

**Інститут молекулярної біології і генетики
Національної академії наук України**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПАПУГА Олександр Євгенійович

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

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗРОБКА ДЕРМАЛЬНИХ ЕКВІВАЛЕНТІВ ШКІРИ
З ВИКОРИСТАННЯМ КЛІТИН ЛЮДИНИ І НОВИХ БІОМАТЕРІАЛІВ
ДЛЯ ЛІКУВАННЯ МАСИВНИХ ОПСКІВ

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ О. Є. Папуга

Науковий керівник:

Лукаш Любов Леонідівна,
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2021

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.

Масивні опікові рани залишаються однією з актуальних проблем сучасної медицини, незважаючи на те, що методи, засоби і тактика лікування постраждалих від опіків мають багатовікову історію. Опікові ураження є одним із найпоширеніших видів травм і погіршують життя мільйонів людей на планеті. Близько 6 млн осіб з опіками щорічно потребують медичної допомоги. 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. Приблизно половина тяжких опікових уражень – це опіки у дітей, серед яких, у свою чергу, 50-80% випадків припадають на дітей віком до 5 років. 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.

За останні півстоліття результати лікування пацієнтів з опіками суттєво покращилися, все ж терапія масивних опікових ран залишається значною проблемою. При наявності опіків ступеню IIIb і IV, коли в окремих місцях повністю втрачено не тільки епідермальний, але і дермальний шар шкіри, необхідно використовувати аутодермопластику або аутодермотрансплантацію. Однак вказаний метод не дозволяє закрити всю поверхню рани навіть при використанні перфорованих аутодермотрансплантантів, якщо загальна площа ран перевищує 30-40% поверхні тіла. Це призвело до впровадження різноманітних штучних ранових покриттів у арсенал сучасного комбустіолога,

серед яких 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. Досі не винайдено ідеальних тимчасових заміників шкіри, тому зусилля біотехнологів всього світу спрямовані на пошук нових шляхів до вирішення цього важливого завдання. На сьогодні серед науковців перспективним напрямом вважається використання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) або мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) людини. Отже, надзвичайно актуальною у наш час залишається розробка та впровадження в клінічну практику нових біотехнологічних ранових покриттів, серед яких значне місце займають дермальні еквіваленти як такі, котрі використовуються задля терапії найнебезпечніших опікових ран, а саме масивних опіків ступеню III^b і IV.

Таким чином, основною метою нашої роботи є розробка нових біоконструкцій (біотехнологічні ранові покриття або еквіваленти дерми) для лікування термічних опіків шкіри з використанням клітин людини, що культивуються, і носіїв, виготовлених з різних біоматеріалів.

Ми провели порівняння властивостей трьох типів щільних матеріалів, придатних бути носіями клітин для створення тимчасових штучних дермальних еквівалентів. Нами встановлено, що недоліками поліакриламідних гідрогелевих матриць є, по-перше, зниження прозорості гідрогеля внаслідок введення до його складу неорганічних наночастинок, а по-друге, певний ступінь крихкості зволжених плоских гідрогелевих фрагментів. Встановлено, що недоліками симбіотичного організму *Medusomyces gisevi* є той факт, що живі клітини не здатні нормально розпластуватися на цій матриці, і це викликає сумніви в тому, що прояви їх життєдіяльності будуть такими, які притаманні цим клітинам в нормальних умовах. Встановлено, що колагенова плівка "Білкозин" є найбільш придатною матрицею з трьох перевірених варіантів для створення тимчасових штучних дермальних еквівалентів.

Нами показано, що аплікація створеного нами тимчасового дермального еквівалента зі структурою "білкозин + желатин + живі клітини" на опікові рани в тваринних моделях стимулює регенерацію дермального шару шкіри і відновлення епітелію.

Ми встановили, що карбополовий гідрогель, приготований із застосуванням культурального середовища DMEM-HG, може слугувати об'ємним носієм живих клітин і підтримувати їх життя протягом кількох годин. Проте ми вважаємо, що задля кращого збереження життєздатності клітин слід проводити поєднання гідрогелю і клітинного компоненту *ex tempore*, безпосередньо перед застосуванням.

Використовуючи тваринну модель опікових ран, встановлено, що стимуляція регенерації тканин після термічного опіку може стимулюватися за допомогою пластичних гідрогелевих біоконструкцій на основі карбомеру, котрі містять клітини лінії 4BL, у той час як позитивний терапевтичний ефект від аналогічних пластичних гідрогелевих біоконструкцій, що несуть у собі лізат клітин лінії 4BL, є суттєво меншим, тобто, на нашу думку, не заслуговує на подальшу увагу.

Ми порівняли (з використанням тваринної моделі опікових ран) ранозагоювальні властивості таких компонентів пластичних гідрогелевих біоконструкцій на основі карбомеру, як клітини трьох встановлених ліній (4BL, E8, A102) і безклітинне кондиційоване середовище (БКС), яке вироблено із застосуванням клітин трьох згаданих ліній (БКС-4BL, БКС-E8, БКС-A102). Зроблено висновок, що найефективнішими серед усіх шости досліджених біоконструкцій виявилися такі, що містять у собі або клітини лінії 4BL, або БКС-4BL. Використовуючи іншу тваринну модель опікових ран, ми підтвердили ранозагоювальну активність клітин лінії 4BL і середовища, кондиційованого клітинами лінії 4BL. Результати нашої роботи доводять, що як самі клітини лінії 4BL, так і зразки кондиційованих середовищ позитивно впливають на процес загоєння термічних ран шкіри (опіки III ступеню).

Нами показано, що терапія опікових ран з використанням карбополових

гідрогелевих біоконструкцій, навантажених клітинами лінії 4BL або середовища, кондиційованого клітинами лінії 4BL (БКС-4BL), супроводжується, по-перше, стимуляцією капіляроутворення у ложі рани, а по-друге, супроводжується статистично достовірним зниженням вмісту в крові 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.

Встановлено, що ступінь конфлюентності клітинної маси лінії 4BL, яка використовується для виробництва БКС-4BL, не має суттєвого значення для ступеня вираженості прорегенераторних властивостей отриманого БКС-4BL. Аналіз експериментальних даних вказує на те, що напрацьоване БКС-4BL має зберігатися у замороженому стані, притому оптимальним є глибоке заморожування отриманого БКС та зберігання його при -80°C (умови, що забезпечуються, наприклад, лабораторним кельвінатором), а менш прийнятним, проте допустимим є зберігання в стандартній морозильній камері при -20°C .

Таким чином, у результаті виконання даної роботи а) створено нові біотехнологічні продукти, а саме дермальні покриття з включенням клітин людини або їхніх похідних (кондиційованих культурою клітин середовищ, внаслідок чого останні містять комплекс біологічно активних речовин, синтезованих клітинами); б) проведено доклінічні дослідження нових еквівалентів дерми з визначення їх терапевтичної ефективності, а також безпечності в експериментах *in vivo*; в) запатентовано спосіб отримання цих біотехнологічних продуктів. Показано, що нові ранові покриття сприяють загоєнню опікових ран у піддослідних тварин при аплікації на ранову поверхню.

Значно важливим з наукової і практичної точки зору є встановлення того факту, що замість живих клітин при виготовленні еквівалентів дерми можуть використовуватись безклітинні середовища (БКС), кондиційовані стовбуровими клітинами *in vitro*. Вперше на модельних тваринах (миші, щури) показано, що зразки БКС, кондиційовані клітинами лінії 4BL, позитивно впливають на

організм, стимулюючи регенеративні процеси на найважливішій ранній стадії загоєння опікових ран. Використання БКС значно спрощує і робить більш економічною технологію отримання і використання нових еквівалентів дерми. В роботі ми виробили технологію отримання пластичних гелевих сумішей з включенням БКС різного походження.

Отже, у даній роботі нами встановлено, що живі клітини лінії 4BL, котра 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 лінії 4BL в процесі штучного культивування останніх (БКС-4BL), можуть бути поєднані з такою м'якою лікарською формою, як гідрогель на основі штучного полімеру карбомеру (карбополовий гідрогель), і отримана пластична біоконструкція здатна стимулювати регенерацію тканин під час загоєння опікових ран. Показано, що терапевтичне використання БКС-4BL є більш вигідним як в плані ранозагоювальної активності, так і в плані зручності зберігання.

Вказані пластичні біоконструкції або такі її складові частини, 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. Таким чином, в перспективі створені нами нові біоконструкції можуть бути об'єктом доклінічних досліджень, а в подальшому, вірогідно, можуть 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, замітник шкіри, еквівалент дерми, ранове дермальне покриття, стовбутова клітина, ММСК, МСК, кондиційоване середовище, опікова рана.

Список наукових публікацій здобувача 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. – P. 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.Danyilevsky. 28-29 May 2013 // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29 (Special Issue). – P. 18.

12. Vasylieva 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.

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.

Massive burn wounds remain one of current problems of modern medicine in spite of the fact that methods, means and tactics of burn victims treatment have centuries-old history. Burn defeats are one of the most widespread types of injuries and worsen life of millions of people on the planet. About 6 million people with burns annually need medical care, and most of them have to be treated in out-patient conditions. According to WHO data, burns take the third place among all types of injuries of peace time and is the reason of annual 180 thousand lethal outcomes around the world most of which happens in the countries with average and low income. About a half of crushing burn defeats are burns at children among those, in turn, 50-80% of cases fall on children under 5 years. In Ukraine burns take the third place among all injuries. Annually 80 thousand people who got burns are registered. Among which children are 10%. Generally, 70% of defeats are burns got in living conditions.

