

МАЦЕВИЧ Л.Л.✉, ПАПУГА О.Є., РУБАН Т.П., БЕРЕГОВА Т.В., 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

✉ l.l.macewicz@imbg.org.ua, (050) 657-99-89

ОПТИМІЗАЦІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ КЛІТИНОВІСНИХ ДЕРМАЛЬНИХ ПОКРИТТІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ОПІКІВ НА МОДЕЛІ *IN VIVO*

Мета. Метою нашої роботи було визначення впливу якості клітинної суспензії на терапевтичну ефективність клітиновмісних дермальних покриттів на тваринній моделі *in vivo*. **Методи.** Здійснювалася аплікація гелевих раневих покриттів із клітинним компонентом різної якості на поверхню опікової рани III ступеня у мишей лінії ICR. Тваринам негативного контролю здійснювали накладення гелю на основі свіжого живильного середовища, а тваринам позитивного контролю – гелю з клітинним компонентом високої якості. Фотофіксація стану опікової рани здійснювалася щоденно. Для обробки результатів використовувався метод ANOVA. **Результати.** Було виявлено статистично вірогідну відмінність між тваринами позитивного контролю та обох експериментальних груп. Також було показано зниження частки живих клітин у гелі протягом 5 годин після приготування. **Висновки.** Було виявлено залежність ранозагоювальних властивостей клітиновмісних покриттів від якості клітинного компонента, зокрема життєздатності та цілісності клітин. Ці результати є важливими для розробки протоколів клінічного застосування таких дермальних покриттів.

Ключові слова: опікова рана, дермальний еквівалент, стовбурові клітини, еквівалент шкіри, штучна шкіра, тканинна інженерія.

За даними ВОЗ, опіки за частотою займають третє місце серед травм різного генезу. Статистика опікового травматизму в Україні свідчить, що спостерігається тенденція до зростання частоти опіків і підвищення ступеня їх тяжкості як серед дітей, так і серед дорослих. Щорічно в Україні більше 20 тисяч дорослих та 10 тисяч дітей (60 % котрих – молодші 3 років) потребують стаціонарного лікування опікової хвороби, що здійснюється як у неспеціалізованих лікувальних закладах, так і в спеціалізованих опікових відділеннях, яких в Україні налічується 23. Се-

редня тривалість перебування опікового хворого в стаціонарі становить близько двох тижнів, проте за тяжких опікових уражень стаціонарне лікування може тривати місяць або значно довше.

Біотехнологічні раневі покриття, що містять клітинний компонент, є ефективними засобами лікування масивних опіків у людини [1, 2]. Проте процес виготовлення клітиновмісних препаратів і їхнє застосування є трудомістким та коштовним, зокрема через проблеми, пов'язані з отриманням, культивуванням і зберіганням клітин, що входять до їхнього складу [3, 4]. Використання кріоконсервованих і стандартизованих аlogenних клітин, у тому числі мезенхімальних стромальних клітин дорослої людини, спрощує та здешевлює виготовлення таких еквівалентів шкіри [5, 6]. Проте при цьому постає питання про оптимізацію протоколів їхнього виготовлення для клінічного застосування, зокрема про збереження якості клітинного матеріалу, особливо життєздатності клітин.

В нашому дослідженні визначався вплив повного чи часткового руйнування клітинного матеріалу на терапевтичну ефективність біотехнологічних дермальних покриттів в експерименті *in vivo*. Як модель обрали розроблене раніше раневе покриття «гель-клітина» з використанням карбополового гідрогелю та культивованих мезенхімальних стромальних клітин дорослої людини 4BL [7]. Вивчалася життєздатність клітин у складі такого раневого покриття у ході його використання та зберігання з метою оптимізації протоколу застосування клітиновмісних дермальних покриттів на основі карбополового гідрогелю.

Матеріали і методи

Для дослідження ранозагоювальних властивостей гелів використовували дорослих самців миші лінії ICR (сублінія (ICR-IMBG) віком 3 місяці. Моделювання опікової хвороби здійс-

© МАЦЕВИЧ Л.Л., ПАПУГА О.Є., РУБАН Т.П., БЕРЕГОВА Т.В., ЛУКАШ Л.Л.

