

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

ПАПУГА ОЛЕКСАНДР ЄВГЕНІЙОВИЧ



УДК 606:616-001+606:616-003+606:616-77

**РОЗРОБКА ДЕРМАЛЬНИХ ЕКВІВАЛЕНТІВ ШКІРИ
З ВИКОРИСТАННЯМ КЛІТИН ЛЮДИНИ І НОВИХ БІОМАТЕРІАЛІВ
ДЛЯ ЛІКУВАННЯ МАСИВНИХ ОПКІВ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацію є рукопис.

Робота виконана у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Лукаш Любов Леонідівна, завідувач
відділу генетики людини
Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України.

Офіційні опоненти: **Гарманчук Людмила Василівна**,
доктор біологічних наук, професор
кафедри екології та зоології
ННЦ "Інститут біології та медицини"
КНУ ім. Т.Г.Шевченка;

Верьовка Сергій Вікторович,
доктор біологічних наук, професор,
завідувач лабораторії біохімії
ДУ "Інститут отоларингології
ім. проф. О.С.Коломійченка
НАМН України".

Захист відбудеться « 28 » вересня 2021 року о 10:30 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розісланий « 28 » серпня 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
к.б.н., с.н.с.



І. В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми.

Масивні опікові рани залишаються однією з актуальних проблем сучасної медицини, незважаючи на те, що методи, засоби і тактика лікування постраждалих від опіків людей мають багатовікову історію. Опікові ураження є одним із найпоширеніших видів травм і погіршують життя мільйонів людей на планеті. Близько 6 млн осіб з опіковою хворобою щорічно потребують медичної допомоги (Powar R. et al., 2016). За даними ВООЗ, опіки займають третє місце серед усіх видів травм мирного часу і є причиною щорічних 180 тис. летальних випадків в усьому світі, переважна частина яких відбувається у країнах із середнім та низьким доходом (<https://phc.org.ua/news/naykrasche-likuvannya-opikiv-ce-ikh-profilaktika>; <https://moz.gov.ua/article/health/jak-zahistiti-ditinu-vid-opikiv>). Середній вік людей з опіковою травмою становить 24 роки, а середній розмір опікової рани – 19% загальної площі поверхні тіла (Atiyeh B.S. et al., 2010). Приблизно половина тяжких опікових уражень – це опіки у дітей, серед яких, у свою чергу, 50-80% випадків припадають на дітей віком до 5 років (Agbenorku P. et al., 2013).

Масштаби проблеми можна оцінити, взявши для прикладу відомі статистичні дані окремих розвинених країн: США (населення складає близько 330 млн осіб) та Великобританії (населення – майже 70 млн осіб). У США щорічно 5,5 тис осіб помирають від опікових травм, а загалом кожного року від опіків страждають приблизно 1,25 млн людей, серед яких 450 тис. потребують медичного лікування (Jeng J.C. et al., 2007; Enoch S. et al., 2009). У Великобританії щороку опікові травми призводять до смерті приблизно 300 осіб, а взагалі опікові ушкодження різного ступеня важкості трапляються у 250 тис. людей, і з них 16 тис. отримують спеціалізовану медичну допомогу у лікарнях (Grossoehme R.H., 2001). В Індії (з її населенням понад 1,3 млрд. осіб) щорічно до опікових відділень з тяжкими опіками поступають 700-800 тис. людей. Слід зазначити, що більшість летальних випадків, пов'язаних з опіковою травмою, за даними ВООЗ, трапляється у країнах південно-східної Азії (www.sciencedirect.com/science/book/9781437727869).

В Україні опіки посідають третє місце серед усіх травм. Щорічно реєструється 80 тис. людей, що отримали опіки, серед яких 10% – це діти. Загалом, 70% уражень становлять опіки, отримані в побутових умовах (<https://phc.org.ua/news/naykrasche-likuvannya-opikiv-ce-ikh-profilaktika>; Vons V.V. et al., 2015).

Хоча за останні півстоліття результати лікування пацієнтів з опіковою хворобою суттєво покращилися (www.sciencedirect.com/science/book/9781437727869), все ж терапія масивних опікових ран залишається значною проблемою, яка потребує хірургічного втручання і наразі є основною тактикою спеціалізованого опікового центру. При наявності опіків ступеню IIIb і IV, коли в окремих місцях поверхні тіла повністю втрачено не тільки епідермальний, але

і дермальний шар шкіри, необхідно використовувати аутодермопластику або аутодермотрансплантацію. Однак вказаний метод не дозволяє закрити всю ранову поверхню навіть при використанні перфорованих аутодермотрансплантантів, якщо загальна площа ран перевищує 30-40% поверхні тіла. Це призвело до впровадження різноманітних штучних замінників шкіри або ранових покриттів у арсенал сучасного комбустіолога. Найсучаснішими та найефективнішими є біотехнологічні ранові покриття, що містять у своєму складі живі клітини різних типів та походження. Такі біоконструкції служать, зазвичай, як тимчасові еквіваленти шкіри або окремих її шарів (дерма, епідерміс), які забезпечують пошкоджені тканини пацієнта біологічно активними речовинами, котрі стимулюють регенерацію шкіри.

Актуальним завданням сучасної біомедицини є дослідження перебігу ранового процесу і регенерації шкіри під дією різних препаратів, а також визначення оптимальних термінів закриття за допомогою пластичних матеріалів ранових дефектів. Оскільки досі не видійдено ідеальних тимчасових замінників шкіри, зусилля біотехнологів всього світу спрямовані на пошук нових шляхів до вирішення цього важливого завдання. На сьогодні перспективним напрямом вважається використання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) або мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) людини.

Отже, розробка та впровадження в клінічну практику нових біотехнологічних ранових покриттів (еквівалентів шкіри, дерми або епідерміса) залишається надзвичайно актуальною у наш час. Серед них значне місце займають дермальні еквіваленти як такі, що використовуються задля терапії найнебезпечніших опікових ран, а саме масивних опіків ступеней IIIb і IV.

Таким чином, дана робота присвячена розробці нових біоконструкцій, які відіграють роль тимчасових дермальних еквівалентів з використанням клітин людини установлених ліній та їх похідних і біоматеріалів різного походження для лікування масивних опіків шкіри. При цьому значна увага приділяється саме клітинному компоненту в складі еквівалентів дерми, особливо стовбуровим клітинам оригінальної лінії 4BL, отриманої з периферійної крові людини у відділі генетики людини ІМБГ НАН України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках науково-дослідних проектів відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, отриманих на конкурсних засадах:

— НДР «Розробка методу одержання біотехнологічних ранових покриттів для подальшого використання в медицині» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (номер державної реєстрації 0115U001358, 2015-2019 рр.);

— НДР «Отримання нових дермальних ранових покриттів для лікування масивних опіків і травматичних уражень шкіри іншого генезу» цільової

програми наукових досліджень НАН України «Матеріали для медицини і медичної техніки та технології їх отримання і використання» (номер державної реєстрації 0117U001929, 2017-2021 рр.).

Мета і завдання досліджень. Основною метою роботи було розробити нові біоконструкції (біотехнологічні тимчасові еквіваленти дерми) з використанням клітин людини та їхніх похідних і носіїв, виготовлених із різних біоматеріалів, для лікування термічних опіків шкіри. Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати такі завдання:

1. Вибір носіїв природного та штучного походження для розробки дермальних еквівалентів з використанням біоматеріалів (клітини людини трьох установлених ліній і кондиційовані ними середовища).

2. Відпрацювання технології отримання м'яких дермальних еквівалентів на прикладі пластичних гідрогелевих сумішей з включенням клітин оригінальної лінії 4BL або зразків безклітинних середовищ (БКС), попередньо кондиційованих клітинами цієї лінії.

3. Дослідження ранозагоювальної здатності клітин лінії 4BL, іммобілізованих у гідрогелі на основі карбомеру (карбополу), зразків середовища, кондиційованого цими клітинами (БКС – безклітинного кондиційованого середовища) і лізату клітин цієї лінії у складі відповідної біоконструкції на моделі опікових ран у тварин (миші).

4. Перевірка терапевтичної ефективності дослідних зразків еквівалентів дерми, що містять клітини трьох різних ліній, на моделі термічних опікових ран у піддослідних тварин (миші, щури) і відбір найефективніших зразків.

5. Порівняння терапевтичних ефектів клітин різних ліній з дією відповідних безклітинних кондиційованих середовищ (БКС) у складі гідрогелів і дослідження особливостей загоєння опікових ран у модельних тварин.

6. Оптимізація умов вирощування клітин і виготовлення безклітинних середовищ (БКС), кондиційованих клітинами різних ліній, а також оптимізація тривалого зберігання біоматеріалів.

Об'єкт дослідження: нові біотехнологічні ранові покриття (еквіваленти дерми) з включенням клітин людини різних установлених ліній або їхніх похідних, що призначені для лікування опікової хвороби, та модельні тварини (миші, щури) з термічними опіками.

Предмет дослідження: терапевтична ефективність розроблених нами еквівалентів дерми в експериментах на модельних тваринах.

Методи досліджень: культивування клітин людини установлених ліній; мікроскопічний аналіз стану і кількості клітин; визначення життєздатності клітин шляхом вітального забарвлення трипановим синім, МТТ-тест; напрацювання і кріоконсервація біоматеріалів (клітини установлених ліній та безклітинні середовища, кондиційовані клітинами в культурі); приготування й адаптація клітинних носіїв, гідрогелів і мембран із матеріалів природного та штучного походження; створення комбінованих біоконструкцій (носіїв, що містять клітини або БКС), моделювання опікової хвороби на моделі

лабораторних гризунів (миші, щури); аплікація дермальних еквівалентів на опікові рани; реєстрація ефективності загоєння опікових ран в динаміці; обробка фотографічних зображень стану ранового ложа; методи статистичної обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті виконання даної роботи створено нові біотехнологічні продукти: а) з використанням клітинної технології отримано еквіваленти дермального шару шкіри з включенням клітин людини оригінальних ліній або їхніх похідних (кондиційованих середовищ, що містять комплекс біологічно активних речовин, синтезованих клітинами в культурі); б) охарактеризовано терапевтичну ефективність нових комбінованих еквівалентів дерми, що містять певний клітинний компонент, на основі твердих і пластичних мазеподібних носіїв в рамках попередніх доклінічних досліджень *in vivo* і відібрано найефективніші зразки; в) показано, що дермальні покриття на основі колагенової мембрани (плівка «Білкозин») і гідрогеля карбопола, що містять імобілізовані стовбурові клітини оригінальної лінії 4BL або похідне цих клітин БКС-4BL, є найефективнішими біоконструкціями, що сприяють прискореному загоєнню опікових ран у піддослідних тварин (миші, щури). Запатентовано способи отримання цих біотехнологічних продуктів.