Over the past half-century results of treatment of burn patients significantly improved, but therapy of massive burn wounds remains a considerable problem. In the presence of IIIb degree burns and (or) IV degree burns when in certain places not only an epidermal skin layer, but also dermal skin layer are completely lost, it is necessary to use an autodermoplastika or an autodermotransplantation. However the mentioned method does not allow to close all surface of a wound even when using perforated autodermotransplantantiv if the total wounds area exceeds 30-40% of a body surface. It led to introduction of various artificial wound coverings into an arsenal of a modern kombustiolog among which there are biotechnology wound

coverings containing living cells of various types and origin in the coverings structure. Such biodesigns serve, as a rule, as temporary equivalents of skin or its separate layers (a derma, an epidermis) that provide the damaged patient tissues with biologically active agents which stimulate skin regeneration. So far no perfect temporary skin substitutes have been found, so the efforts of biotechnologists around the world are aimed at finding new ways to solve this important task. For today use of the human multipotentny mesenchymal stromal cells (MMSC) or human mesenchymal stem cells (MSC) is considered the perspective direction. So, presently a development and a deployment in clinical practice of new biotechnology wound coverings is extremely relevant aim for scientists. Dermal equivalents take the important place among these coverings as such which are used for therapy of the most dangerous burn wounds, namely massive burns of IIIb degree and IV degree.

Thus, development of new biodesigns (biotechnology wound coverings or dermal equivalents) for treatment of thermal skin burns using the cultivated human cells and carriers manufactured of various biomaterials for treatment of thermal burns of skin was a main objective of our work.

We compared properties of three types of the dense materials suitable to be cells carriers for creation of temporary artificial dermal equivalents. We established that shortcomings of polyacrylamide hydrogel matrixes is, first, transparency decrease of hydrogel owing to introduction of inorganic nanoparticles into its structure, and secondly, a certain degree of fragility of the humidified flat hydrogel fragments. It is established that shortcomings of a symbiotic organism *Medusomyces gisevi* is the fact that living cells are not capable to be spread normally on this matrix that raises doubts in normality of their activity in such conditions. It is established that the collagenic film "Belkozin" is the most suitable matrix from three checked options for creation of temporary artificial dermal equivalents.

It is shown that applique of the temporary dermal equivalent with structure "belkozin + gelatin + living cells" on burn wounds stimulates regeneration of a dermal skin layer and epithelium restoration in animal models. We established that the carbomer hydrogel prepared with use of DMEM-HG culture medium can serve as

the volume carrier of living cells and support their life within several hours. However, we consider that in order to better maintain the cells viability it is necessary to carry out a combination of hydrogel and the cellular component *ex tempore*, just before use.

It is shown that the presence of antibiotics in the carbomer hydrogel prepared using DMEM-HG culture medium (which, in fact, contains antibiotics) gives the finished hydrogel bioconstruction a certain degree of bactericidal, bacteriostatic and fungistatic properties, which can prevent wound treatment and thus have a positive effect on the healing process.

Using an animal model of burn wounds, it was found that the stimulation of tissue regeneration after thermal burns can be stimulated by carbomer-based plastic hydrogel bioconstructions containing 4BL cells, while the positive therapeutic effect of similar plastic hydrogel bioconstructions with 4BL cells lysate is significantly smaller, i.e., in our opinion, does not deserve further attention.

We compared (using an animal model of burn wounds) the wound-healing properties of such components of plastic hydrogel bioconstructions based on carbomer, as cells of three established lines (4BL, E8, A102) and cell-free conditioned medium (CFCM), which is produced using cells of these three lines (CFCM-4BL, CFCM-E8, CFCM-A102). We concluded that the most effective among all six studied biostructures were ones that are containe either 4BL cells or CFCM-4BL. Using another animal model of burn wounds, we confirmed the wound-healing activity of 4BL cells and cell-free medium conditioned with 4BL cells. The results of our work prove that both the 4BL cells and the samples of cell-free conditioned media have a positive effect on the healing process of thermal skin wounds (IIIb degree burns).

We have shown that the treatment of burn wounds using carbomer hydrogel biostructures loaded with cells of line 4BL or cell-free medium conditioned by cells of line 4BL (CFCM-4BL), is accompanied, first, by stimulation of capillary formation in the wound bed, and at the same time the stimulating effect of the cell-free conditioned medium is much stronger, and second, 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 was found that the degree of 4BL cell mass confluence during the production of CFCM-4BL is not significant for the severity of the CFCM-4BL proregenerative properties. The analysis of experimental data indicates that the earned CFCM-4BL should be stored in a frozen state, and deep freezing and storage at -80°C of the obtained CFCM (conditions provided, for example, by a laboratory kelvinator) is optimal, and storage is less good but acceptable in a standard freezer at -20°C .

Thus, the results of this work are: a) we have created new biotechnological products, namely the dermal coverings with the inclusion of human cells or their derivatives (cell-free conditioned media, those contain a complex of biologically active substances synthesized by cells); b) preclinical studies of new dermal equivalents to determine their therapeutic efficacy and safety within *in vivo* experiments; c) a method of obtaining these biotechnological products was patented. It is shown that the new wound dressings promote healing of burn wounds in experimental animals when applied to the wound surface.

From the point of view of both science and practice, establishment of the fact that cell-free conditioned media, caused by stem cells *in vitro*, can be used instead of living cells in the manufacture of dermal equivalents, is significantly important. For the first time in model animals (mice, rats) it was shown that CFCM samples conditioned by 4BL cells have a positive effect on the organism, stimulating regenerative processes at the most important early stage of burn wound healing. The use of CFCM greatly simplifies and makes more economical technology for obtaining and using new dermal equivalents. In this work, we have developed a technology for producing plastic gel mixtures with the inclusion of CFCM of various origins.

Thus, in this work we found that living 4BL line cells, which is a line of adult human multipotent mesenchymal stromal cells or a line of mesenchymal stem cells (MSCs) and was obtained in the Human Genetics Department of IMBG NAS of

Ukraine from peripheral blood of a healthy donor, that these cells and cell-free conditioned media (CFCM), caused by 4BL line cells in the artificial cultivation process (CFCM-4BL), can be combined with such a semi-solid preparation as a carbomer hydrogel (or carbopol hydrogel based on an artificial polymer carbomer) based on an artificial polymer carbomer (carbopol hydrogel), and the resulting plastic bioconstruction is able to stimulate tissue regeneration during the burn wounds healing. We shown that the therapeutic using of CFCM-4BL is more advantageous both in terms of wound healing activity and in terms of storage simplicity.

These plastic bioconstructions or its components, namely 4BL line living cells or cell-free conditioned media, caused by 4BL cells (CFCM-4BL), can be used for the production of temporary artificial equivalents of the dermal skin layer. Thus, in the prospects, these the new bioconstructions may be the subject of preclinical studies, and in the future, probably, may 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.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation

Papers:

1. Papuga A. Ye., Lukash L. L. Modern dermo-epidermal skin equivalents // Achievements and problems of genetics, selection and biotechnology. Proceedings of the IX Congress of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. – Kyiv, publishing house "Logos", 2012. – 3. – P. 342-347.

2. Papuga A. Ye., Samchenko Yu. M. , Ulberg Z. R., Ruban T. P., Kozinets G. P. , Lukash L. L. Artificial skin equivalent based on acrylic hydrogels with immobilized silver nanoparticles and human cells // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2014. – 15. – P. 121-124.

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. – P. 83-96.

4. Papuga A. Ye., Samchenko Yu. M., Sukhorada O. M., Ruban T. P., Kolomiyets Yu. N., Zenych A. V., Uvarova I. V., Ulberg Z. R., Lukash L. L. Influence of nanoparticles and metal ions on the survival and proliferation of human stem cells *in vitro* // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2015. – T. 17. – C. 225-229.

5. Papuga A. Ye., Macewicz J. J., Ruban T. P., Lukash L. L. A study of the effectiveness of dermal equivalents for the treatment of severe burns // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2016. – 19. – P. 172-175.

6. Macewicz J. J., Papuga A. Ye., Ruban T. P., Lukash L. L. Study of the effectiveness of drugs based on cells and their derivatives for the treatment of severe burns // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2017. – 20. – P. 232-236.

7. Macewicz J. J., Papuga A. Ye., Ruban T. P., Beregova T. V., Lukash L. L. Optimization of the production of cell-containing dermal coverages for the treatment of burns in the *in vivo* model // Factors in Experimental Evolution of Organisms. – 2018. – 22. – P. 287-292.

Patents:

8. A method of obtaining a temporary equivalent of the dermal layer of the skin. Patent of Ukraine for invention №112584, publication was 2016.09.26. Papuga A. Ye., Ruban T. P., Macewicz L. L., Lukash L. L., Lukash S. I.

9. A method of obtaining a temporary plastic wound coverage "gel-cell" for the treatment of burn wounds. Useful model patent №127876, publication was 2018.08.27. Papuga A. Ye., Lukash L. L., Beregova T. V., Macewicz L. L., Ruban T. P., Medvedeva N. S.

Conference abstracts:

10. Papuga A. Ye., Lukash L. L., Ruban T. O. Study of the possibility of using of *Medusomyces gisevi* fungus zoogloea in biotechnological structures // Conference of Young Scientists “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2012”, 22-23 May 2012, Kyiv.