нювали 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 у стан наркозу на каудальній частині спини видалялася шерсть і здійснювалася аплікація металевої пластини температурою $\approx 200^{\circ}\text{C}$ протягом 2 с. Надалі всім тваринам здійснювали щоденну обробку поверхні рани одним із препаратів на основі м'якого карбополового гелю з щоденною фотофіксацією поверхні рани та наступним вимірюванням площини рани за допомогою програмного забезпечення ScionImage 4.0.2 beta. В групі негативного контролю гель готували на основі живильного середовища DMEM. За позитивний контроль слугувала група тварин, якій аплікували гель на основі суспензії живих кріоконсервованих клітин 4BL [7]. В двох експериментальних групах до гелю додавали препарати клітинного походження, що готувалися на основі кріоконсервованої суспензії клітин 4BL та лізату клітин 4BL, отриманого за допомогою послідовних циклів заморожування та розморожування без додавання кріопротектора.

Визначення життєздатності клітин проводилося за допомогою забарвлення клітинної суспензії 1 % розчином трипанового синього з наступним підрахунком забарвлених та незабарвлених клітин у камері Горяєва.

Результати піддавалися статистичній обробці методами одно- та двофакторного дисперсійного аналізу за допомогою програмного забезпечення Origin 8.1.

Результати та обговорення

Для групи негативного контролю #1 гель готували на основі стандартного культурального середовища DMEM, а для групи тварин позитивного контролю #2 – на основі середовища DMEM з додаванням суспензії живих кріоконсервованих клітин 4BL. Для визначення впливу цілісності клітин у складі біотехнологічного препарату «гель-клітина» на ефективність його як лікувального засобу для тварин експериментальної групи #3 гель готували з використанням суміші суспензії живих клітин 4BL та їхнього лізату (1:1), а в експериментальній групі #4 гель готували на основі клітинного лізату без додавання живих клітин.

Типовий вигляд опікових ран у тварин кожної групи наведено на рис. 1.

Слід відзначити, що епітелізація країв рани спостерігалася лише у тварин із групи позитивного контролю (#2); під час застосування гідрогелів, що містили клітинний лізат (#3 і #4), стан рани не відрізнявся від такого у тварин групи негативного контролю (#1).

Динаміку загоєння опікових ран у контрольних та експериментальних тварин наведено на рис. 2.

Статистичний аналіз отриманих даних показав, що на першому етапі загоєння (1–7 доба експерименту) має місце погіршення динаміки загоєння рани в обох експериментальних групах порівняно з групою позитивного контролю #2 ($z^2=0,16$, $p\leq 0,05$ для групи #3 та $z^2=0,13$, $p\leq 0,05$ для групи #4), а в експериментальній групі #3 – порівняно з групою негативного контролю #1 ($z^2=0,05$, $p\leq 0,05$). Водночас загоєння ран у тварин групи позитивного контролю #2 було ефективнішим порівняно з тваринами, яким накладали гель без клітинного компонента #1 ($z^2=0,02$, $p\leq 0,05$).

Протягом другого тижня експерименту різниця між тваринами, які отримували лікування за допомогою гелю з живими клітинами, та тваринами обох експериментальних груп не лише зберігалася, але і збільшувалася (табл. 1). Спостерігалася значне прискорення загоєння ран у тварин групи позитивного контролю #2, тоді як в експериментальних групах ефективність лікування для групи #4 була на рівні, а для групи #3 навіть статистично вірогідно гіршою, ніж для негативного контролю.

Таким чином, було показано, що введення до складу покриття клітинного лізату призводить до уповільнення загоєння опікової рани не лише порівняно з позитивним контролем, але навіть із тваринами групи негативного контролю.

Було проведено також обчислення впливу наявності у складі раневого покриття живих та зруйнованих клітин на динаміку загоєння експериментальних опікових ран. Із використанням методу дисперсійного аналізу показано, що наявність клітинного лізату суттєво погіршує загоєння опікових ран незалежно від присутності живих клітин (протягом першого тижня експерименту при $z^2=0,14$, $p\leq 0,05$ та протягом другого тижня дослідження при $z^2=0,20$, $p\leq 0,05$), а наявність живих клітин у покритті не впливає належним чином на негативний ефект лізату ($p=0,08$).

