Після входження тварини в стан наркозу на каудальній частині спини видалялася шерсть і здійснювали аплікацію металевої пластини температурою $\approx 200^{\circ}\text{C}$ протягом 2 с. В подальшому всім тваринам здійснювали щоденну обробку поверхні рани одним із препаратів на основі м'якого гелю (деталі не розкриваються, оскільки розробка знаходиться в процесі патентування). В контрольній групі гелю готували на основі живильного середовища DMEM. В трьох експериментальних групах до гелю додавали суспензію клітин однієї з трьох клітинних ліній людини (4BL, A102 та E8), а ще в трьох – безсироваткове живильне середовище DMEM, кондиціоноване протягом доби моношаровою культурою відповідних клітинних ліній. Здійснювалася щоденна фотофіксація поверхні рани з наступним вимірюванням площі рани за допомогою програмного забезпечення ScionImage 4.0.2 beta. Результати піддавалися статистичній обробці методами одно-та двофакторного дисперсійного аналізу за допомогою програмного за безпечення Origin8.1.

Результати та обговорення

У дослідженні використовувалися три клітинні лінії людини різного походження. Клітинну лінію 4BL було отримано з периферійної крові дорослого донора шляхом імуорталізації комплексом цитокінів та ростових факторів [7], A102 є похідною трансформованих фібробластів шкіри людини (люб'язно надана проф. Дж. МакКорміком), а E8 – похідна гермінативних клітин людини, отримана Л. Л. Лукаш.

Результати апробації на тваринах препаратів на основі клітин трьох вищезазначених ліній наведено на рис. 1.

За результатами двофакторного дисперсійного аналізу, де за фактор 1 правила наявність клітинного компонента в препараті, а за фактор 2 – чинник часу, було підтверджено терапевтичну ефективність клітинної суспензії, виготовленої з клітин усіх трьох ліній, проте кожен із досліджуваних препаратів проявляв певні особливості. Так, препарат на основі суспензії 4BL проявляв максимальну терапевтичну дію на перших етапах загоєння опікової рани ($\eta^2=0,07$, $p \leq 0,05$ при сумарному впливі впорядкованих чинників на цій стадії опікової хвороби $\eta^2=0,17$); препарат на основі суспензії A102 впливав на швидкість загоєння рани однаково протягом усього експерименту ($\eta^2=0,07$, $p \leq 0,05$), а ефективність препарату на основі суспензії E8 виявлялася лише після 5 доби застосування ($\eta^2=0,10$, $p \leq 0,05$). Важливо, що лише в групі тварин, котрі отримували препарат на основі клітин E8, спостерігалася загибель однієї тварини, що мала місце на 5 добу експерименту.

Спостерігалися також певні тенденції щодо розподілу в часі таких показників, як початок епітелізації рани та тривалість повного загоєння рани. Так, 2/3 тварин, що оброблялися препаратом на основі суспензії 4BL, демонстрували перші прояви епітелізації на 7 добу експерименту; в решті тварин із цієї групи епітелізація розпочалася на 8–10 добу.

У тварин, що отримували лікування препаратом на основі суспензії A102, епітелізація розпочиналася на 7–9 добу з модою на 8 добу експерименту. В групі, що оброблялася препаратом на основі клітин E8, епітелізація розпочиналася дещо пізніше: 8–10 доба експерименту з модою на 8–9 добу. У контрольних тварин епітелізація розпочиналася на 8–12 добу; таким чином, у частини тварин

контрольної групи цей процес дещо затримувався в часі. Однофакторний дисперсійний аналіз вказував на статистично вірогідну різницю між контрольною групою та тваринами, що отримували препарати на основі клітин ліній 4BL та A102 ($\eta^2=0,32$ та $0,33$, відповідно; $p \leq 0,05$).