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. Vasylieva 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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	31
1.1. Комерційно доступні ранові покриття	31
1.1.1. Епідермальні еквіваленти	33
1.1.2. Дермальні еквіваленти	36
1.1.3. Дермо-епідермальні еквіваленти (композитні замітники шкіри)	37
1.2. Розробка нових біоінженерних еквівалентів шкіри, що містять клітини	38
1.2.1. Створення матриць з використанням желатину	38
1.2.2. Створення матриць з використанням колагену	40
1.2.3. Створення матриць з використанням хітину / хітозану та інших матеріалів	44
1.2.4. Створення матриць з використанням гіалуронової кислоти	47
1.2.5. Створення матриць з використанням різних синтетичних полімерів	48
1.2.6. Інші матеріали, використовувані для створення матриць ...	49
1.3. Властивості мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) і їх зв'язок з процесами регенерації шкіри	52
1.4. Використання гелеутворювачів для створення м'яких фармацевтичних форм типу мазі з включенням живих клітин	57
1.5. Дослідження на базі відділу генетики людини ІМБГ НАН України	59
1.6. Підсумки до розділу.....	62

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	63
2.1. Створення і використання штучних носіїв клітин і біологічно активних речовин	63
2.1.1. Поліакриламідний гідрогель: синтез і підготовка до експериментів	63
2.1.2. Симбіотичний організм (бактерійно-дріжджове угруповання) <i>Medusomyces gisevii</i> (комбуча, kombucha, чайний гриб): підготовка до експериментів.....	65
2.1.3. Колагенова плівка „Білкозин”: підготовка до експериментів, адаптація до контакту з клітинами	65
2.1.4. Карбополовий гідрогель: синтез і підготовка до експериментів	66
2.2. Клітини і біологічно активні компоненти біоконструкцій, створених у нашій роботі	68
2.2.1. Клітини	68
2.2.2. Культивування клітин <i>in vitro</i>	69
2.2.3. Кріоконсервування клітин і виведення їх із кріоконсервованого стану	69
2.2.4. Отримання клітинних лізатів	70
2.2.5. Отримання безклітинного кондиційованого середовища (БКС)	70
2.3. Визначення якості та ефективності біоконструкцій, створених у нашій роботі.....	71
2.3.1. Визначення життєздатності клітин	71
2.3.2. Підрахунок клітин на поверхні твердого гідрогеля	72
2.3.3. Наночастинки оксиду заліза	73
2.3.4. МТТ-тест метаболічної активності клітин під впливом різних чинників	73
2.3.5. Визначення концентрації низки регуляторних білків у тварин	74

2.3.6. Експериментальні тварини	75
2.3.7. Моделювання опікової хвороби у мишей і щурів	76
2.3.8. Визначення динаміки загоєння опікових ран	77
2.3.9. Програмна і статистична обробка даних	78
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА НОВИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ НОСІЇВ ДЛЯ	
ВИГОТОВЛЕННЯ ТИМЧАСОВИХ ЕКВІВАЛЕНТІВ ДЕРМИ З	
ВКЛЮЧЕННЯМ КЛІТИН ЛЮДИНИ АБО ЇХ ПОХІДНИХ	
79	
3.1. Модифікація поліакриламідного гідрогелю як носія для клітинного компоненту дермального ранового покриття	79
3.2. Використання біоплівки симбіотичного організму <i>Medusomyces gisevii</i> як мембрани-носія для створення тимчасових дермальних еквівалентів	85
3.3. Розробка і дослідження ефективності <i>in vivo</i> тимчасових еквівалентів дерми на основі колагенової плівки „Білкозин”	87
3.3.1. Створення еквівалентів дерми із включенням стовбурових клітин на основі колагенової плівки „Білкозин”	88
3.3.2. Випробування ефективності тимчасових дермальних еквівалентів шкіри на основі колагенової плівки „Білкозин”	89
Підсумки до розділу 3	91
РОЗДІЛ 4. СТВОРЕННЯ ПЛАСТИЧНИХ МАЗЕПОДІБНИХ ГЕЛЕЙ,	
ЩО МІСТЯТЬ КЛІТИНИ ЛЮДИНИ АБО БЕЗКЛІТИННІ	
КУЛЬТУРАЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА, КОНДИЦІЙОВАНІ ЦИМИ	
КЛІТИНАМИ	
94	
4.1. Створення пластичного мазеподібного препарату на основі карбополового гідрогелю	94
4.2. Перевірка біологічної сумісності карбополового гідрогелю і живих клітин	96
4.3. Дослідження терапевтичної ефективності клітиновмісних покриттів на основі карбополового гідрогелю <i>in vivo</i>	98
4.3.1. Експерименти із залученням щурів	98

4.3.2. Експерименти із залученням мишей	100
4.4. Порівняння можливостей терапевтичного використання клітин людини різних ліній та їх похідних у складі карбополових гідрогелей	103
4.4.1. Створення терапевтичних біоконструкцій з використанням клітин трьох ліній та їх похідних, а саме безклітинних середовищ, кондиційованих клітинами	103
4.4.2. Терапевтична дія живих клітин різного походження	104
4.4.3. Терапевтична дія культуральних середовищ, кондиційованих живими клітинами різного походження	106
4.4.4. Порівняння терапевтичної дії живих клітин різного походження і культуральних середовищ, кондиційованих відповідними клітинами	107
4.4.5. Подальші дослідження терапевтичної дії клітин лінії 4BL та культурального середовища, кондиційованого цими клітинами	108
4.4.6. Васкуляризація ложа рани в дослідженні ранозагоювальної активності клітин лінії 4BL та безклітинного культурального середовища, кондиційованого цими клітинами, у лабораторних щурів лінії Wistar	111
4.4.7. 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	112
4.5. Вплив особливостей напрацювання та зберігання безклітинного кондиційованого середовища на його властивості	114
4.5.1. Дослідження можливого впливу конфлюентності клітинного моношару на властивості безклітинного кондиційованого середовища	114
4.5.2. Дослідження можливого впливу температурних умов зберігання безклітинного кондиційованого середовища на його властивості	116
Підсумки до розділу 4	118

РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ	
РЕЗУЛЬТАТІВ	121
ВИСНОВКИ	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	141
ДОДАТОК А. ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	166

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БКС – безклітинне середовище, кондиційоване клітинами *in vitro*.

ДМСО – диметилсульфоксид.

ММСК – Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини.

МСК – Мезенхімальні стовбурові клітини.

МСК-БКС – безклітинне середовище, кондиційоване МСК *in vitro*.

ПЛР – Полімеразна ланцюгова реакція.

СК – Стовбурові клітини.

DMEM-High Glucose – Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose level (4500 mg/l), або культуральне середовище Ігла в модифікації Дюльбеко з високим вмістом глюкози.

FCS – fetal calf serum.

MSCs – Mesenchymal stem cells.

MTT – тетразолієвий барвник 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, або 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенілтетразолиум бромид

РТ-ПЛР – Real-Time ПЛР, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (або кількісна ПЛР).

SCs – Stem cells.

TBS або TBS buffer – Tris-buffered saline, або Трис-НСІ буфер.

TBS-T – Розчин 0,05% Tween 20 у TBS.

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethane, або тріс(гідроксиметил)амінометан.

ВСТУП

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 [1]. 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 [2, 3]. Середній вік людей з опіковою травмою становить 24 роки, а середній розмір опікової рани – 19% загальної площі поверхні тіла [4]. Приблизно половина тяжких опікових уражень – це опіки у дітей, серед яких, у свою чергу, 50-80% випадків припадають на дітей віком до 5 років [5].

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 [6, 7]. 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 [8]. 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 [9].

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 [2, 10].

Хоча за останні півстоліття результати лікування пацієнтів з опіковою хворобою суттєво покращилися [11], 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 винайдено 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, імобілізованих 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, щурі); 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 іммобілізовані 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^б 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 – завідуючій 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 гідрогелів Інституту біоколоїдної 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.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Комерційно доступні ранові покриття

Як було зазначено у вступі, за наявності опіків ступеню III^b і IV закриття великих за площею і одночасно глибоких ран потребує використання аутодермопластики. Брак донорських ресурсів, тобто власних здорових тканин пацієнта, у таких випадках можна подолати завдяки використанню біотехнологічних ранових покриттів або штучних замінників шкіри (еквівалентів шкіри, дермальних або епідермальних еквівалентів), покликаних тимчасово або постійно замінювати пошкоджені або зруйновані ділянки шкіри. Серед них найбільшу увагу лікарів привертають такі, що містять у своєму складі живі клітини різних типів та походження. Результати наукових експериментів свідчать про те, що завдяки використанню таких замінників шкіри пошкоджені тканини пацієнта можуть забезпечуватись біологічно активними речовинами, які стимулюють процес регенерації. У складі клінічно доступних на поточний момент комерційних біоконструкцій, що містять у собі клітини, зазвичай є кератиноцити і фібробласти (або спільно, або один з цих варіантів клітин). Відомо, що у присутності фібробластів краще відбуваються процеси проліферації і диференціювання кератиноцитів, і, в свою чергу, кератиноцити впливають на функціональний стан фібробластів [12]. Показано, що фібробласти виділяють біологічно активні речовини, від яких залежить проліферація і міграція меланоцитів шкіри [13]. Слід зазначити, що всі еквіваленти шкіри, що використовуються у клініці, не містять нервових, імунних клітин, потових залоз і волосяних фолікулів, тому не здатні виконувати всі функції шкіри. Як правило, такі біоконструкції діють як тимчасові біологічно активні покриття для рани, що забезпечують пошкоджені тканини компонентами екстрацелюлярного матриксу, цитокінами і факторами

росту (вітронектин, тенасцін, колаген, глікозаміноглікани, інтерлейкіни 1, 6, 8, інтерферони α і β , PDGF, FGF-1, KGF-1, PDGF, VEGF або судинний ендотеліальний фактор росту, TGF- α) [14, 15]. Завдяки цьому стимулюється міграція власних клітин організму-реципієнта в область рани, їх проліферація, регенерація дермального шару і реепітелізація рани, і в результаті цих процесів ложе рани стає «кондиційованим» для наступної трансплантації донорської шкіри, як правило ауто трансплантації. Це сприяє зменшенню часу загоєння рани і перешкоджає утворенню рубців і шрамів у порівнянні з використанням безклітинних біоактивних ранових покриттів [16].