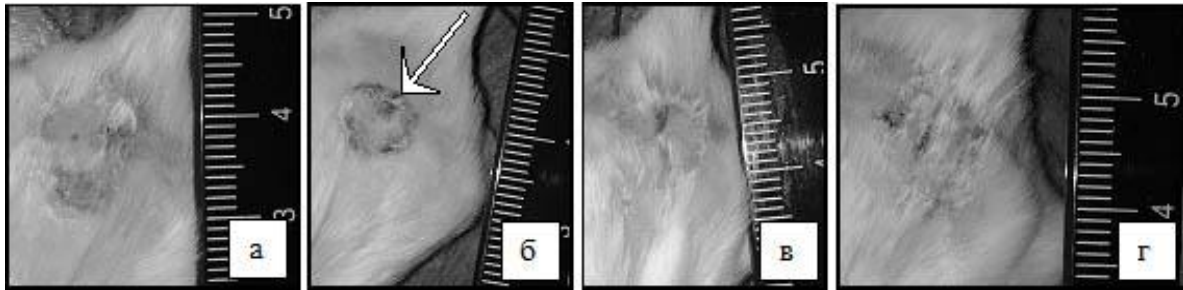


Рис. 1. Фотознімки опікових ран у тварин на 5 добу експерименту: а – гель на основі живильного середовища (#1); б – гель на основі суспензії живих клітин, стрілка вказує на зону епітелізації (#2); в – гель на основі суміші живих клітин та клітинного лізату (#3); г – гель на основі самого клітинного лізату (#4).

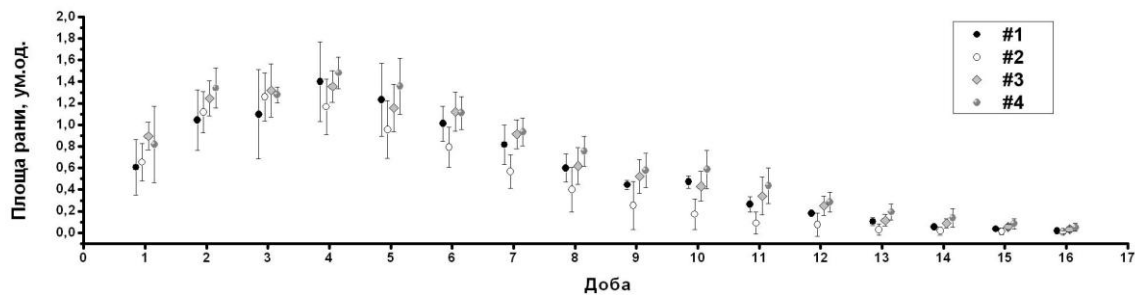


Рис. 2. Динаміка загоєння опікових ран у тварин під впливом раневих покриттів «гель-клітина» з різною якістю клітинного матеріалу: #1 – гель на основі живильного середовища; #2 – гель на основі суспензії живих клітин; #3 – гель на основі суміші живих клітин та клітинного лізату; #4 – гель на основі самого клітинного лізату.

Таблиця 1. Результати дисперсійного аналізу динаміки загоєння експериментальних опікових ран у тварин під впливом раневих покриттів «гель-клітина» з різною якістю клітинного матеріалу протягом 7–13 доби лікування

	гель з живими клітинами (#2)	гель із частково зруйнованими клітинами (#3)	гель із лізатом клітин (#4)
гель без клітинного компонента (#1)	$z^2=0,13, p \leq 0,05$	$z^2=0,05, p \leq 0,05$	NS
гель з живими клітинами (#2)		$z^2=0,28, p \leq 0,05$	$z^2=0,17, p \leq 0,05$

Примітка. NS – різниця між групами не є статистично вірогідною.

Погіршення ранозагоювальних властивостей досліджуваних раневих покриттів за внесення до їх складу клітинного лізату підтверджувалося також даними із зростання терміну повного загоєння рани (рис. 3) та втрати маси тіла у тварин відповідних експериментальних груп (рис. 4)

У зв'язку з тим, що клітинний лізат має виражену здатність до погіршення загоєння опікових ран, виникло питання про тривалість збереження клітинами життєздатності за існу-

вання у складі гелю карбополу, нанесеного на поверхню рани. Ці дані можуть бути важливими для опрацювання протоколів лікування за допомогою клітиновмісних препаратів, зокрема щодо тривалості накладання лікувального засобу на поверхню рани. Крім того, ці спостереження пов'язані з питанням про можливість зберігання готового клітиновмісного покриття та допустимого проміжку часу між його приготуванням та застосуванням.