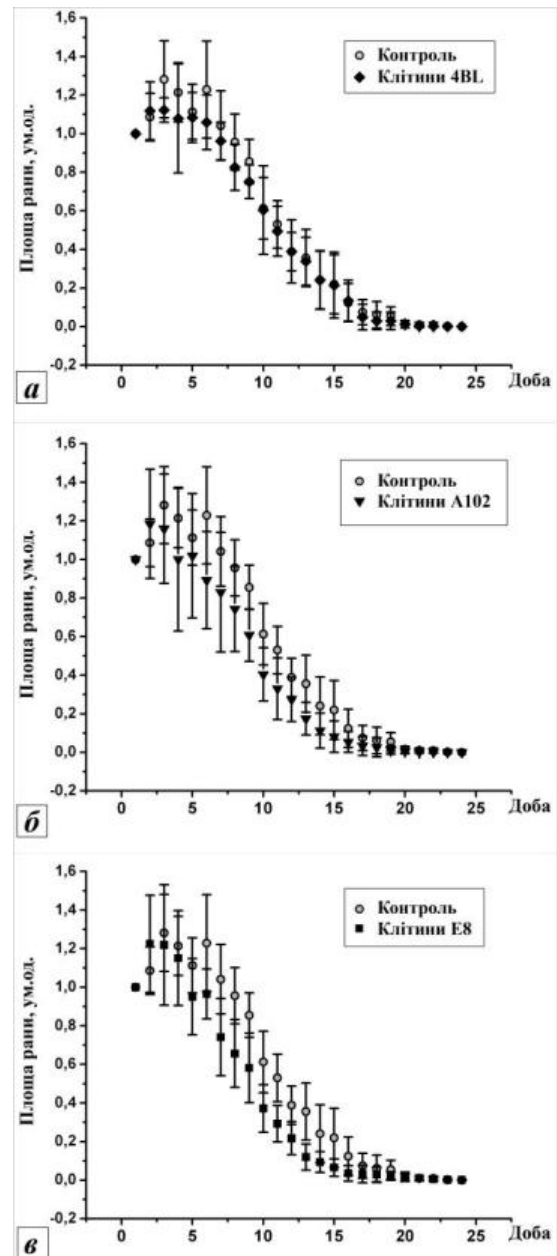


Рис. 1. Загоєння опікових ран у мишей під впливом препарату на основі клітинних ліній людини різного походження: а – 4BL; б – A102; в – E8.

Схожі тенденції спостерігалися і відносно загальної тривалості загоєння рани: якщо в дослідних групах у 40–60 % тварин загоєння наставало на 16–17 добу (групи, щодо яких

застосовувалися препарати на основі суспензій 4BL та E8) чи на 18–19 добу (у тварин, що отримували препарат на основі A102), то в контрольній групі 50 % тварин одужало лише на 20–22 добу дослідження. Проте у деяких тварин, що отримували лікування препаратом на основі E8, спостерігалось уповільнення процесу одужання: у двох особин час повного загоєння рани становив 25 днів, тоді як навіть у контрольній групі максимальна тривалість загоєння рани складала 24 доби.

Вважається, що препарати на основі живих клітин можуть стимулювати регенераційні процеси за двома основними механізмами: безпосереднє заміщення уражених тканин донорськими клітинами та підтримка регенерації пошкодженої тканини через секрецію донорськими клітинами факторів росту, антиапоптичних та протизапальних чинників [8]. Хоча в нашому випадку донорські клітини й були ксеногенними відносно організму реципієнтів, проте, з одного боку, вони мали ті чи інші ознаки дедиференціації та/або стовбуровості [7], а з іншого боку, шкірі притаманне відносно повільне відторгнення неаутогенних трансплантатів [9]. Тому було проведено порівняльний аналіз терапевтичних властивостей препаратів, що містять клітинні суспензії, та безклітинних препаратів на основі середовища, кондиціонованого клітинами відповідної лінії. Ці останні в жодному випадку не могли спричинити замісну терапію, проте містили в собі комплекс біологічно активних речовин, секретованих донорськими клітинами. Результати наведено на рис. 2.

У той час, як для безклітинного та клітиновмісного препаратів на основі клітин A102 не було виявлено жодної різниці в їхніх ранозагоювальних властивостях, безклітинний препарат на основі культури E8 виявився менш ефективним за клітиновмісний ($\eta^2=0,03$, $p \leq 0,05$ за результатами двофакторного дисперсійного аналізу).

На відміну від обох вищеописаних безклітинних препаратів, субстанція, приготована на основі кондиціонованого клітинами 4BL живильного середовища, була значно ефективнішою за відповідний клітиновмісний препарат ($\eta^2=0,07$, $p \leq 0,05$), і найефективнішою з усіх досліджених препаратів на всіх етапах загоєння рани.