Використання аутологічних клітин для отримання еквівалентів шкіри усуває можливість імунного відторгнення і інфікування пацієнта зовнішніми мікроорганізмами, однак ускладнює отримання продукту в потрібний момент і у достатній кількості, і крім того, збільшує витрати на його виробництво. З урахуванням цих двох проблем перевагу надають алогенним клітинам сполучної тканини, фібробластам. Про це свідчать повідомлення про тимчасову імуногенну толерантність організму-реципієнта до алогенних фібробластів і їх виживання та проліферацію в донорському організмі протягом до двох місяців без симптомів імунного відторгнення [17, 18]. У той же час алогенні кератиноцити є високо імуногенними, відторгаються організмом і гинуть, як правило, через кілька тижнів після аплікації на рану [19]. Ця більша рання загибель у порівнянні з алогенними фібробластами є, ймовірно, наслідком високого рівня експресії людського лейкоцитного антигена (HLA).

Ідеальний біологічний замітник шкіри має відповідати багатьом вимогам. Можна вказати такі:

- відсутність антигенів, наявність тканинної сумісності,
- відсутність місцевої або системної токсичності,
- непроникність для екзогенних мікроорганізмів,
- інгібування життєдіяльності мікроорганізмів в рані,
- вологопроникність, подібна до такої за умов нормальної шкіри,
- хороша липкість до поверхні рани,

- податливість по відношенню до поверхневих нерівностей,
- еластичність, що не порушує рухливості підлеглих тканин,
- стійкість до лінійних деформацій і деформацій зсуву,
- міцність при розтягуванні,
- здатність до біодеградації,
- тривалий термін і простота зберігання,
- низька собівартість,
- зручність у використанні медперсоналом,
- прийнятність і мінімальний дискомфорт для пацієнта,
- напівпрозорість, щоб мати можливість спостерігати за процесом загоєння рани,
- зменшення часу загоєння рани [20].

Отже, донині ще не створені ідеальні біоконструкції, які б задовольняли всім пропонованим до них критеріям, тому розробка та впровадження в клінічну практику нових біотехнологічних ранових покриттів залишається надзвичайно актуальним завданням.

1.1.1. Епідермальні еквіваленти. Коли стало можливим культивування *in vitro* людських кератиноцитів з багаторазовим збільшенням їх загальної кількості [21], їх стали використовувати в клініці для лікування ран [22], що сприяло в ряді випадків виживанню важких хворих [23]. Для створення епідермальних еквівалентів, як правило, використовують аутологічні кератиноцити, виділені з маленьких (2-5 см²) біоптатів шкіри, що ростуть в культурі з утворенням багат шарових епітеліальних шарів. Ці шари можна ферментативно відокремити від поверхонь культуральних флаконів і перенести на підтримуючий субстрат, наприклад, парафінову марлю або інші носії. Таку конструкцію наносять на рану з урахуванням базально-апикальної орієнтації клітин [24].

Сучасні методи експансії кератиноцитів *in vitro* дозволяють отримати з 3 см² тканини через 3-4 тижні досить великі епітеліальні аутоотрансплантанти,

що дозволяють закрити всю поверхню тіла людини [25]. До недоліків таких пластинчастих епітеліальних аутотрансплантатів відносяться тривалий час культивування, крихкість і складність використання трансплантатів і, головне, непередбачувані клінічні результати в плані різного ступеня приживлюваності від 15% до 85% [24, 26]. Ферментативна обробка може змінити структуру фібрил, відповідальних за взаємодію кератиноцитів з тканинами організму-реципієнта [27, 28]. Внаслідок цього спостерігається слабка адгезія трансплантата на рані і утворення пухирів при незначних зусиллях зсуву навіть через місяці після трансплантації [22]. Вирощування кератиноцитів на спеціальних транспортних мембранах (delivery membranes), які потім разом з культивованими клітинами аплікується на поверхню рани, дозволяє усунути необхідність застосування ферментів [27, 29] і прискорює процес проліферації, особливо якщо використовується не синтетичний, а природний матеріал. Зокрема, якщо як носій використовується фібрин [29], то швидкість утворення трансплантатів збільшується майже втричі.

В даний час епідермальні еквіваленти практично повністю відсутні в опікових центрах України. Загальними недоліками цих замінників шкіри є неможливість їх самостійного використання для терапії ран повної товщини, а лише в комбінації з дермальними трансплантатами [30, 31], а також висока вартість.

Давно відомі епідермальні еквіваленти Epicel [23], EPIBASE [32] і EpiDex [33] (таблиця 1.1), які є найстарішими серед аналогічних біоконструкцій і представляють собою прості пласти з кератиноцитів, вирощуваних протягом 15 днів. Крім вищевказаних недоліків їх негативною стороною є короткий (24 год) термін придатності [34]. Інший комерційний продукт MySkin [35] складається з несучої силіконової мембрани, покритої субконфлюентним шаром культивованих кератиноцитів. Кератиноцити продукту Laserskin (Vivoderm) [36] утворюють конфлюентний шар на поверхні гіалуронової мікроперфорованої мембрани і здатні мігрувати крізь цей матеріал вниз, до ложа рани.

Застосування епідермальних еквівалентів

Марка	Виробник, країна	Об'єкти для застосування
Epicel	«Genzyme Biosurgery», Cambridge, MA, USA	Масивні опіки [24]
EPIBASE	«Laboratoires Genevrier», Sophia- Antipolis, Nice, France	Масивні опіки [24]
EpiDex	«Modex Therapeutiques», Lausanne, Switzerland	Масивні опіки [24]
MySkin	«CellTran Ltd», Sheffield, UK	Виразки нижніх кінцівок, поверхневі опіки; донорські місця для шкірного трансплантата [39, 40]
Laserskin или Vivoderm	«Fidia Advanced Biopolymers», Padua, Italy	Доклінічні випробування на тваринах [41, 42]. Невеликі клінічні дослідження [43].
Bioseed-S	«BioTissue Technologies GmbH», Freiburg, Germany	Хронічні венозні виразки нижніх кінцівок [44, 45]. Рани повної товщини у тварин [33].
CellSpray	«Clinical Cell Culture (C3)», Perth, Australia	Рани часткової товщини; донорські місця для шкірного трансплантата [24].

У продуктах Bioseed-S [37] і CellSpray [38] використовуються кератиноцити, зібрані з субконфлюентного шару в їх найактивнішому стані проліферації. Кератиноцити продукту компанії Bioseed-S рівномірно розподілені усередині фібринового гелю алогенного походження. Продукт CellSpray є просто суспензією кератиноцитів. Після аплікації на поверхню рани проліферація кератиноцитів триває до формування епітеліального шару шкіри [25, 37, 38].

1.1.2. Дermalні еквіваленти. Лише деякі з існуючих дермальних замінників шкіри містять клітини, оскільки безклітинні конструкції набагато легше і дешевше виробляти великими партіями, і також набагато легше отримати ліцензію для їх клінічного застосування. Однак, слід зазначити, що дермальні ранові покриття практично недоступні для використання в опікових центрах України.

У відомому продукті TransCyte (рання назва – Dermagraft-TC) (таблиця 1.2) культивовані аlogenні фібробласти іммобілізовані на поверхні композиту із силіконової плівки, нейлонової сітки і дермального свинячого колагену. Це дермальне покриття призначене для тимчасового закриття ранового ложа, видаляється через 7-14 днів і замінюється аутотрансплантатом.

Таблиця 1.2

Застосування дермальних еквівалентів

Марка	Виробник, країна	Об'єкти для застосування
TransCyte (Dermagraft-TC)	«Advanced BioHealing, Inc.», New York, NY and La Jolla, CA, USA	Опікові рани часткової товщини; донорські місця шкірних трансплантатів [49, 50, 51].
Dermagraft	«Advanced BioHealing, Inc.», New York, NY and La Jolla, CA, USA	Діабетичні виразки нижніх кінцівок [52]. Венозні виразки [53]. Опікові рани.
Hyalograft 3D	«Fidia Advanced Biopolymers», Abano Terme, Italy	Стимуляція дермально-епідермального дозрівання [47, 48]. Виразки нижніх кінцівок (в комбінації з Laserskin) [54].

Несучий матеріал продукту Dermagraft [46] деградує на поверхні рани шляхом гідролізу через 20-30 діб. Він складається з полігліколевої кислоти, полімолочної кислоти і екстрацелюлярного матриксу. Останній виробляється

клітинним компонентом, представленим культивованими аlogenними фібробластами.

Біоконструкція Hyalograft 3D [47, 48] утворена гіалуроновою мікроперфорованою мембраною, яка є носієм для культивованих аутологічних фібробластів.

1.1.3. Дермо-епідермальні еквіваленти (композитні замітники шкіри).