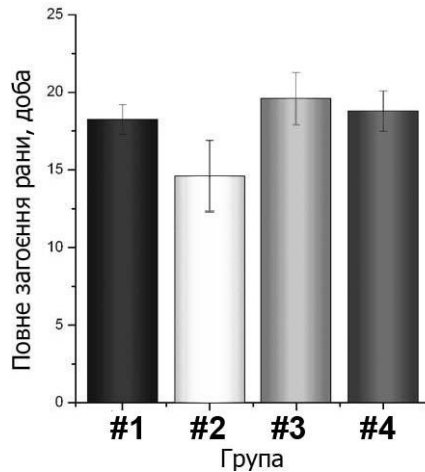


Рис. 3. Тривалість загоєння опікових ран у тварин під впливом раневих покриттів «гель-клітина» з різною якістю клітинного матеріалу. #1 – гель на основі живильного середовища; #2 – гель на основі суспензії живих клітин; #3 – гель на основі суміші живих клітин та клітинного лізату; #4 – гель на основі самого клітинного лізату.

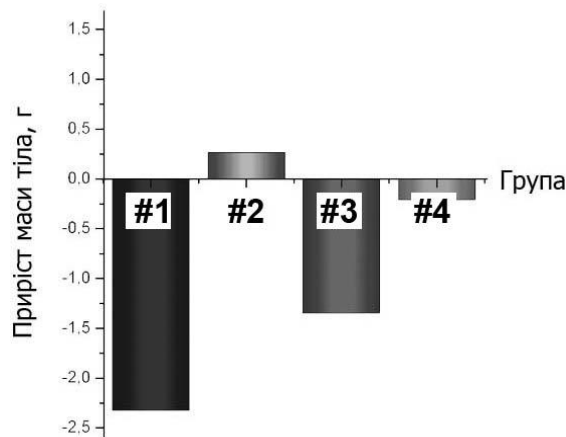


Рис. 4. Втрата/приріст маси тіла у тварин на 22 добу експерименту після терапії за допомогою раневих покриттів «гель-клітина» з різною якістю клітинного матеріалу. #1 – гель на основі живильного середовища; #2 – гель на основі суспензії живих клітин; #3 – гель на основі суміші живих клітин та клітинного лізату; #4 – гель на основі самого клітинного лізату.

Тому були проведені спеціальні дослідження з виявлення співвідношення живих та загиблих клітин у гідрогелях, що перебували в умовах, наближених до таких за аплікації на поверхню рани, тобто за температури +20°C при денному освітленні. Експеримент проводився в трьох біологічних повторах, усереднені дані наведено в табл. 2.

Гідрогелеві покриття, як правило, готуються на основі розморожених *ex tempore* кріоконсервованих клітин, і за таких умов в наших експериментах частка живих клітин в початковій часовій точці становила близько 70 %.

Статистичний аналіз отриманих даних вказує на поступове зниження частки життєздатних клітин ($z^2=0,36$, $p\leq 0,05$) залежно від термі-

ну експозиції, проте протягом першої години статистично вірогідної загибелі клітин не спостерігається. Було проведене додаткове дослідження життєздатності клітин у гідрогелі за умов термостатування за 37°C; отримані результати наведено в табл. 3.

Отже, термостатування готового клітиновмісного покриття, приготовленого на основі гелю карбополу, призводить до зниження життєздатності клітин; більш того, виживаність клітин при цьому навіть погіршується порівняно з попереднім дослідом ($z^2=0,26$, $p\leq 0,05$). Тому можна стверджувати, що приготування дермальних покриттів, що містять живі клітини *ex tempore*, є оптимальним.

Таблиця 2. Частка живих клітин у клітиновмісних гідрогелях, що інкубувалися за температури +20°C та за умов денного освітлення

Тривалість інкубації, год	Частка живих клітин, %
0	68,7±12,1
1	64,3±9,7
3	59,0±17,7
5	56,2±25,9

Таблиця 3. Частка живих клітин у клітиновмісних гідрогелях, що перебували за температури +37°C без освітлення в умовах інкубації

Тривалість інкубації, год	Частка живих клітин, %
0	68,7±12,1
1	55,1±5,0
3	53,2±4,0
5	40,6±18,7

Таким чином, задля уникнення зниження терапевтичної ефективності клітиновмісних раневих препаратів на основі гідрогелю карбополу внаслідок загибелі клітин видається доцільним обмежити термін їхнього зберігання і, можливо, аплікації на рану. Однак останнє питання потребує спеціального дослідження в умовах, наближених до мікрооточення опікової рани, модельного організму.

Стосовно можливостей зберігання клітиновмісних дермальних покриттів, то слід відзначити, що зазвичай для проведення досліджень, у тому числі і клінічних, ми тримали їх протягом доби за +4°C, і в цих умовах життєздатність мезенхімальних стромальних клітин дорослої людини в гелі желатини практично не знижувалася [6]. Однак триваліше зберігання навіть за температури +4°C не рекомендується через зниження життєздатності клітин.