Особлива наукова значущість отриманих результатів полягає у встановленні того факту, що замість живих клітин при виготовленні еквівалентів дерми можуть успішно використовуватись БКС, тобто такі культуральні середовища, що попередньо кондиціювалися стовбуровими клітинами при їх культивуванні *in vitro*. Це значно спрощує і робить більш економічною технологію отримання і використання нових еквівалентів дерми. В роботі удосконалено біотехнологію отримання пластичних мазеподібних сумішей на основі дозволеного в медицині гідрогелю карбополу з включенням клітин або відповідних БКС.

Вперше на модельних тваринах (миші, щури) показано, що зразки середовищ, кондиційованих клітинами лінії 4BL, позитивно впливають на організм, стимулюючи регенеративні процеси на найважливішій ранній стадії загоєння опікових ран. Отримані дані свідчать про те, що внаслідок дії біологічно активних речовин клітинного походження в тканинах шкіри відбувається статистично достовірне зниження вмісту регуляторних білків MMP2 та HIF-1 α майже до рівня, притаманного здоровим тваринам. Оскільки ці білки спричиняють процес запалення, то зниження їх рівня до контрольних значень може свідчити про гальмування запального процесу і більш раннє завершення першої фази загоєння рани.

Практичне значення отриманих результатів. Результати нашої роботи показали, що як самі клітини лінії 4BL, так і зразки кондиційованого ними середовища БКС-4BL прискорюють загоєння термічних ран шкіри у модельних тварин (опіки III^b ступеню) і гальмують запальні процеси у місці загоєння. В перспективі отримані нами результати можуть використовуватись для створення нових біотехнологічних конструкцій, які подалі можуть стати

об'єктом доклінічних досліджень в спеціальній акредитованій лабораторії, а в подальшому допущені до клінічних випробувань у опікових відділеннях закладів охорони здоров'я України з метою лікування опікової хвороби та пошкоджень шкіри іншого генезу.

Особистий внесок здобувача. Наведені в дисертаційній роботі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі. Роботу виконано під керівництвом завідувача відділу генетики людини ІМБГ НАН України д.б.н., проф. Л.Л.Лукаш. В експериментах брали участь співробітники відділу генетики людини ІМБГ НАН України і працівники Науково-дослідної лабораторії фармакології і експериментальної патології (керівник д.б.н., проф. Т.В.Берегова) відділення біологічних та біомедичних технологій ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, які є співавторами опублікованих наукових праць. Дослідження на тваринах проводилися під керівництвом с.н.с. відділу генетики людини Л.Л.Мацевич на базі ІМБГ НАН України або спільно з працівниками вищезгаданої Науково-дослідної лабораторії фармакології і експериментальної патології.

Апробація результатів дисертації. Матеріали даної дисертаційної роботи доповідалися на семінарах відділу генетики людини ІМБГ НАН України і на українських конференціях: VI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2012), VII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2013), IX Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, Україна, 2014), X Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Чернівці, Україна, 2015), XI Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Одеса, Україна, 2016), XII Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, Україна, 2017), XIII Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Яремче, Україна, 2018).

Публікації. Основні результати досліджень опубліковано в 12 наукових працях, серед яких 7 наукових статей у фахових виданнях, 3 тезах доповідей, 2 патентах України (1 патент на винахід і 1 патент на корисну модель).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із вступу і 5 розділів, серед яких огляд літератури, матеріали і методи досліджень, 2 розділи власних досліджень, розділ, присвячений узагальненню і аналізу отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 231 джерело. Дисертація викладена на 167 сторінках машинописного тексту (комп'ютерний друк), (з них 118 сторінок припадає на основну частину) і містить 21 рисунок та 12 таблиць.

Автор висловлює подяку своєму науковому керівнику – завідувачій відділом генетики людини д.б.н., проф. Л.Л.Лукаш, співробітникам відділу генетики людини ІМБГ НАН України к.б.н. Л.Л.Мацевич, Т.П.Рубан, О.М.Сухораді та ін., а також завідувачу відділу функціональних гідрогелей Інституту біологічної хімії ім. Ф.Д.Овчаренко НАН України д.х.н., с.н.с. Ю.М.Самченко і співробітникам цього відділу, а також керівнику Науково-дослідної лабораторії фармакології і експериментальної патології відділення біологічних та біомедичних технологій ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка д.б.н., проф. Т.В.Береговій і співробітникам цієї лабораторії.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень

Поліакриламідний гідрогель: синтез і підготовка до експериментів.

Зразки поліакриламідного гідрогелю (рисунок 1) були синтезовані у відділі функціональних гідрогелей ІБКХ ім. Ф.Д.Овчаренка НАН України на основі акриламіда і акрилонітрила (співвідношення 62,5:32,5) шляхом радикальної кополімерізації.



a



б

Рис. 1. Сухий поліакриламідний гідрогель. *a* – Зразки в целофановій індивідуальній упаковці. *б* – Зразки з включенням наночастинок срібла у різній концентрації

Перед проведенням експерименту ми інкубували висушені гідрогелеві пластини у культуральному середовищі DMEM-HG, щоб гідрогель поглинув максимально можливий об'єм рідини (рисунок 2). Надлишок середовища видаляли і на поверхню гідрогелю наносили суспензію клітин, а через дві години інкубації при +37°C і 5% CO₂ додавали ростове середовище.



Рис. 2. Вологий поліакриламідний гідрогель із залишками вільного середовища DMEM-HG в чашці Петрі

Симбіотичний організм (бактерійно-дріжджове угруповання) Medusomyces gisevii (kombucha, чайний гриб): підготовка до експериментів. Від товстого шару біоплівки симбіотичного організму відділяли тонкі пласкі

фрагменти, які занурювали у дистильовану воду і у такому стані піддавали термічній обробці в автоклаві. Далі фрагменти біоплівки протягом 3 діб інкубували в культуральному середовищі DMEM-HG з додаванням 100 Од/мл бензилпеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину.

Колагенова плівка „Білкозин”: підготовка до експериментів.

Колагенова плівка „Білкозин” виробляється ВАТ „Прилуцький завод "Белкозин"" (м. Прилуки, Україна). Ми спеціально адаптували плівку „Білкозин” для контакту з клітинами. Для цього фрагменти білкозинової плівки інкубували в буферному розчині Хенкса з індикатором феноловим червоним для вимивання низькомолекулярних фрагментів колагену, які дають кислу реакцію і, відповідно, пожовтіння рідини. Розчин змінювали кожен день, бажаючи досягти припинення зміни рН. Зазвичай вистачало двох замінів розчину на свіжу порцію. Далі плівку витримували при -18°C протягом доби, щоб підвищити м'якість та гнучкість плівки. Після розморожування плівку занурювали у буферний розчин Хенкса і стерилізували автоклавуванням (30 хвилин, 0,5 додаткових атмосфери). Стерильні фрагменти адаптованої білкозинової плівки зберігали у середовищі DMEM-HG.

Карбополовий гідрогель: синтез і підготовка до експериментів.

Гідрогель карбомеру або карбополу виробляється на основі гелеутворювача Carborol 980 з концентрацією останнього 1,5%. Розчинником було середовище DMEM-HG. Попередньо готували 3%-ву суспензію карбомеру. Безпосередньо перед відмірюванням аліквот зробленої суспензії слід її збовтати. Отримана суспензія карбомеру має низьке значення рН. Спостерігаючи за зміною кольору індикатора фенолового червоного у складі DMEM-HG, ми доводили рН гідрогелю до 7,4 за допомогою 18% розчину NaOH. Під час цього відбувався фазовий перехід, і суміш перетворювалася на однорідний гідрогель. Вироблений 3%-й карбополовий гідрогель змішувався або з чистим середовищем (контроль у дослідах), або з іншими рідинами (залежно від схеми досліду) у об'ємній пропорції 1:1, тому кінцевий гідрогелевий препарат містив 1,5% карбомеру.

Клітини. В роботі були використані наступні лінії клітин: а) клітинна лінія 4BL – лінія ММСК людини, яка була отримана у відділі генетики людини ІМБГ НАН України з периферійної крові здорового донора; б) клітинна лінія E8, яка походить від ембріональних гермінативних клітин людини і також була отримана у відділі генетики людини ІМБГ НАН України; в) клітинна лінія A102, яка походить від фібробластів шкіри дорослої людини і була люб'язно надана у наше розпорядження професором Дж. МакКорміком (Мічиганський Державний Університет, США).

Культивування клітин in vitro. Моношарові культури клітин культивувалися у стандартному середовищі DMEM-HG з додаванням 10% FCS, 100 Од/мл бензилпеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Використовувалися стандартні умови культивування клітин: для чашок Петрі – $+37^{\circ}\text{C}$ і 5% CO_2 , для невентильованих культуральних флаконів – $+37^{\circ}\text{C}$.

Кріоконсервування клітин. Клітини суспендували при +4°C в суміші для кріоконсервування: 45% DMEM-HG, 45% FCS, 10% ДМСО. Потім аліквоти клітинної суспензії інкубувалися на льду протягом 30 хвилин, після чого заморожувалися і зберігалися при –80°C.

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

Отримання клітинних лізатів. Клітинні суспензії у середовищі DMEM-HG з концентрацією клітин 1 млн/мл 10-кратно швидко заморожували і розморожували, шляхом центрифугування видаляли клітинний детрит, ділили лізат на аліквоти і зберігали при –80°C.

Отримання безклітинного кондиційованого середовища, або БКС. Використовували клітинні культури з певною величиною конфлюентності клітинного моношару (за замовчуванням ≈90%). Видаляли ростове середовище, замість нього додавали такий самий об'єм середовища DMEM-HG без FCS і антибіотиків. Після інкубації протягом доби за стандартних умов культивування клітин БКС збирали, шляхом центрифугування видаляли випадкові клітини, ділили на аліквоти і зберігали при –80°C.

Наночастинки оксиду заліза. Наночастинки оксиду заліза (II, III) Fe₃O₄ у вигляді порошку були отримані в Інституті проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевіча НАН України.

МТТ-тест метаболічної активності клітин під впливом різних чинників. Клітини лінії 4BL розсівали на 96-лунковий планшет з плоским дном по 5 тис. клітин на лунку і культивували протягом доби. Далі ростове середовище замінювали і здійснювали титрування досліджуваних зразків кондиційованого середовища, або в лунки додавали певні кількості порошку оксиду заліза Fe₃O₄ (не менше 3 лунок на варіант). За контроль правили клітини, що культивували в ростовому середовищі. Загальний об'єм рідини в кожній лунці становив 100 мкл. Після інкубації протягом трьох діб (+37°C, 5% CO₂) з кожної лунки видаляли рідину і додавали 115 мкл суміші «100 мкл ростового середовища + 15 мкл 0,5%-ного розчину МТТ», після чого інкубували протягом 4 годин (+37°C, 5% CO₂). Потім в кожну лунку додавали по 200 мкл ДМСО і інкубували на планшетному шейкері при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів формагану. Оптичну густину отриманих розчинів визначали при довжині хвилі 570 нм.