До складу дермо-епідермальних еквівалентів одночасно входять культивовані фібробласти і кератиноцити, які розташовуються в різних шарах біоконструкцій.

Біоінженерна конструкція Apligraf («Apligraf Organogenesis Inc.», USA) (таблиця 1.3) на даний момент є клінічно найуспішнішим дермо-епідермальним еквівалентом [19]. Основний, тобто дермальний шар виробу представлений фібробластами аlogenного походження, які утворюють конфлюентний шар в гелевій матриці бичачого колагену типу I. Верхній шар складається з кератиноцитів [55]. Продукт є тимчасовим трансплантатом і резорбується на поверхні рани, його недоліком є низька тривалість зберігання (не більше 5 днів).

Аlogenні фібробласти продукту OrCell («OrCel Ortec International, Inc.», USA) іммобілізовані всередині губчастого гелю з бичачого колагену типу I, на одній зі сторін якого сформований конфлюентний шар аlogenних кератиноцитів. Продукт резорбується на поверхні рани через 7-14 днів після застосування.

Несуча пориста матриця продукту PolyActive [56, 57] («PolyActive HC Implants BV», The Netherlands) складається з м'якого компоненту поліетиленоксиду – poly(ethylene oxide) (PEO) – і твердого компоненту полібутилен-терефталату – poly(butylene terephthalate) (PBT). Така матриця містить у собі аутологічні культивовані клітини. Слід зазначити, що цю біоконструкцію в основному використовують не для репарації шкіри, а для реконструкції кістки.

Продукт TissueTech Autograft System («Fidia Advanced Biopolymers», Italy) [58] не є «істинним» двошаровим заміником шкіри, а лише комбінацією еквівалента дерми Hyalograft 3D і еквівалента епідермісу Laserskin.

Таблиця 1.3

Застосування дермо-епідермальних еквівалентів

Марка	Виробник, країна	Об'єкти для застосування
Apligraf	«Organogenesis Inc.», Canton, Massachusetts, CA, USA	Опіки часткової товщини [59, 60]. Діабетичні виразки на ногах [19].
OrCel	«Ortec International, Inc.», New York, NY, USA	Опікові рани; донорські місця для шкірного трансплантата [16].
PolyActive	«HC Implants BV», Leiden, The Netherlands	Рани часткової товщини; донорські місця для шкірного трансплантата [56, 57].
TissueTech Autograft System	«Fidia Advanced Biopolymers», Abano Terme, Italy	Виразки нижніх кінцівок.

1.2. Розробка нових біоінженерних еквівалентів шкіри, що містять клітини

1.2.1. Створення матриць з використанням желатину. Природний продукт желатин утворюється в результаті часткової денатурації і деградації колагенових волокон і так само, як і сам колаген, є аттрактантом для фібробластів в процесах загоєння ран [61, 62]. Маючи низьку вартість і здатність до біодеградації *in vivo*, желатин широко використовується як покриття при лікуванні ран [63, 64, 65]. Також корисними властивостями желатину є відсутність антигенної активності на відміну від колагену [66] і сильний гемостатичний ефект [66, 67]. Оскільки желатин розчинний у водному середовищі, то для використання у тривало живучих біоконструкціях молекули структур, що містять желатин, мають бути перехресно-пов'язані.

В роботі S.B. Lee і співавт. [68] носієм для фібробластів і кератиноцитів людини слугувала поверхня пористої матриці, що складається з желатину і (1-3),(1-6)- β -глюкана. Останній є вуглеводом мікроорганізму *Schizophyllum commune* і має антибактеріальну, антивірусну, антикоагуляційну і ранозагоювальну активність [69].

Певний інтерес представляє робота, в якій автори H.M.Powell і S.T.Boyce [70] використовували волокнисту желатинову матрицю, для виготовлення якої застосовувався метод «електропрядіння» («electrospinning»). У складі отриманої ними конструкції людські фібробласти і кератиноцити формували безперервні клітинні шари між волокнами. Слід зазначити, що «електропрядіння» – це процес створення довгих волокон з діаметром в діапазоні від нанометрів до частин мікрметра з використанням високовольтної напруги. Таким е-spun-волоконам притаманні висока пористість і високий взаємозв'язок між порами [71].

На відміну від робіт, розглянутих вище, Sh. Huang і співавт. [72] отримували так звані желатинові мікросфери розміром порядку десятків-сотень мікрметрів, при цьому желатин розглядався ними як потенційне депо для біологічно активних речовин. Потім на поверхні мікросфер культивували мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) кісткового мозку мишей, після чого мікросфери змішували з розчином колагену типу I. Після застигання колагену ці біоконструкції випробовували при лікуванні опіків шкіри мишей, і результати були позитивними.

Інші автори R.Quan і співавт. [73] використовували ліофілізацію при виготовленні клітинного носія складу «желатин + хондроїтин-6-сульфат + гіалуронова кислота». Як клітинний компонент виступали клітини, які рідко використовуються в аналогічних дослідженнях, – стовбурові клітини волосяних фолікулів. Були показані можливості використання цих біоінженерних продуктів у терапії ушкоджень шкіри лабораторних щурів.

У своїй роботі R.V.Shevchenko і співавт. [74] використовували двошаровий клітинний носій. Пористий шар желатину містив людські первинні

фібробласти, а шар силікону з дрібнішими порами був засіяний кератиноцитами людини. Результати застосування цього дермального замітника в процесі терапії ушкоджень шкіри свиней дозволили, з точки зору авторів, оцінювати його як одну з біомедичних конструкцій, які будуть використовуватися в майбутньому.

1.2.2. Створення матриць з використанням колагену. Колаген, як показано багатьма авторами, є хорошим субстратом для адгезії і проліферації культивованих клітин. Так, в роботі J.George і співавт. [75] колагенова губчаста матриця накладалася на шар фіброblastів, які проліферують, входять всередину губки і продовжують розмноження протягом 60 днів. В результаті утворена структура ставала морфологічно подібною до дермального шару шкіри.

Різні групи дослідників, наприклад, A.Kinsner і співавт. [76], S.H.Ahn і співавт. [77] також створювали губчасті колагенові матриці. У цих конструкціях фібробласти розташовувалися всередині губчастого шару, а кератиноцити – на його поверхні, формуючи добре розвинений багатошаровий епітелій [76] і навіть зовнішній роговий шар (*striatum corneum*) [77] подібно до натуральної шкіри. A.El.Ghalbzouri і співавт. [78] отримали біоконструкції з аналогічною структурою і розподілом клітин, але для створення матриці використовували не, як зазвичай, шурячий або бичачий колаген, а проколаген-І людини.

На відміну від робіт, розглянутих вище, K.K.Hu і співавт. [79] використовували як носій клітин «стислий» («*compressed*») колагеновий гель, який був отриманий шляхом стиснення під вантажем полімеризованого колагену з інкорпорованими мишачими фібробластами. Гель при стисненні втрачав воду (і в меншій мірі зменшувався в розмірах при висиханні), його механічні властивості поліпшувалися, а концентрація клітин збільшувалася. Мишачі кератиноцити в процесі культивування на поверхні гелю утворювали багатошаровий аналог епідермісу. Також стиснення колагенового гідрогелю,

що містить у своїй товщі фібробласти, використовувалося в роботі С.Helary і співавт. [80]. Гідрогель при цьому ставав стабільнішим і краще підтримував проліферацію клітин, ув'язнених всередині, в процесі зберігання при сприятливих для проліферації умовах.

Група Н.М.Powell і співавт. як носій фібробластів і кератиноцитів людини використовували губку, виготовлену з колагену і хондроїтин-6-сульфату [81]. В іншій роботі тієї ж групи [82] волокниста колагенова матриця для клітин була вироблена з використанням «електропрядіння». Аналогічний волокнистий носій фібробластів і кератиноцитів був створений в роботі М.Kempf і співавт. [83] з бичачого колагену типу I.

Група вчених з Великобританії і Тайваню [84, 85, 86] синтезували в експериментах кополімерну плівку із суміші колагену і полі-ε-капролактону (poly-ε-caprolactone, PCL) у співвідношенні 1:20. Останній є біосумісним полімером [87], що здатний до ензиматичної біодеградації [88]. Різні сторони плівки покривали в процесі культивування шаром фібробластів і шаром кератиноцитів. J.Venugopal і S.Ramakrishna [89] отримували кополімерні нанофібрили з суміші колагену і полі-ε-капролактону за допомогою згаданого вище методу «електропрядіння». На сплетених матрицях культивували людські фібробласти. Також поєднання колагену з полі-ε-капролактоном і той самий метод «електропрядіння» були використані в роботі S.Sharif і співавт. [90], але клітинний компонент в даному випадку – це стовбурові клітини ендометрію людини (hEnSCs). Автори вказують на те, що клітини hEnSCs легко ізолюються, серед їх властивостей є сильна здатність створювати нові капіляри, і застосування цього типу клітин для створення нових еквівалентів шкіри має гарні перспективи.

Нещодавно, у другій половині 2020-го року з'явилася робота S.Ababzadeh і співавт. [91], де каркас біоконструкції був подібним до вищезгаданих. Автори застосовували «електропрядіння» і поєднували полі-ε-капролактон не з колагеном, а з продуктом часткової деструкції колагену – із желатином (співвідношення складало 1:1). Третім компонентом матриці в цій роботі були

частинки оксиду магнію (MgO), їх концентрація складала 1, 2 та 4 мас.%. Клітинним компонентом також були стовбурові клітини ендометрію людини (hEnSCs). На моделі різаної рани повної товщини були отримані позитивні результати в плані загоєння пошкоджень шкіри, і найкращим варіантом складу матриці був варіант із 2 мас.% оксиду магнію.