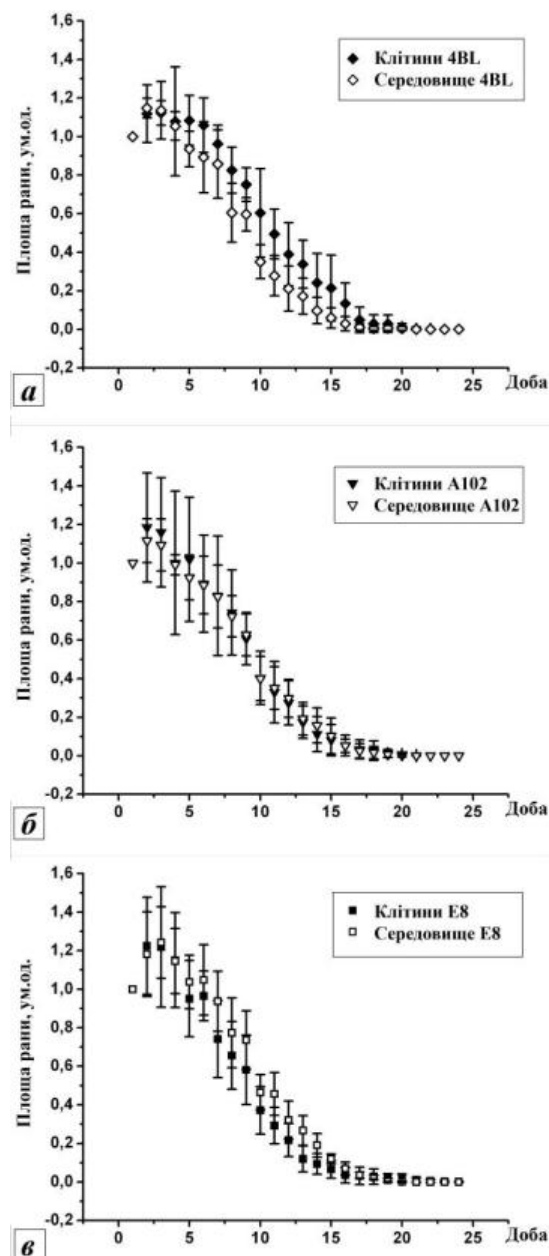


Рис. 2. Порівняльна швидкість загоєння опікових ран у мишей під впливом препаратів на основі клітиновмісних препаратів та відповідних кондиціонованих середовищ: а – 4BL; б – A102; в – E8.

Цікаво, що препарати на основі кондиціонованих середовищ дещо різнилися і за тривалістю загоєння ран в експериментальних групах: так, препарат на основі середовища, кондиціонованого 4BL, спричиняв повне загоєння ран протягом 16–18 днів у 80 % тварин; решта повністю одужала до 21 доби дослідження. Повне загоєння ран під впливом препарату на основі середовища, кондиціонованого A102, розпочалося на 17 добу дослідження, до

21 доби воно настало у 80 % тварин, і на 22 добу – у всіх тварин групи. Загоєння ран у тварин, що отримували препарат на основі середовища, кондиціонованого E8, відбулося протягом 19–21 доби експерименту. У контрольних тварин повне загоєння наставало дещо повільніше – це поступово відбувалося протягом 17–24 доби досліду.

Проведений однофакторний дисперсійний аналіз вказав на статистично вірогідний характер впливу середовища, кондиціонованого клітинами 4BL, на тривалість загоєння опікових ран ($\eta^2=0,34$, $p \leq 0,05$).

Таким чином, дві серед трьох досліджуваних клітинних ліній людини мали статистично вірогідний терапевтичний ефект при лікуванні опікових ран у мишей, тобто при клітинній ксенотрансплантації. Найбільш виражений ефект спричиняла клітинна лінія A102, що походить від фібробластів шкіри проте дві інші лінії, що походять від мезенхімальних клітин крові (4BL) та від гермінативних клітин (E8), також прискорювали загоєння опікових ран. 3-посеред цих двох останніх клінічно ефективнішою була клітинна лінія 4BL, оскільки клітини цієї лінії спричиняли статистично вірогідний позитивний вплив на динаміку розвитку та загоєння опікової рани на найбільш критичній для організму першій стадії опікової хвороби.

Клінічна ефективність препаратів на основі клітин лінії E8 залишається під знаком питання, оскільки в групах тварин, що отримували такі препарати, спостерігалася незначна, але ненульова смертність тварин, відсутня навіть у контрольній групі. Причини цієї смертності потребують подальшого уточнення.