Визначення концентрації деяких регуляторних білків у тварин. Вміст фактору росту ендотелію судин (VEGF), фактору росту нервів (NGF), матричної металопротеїнази 2 (MMP-2) та гіпоксієіндукованого фактору-1α (HIF-1α) визначали в ділянці шкіри щурів, де відбулося загоєння опікової рани. Кожна тварина в день повного загоєння рани була виведена з дослідження шляхом цервікальної дислокації, після чого в області, де була рана, вирізався фрагмент шкіри розміром приблизно 1 см×1 см. Цей фрагмент гомогенізували у

фізіологічному розчині на холоді за допомогою електромеханічного пристрою у пробірці типу Eppendorf (1,5 мл). Гомогенат фільтрували крізь чотири шари нейлонової сітки і зберігали при -20°C . В гомогенаті шкіри щурів визначали вміст загального білку за методом Бредфорд і розводили проби з використанням TBS до концентрації білку 20 мкг/мл. Концентрацію вищезазначених білків в гомогенаті визначали імуноферментним методом ELISA з використанням комерційних наборів "GE Healthcare: Amersham" (Великобританія). Концентрація визначалася за допомогою формули в інструкції до комерційного набору і виражалася в умовних одиницях на 1 мг білку (ОУ/мг білку).

Експериментальні тварини. Дослідження із залученням тварин проводилися на базі віваріїв ІМБГ НАН України і ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ імені Тараса Шевченка. Використовувалися тварини власного розведення, а саме лабораторні білі щури лінії Wistar дорослого віку і лабораторні білі миші лінії ICR (сублінія ICR-IMBG) віком 3 місяці.

Моделювання опікової хвороби у мишей і щурів. Тварини піддавалися премедикації за допомогою комерційного препарату "Ксила" (2% ксилазину гідрохлориду) і 1%-го водного розчину натрію тіопенталу (60 мг діючої речовини на 1 кг ваги тіла тварини). Після входження тварини у наркотичний стан видаляли шерстний покрив на каудальній частині спини і за допомогою квадратної металевої пластини 1×1 см, нагрітої до $\approx 200^{\circ}\text{C}$, наносили на голу шкіру термічний опік III ступеню. Для мишей аплікація пластини до шкіри тривала 2 с. Для щурів аплікація пластини до шкіри тривала 4 с. Тварини перебували в теплі ($28-30^{\circ}\text{C}$) до повного виходу з наркозу.

Обчислення швидкості загоєння ран. Під час дослідження загоєння опікових ран фотофіксацію стану опікової рани проводили раз на добу приблизно у той самий час. У кожному кадрі була присутня мірна лінійка, котра розташовувалася на тій самій відстані від об'єктиву, що і поверхня рани, а також була паралельна поверхні рани. В подальшому всі фотографії приводили до одного масштабу та вимірювали площу поверхні опікової рани за допомогою спеціалізованої програми ScionImage (beta-версія 4.0.2) або ImageJ. Площу рани вимірювали в умовних одиницях, де за 1 (одиницю) було прийнято значення цього показника на першу добу після індукції опіку.

Програмна та статистична обробка даних. Для статистичної обробки отриманих результатів використовували непараметричні тести Манна-Уїтні, Колмогорова-Смирнова, а також одно- та двофакторний дисперсійний аналіз із поправкою Бонфероні на множинність порівняння. Відмінності між групами вважалися вірогідними при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Розробка нових біотехнологічних носіїв для виготовлення тимчасових еквівалентів дерми з включенням клітин людини або їх похідних

Модифікація поліакриламідного гідрогелю як носія для клітинного компоненту дермального ранового покриття. Раніше вже було показано, що зразки такого гідрогелю, які були отримані в ІБКХ ім.Ф.Д.Овчаренка НАН України, не є цитотоксичними: через добу після висівання клітин на гідрогелеві мембрани спостерігалось прикріплення і розпластування клітин на поверхні з подальшим розмноженням до утворення клітинного моношару. Одним із наших практичних завдань було дослідження впливу деяких наночастинок у складі гідрогелю на клітини лінії 4BL, які мають перебувати на поверхні поліакриламідних гідрогелевих матриць. Ми передбачали, що введення наночастинок до складу наших біоконструкцій поліпшить життєдіяльність клітинного компоненту, а також надасть біоконструкціям деяких додаткових позитивних рис, серед яких буде, наприклад, бактерицидність.

В першу чергу, ми досліджували дію наночастинок срібла (розмір – 30 нм) на морфологію і розмноження клітин лінії 4BL на поверхні поліакриламідних гідрогелевих матриць. Наночастинок вводилися до складу гідрогелю під час синтезу. Було використано такі концентрації колоїдного срібла: 5, 25, 50, 100, 250 мкг/г маси сухої речовини. Найефективнішою в плані стимуляції проліферації клітин лінії 4BL виявилась концентрація наночастинок срібла 25 мкг/г (0,0025%), так як на 3 добу культивування призводила до статистично достовірного ($p \leq 0,05$) збільшення числа клітин на поверхні гідрогелевих мембран. Вже на 3-й день спостереження за проліферацією клітин нами було відзначено формування конфлюентного клітинного моношару на поверхні гідрогелю, у той час як у контролі (тобто на поверхні гідрогелевих зразків без срібла у їх складі) ми спостерігали лише острівці клітин у стані активної проліферації: частина клітин мала сферичну форму, якої вони набувають безпосередньо перед мітозом. При концентраціях срібла 5 мкг/г і 50 мкг/г спостерігалась тенденція до збільшення числа клітин у порівнянні з контролем, проте ефект не був статистично достовірним. Збільшення концентрації колоїдного срібла до 100 мкг/г і 250 мкг/г призводило до формування клітинних агрегатів і, можливо, цитотоксичному ефекту.

Вплив наночастинок оксиду заліза Fe_3O_4 на життєдіяльність клітин 4BL вивчався в інших умовах. Клітини вирощували в 96-лункових планшетах у присутності наночастинок Fe_3O_4 в різних концентраціях. Розміри частинок були 10 нм, 20 нм, 60 нм і 200 нм. Через 3 доби культивування проводився МТТ-тест.

Спостерігалась зворотна залежність виживаності клітин від концентрації частинок розміром 10 нм в культуральному середовищі. Наночастинок вже при найменшій концентрації (0,625 мг/мл), що використовувалась, спричиняли різке статистично достовірне ($p \leq 0,05$) зниження кількості живих клітин, і зі

збільшенням їх концентрації цитотоксична дія значно посилювалася. Наночастинки більшого розміру, а саме 20 нм і 60 нм при деяких концентраціях призводили до збільшення кількості метаболічно активних клітин у порівнянні з контролем. У дослідах з наночастинками розміром 20 нм статистично достовірний ефект ($p \leq 0,05$) стимуляції метаболічної активності клітин спостерігався при концентраціях 5 мг/мл і 10 мг/мл. Використання наночастинок розміром 60 нм не дало статистично достовірну різницю між дослідом і контролем. Наночастинки розміром 200 нм не чинили істотного впливу на життєздатність клітин.

Присутність наночастинок оксиду заліза у складі мембран-носіїв, як і наночастинок срібла, призводила до втрати прозорості поліакриламідних мембран, що ми вважаємо суттєвим недоліком, так як це не дозволяє проводити спостереження за станом опікових ран.

Використання біоплівки симбіотичного організму *Medusomyces gisevii* як мембрани-носія для створення тимчасових дермальних еквівалентів. Ми спробували використати біоплівку даного симбіотичного організму як носій живих клітин. Стерилізовані фрагменти біоплівки поміщали в скляну чашку Петрі, зверху на них наносили суспензію клітин 4BL із розрахунку 100 000 клітин/см², потім додавали ростове середовище. Через 1 добу, 3 доби і 6 днів після початку експерименту проводили спостереження за клітинами за допомогою інвертованого мікроскопу. Також через 6 днів від початку експерименту ми проводили забарвлення фрагментів біоплівки, що несуть клітини, за допомогою фарбника трипанового синього.

Клітини рівномірно розподілялися всередині шару біоплівки. У більшості випадків розпластування і поділ клітин не спостерігалися, клітини зазвичай залишалися сферичними протягом 6 днів від дня початку експерименту. Тільки невелика частина клітин розпластувалася по волокнам біоплівки, утворюючи форму, схожу на ту, якої клітини набувають при культивуванні на склі. При забарвленні трипановим синім більшість клітин залишалася незабарвленою, тобто вони були живими. Проте точний підрахунок живих і мертвих клітин в цих умовах був утрудненим.

Створення еквівалентів дерми із включенням стовбурових клітин на основі колагенової плівки „Білкозин”. Колагенова плівка „Білкозин” є міцною, значною мірою еластичною, вже давно виробляється у великих кількостях для потреб харчової промисловості. Останнє вказує, по-перше, на те, що це нетоксичний продукт, а, по-друге, що виготовлення біотехнологічних конструкцій на її основі не потребує налагодження серійного виробництва власне цієї плівки.

Суспензію клітин 4BL з концентрацією 2 млн. клітин/мл змішували з рівною кількістю стерильного і підігрітого до 37°C розчину желатини у середовищі DMEM-High Glucose (20%) і суспендували, щоб клітини були рівномірно розподілені в рідкій фазі. Отриману суспензію, що містить у своєму складі желатин (10%) і клітини в концентрації 1 млн./мл, переносили у чашки

Петрі з фрагментами «адаптованої» білкозинової плівки у такій кількості, щоб товщина клітиновмісного шару рідини над плівкою дорівнювала приблизно 5 мм. Далі виготовлені бішарові конструкції інкубували у холодильнику при температурі +4°C протягом двох годин. Впродовж цього часу розчин желатини перетворювався на гідрогель, який міцно зчеплювався з поверхнею білкозинової плівки. Безпосередньо після утворення желатинового гідрогелю тимчасовий замінник дермального шару шкіри був вже готовий для практичного використання.

Випробування ефективності тимчасових дермальних еквівалентів шкіри на основі колагенової плівки „Білкозин”. Зразки розробленого тимчасового еквіваленту дермального шару шкіри на білкозиновій основі були апробовані на ефективність в попередньому експерименті із залученням лабораторних білих мишей лінії ICR. Чисельність дослідної та контрольної груп становила по 3 тварини в кожній. В дослідній групі кожній тварині одразу після нанесення опіку здійснювали аплікацію фрагменту біоконструкції на всю поверхню опікової рани так, щоб поверхня гідрогелю щільно прилягала до поверхні рани. За допомогою клею медичного БФ-6 края біоконструкції фіксували до неуражених ділянок шкіри. Під дією температури тіла желатиновий гель, що містить клітини, поступово розплавлявся. Тривалість аплікації становила 8 годин. В контрольній групі тварин жодної обробки опікової рани не проводили.