Прикладом електропрядіння волокон із суміші колагену з іншим синтетичним полімером є робота Ma і співавт. [92], в якій використовували колаген і полімер, що складається із залишків молочної та гліколевої кислот poly-(D,L)-lactic-co-glycolic acid (PLGA, співвідношення залишків було 75:25). Цей полімер здатний до біодеградації шляхом гідролізу. У ролі клітинного компоненту виступали МСК кісткового мозку людини. Отриманий продукт, як показали експерименти на щурах, сприяв синтезу колагену і дозріванню епітелію в ложі рани.

Інша група, M.Ananta і співавт. [93], також використовувала суміш колагену з тим же самим полімером, у них він описаний як poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA), комерційна назва – Vicryl. Колагеновий пласт з рівномірно розподіленими за об'ємом фибробластами містив сітку з PLGA, яка слугувала каркасом для зміцнення конструкції. Одна з поверхонь колагенового листа несла кератиноцити. Клітини були отримані зі шкіри лабораторних кроликів, в подальшому саме на кроликах проводилися експерименти з вивчення ефективності застосування даного еквіваленту шкіри для терапії опіків. Автори зробили висновок, що отримані біоконструкції прискорювали загоєння ран.

Можна навести приклад експериментальної роботи, коли P.Liu і співавт. [94] отримували мезенхімальні стовбурові клітини з кісткового мозку і сіяли їх на поверхню мембрани складу «колаген + глікозаміноглікани». Такі біоконструкції були використані для терапії опіків шкіри. Йоркширські свині використовували як джерело для отримання МСК і як модель для дослідження опіків. Результатами були поліпшення васкуляризації рани, стимулювання загоєння рани і формування епідермального шару шкіри.

H.D.Zomer і співавт. [95] в роботі минулого року також використовували МСК. Каркасом біоконструкції слугував комерційний продукт «Integra», до складу якого входять бичачий колаген і хондроїтин-6-сульфат). На моделі рани повної товщини у мишей порівнювали *in vivo* терапевтичний потенціал клітин, які було виділено або зі шкіри (DSCs, тобто dermal-derived MSCs), або із жирової тканини (ASCs, тобто adipose tissue derived MSCs). Автори порівнювали вплив на загоєння ран своїх біоконструкцій з впливом безклітинного виробу «Integra». Наявність обох типів МСК прискорювали загоєння ран, стимулювали ангиогенез та ремоделювання позаклітинного матриксу, останнє призводило до покращення стану післяранових рубців. Однак використання DSCs давало кращі результати: рубці були меншими, збільшувалась кількість придатків шкіри на ділянці новоствореної тканини. Біоконструкції, котрі містили у собі ASCs, часом показували ненабагато кращий терапевтичний ефект, ніж безклітинний матеріал «Integra».

Інший комерційний продукт «Matriderm» використовувався в роботі M.Kesck і співавт. [96]. Цей біоматеріал представляє собою пластину з бичачого колагену, покритого висушеним гідролізатом зв'язкового α -еластину. Автори сіяли людські кератиноцити і преадипоцити на поверхню «Matriderm». Кератиноцити формували на поверхні конфлюентний шар, а преадипоцити проникали всередину зразків.

B.Cui і співавт. [97], використовуючи метод ліофільної сушки, поєднали в своїй біоконструкції дві речовини: колаген, екстрагований із бичачих сухожилів, і фіброїн шовку. МСК кісткового мозку щурів були посіяні на поверхню цього матеріалу. Дослідження показало, що ця біоконструкція може бути перспективним засобом для терапії ран, оскільки сам по собі безклітинний матеріал має чудову спорідненість до шкіри, добру проникність для повітря і води, а клітинний компонент стимулює регенерацію тканин.

Нарешті, R.K.Chan і співавт. [98] спробувала створити всі три шари шкірних покривів. Основою клітинного компоненту слугували стовбурові клітини, виділені з людської жирової тканини (ASCs). Матриці для клітинних

мас були сформовані з колагену, поліетиленгліколю і фібрину. Шляхом інкубації окремих конструкцій з клітинами в культуральних середовищах різного складу дослідники домагалися трансформації ASCs в епітеліальні і жирові клітини. При створенні дермального еквіваленту, клітини не зазнавали спеціально спрямованої диференціації. Доклінічні випробування отриманих біоконструкцій не описані в статті, але, за словами авторів, вони вже були розпочаті на момент подачі статті («Further demonstration of this methodology in a preclinical model is under way»).

Робота M.Itoh і співавт. [99] цікава тим, що як джерело клітин автори використовували людські індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (iPSC). Раніше ці автори повідомляли про можливість штучно активувати диференціювання iPSC в кератиноцити. У даній роботі вони розробили протокол для проведення диференціювання тих же людських iPSC в дермальні фібробласти. В ході експериментів були виготовлені зразки еквівалентів шкіри, що містять ті самі клітини, які утворювалися в результаті спрямованого диференціювання iPSC. На поверхню мембрани з поліетилен-терефталату наносився шар колагену, а після полімеризації послідовно, з інтервалом в 5-7 днів висівали фібробласти і кератиноцити. Автори не проводили доклінічних випробувань отриманих біоконструкцій, але повідомили, що їх гістологічна структура була співставною з такою еквівалентів, що були отримані за аналогічною методикою, але з використанням нормальних людських фібробластів і кератиноцитів.

1.2.3. Створення матриць з використанням хітину / хітозану та інших матеріалів. Хітин – це нерозгалужений полісахарид, чия мономерна одиниця, N-ацетилглюкозамин, входить до складу гіалуронової кислоти, яка здатна стимулювати регенерацію дерми. Саме тому і хітин здатний прискорювати загоєння ран. Хітозан – це продукт часткового деацетилювання хітину, його окремих мономерних ланок. Слід зазначити, що хітин і хітозан біосумісні, тобто не спричиняють запальних або алергічних реакцій після місцевого застосування

або імплантації в людське тіло [100], можуть резорбуватися під дією лізоциму [101], мають бактеріостатичну і фунгістатичну активність [102].

Як приклад можна привести роботу Г.М.Міхайлова і співавт. [103], які синтезували еластичні хітинові нитки і ткали з них плівку. На ній проводилося культивування людських фібробластів, які прикріплялися до волокон і розпластувалися на них. А.В.Нілмі і співавт. [104] також використовували лише два компоненти – хітозан і первинні фібробласти людського походження, але хітозановий носій був виготовлений у вигляді губчастих пластин, в товщі яких розташовувалися клітини. В аналогічній роботі D.Revi і співавт. [105] кератиноцити і фібробласти, які були виділені із шкіри кроликів, спільно культивувалися на хітозановій губчастій основі. Модель різаної рани повної товщини на спинах кроликів допомогла встановити, що біоконструкція, навантажена клітинами, стимулювала загоєння ран і зменшення рубців у порівнянні з безклітинною хітозановою губкою.

Дві групи дослідників [106, 107] створювали пористу матрицю з суміші розчинів колагену і хітозану. Останній збільшує біостабільність матриці, що було продемонстровано в тестах з використанням колагенази [106] і лізоциму [107]. Клітинним компонентом слугували людські фібробласти [106] або клітини мишачої фібросаркоми L929 [107].

Цікаву експериментальну роботу провели І.Н.Большаков і співавт. [108], які використовували як клітинний носій колаген-хітозановий комплекс, який додатково містив аскорбінову, хондроїтинсірчану і гіалуронову кислоту, гепарин і медичний препарат «Адгелон» (на основі сироваткового фактора росту великої рогатої худоби). Вони отримували плівки або губчасті пластини, на поверхні яких культивувалися ембріональні щурячі фібробласти. Експерименти з використанням щурів показали, що застосування даних біоконструкцій сприяє повноцінному відновленню епідермально-дермального комплексу до стану, відповідного здоровій шкірі.

В іншій експериментальній роботі А.В.Єремєєв і співавт. [109] спостерігали хорошу проліферативну і метаболічну активність ембріональних

фібробластів щура і ММСК жирової тканини щура при культивуванні на рановому колаген-хітозановому покритті «Колахіт-бол» (Patent of the Russian Federation № 2252787, 27.05.2005; Patent of the Russian Federation № 2254145, 20.06.2005). У процесі культивування стромальні клітини починали диференціюватися в епітеліальні. J.Мао і співавт. [110] проводили експерименти з клітинним носієм, що складається з хітозанового і желатинового шару. Як клітинний компонент використовували людські фібробласти і кератиноцити. Останні вводилися до складу біоконструкцій через деякий час після засівання матриці фібробластами. На відміну від робіт, наведених вище, С.М.Нап і співавт. [111] створювали колаген-хітозанову пористу мембрану. Її поверхня після тижневого культивування покривалася фібріновим шаром, на який наносили шар кератиноцитів людини.

Поєднання колагену і хітозану також було застосовано у роботі Y.Shen і співавт. [112]. Вони створили, за їх словами, «collagen-chitin biomimetic membrane», і ця мембрана була здатна розсмоктуватися, коли її підшкірно трансплантували щурам. На поверхні створеної плівки культивували ембріональні стовбурові клітини (ESCs), після чого отриману біоконструкцію застосовували для лікування дефектів шкіри повної товщини у мишей. Використання створеного дермального еквіваленту мало наступні наслідки: нова шкіра після регенерації була більш товстою, червоною та еластичною, ніж у контролі (де використовували безклітинний каркас), також в ній спостерігалася проліферація клітин волосяного фолікула. Дослідження маркерів стовбурових клітин показало, що ESCs брали активну участь у відновленні та регенерації шкіри.