Література

1. Papuga A.Ye., Lukash L.L. Different types of biotechnological wound coverages created with the application of alive human cells // *Biopolym. Cells.* – 2015. – 31, № 2. – P. 83–96. doi: 10.7124/bc.0008D1.
2. Adams D.C., Ramsey M.L. Grafts in dermatologic surgery: review and update on full and splitthickness skin grafts, free cartilage grafts and composite grafts // *Dermatol. Surg.* – 2005. – 8 Pt 2, № 31. – P. 1055–1067. doi: 10.1111/j.1524-4725.2005.31831.
3. Nicholas M.N., Jeschke M.G., Amini-Nik S. Methodologies in creating skin substitutes // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – 73, № 18. – P. 3453–3472. doi: 10.1007/s00018-016-2252-8.
4. Chaudhari A.A., Vig K., Baganizi D.R., Sahu R., Dixit S., Dennis V., Singh S.R., Pillai S.R. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review // *Int J Mol Sci.* – 2016. – 17, № 12. – doi: 10.3390/ijms17121974.
5. Pourmoussa A., Gardner D.J., Johnson M.B., Wong A.K. An update and review of cell-based wound dressings and their integration into clinical practice // *Ann Transl Med.* – 2016. – 4, № 23. – P. 243–247. doi: 10.21037/atm.2016.12.44.
6. Cerqueira M.T., Pirraco R.P., Marques A.P. Stem Cells in Skin Wound Healing: Are We There Yet? // *Adv Wound Care (New Rochelle).* – 2016. – 5, № 4. – P. 164–175. doi: 10.1089/wound.2014.0607.
7. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Кушнирук В.О., Пидпала О.В. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2011. – Т. 11. – С. 493–498.

Порівняння та узагальнення отриманих результатів вказує на те, що найефективнішим серед усіх досліджених виявився препарат на основі живильного середовища, кондиціонованого культурою клітин лінії 4BL. Використання клітинних культур як продуцентів комплексу біологічно активних речовин, що стимулює загоєння опікових ран, має певні переваги перед безпосередньо клітинною трансплантацією. До цих переваг можна віднести:

- полегшення контролю безпеки препарату, зокрема запобігання попередження контамінації препарату патогенами;
- полегшення стандартизації технології отримання препарату;
- усунення необхідності вводити в склад препарату кріопротектори;
- зниження собівартості виготовлення препарату,
- спрощення технології зберігання та використання препарату;
- виключення потенційних ризиків, пов'язаних з трансплантацією культивованих клітин, тощо.

Висновки

Клітинні ксенотрансплантанти є ефективними на експериментальній тваринній моделі при лікуванні термічних опіків IIIb ступеня. Механізми їх сприятливого впливу, ймовірно, є опосередкованими гуморальними чинниками, що синтезуються клітинами трансплантанту. Показано високу ефективність безклітинних препаратів, що містять комплекс біологічно активних речовин, секретованих клітинами у процесі своєї життєдіяльності *in vitro*.

8. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Parekkadan B., Kitagawa Y., Tompkins R.G., Kobayashi N., Yarmush M.L. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing // *Cell Transplant.* – 2010. – 19, № 6. – P. 667–679. doi: 10.3727/096368910X508762.
9. Fodor W.L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate // *Reproductive Biology and Endocrinology.* – 2003. – 1. – P. 102–107. doi: 10.1186/1477-7827-1-102.

MACEWICZ L.L., PAPUGA A.Ye., RUBAN T.P., LUKASH L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine,

Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua

INVESTIGATION OF CELL-DERIVED PREPARATIONS EFFICACY FOR THE TREATMENT OF SEVERE BURN WOUNDS

Aim. The aim was to estimate the efficiency of cell-containing and non-cellular dermal coverages in animal model *in vivo*. **Methods.** We carried out the application of gel wound coverages with three different cell lines and cultural medium conditioned by these cells on the third degree burns of ICR line mice. In the control group animals were treated with fresh medium-containing gel. Photo fixation of burn wound status was carried out once a day. The results were estimated by ANOVA approach. **Results.** There was a statistically significant difference of burn wounds development and healing within three experimental groups treated with cell suspensions of different lines. Cell-free gels with media conditioned by these cells were shown to be effective as well. **Conclusions.** It has been shown the dependence of wound healing properties of coatings containing cells from the origin of these cells. The effectiveness of these coverages is supposed to be intermediated by biologically active substances secreted by the cells.

Keywords: burn wound, dermal equivalent, stem cells, skin equivalent, skin substitute, tissue engineering.