Вже на другу добу досліді ми спостерігали тенденцію до зменшення площі опікової рани в дослідній групі порівняно з контролем (рисунок 3). На третю добу цей показник в контрольній та дослідній групах відрізнявся статистично достовірно. На четверту добу досліді на ранах сформувався щільний струп, який унеможливив безпосередній візуальний контроль поверхні рани до повного її загоєння. Проте на периферії опікової рани існувала ділянка ранової поверхні, котра була доступною для візуального спостереження.

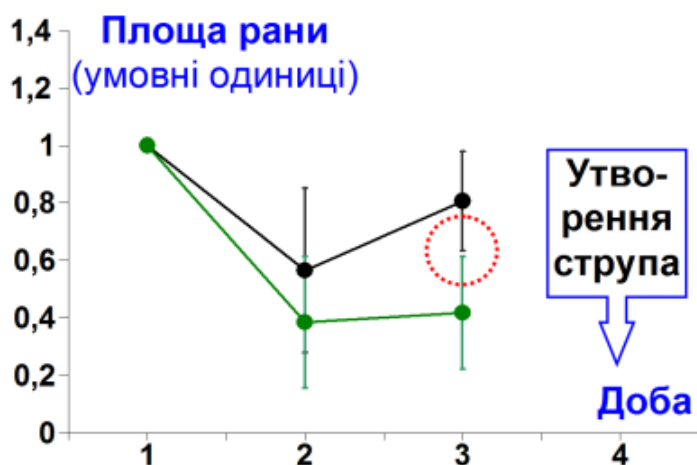


Рис. 3. Вплив аплікації тимчасового дермального еквіваленту на основі білкозину на динаміку розвитку опікової рани. $p \leq 0,05$

● Контроль
● Терапія

У всіх тварин експериментальної групи на вказаній ділянці вже на четверту добу спостерігали ознаки розвитку епітелізації, тоді як в контрольній групі у жодної тварини початок епітелізації цих зон не мав місця.

Створення пластичних мазеподібних гелей, що містять клітини людини або безклітинні культуральні середовища, кондиційовані цими клітинами

Створення пластичного мазеподібного препарату на основі карбополового гідрогелю. Ґрунтуючись на літературних даних, ми поставили перед собою завдання перевірити можливість включення живих клітин людини в гідрогель на основі гелеутворювача Carborol 980 з концентрацією 1,5%. Карбополові гідрогелі широко використовуються в медичній практиці. Одна з переваг карбополу – це його певні антисептичні властивості, карбополові гідрогелі не підтримують мікробні інфекції.

Ми змішували або клітинну суспензію з концентрацією клітин 2 млн/мл, або клітинний лізат, або БКС (безклітинне кондиційоване середовище) з 3%-м карбополовим гідрогелем (рН 7,4) у пропорції 1:1. Таким чином, гідрогелеві препарати, що були отримані, містили 1,5% карбополу.

Дослідження терапевтичної ефективності клітиновмісних покриттів на основі карбополового гідрогелю *in vivo*. Експерименти із залученням щурів. Завданням цього фрагменту експериментальної роботи було дослідити можливу терапевтичну дію живих клітин лінії 4BL, лізату клітин лінії 4BL та їх суміші у складі карбополових гідрогелей (таблиця 1). В пілотному експерименті з використанням щурів лінії Wistar було сформовано 6 експериментальних груп щурів, по 2 тварини в кожній групі. Протягом години після нанесення опіку у тварин груп 1-5 ми здійснювали обробку ураженої ділянки шкіри композицією з відповідним номером. Препарат того або іншого складу наносили на рану щоденно раз на добу до повного загоєння рани. В групі 1 використовувався гідрогель, створений не на культуральному середовищі DMEM-High Glucose, а на фізіологічному розчині. У тварин групи 6 жодної обробки ран не проводили.

Таблиця 1

Чинники, досліджувані в експерименті із залученням щурів лінії Wistar

№ композиції	Наявність компонентів			
	карбопол	середовище DMEM	живі клітини лінії 4BL	лізат клітин лінії 4BL
1 (карбопол)	+	–	–	–
2 (карбопол+ DMEM)	+	+	–	–
3 (карбопол+DMEM+4BL)	+	+	+	–
4 (карбопол+DMEM+лізат)	+	+	–	+
5 (карбопол+DMEM+4BL+лізат)	+	+	+	+
6 (інтактний контроль)	–	–	–	–

Результати двохфакторного дисперсійного аналізу динаміки загоєння опікових ран за найкритичніший перший період експерименту (2-11 доба) наведені в таблиці 2. Було проаналізовано вплив складу композиції, вплив часу загоєння і сумарний вплив цих двох чинників. Значення показників впливу складу і сумарного впливу дозволяють зробити висновок, що композиція №3

найкращим чином впливала на процес загоєння ран.

Таблиця 2

Вплив досліджуваних композицій на загоєння опікових ран у щурів ($p \leq 0,05$)

Номер композиції	№1 (карбопол)	№2 (карбопол +DMEM)	№3 (карбопол +DMEM +4BL)	№4 (карбопол +DMEM +лізат)	№5 (карбопол +DMEM +4BL+лізат)
η^2 – Застосування різних композицій	0,01	0,40	0,34	0,33	0,02
η^2 – Дата заміру (діб від початку експерименту)	0,60	0,52	0,27	0,45	0,61
η^2 – Взаємодія впорядкованих чинників	0,39	0,08	0,39	0,22	0,36

Експерименти із залученням мишей. Схема пілотного експерименту, яка описана вище, була повторена нами із залученням мишей лінії ICR. Розмір експериментальних груп збільшили до 6 тварин (рисунок 4).

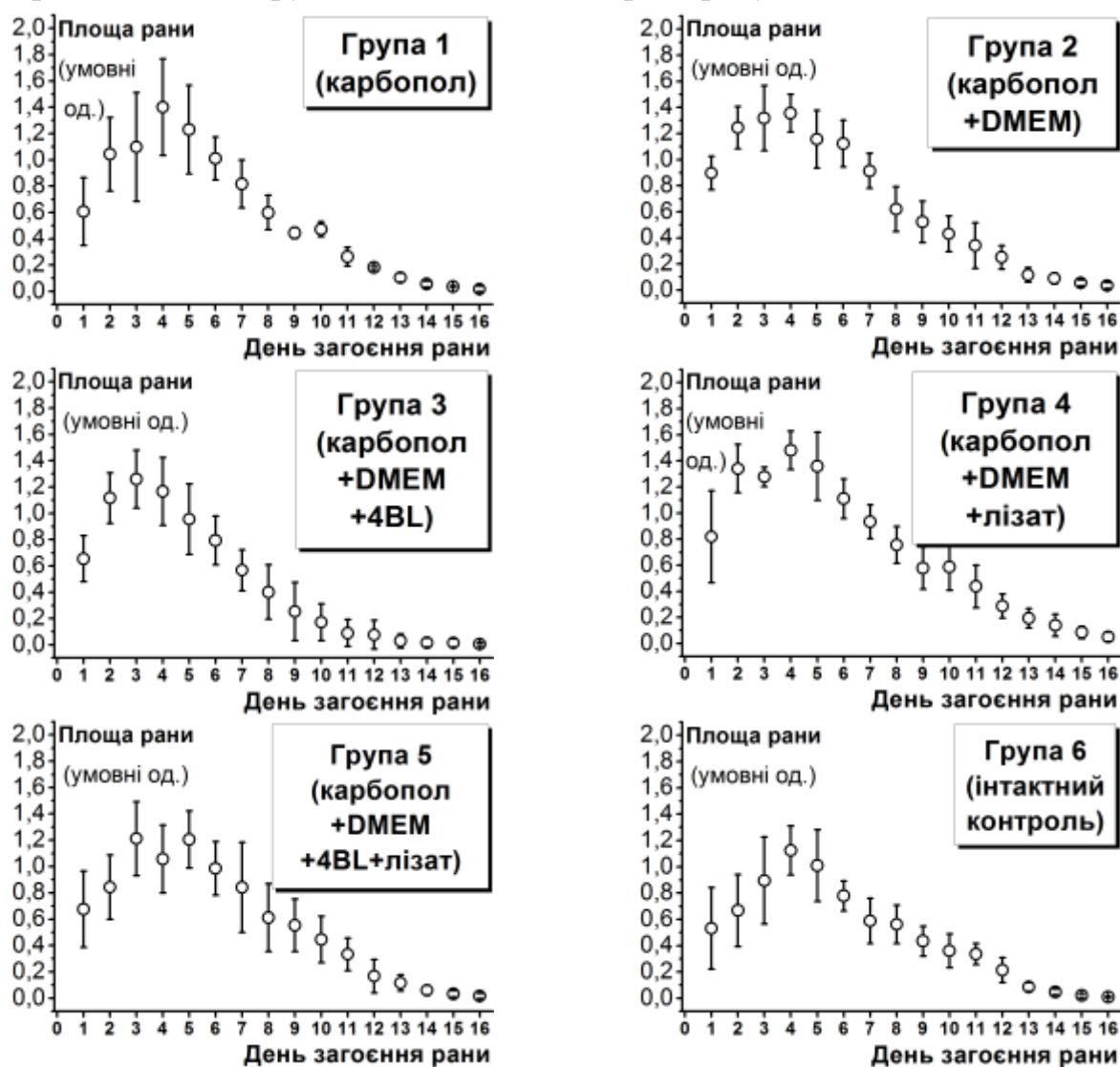


Рис. 4. Динаміка загоєння опікових ран у мишей лінії ICR під впливом компонентів різних композицій на основі карбополового гідрогелю

Порівняння динаміки загоєння опікових ран в різних групах також свідчило про те, що склад досліджуваної композиції має вплив на швидкість загоєння рани. Суттєвість цього впливу підтверджується результатами дисперсійного аналізу: $\eta^2 = 0,60$ при $p \leq 0,05$.

Також ми порівнювали зміну ваги тіла експериментальних тварин протягом 22 діб експерименту (рисунок 5).