А група J.L.Soriano-Ruiz і співавт. у роботі 2019-го року [113] разом із колагеном і хітозаном використали глікозаміноглікани трьох типів. Останні, за словами авторів, разом з колагеном не тільки забезпечували оптимальне мікросередовище для меземхімальних стовбурових клітин людини, виділених із жирової тканини (adipose tissue derived MSCs), але ще й відігравали важливу структурну роль у загоєнні ран.

Оригінальну роботу виконали Sh.Ikemoto і співавт. [114], в якій автори успішно культивували людські кератиноцити на мембрані, що складалася з хітозану, кон'югованого з білком AG73. Останній є одним із представників сімейства ламінінів – більше 30 великих глікопротеїнів, локалізованих на базальній мембрані. Серед них пептид AG73 є найефективнішим як стимулятор клітинної міграції, адгезії і стимуляції проростання аксонів. Автори розглядають свій продукт як хороший транспортний засіб для доставки кератиноцитів до ложа рани.

Дві групи дослідників [115, 116] методом «електропрядіння» отримували катіонні нанофібрили з двох компонентів. Один – хітозан, що несе короткі олігомерні фрагменти полі-ε-капролактону (chitosan-graft-poly-ε-caprolactone). Другий – чистий полі-ε-капролактон (poly-ε-caprolactone). На отриманих зразках добре проходила проліферація клітин мишачої фібросаркоми L929 [115, 116], клітин людської остеосаркоми MG63 [116], мишачих ембріональних фібробластів NIH3T3 [116].

1.2.4. Створення матриць з використанням гіалуронової кислоти.

Гіалуронова кислота являє собою полімер, що складається із залишків D-глюкуронової кислоти і D-N-ацетилглюкозаміна, з'єднаних по черзі β-1,4- і β-1,3-глікозидними зв'язками. Природні молекули гіалуронової кислоти можуть містити до 25000 таких дисахаридних ланок. Ця речовина є одним з основних компонентів позаклітинного матриксу, міститься в багатьох біологічних рідинах, бере участь в процесах адгезії, міграції та проліферації фібробластів і кератиноцитів, бере участь в фетальному загоєнні рани без рубців [117].

Розглянемо серію експериментальних робіт по застосуванню гіалуронової кислоти. T.W.Wang і співавт. [118] приготували композитну матрицю шляхом полімеризації розчину, що містить желатин, гіалуронову кислоту і хондроїтин-6-сульфат в концентраціях 5%, 0,2% і 0,05% відповідно. H.Liu і співавт. [119, 120] синтезували матрицю з розчину желатину, ацетату хітозану і гіалуронової кислоти в концентраціях 0,7%, 0,4% і 0,001% відповідно. У процесі спільного

культивування на отриманих композитних біополімерах людські фібробласти і кератиноцити демонстрували високу життєздатність і здатність до проліферації. При цьому в роботах [119, 120] через два тижні кератиноцити поступово самоорганізовувалися в шарувату структуру, яка включала в себе, зокрема, шар кубічних клітин і поверхневий шар сплосчених клітин. Н.М. Wang і співавт. [121] також створювали трикомпонентну матрицю, що складалася з колагену, гіалуронової кислоти і желатину, а клітинний компонент включав в себе не два, а три типи клітин: кератиноцити, меланоцити і фібробласти. В експериментах *in vivo* отриманий еквівалент шкіри поліпшував загоєння ран.

Цікава робота, в якій N.Scuderi і співавт. [122] описали клінічний випадок лікування хірургічної рани з використанням біоконструкцій, в основі яких була матриця з полімеризованої гіалуронової кислоти. На цій матриці спільно культивували фібробласти, кератиноцити і меланоцити, отримані при біопсії шкіри перед операцією. J.Engione і співавт. [123] досліджували механічні та фізичні властивості такої ж матриці і перевірили її цитотоксичність на культивованих людських фібробластах.

У наступній роботі Sh.Kondo і співавт. [124] виготовили композитні губчаті матриці з гіалуронової кислоти, поперечно-зшитого колагену і епідермального фактора росту (EGF). Останній значно стимулював проліферацію фібробластів на поверхні матриці, а також формування грануляційної тканини, ангіогенез і епітелізацію рани в експериментах на щурах.

1.2.5. Створення матриць з використанням різних синтетичних полімерів. Плівка, виготовлена із згаданого вище полі-ε-капролактона (poly-ε-caprolactone, PCL), використовувалася в роботі K.W.Ng і співавт. [87] як носій для людських фібробластів. A.R.Chandrasekaran і співавт. [125] використовували метод «електропрядіння» для створення волокон, до складу яких входили кополімер L-молочної кислоти і ε-капролактона (poly-L-lactic_acid-co-poly-ε-caprolactone), а також желатин. Клітинним компонентом

біоконструкції були людські фібробласти.

У роботах двох груп, а саме K.A.Blackwood і співавт. [126], S.G.Kumbar і співавт. [127], з суміші розчинів молочної та гліколевої кислот методом «електропрядіння» створювали кополімерні волокна складу poly(lactide-co-glycolide). Цей полімер також був згаданий вище, але автори даних робіт не комбінували його з іншими матеріалами. З отриманих волокон спліталися носії, що здатні до біодеградації, для людських фібробластів і кератиноцитів [126] або тільки фібробластів людини [127]. В роботі [126] найкращим було визнано співвідношення полімолочної і полігліколевої кислот 85:15 або 75:25.

1.2.6. Інші матеріали, використовувані для створення матриць.

Складні матриці виготовили A.L.Mazlyam і співавт. [128]: вони ініціювали полімеризацію людського фібрину в суспензії людських фібробластів. Зверху аналогічним чином формувався гелевий шар, що несе кератиноцити. На нього накладався шар шовку для стабілізації під час транспортування і трансплантації.

Амніотичну мембрану людини використовували як носій клітин в чотирьох роботах. S.S.Kim і співавт. [129] іммобілізували на її поверхні кролячі мезенхімальні стромальні клітини (МСК). В роботі Lujun Yang і співавт. [130] спочатку поверхня мембрани після видалення епітеліального шару була засіяна фібробластами. П'ять днів по тому, коли фібробласти занурилися в струму мембрани, поверхня була засіяна кератиноцитами.

R.Sánchez-Sánchez і співавт. [131] використовували два типи безклітинних каркасів: людські амніони, стерилізовані радіоактивним випромінюванням, і свинячу шкіру. Як клітинний компонент у даному випадку використовували мезенхімальні стовбурові клітини людини, отримані із жиру (human adipose-derived mesenchymal stem cells, hADMSCs). Автори вказують, що клітини були здатні мігрувати крізь безклітинну основу. Остання спонукала hADMSC виділяти інтерлейкін-10, важливий негативний регулятор запалення, та інтерлейкін-1 β , прозапальний білок. Доведено, що взаємодія цих двох білків

є життєво важливою для збалансованого відновлення тканин.

У роботі минулого, 2020-го року F.Liu і співавт. [132] поєднали безклітинну людську амніотичну мембрану (human acellular amniotic membrane, hAAM) і стовбурові клітини волосяних фолікулів щурів (rat hair follicle stem cells, rHFSCs). Терапія з використанням цих біоконструкцій застосовувалася до ран шкіри повної товщини у мишей. Ізольовані та культивовані rHFSC мали сильний потенціал до клонування та проліферації. Після трансплантації ця біоконструкція сприяла загоєнню ран. Крім того, клітинний компонент брав безпосередню участь у формуванні волосяних фолікулів та ангіогенезі тканини навколо волосяних фолікулів. Автори вважають, що ці результати забезпечують експериментальну і теоретичну основу для клінічного застосування HFSCs для репарації дефектів шкіри людини та новий підхід до тканинної біоінженерії.

Цікава робота S.Castagnoli і співавт. [133], в якій автори для створення шкірного еквіваленту використовували безклітинний дермальний шар мертвої донорської шкіри. А потім на його поверхні протягом 21 дня культивували кератиноцити.

До оригінальних робіт можна віднести дослідження S.E.Yeum і співавт. [134]. Автори засівали ММСК, отримані з кісткового мозку лабораторних мишей, на поверхню безклітинної підслизової оболонки свинячої тонкої кишки (small intestinal submucosa, SIS), це один з шарів стінки кишечника, механічно міцний і утворений пухкою сполучною тканиною. Було показано, що клітини мігрують з поверхні даного носія в ложе рани, виділяючи фактори росту. При цьому число клітин, що мігрують на поверхню рани, досягало певного максимального рівня (в залежності від розміру рани) і в подальшому залишалось постійним, навіть якщо число ММСК, що доставляються до рани у складі трансплантатів, було збільшено.

J.Kiiskinen і соавт. [135] для створення безклітинного носія вирішили використати нанофібрилярну целюлозу, отриману з деревини (wood-derived nanofibrillar cellulose, NFC). Цей матеріал, зокрема, є цікавим фактом через те, що його походження є не тваринним, як у більшості інших випадків, а

рослинним. До роботи були залучені мезенхімальні стовбурові клітини людини, отримані із жиру самого пацієнта (human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells, hASCs). Безклітинна основа не мала якогось особливого покриття, створеного задля підвищення адгезії клітин. Клітини прилипали до каркасу та демонстрували високу виживаність протягом двохтижневого періоду досліджень. Крім того, спостерігали відсутність цитотоксичності целюлозної основи, а також відсутність змін морфології, проліферативного потенціалу і недиференційованого стану hASCs.