Висновки

Як показали результати проведених досліджень, якість клітинного компонента біотехнологічних раневих покриттів є критичною для лікування опікових ран в експериментальних тварин. Таким чином, під час виготовлення та застосування клітиновмісних дермальних еквівалентів із використанням кріоконсервованих клітин слід звертати особливу увагу на дотримання процедур кріоконсервації, розмороження і зберігання клітинної суспензії. Приготування таких раневих покриттів, ймовірно, слід здійснювати *ex tempore*, враховуючи, що зберігання за температури +20°C і вищої призводить до погіршення їхньої якості (зниження життєздатності) та, очевидно, терапевтичних властивостей.

Література

- Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008. Vol. 453. P. 314–320. doi: 10.1038/nature07039.
- Supp D.M. Skin substitutes for burn wound healing: current and future approaches. *Expert Review of Dermatology*. 2011. Vol. 6. P. 217–227. doi: 10.1586/edm.10.73.
- 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. Vol. 1. P. 102–115. doi: 10.1186/1477-7827-1-102.
- Kim J.S., Kaminsky A.J., Summitt J.B., Thayer W.P. New innovations for deep partial-thickness burn treatment with ACell MatriStem Matrix. *Advances in wound care*. 2016. Vol. 5. P. 546–552. doi: 10.1089/wound.2015.0681.
- Liu J., Bian Z., Kuijpers-Jagtman A.M., Von den Hoff J.W. Skin and oral mucosa equivalents: construction and performance. *Orthodontics & craniofacial research*. 2010. Vol. 13. P. 11–20. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01475.x.
- Папуга О.Є., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Лукаш Л.Л., Лукаш С.І. Спосіб одержання тимчасового еквіваленту дермального шару шкіри. Пат. на винахід № 112584, Україна; заявл. 18.12.2014, опубл. 26.09.2016, бюл. № 18.
- Мацевич Л.Л., Папуга О.Є., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л. Дослідження ефективності препаратів на основі клітин та їх похідних для лікування важких опікових ран. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 20. С. 232–236.

References

1. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008. Vol. 453. P. 314–320. doi: 10.1038/nature07039.
2. Supp D.M. Skin substitutes for burn wound healing: current and future approaches. *Expert Review of Dermatology*. 2011. Vol. 6. P. 217–227. doi: 10.1586/edm.10.73.
3. 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. Vol. 1. P. 102–115. doi: 10.1186/1477-7827-1-102.
4. Kim J.S., Kaminsky A.J., Summitt J.B., Thayer W.P. New innovations for deep partial-thickness burn treatment with ACell MatriStem Matrix. *Advances in wound care*. 2016. Vol. 5. P. 546–552. doi: 10.1089/wound.2015.0681.
5. Liu J., Bian Z., Kuijpers-Jagtman A.M., Von den Hoff J.W. Skin and oral mucosa equivalents: construction and performance. *Orthodontics & craniofacial research*. 2010. Vol. 13. P. 11–20. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01475.x.
6. Papuha O.Ie., Ruban T.P., Matsevych L.L., Lukash L.L., Lukash S.I. A method of obtaining of temporary dermal skin equivalent. Pat. na vynakhid N 112584, Ukraina; zaiavl. 18.12.2014, opubl. 26.09.2016, biul. #18.
7. Macewicz L.L., Papuga A.Ye., Ruban T.A., Lukash L.L. Investigation of cell-derived preparations efficacy for the treatment of severe burn wounds. *Factors of experimental evolution of organisms*. 2017. T. 20. C. 232–236.

MACEWICZ L.L., PAPUGA A.Ye., RUBAN T.P., BEREGOVA T.V., 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*

OPTIMIZATION OF CONTEINING DERMAL COVERAGES PRODUCTION FOR BURN WOUND TREATMENT AT *IN VIVO* MODEL

Aim. The aim was to estimate the influence of cell suspension quality on the therapeutic efficiency of cell-containing dermal coverages in animal model *in vivo*. **Methods.** We carried out the application of gel wound coverages with different quality of cellular compound on the third degree burns of ICR line mice. In the negative control group animals were treated with fresh medium-containing gel, and in positive control – by gel containing high quality cell suspension. 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 between positive control and both experimental groups. The decreasing of alive cell fraction in prepared gel within 5 hours has been shown as well. **Conclusions.** It has been shown the dependence of wound healing properties of coatings containing cells on the cell compound quality, in particular, from the viability and integrity of cells. These results are important for developing of clinical protocols using such cell-containing dermal equivalents.

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