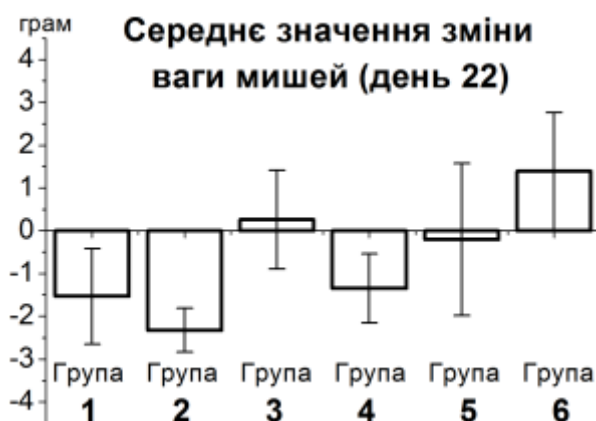


Рис. 5. Зміна ваги у мишей з експериментальними опіками під впливом окремих досліджуваних композицій. Показник впливу $\eta^2=0,66$ при $p \leq 0,05$

Якщо брати до уваги лише групи, в яких тварини в процесі експерименту піддавалися терапії, то тільки в групі 3 (композиція "карбопол + DMEM + клітини лінії 4BL"), спостерігався сумарний приріст ваги тіла мишей.

Порівняння можливостей терапевтичного використання клітин людини різних ліній та їхніх похідних у складі карбополових гідрогелів. Ми вирішили порівняти можливості терапевтичного використання клітин людини різного походження, а саме ліній 4BL, E8, A102, а також БКС, кондиційованих цими типами клітин. В експерименті використовували самців мишей лінії ICR, які були поділені на 7 груп по 6 тварин в групі. Карбополові гідрогелі з різними наповненнями правили за досліджувані терапевтичні препарати.

Показано, що біоконструкція з клітинами лінії 4BL проявляла максимальну терапевтичну ефективність на перших етапах загоєння опікової рани ($\eta^2=0,07$, $p \leq 0,05$, при сумарному впливі впорядкованих чинників на цій стадії опікової хвороби $\eta^2=0,17$). Ефективність біоконструкції з клітинами лінії E8 виявлялася лише після 5-ї доби застосування ($\eta^2=0,10$, $p \leq 0,05$). Біоконструкція з клітинами лінії A102 впливала на швидкість загоєння ран однаково протягом всього експерименту ($\eta^2=0,07$, $p \leq 0,05$) (рисунок 6).

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 $\eta^2=0,33$, відповідно; $p \leq 0,05$).

В групах, де ми застосовували біоконструкції з клітинами ліній 4BL та E8, у половини тварин загоєння рани наставало на 16-17 добу. В групі, де нами були застосовані біоконструкції з клітинами лінії A102, у половини тварин загоєння рани наставало на 18-19 добу. В контрольній групі загоєння ран у тварин почалося із 17 доби експерименту, а половина тварин повністю одужала

лише на 20-22 добу. У той же час у двох тварин з групи, де використовувалися клітини лінії E8, час повного загоєння ран становив 25 діб, тоді як навіть в контрольній групі максимальна тривалість загоєння рани складала 24 доби. Також в групі тварин, де використовувалися клітини лінії E8, спостерігалася незначна, але ненульова смертність тварин.

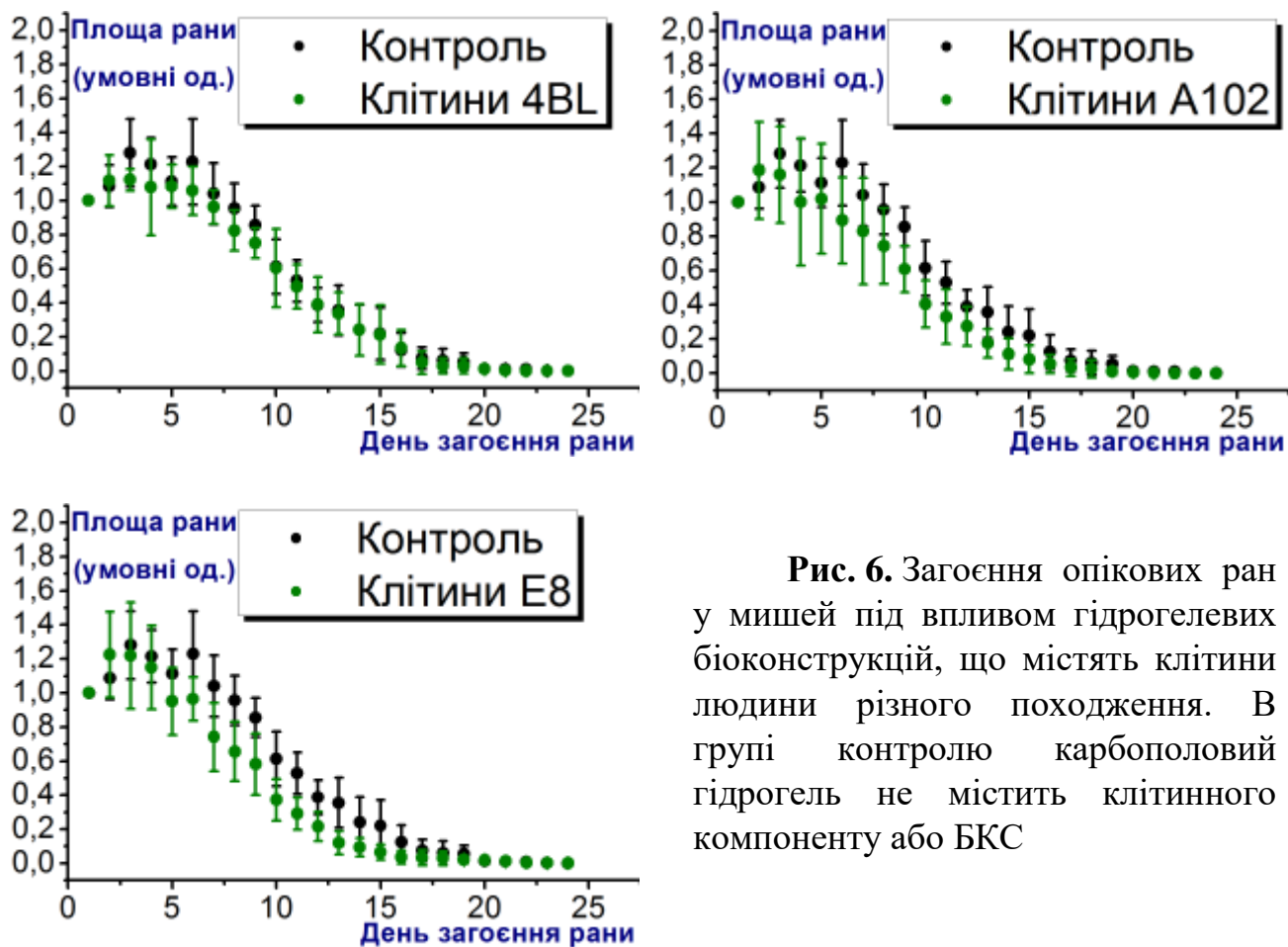


Рис. 6. Загоєння опікових ран у мишей під впливом гідрогелевих біоконструкцій, що містять клітини людини різного походження. В групі контролю карбополовий гідрогель не містить клітинного компоненту або БКС

Порівняння терапевтичної дії живих клітин різного походження і культуральних середовищ, кондиційованих відповідними клітинами. Ми порівняли терапевтичні властивості препаратів, які містять живі клітини трьох зазначених вище ліній, з терапевтичними властивостями таких препаратів, які замість клітин містять зразки культуральних середовищ, кондиційованих клітинами відповідних ліній (рисунок 7).

Гідрогелевий безклітинний препарат, приготований з використанням БКС-4BL, був значно ефективніший ($\eta^2=0,07$, $p \leq 0,05$) за відповідний клітиновмісний препарат на всіх етапах загоєння рани і загалом найефективніший з усіх досліджених в цьому експерименті препаратів. Безклітинний препарат на основі БКС-E8 виявився менш ефективним, ніж той, що містив клітини тієї ж лінії ($\eta^2=0,03$, $p \leq 0,05$ за результатами двохфакторного дисперсійного аналізу). І, нарешті, ми не виявили різницю між ранозагоювальними властивостями препарату з клітинами лінії A102 і препарату з БКС-A102.

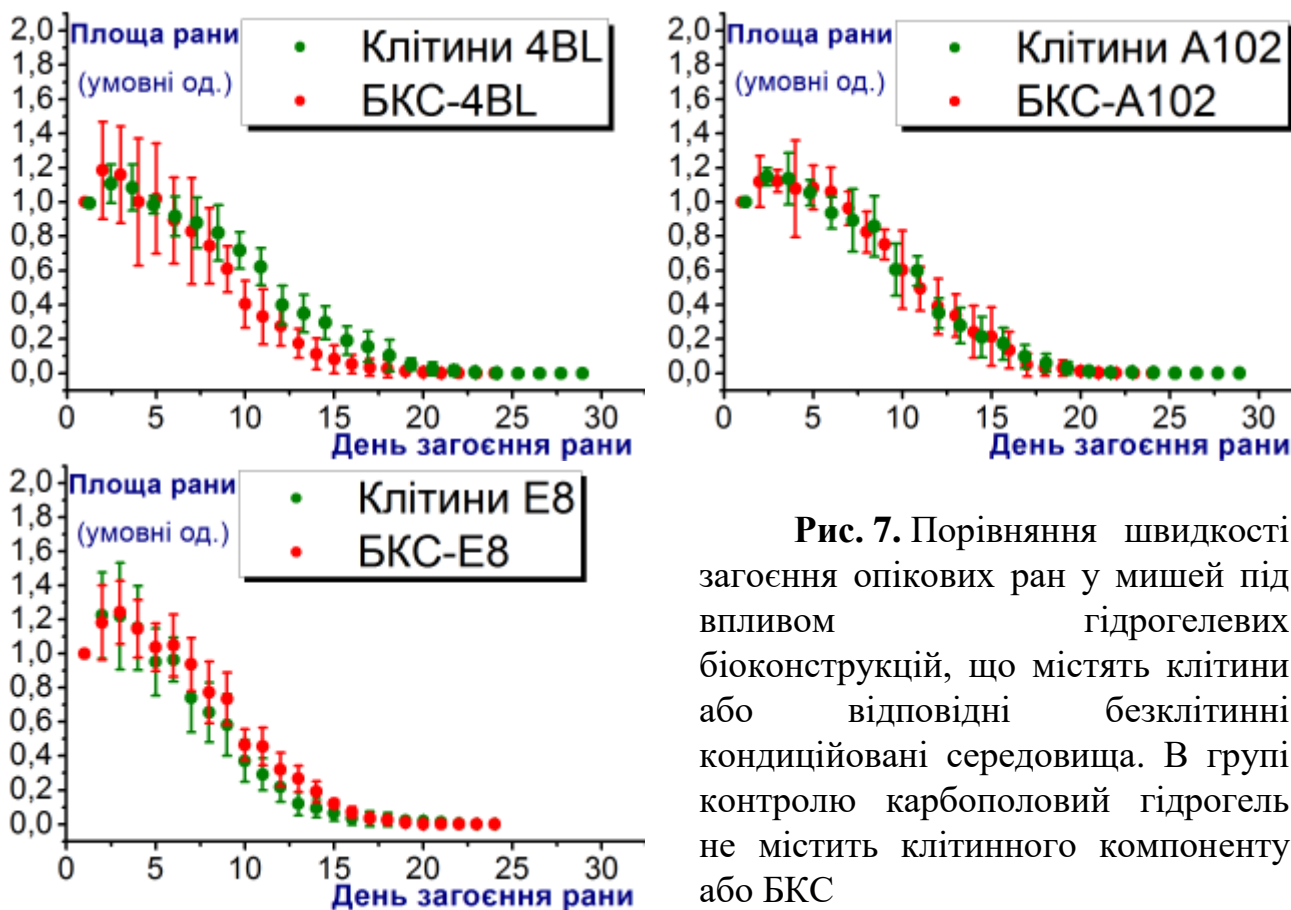


Рис. 7. Порівняння швидкості загоєння опікових ран у мишей під впливом гідрогелевих біоконструкцій, що містять клітини або відповідні безклітинні кондиційовані середовища. В групі контролю карбополовий гідрогель не містить клітинного компоненту або БКС

Терапевтична дія культуральних середовищ, кондиційованих живими клітинами різного походження. Якщо проаналізувати динаміку загоєння ран в тих групах, де використовувалися гідрогелеві препарати, які замість клітин містять зразки середовищ, кондиційованих клітинами відповідних ліній (рисунок 8), то ми побачимо, що найефективнішим щодо загоєння опікових ран у мишей виявився препарат, який містив середовище, кондиційоване стовбуровими клітинами лінії 4BL.

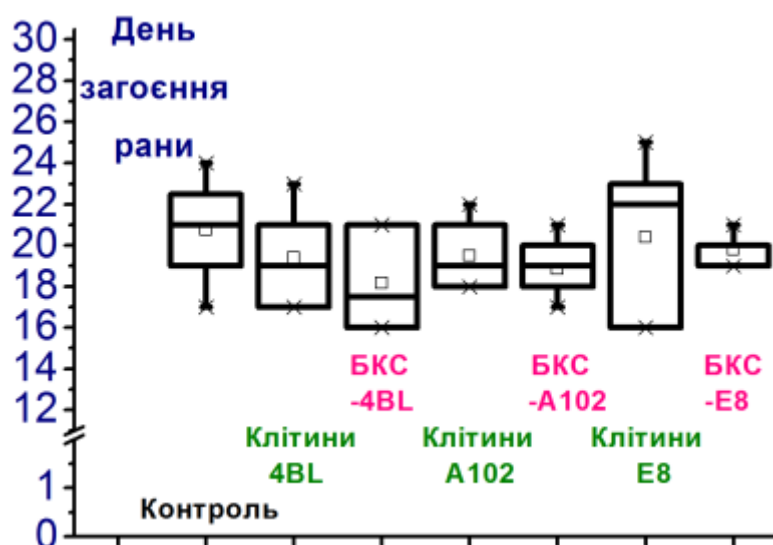


Рис. 8. Тривалість загоєння опікових ран у мишей під впливом біотехнологічних препаратів на основі карбополового гідрогелю

Подальші дослідження терапевтичної дії клітин лінії 4BL та культурального середовища, кондиційованого цими клітинами. Стандартна процедура підтвердження ефективності потенційних лікарських препаратів передбачає їх тестування не менш, ніж на двох видах лабораторних тварин. Вище було показано, що найкращі терапевтичні результати досягаються при використанні біоконструкцій, які містять або клітини лінії 4BL, або БКС-4BL. Ми вирішили провести ще одне тестування ранозагоювальної здатності цих двох біологічно активних агентів *in vivo* на моделі опікової хвороби у лабораторних щурів лінії Wistar (рисунок 9).

Оскільки наші карбополові гідрогелі мають певні антисептичні властивості, то динаміка загоєння ран в групі контролю носія суттєво відрізнялася у кращій бік від динаміки загоєння в групі інтактного контролю: $\eta^2=0,42$ при $p \leq 0,05$ вже в першій декаді досліду, а в подальшому різниця між показниками у цих двох групах лише зростала. Тому ми обчислювали ранозагоювальну дію досліджуваних препаратів не відносно інтактного контролю, а відносно контролю носія.

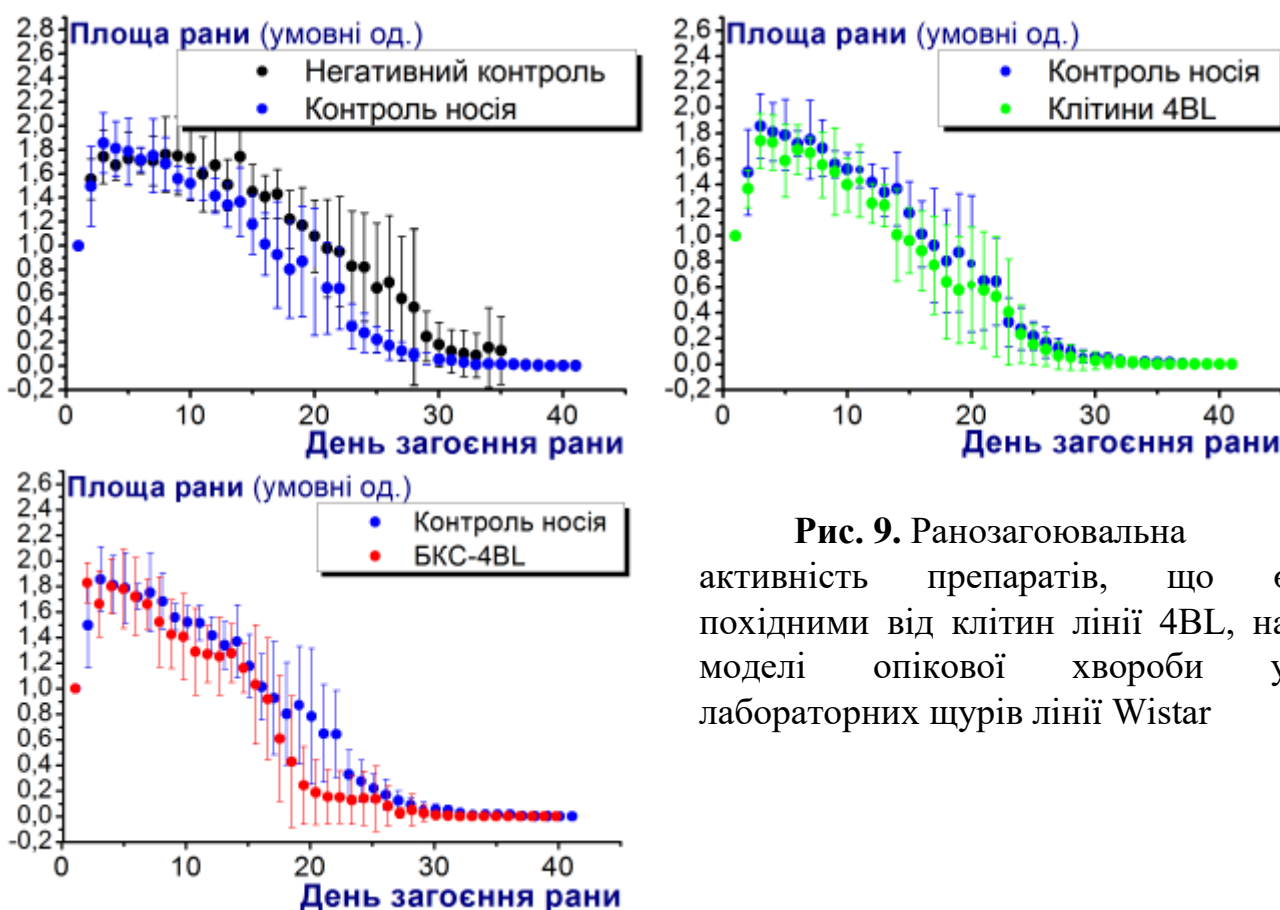


Рис. 9. Ранозагоювальна активність препаратів, що є похідними від клітин лінії 4BL, на моделі опікової хвороби у лабораторних щурів лінії Wistar

Результати дисперсійного аналізу динаміки загоєння опікових ран (таблиця 3) вказують на те, що обидва препарати – клітиновмісний і безклітинний – позитивно впливали на динаміку регенерації шкіри протягом всього періоду загоєння ран.

Результати дисперсійного аналізу динаміки загоєння опікових ран ($p \leq 0,05$)

Чинник	Спосіб лікування	Час	Взаємодія
1 декада досліджу	0,35	0,31	0,34
2 декада досліджу	0,37	0,27	0,37
3 декада досліджу	0,02	0,79	0,19

Васкуляризація ложа рани в дослідженні ранозагоювальної активності клітин лінії 4BL та культурального середовища, кондиційованого цими клітинами, у лабораторних щурів лінії Wistar. Під час експерименту з порівняння ранозагоювальної активності клітин лінії 4BL та культурального середовища, кондиційованого цими клітинами, ми також провели мікроскопічне дослідження ложа опікової рани у щурів з метою визначити, чи впливає клітиновмісний препарат або препарат, що містить БКС на утворення судин в процесі загоєння опікових ран (рисунок 10).

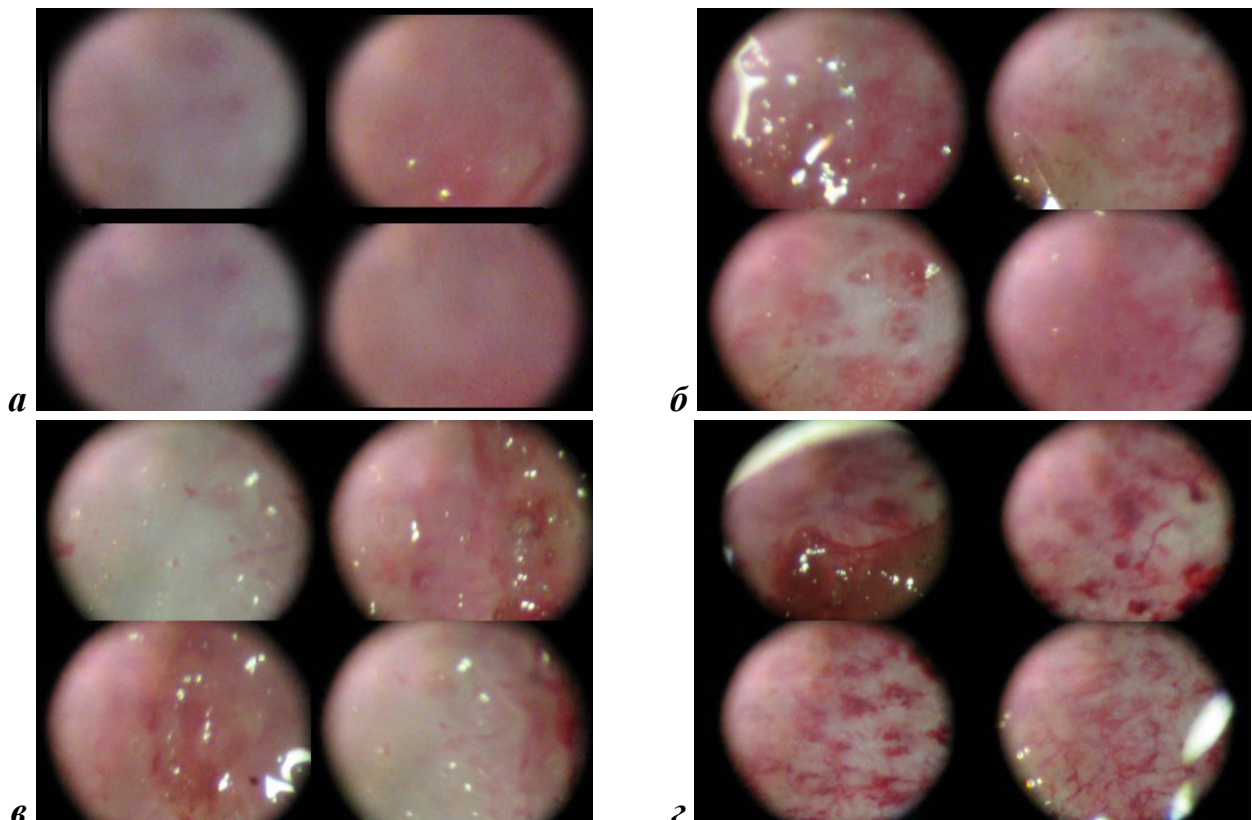


Рис. 10. Стимуляція капіляроутворення у ложі рани під дією живих клітин лінії 4BL та безклітинного кондиційованого середовища (БКС-4BL). *а* - Контрольна група. *б* - Група з контролем носія. *в* - Група з перевіркою дії живих клітин. *г* - Група з перевіркою дії БКС-4BL

Мікроскопічне спостереження ранової поверхні здійснювалося на 7-й день експерименту після штучного видалення струпа. В контрольній групі не спостерігалось утворення нових капілярів у ложі рани. В групі з контролем носія і в групі з перевіркою дії живих клітин 4BL було помічено утворення

окремих капілярів. В групі з перевіркою дії безклітинного кондиційованого середовища спостерігалася більш інтенсивна васкуляризація. В цій групі, на наш погляд, ефект капіляроутворення був найзначнішим.

Рівень протеїнів VEGF, NGF, MMP2 та HIF-1 α в шкірі лабораторних щурів лінії Wistar при дослідженні ранозагоювальної активності клітин лінії 4BL та відповідного БКС-4BL. Наприкінці експерименту з порівнянням ранозагоювальної активності клітин лінії 4BL та культурального середовища, кондиційованого цими клітинами (БКС-4BL), ми також провели дослідження вмісту таких ростових/регуляторних чинників, як VEGF, NGF, MMP2 та HIF-1 α , у шкірі тварин після загоєння опікових ран (таблиця 4). В шкірі тварини, що отримували лікування препаратами, які містять або клітини лінії 4BL, або зразки кондиційованого ними середовища, спостерігалось статистично достовірне зниження вмісту регуляторних білків MMP2 та HIF-1 α .

Таблиця 4

Вміст VEGF, NGF, MMP2 та HIF-1 α в шкірі тварин
після загоєння опікових ран ($p \leq 0,05$)

Група тварин	VEGF УО/мг білку	NGF УО/мг білку	MMP2 УО/мг білку	HIF-1 α УО/мг білку
Здорові тварини	0,48 \pm 0,05	0,43 \pm 0,09	0,38 \pm 0,07	0,39 \pm 0,08
Інтактний контроль	0,54 \pm 0,04	0,58 \pm 0,04	0,59 \pm 0,03	0,59 \pm 0,04
Контроль носія	0,52 \pm 0,02	0,56 \pm 0,03	0,55 \pm 0,05	0,58 \pm 0,04
Клітини 4BL	0,49 \pm 0,06	0,53 \pm 0,07	0,30 \pm 0,04	0,35 \pm 0,06
БКС-4BL	0,52 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	0,44 \pm 0,13	0,41 \pm 0,13

Примітки: УО – умовні одиниці

Дослідження можливого впливу конфлюентності клітинного моношару на властивості безклітинного кондиційованого середовища. Щоб дослідити залежність терапевтичних властивостей БКС від ступеню конфлюентності клітинного моношару, ми напрацювали зразки БКС-4BL, використовуючи три варіанта стану культури лінії 4BL: а) початок стадії активної проліферації – конфлюентність $\approx 30\%$; б) стан активної проліферації – конфлюентність $\approx 50\%$; в) близькість до стану контактного інгібування – конфлюентність $\approx 97\%$.

Стимулювання метаболічної активності клітин лінії 4BL під впливом БКС досліджували з використанням МТТ-тесту. В лунки 96-лункового планшета додавали зразки БКС, що знімали при різному стані клітин В контрольні лунки додавали DMEM-HG без сироватки. Аналіз результатів експерименту показує, що різниця між стимулювальною активністю зразків БКС, отриманими з використанням культур на різних стадіях росту, не була статистично достовірною. Отже, ймовірно, і терапевтичні властивості зразків БКС-4BL не різняться.

Дослідження можливого впливу температурних умов зберігання безклітинного кондиційованого середовища на його властивості. Протягом одного тижня ми зберігали аліквоти БКС при різних температурних умовах, а саме: а) при -80°C (лабораторний кельвінатор); б) при -20°C (лабораторна морозильна камера); в) при $+4^{\circ}\text{C}$ (лабораторний холодильник); г) при $+20^{\circ}\text{C}$.

За допомогою МТТ-тесту ми перевірили здатність зразків, що зберігалися за різних умов, стимулювати метаболічну активність клітин лінії 4BL. Позитивним контролем був зразок свіжовиробленого БКС-4BL. Аналіз результатів експерименту показує наявність залежності стимулювальних властивостей зразків БКС від температурних умов його зберігання. Зберігання при -20°C дещо знижує стимулювальні властивості БКС у порівнянні зі зразками, котрі зберігалися при -80°C . Зі зростанням температури зберігання зразка БКС спостерігалася подальша його інактивація. Дисперсійний аналіз числових даних підтверджує статистично достовірний характер різниці стимулювальних властивостей БКС ($\eta^2=0,51$, $p\leq 0,05$) при різних умовах.

ВИСНОВКИ

З використанням клітинних технологій створено нові штучні еквіваленти дермального шару шкіри на основі щільних носіїв (колагенові і поліакриламідні мембрани) та м'яких гідрогелевих субстратів (желатин, карбопол) з включенням стовбурових клітин людини або кондиційованих цими клітинами середовищ. Показано, що життєздатні клітини оригінальної лінії 4BL і, особливо, безклітинне культуральне середовище, кондиційоване клітинами цієї лінії (БКС-4BL), є ефективними біологічно активними компонентами досліджуваних конструкцій, що стимулюють загоєння опікових ран у модельних тварин та можуть використовуватись для вироблення біотехнологічних дермальних еквівалентів з метою подальшого застосування в медицині.

1. Показано, що адаптована колагенова плівка "Білкозин" є найпридатнішою матрицею з трьох досліджених щільних матеріалів (поліакриламідні гідрогелеві матриці, целюлозні біоплівки симбіотичного організму *Medusomyces gisevi* і комерційна колагенова плівка), що можуть бути носіями біологічно активних клітинних компонентів при виробленні біотехнологічних тимчасових дермальних еквівалентів.

2. Встановлено, що карбополовий гідрогель, приготований із застосуванням стандартного культурального середовища DMEM-HG, може слугувати субстратом для іммобілізації клітин і підтримувати їх життєдіяльність на високому рівні протягом певного часу.

3. Вперше продемонстровано виразну ранозагоювальну здатність на моделі опікових ран у тварин, яку виявляють саме життєздатні клітини лінії 4BL, іммобілізовані у гідрогелі карбополу, на відміну від лізату клітин цієї лінії у складі відповідної біоконструкції.

4. Вперше проведено порівняльне дослідження терапевтичної дії клітин людини трьох установлених ліній, імобілізованих у гідрогелі карбополу, з використанням моделі опікових ран у тварин, і показано, що ранозагоювальна властивість притаманна клітинам різного походження, але більш ефективною є оригінальна клітинна лінія 4BL, яка стимулює загоєння ран на ранніх стадіях.

5. Порівняння терапевтичної ефективності клітин різних ліній та відповідних БКС на двох моделях опікових ран у тварин (миші, щури) дозволило встановити, що найвиразніший терапевтичний ефект виявляє безклітинне середовище, кондиційоване клітинами лінії 4BL (БКС-4BL), у складі карбополового гідрогелю.

6. Вперше виявлено стимуляцію капіляроутворення у ложі рани при терапії опікових ран за допомогою м'яких біоконструкцій, що містять безклітинне кондиційоване середовище БКС-4BL. При цьому при застосуванні м'яких біоконструкцій, що містять клітини лінії 4BL або безклітинне кондиційоване середовище БКС-4BL, в тканинах шкіри спостерігається статистично достовірне зниження вмісту регуляторних білків MMP2 та HIF-1 α майже до рівня, притаманного здоровим тваринам, що може свідчити про гальмування запального процесу і більш раннє завершення першої фази загоєння рани.

7. Отримано дані, які свідчать про те, що ступінь конфлюентності моношару клітин лінії 4BL в культурі, яка використовується для виробництва БКС, імовірно, не має суттєвого значення для прояву ранозагоювальних властивостей цього біологічного фактору. Показано, що напрацьовані зразки рідкого біоматеріалу БКС-4BL мають зберігатися у замороженому стані, притому оптимальним є глибоке заморожування та зберігання їх при -80°C .

СПИСОК НАУКОВИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях:

1. Папуга А. Е., Лукаш Л. Л. Современные дермо-эпидермальные кожные эквиваленты // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Сбірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. – Київ, ЛОГОС, 2012. – Т. 3. – С. 342-347 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, написання статті та підготування її до друку*).

2. Папуга А. Е., Самченко Ю. М., Ульберг З. Р., Рубан Т. А., Козинец Г. П., Лукаш Л. Л. Искусственный эквивалент кожи на основе акриловых гидрогелей с иммобилизованными наночастицами серебра и клетками человека // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 15. – С. 121-124 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підготовка гідрогелевих зразків до культивування клітин на них, культивування клітин, дослідження проліферації та морфології клітин, аналіз отриманих результатів, написання статті та підготування її до друку*).

3. Papuga A. Ye., Lukash L. L. Different types of biotechnological wound coverages created with the application of alive human cells // Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31,

№2. – Р. 83-96 (*Особистий внесок здобувача: пошук та аналіз літературних джерел, написання статті та підготування її до друку*).

4. **Папуга А. Е.**, Самченко Ю. М., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Коломиец Ю. Н., Зенич А. В., Уварова И. В., Ульберг З. Р., Лукаш Л. Л. Влияние наночастиц и ионов металлов на выживаемость и пролиферацию стволовых клеток человека *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2015. – Т. 17. – С. 225-229 (*аналіз літературних джерел, культивування клітин, участь у дослідженні проліферації клітин, аналіз отриманих результатів, написання статті та підготування її до друку*).

5. **Папуга О. Є.**, Мацевич Л. Л., Рубан Т. П., Лукаш Л. Л. Дослідження ефективності дермальних еквівалентів, призначених для лікування тяжких опікових ран // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 19. – С. 172-175 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, культивування клітин та напрацювання клітинної біомаси, створення біоконструкцій, котрі досліджуються (на той момент їх сутність не була розкрита через підготовку до отримання патенту), робота з тваринами, контроль загоєння ран, аналіз отриманих результатів, участь у написанні статті та підготуванні статті до друку*).

6. 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 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, культивування клітин та напрацювання клітинної біомаси, отримання кондиційованого культурального середовища, створення гідрогелевих біоконструкцій, робота з тваринами, контроль загоєння ран, участь у аналізі отриманих результатів, участь у написанні статті та підготуванні статті до друку*).

7. Мацевич Л. Л., **Папуга О. Є.**, Рубан Т. П., Берегова Т. В., Лукаш Л. Л. Оптимізація виготовлення клітиновмісних дермальних покриттів для лікування опіків на моделі *in vivo* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2018. – Т. 22. – С. 287-292 (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, культивування клітин та напрацювання клітинної біомаси, отримання кондиційованого культурального середовища та лізату клітин, створення гідрогелевих біоконструкцій, робота з тваринами, контроль загоєння ран, лабораторні маніпуляції з клітинами і гідрогелем, участь у аналізі отриманих результатів, участь у написанні статті та підготуванні статті до друку*).

Патенти:

8. Спосіб одержання тимчасового еквіваленту дермального шару шкіри. Патент України на винахід №112584, опубліковано 26.09.2016. **Папуга О. Є.**, Рубан Т. П., Мацевич Л. Л., Лукаш Л. Л., Лукаш С. І. Власник патенту: ІМБГ НАН України (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, культивування клітин та напрацювання клітинної біомаси, лабораторні маніпуляції з плівкою "Білкозин", створення біоконструкцій, робота з тваринами, контроль загоєння ран, участь у аналізі отриманих результатів, підготування тексту патенту*).

9. Спосіб одержання тимчасового пластичного раневого [Так в тексті патенту. – О.П.] покриття «гель-клітина» для лікування опікових ран. Патент на корисну модель №127876, опубліковано 27.08.2018. **Папуга О. Є.**, Лукаш Л. Л., Берегова Т. В., Мацевич Л. Л., Рубан Т. П. Медведєва Н. С. Власник патенту: ІМБГ НАН України

(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, культивування клітин та напрацювання клітинної біомаси, отримання кондиційованого культурального середовища та лізату клітин, створення гідрогелевих біоконструкцій, робота з тваринами, контроль загоєння ран, участь у аналізі отриманих результатів, підготування тексту патенту).

Тези наукових доповідей на конференціях:

10. Папуга О. Є., Лукаш Л. Л., Рубан Т. О. Вивчення можливості використання зооглеї гриба *Medusomyces gisevi* у біотехнологічних конструкціях // Конференція молодих вчених “Актуальні аспекти біохімії та біотехнології – 2012”, 22-23 травня 2012, Київ.

11. **Papuga A. Ye.**, Samchenko Yu. M., Ruban T. A., Lukash L. L.. Тези доповіді: Development of dermal equivalents contained living cells for the treatment of massive burns of human skin // Materials of VII Annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine dedicated to 175 Anniversary of O.Ya.Danylevsky. 28-29 May 2013 // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29 (Special Issue). – P. 18.

12. Vasylyeva M. S., Malysheva M. L., Samchenko Yu. M., **Papuga A. Ye.** Hydrogel nanocomposites with silver nanoparticles. Proceedings of the VII International scientific conference “Kiev-Toulouse” (Kyiv, 2-7 June 2013) // French-Ukrainian Journal of Chemistry. – 2013. – Volume 1, Issue 1. – P. 69-71.

АНОТАЦІЯ

Папуга О. Є. Розробка дермальних еквівалентів шкіри з використанням клітин людини і нових біоматеріалів для лікування масивних опіків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія». – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2021.

Основною метою роботи було розробити нові біоконструкції (біотехнологічні дермальні покриття або еквіваленти дерми) з використанням клітин людини та їхніх похідних і носіїв, виготовлених із різних біоматеріалів, для лікування термічних опіків шкіри.

У даній роботі нами вперше встановлено, що живі клітини лінії 4BL, що є лінією дорослих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) людини і була отримана у відділі генетики людини ІМБГ НАН України з периферійної крові здорового донора, а також безклітинне культуральне середовище (БКС), кондиційоване клітинами 4BL при їх культивуванні *in vitro* (БКС-4BL), у поєднанні з такою м'якою лікарською формою, як гідрогель на основі штучного полімеру карбополу (карбомеру), дозволяють створити новий перспективний біотехнологічний продукт. Показано, що отримані нові пластичні біоконструкції, як і біоконструкції на основі колагенових і поліакриламідних матриць-мембран із включенням клітин або їхніх похідних здатні стимулювати регенерацію тканин під час загоєння

опікових ран у модельних тварин (миші, щури). При цьому терапевтичне використання БКС-4BL є більш вигідним як в плані ранозагоювальної здатності, так і в плані зручності зберігання.

Вказані біоконструкції або такі їх компоненти, як живі клітини лінії 4BL або безклітинне культуральне середовище, кондиційоване клітинами лінії 4BL (БКС-4BL), можуть бути застосовані для виробництва тимчасових штучних еквівалентів дермального шару шкіри. В перспективі отримані нами результати можуть використовуватись для створення нових біоконструкцій, які можуть стати об'єктом доклінічних досліджень в спеціальній акредитованій лабораторії, а в подальшому бути допущені до клінічних випробувань у опікових відділеннях закладів охорони здоров'я України з метою лікування опікової хвороби та пошкоджень шкіри іншого генезу.

Ключові слова: клітинна біотехнологія, заміник шкіри, еквівалент дерми, ранове дермальне покриття, стовбурова клітина, ММСК, МСК, кондиційоване середовище, опікова рана.

SUMMARY

Papuga A. Ye. Development of dermal skin equivalents using human cells and new biomaterials for the treatment of massive burns. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

In this research we compared the properties of three types of the dense materials suitable to be cells carriers at the creation of temporary artificial dermal equivalents. It has been established that shortcomings of modified polyacrylamide hydrogel matrixes are, at first, a decrease of transparency of those hydrogels owing to the introduction of inorganic nanoparticles into their structure, and secondly, a certain degree of fragility of the humidified flat hydrogel fragments. It has been found that main shortcoming of a symbiotic organism *Medusomyces gisevi* is the fact that living cells are not capable to be spread and survived normally on this matrix what raises doubts in their normal metabolic activity in such conditions. Finally it has been established that the commercial collagenic film "Belkozin" is the most suitable matrix from three checked options for creation of temporary artificial dermal equivalents. It has been supported by our results that application of the temporary dermal equivalent with structure "belkozin + gelatin + living cells" on burn wounds of model animals stimulates regeneration of a dermal layer of skin and epithelium restoration.

We have shown also that the hydrogel of carbopol (carbomer) prepared with using DMEM-HG culture medium can serve as the volume carrier of living cells and support their life within several hours. However, we consider that for better maintaining the cells viability it is necessary to carry out a combination of hydrogel and the cellular component *ex tempore*, just before its application. It is important that the presence of antibiotics in the carbopol hydrogel prepared with using DMEM-HG

culture medium (which, in fact, contains antibiotics) gives some bactericidal, bacteriostatic and fungistatic properties for the finished bioconstructions, what might prevent wound infection and thus reveal a positive effect on the healing process.

We compared the wound-healing properties of such components of plastic carbopol hydrogel bioconstructions, as cells of three established lines (4BL, E8, A102) and cell-free conditioned mediums (CFCM), which have been produced by cultivating cells of these three lines (CFCM-4BL, CFCM-E8, CFCM-A102). The most effective for wound-healing in animals among all of six studied biostructures were ones which include either 4BL cells or CFCM-4BL.

It has been shown by us that the treatment of burn wounds using carbopol hydrogel biostructures loaded with the cells of 4BL line or with the corresponding cell-free medium conditioned by cells of 4BL line (CFCM-4BL), are accompanied, at first, by stimulation of capillary formation in the wound bed, and secondly, by a statistically significant decrease of regulatory proteins MMP2 and HIF-1 α levels in blood, almost to the level inherent in healthy animals, which may indicate an inhibition of the inflammatory process and earlier completion of the first phase of wound-healing. It should be noted that the stimulating effect of wound-healing induced by the cell-free conditioned medium was much stronger than by the cells.

It has been found that the degree of 4BL cells confluence during their cultivation and production of the cell-free conditioned mediums is not significant for the expression of their regenerative wound-healing properties. The prepared conditioned medium should be stored in a frozen state, and deep freezing and storage of the obtained CFCM at -80°C is optimal, at the same time storage in a standard freezer at -20°C is less good but acceptable.

Thus, the main results of this work are: a) creation of new biotechnological products, namely the dermal equivalents with the inclusion of human cells or their derivatives (cell-free conditioned mediums); b) preclinical studies of new dermal equivalents to determine their therapeutic efficacy and safety *in vivo* with using model animals; c) a method of obtaining these biotechnological products was patented. It has been shown that the new wound dressings promote burn wounds healing in experimental animals when applied to the wound surface.

The most important result from the point of view of both science and practice, is the establishment of the fact that cell-free conditioned media, produced by stem cells *in vitro*, can be used instead of living cells in the manufacture of dermal equivalents. For the first time it has been shown that CFCM samples conditioned by 4BL cells have a positive effect on the organism, and are stimulating regenerative processes at the most important early stage of burn wound-healing in model animals (mice, rats). The use of CFCM greatly simplifies and makes more economical the biotechnology for obtaining and using new dermal equivalents.

In the prospects, new bioconstructions developed by us might be the subject of preclinical studies at special accredited laboratory, and on the next step they might be admitted to clinical trials in burn departments of health care institutions of Ukraine to treat burns and other skin lesions.

Key words: Cell biotechnology, skin substitute, dermal equivalent, wound dermal coverage, stem cell, MMSCs, MSCs, conditioned medium, burn wound.