В роботі S.X.Chen і співавт. [136] основою біоконструкції для лікування хронічних ран слугував термочутливий пористий гідрогель на основі полі-N-ізопропілакриламід (poly(N-isopropylacrylamide, NIPAM). Клітинним компонентом були мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку, які були здатні покращувати мікросередовище ран при хронічному запаленні. Автори цікавилися терапією діабетичних виразок, і як модель таких пошкоджень була обрана модель рани шкіри повної товщини на спинах мишей. Дослідження показало, що даний гідрогель підходить для інкапсуляції МСК кісткового мозку і може сприяти тому, щоб зазначені клітини секретували TGF- β 1 та bFGF. Біоконструкція, яку було створено, інгібувала прозапальну активність макрофагів M1, стимулювала формування грануляційної тканини, ангиогенез, скорочення ран та реепітелізацію, тобто загалом сприяла швидкому загоєнню ран шкіри.

Дещо незвичайний матеріал, а саме карагінан (carrageenan) був використаний у роботі M.Rode і співавт. [137]. Це теж термочутливий полімер, котрий має природне походження (в даному випадку він видобувався із червоних морських водоростей *Carrahyucus alvarezii*), широко застосовується у харчовій та фармацевтичній промисловості та має структуру, подібну до глікозаміногліканів. Мультипотентні стромальні клітини шкіри (skin-derived multipotent stromal cells, SD-MSCs) культивувалися всередині карагінанового гідрогелю. Під час культивування форма клітин була сферичною, вони зберігали свій ріст та життєздатність протягом щонайменше одного тижня в

культури. На мишачій моделі рани шкіри повної товщини за допомогою макроскопічного і гістологічного аналізу було показано, що дана композиція гідрогелю і МСК зменшує запальний процес, прискорює початкове відновлення місця поранення і покращує формування позаклітинного матриксу.

Y.M.Gao і співавт. [138] зазначають, що посилення ранньої васкуляризації шкірних трансплантатів є одним з ключових факторів поліпшення трансплантації шкіри. У дослідженні були застосовані збагачений тромбоцитами плазмовий гідрогель (platelet-rich plasma gel, PRP-gel) і стовбурові клітини, отримані із жирової тканини (adipose-derived stem cells, ADSCs). Терапевтична ефективність даної комбінації «гідрогель + клітини» вивчалася на щурачій моделі Льюїса (Lewis rat model). Було показано, що використання біоконструкції покращує результати трансплантації шкіри, а саме стимулює ангиогенез шляхом підвищення експресії факторів васкуляризації VEGF, BFGF та PDGFB, збільшує товщину новоствореної шкіри і покращує розташування колагену в ній.

1.3. Властивості мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) і їх зв'язок з процесами регенерації шкіри

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) представляють популяцію мультипотентних клітин мезодермального походження, які присутні практично в усіх тканинах і органах дорослого організму: в кістковому мозку (це основне їх джерело в постнатальному онтогенезі), м'язовій, жировій, кістковій тканинах, в селезінці, тимусі, легенях, серці, судинах та інших місцях [139, 140, 141, 142, 143]. Скупчення таких клітин утворює бластему (апикальну шапку) при регенерації кінцівки у дорослої тварини [144]. У шкірі, як і в багатьох інших тканинах, присутня постійна популяція МСК, що бере участь у репарації ушкоджень і підтримці тканинного гомеостазу [141, 145].

Міжнародне товариство клітинної терапії вважає, що до МСК відносяться клітини, що характеризуються адгезією до пластику, експресією поверхневих

антигенів CD73, CD90 і CD105, а також можливістю диференціювання, щонайменше, в трьох напрямках, а саме в клітини кісткової, жирової та хрящової тканин [146]. МСК не мають на своїй поверхні маркерів CD34 і CD45, що характерні для гемопоетичних стовбурових клітин. Крім здатності до мультилінійного диференціювання, важливого для регенерації тканин, МСК також мають здатність до міграції в кровотоці.

МСК беруть участь у регуляції практично всіх фізіологічних процесів при регенерації тканин шкіри шляхом паракринного впливу на навколишні клітини, в тому числі і деякі клітини імунної системи. В даний час відомо, що МСК секретують велику кількість біологічно активних речовин (цитокіни і хемокіни, фактори росту, ангіогенні фактори, матриксні металопротеїнази, колаген та ін.) [147, 148]. Зокрема це інтерлейкіни IL-1, IL-6, IL-8, TNF- β (tumour necrosis factor), IFN- γ (Interferon gamma), CXCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 [149], VEGF-A, інсуліноподібний фактор росту (IGF-1), EGF, фактор росту кератиноцитів (KGF), ангіопоетин-1, фактор стромального походження (SDF-1), запальні білки макрофагів (MIP-1 α і MIP-1 β) [150, 151]. Це, вочевидь, і є причиною того, що МСК здатні підтримувати міграцію і проліферацію дермальних фібробластів і ендотеліальних клітин (ангіогенез) [152], міграцію кератиноцитів [153]. За даними гістологічного аналізу, системне або місцеве введення МСК тваринам з ранами шкіри покращує перебіг запалення, прискорює епітелізацію, збільшує утворення грануляційної тканини і ангіогенез [154, 155, 156, 157]. Стимуляція останнього процесу, як показано, відбувається на фоні того, що в рані після місцевого введення МСК з'являється значна кількість таких проангіогенних чинників, як білки VEGF і ангіопоетин-1 [157].

Варто зазначити, що МСК секретують ряд цитокінів (EGF, KGF, IGF-1, VEGF-A, PDGF-BB, еритропоетин і тромбопоетин) в значно більших кількостях у порівнянні з дермальними фібробластами, які теж є важливими учасниками загоєння рани [150].

У характерних для рани умовах гіпоксії МСК підсилюють секрецію білків VEGF і bFGF. Щоб показати важливу роль цих двох білкових факторів для

регенерації, можна нейтралізувати їх шляхом використання відповідних антитіл, після чого гальмується міграція фібробластів в рану і власне процес її загоєння [158].

Є дані, котрі вказують на те, що МСК після введення в ділянки пошкодженої шкіри запобігають фіброзу шляхом пригнічення проліферації і диференціювання міофібробластів, а також надлишкового відкладення колагену. Важливу роль в цьому відіграє TGF- β 3, що продукується мезенхімальними стовбуровими клітинами [159, 160].

На експериментах з бактеріальними культурами показано, що присутність МСК веде до зниження числа колоній *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*. Це відбувається завдяки тому, що при контакті з бактеріями МСК секретують антимікробний пептид hCAP-18/LL-37 [161]. Також МСК здатні секретувати імуномодулятори, які стимулюють знищення і фагоцитоз бактерій клітинами імунної системи [162]. Таким чином на ранніх стадіях відновлення шкіряних покривів МСК сприяють очищенню рани від інфекції, проявляючи антимікробну дію.

В культурі накопичення біомаси МСК відбувається швидко. Так, тисячократне збільшення кількості клітин досягається шляхом культивування протягом 2-3 тижнів [163]. Під час проліферації *in vitro* МСК можуть подвоюватися до 45 разів, однак тривале культивування знижує їх диференціювальний потенціал і призводить до клітинного старіння [164].

І нормальна, і пошкоджена шкіра є мішенню для заселення мезенхімальними стовбуровими клітинами кістковомозкового походження. Це показано, наприклад, в експериментах з мишами-хімерами. Тваринам-реципієнтам після опромінення вводили внутрішньовенно клітини кісткового мозку, що були мічені зеленим флуоресцентним білком (GFP, green fluorescent protein). Донорські клітини з'являлися в багатьох органах реципієнта (серце, легені, мозок, нирки, селезінка), але їх найбільша відносна кількість відзначалася в шкірі. Через 10 тижнів після такого введення частка донорських клітин в дермі та епідермісі шкіри реципієнта сягала 14%, а через 8 міс. після

трансплантації в дермі зберігалось до 11% донорських клітин. Також донорські клітини були здатні надходити до шкіри реципієнта з пригніченим імунітетом і після імплантації фрагмента кісткового мозку трансгенних по GFP донорів в стегно реципієнта. В такому випадку через 3 тижні після імплантації частка мічених клітин в шкірі реципієнта складала до 15% [165]. В іншій роботі мишам-самкам після летального опромінення трансплантували МСК з кісткового мозку мишей-самців. Завдяки виявленню флуоресцентної мітки і Y-хромосоми, які були присутні в донорських МСК, показано, що ці клітини мігрували в шкіру, зберігалися в ній тривалий час і брали участь у формуванні волосся [166].

В інших дослідах з хімерами, які піддавалися впливу радіоактивного випромінювання, було показано, що після штучного нанесення рани міграція донорських клітин кістково-мозкового походження в шкіру посилюється [167]. В рані ці донорські клітини представлені двома популяціями. Одна популяція – це гемопоетичні клітини $CD45^+$, і їх частка знижується до незначної величини к моменту завершення епітелізації. Друга популяція – це мезенхімальні клітини $CD45^-$, які присутні на всіх стадіях ранового процесу, здатні продукувати колаген I і III типу і поряд з резидентними клітинами шкіри беруть участь у відновленні популяції дермальних фібробластів [165]

Таким чином, мезенхімальні стовбурові клітини присутні в рані на всіх фазах її загоєння і мають особливу роль в процесі регенерації шкіри. Механізм, що веде МСК з кісткового мозку в ложе рани, є комплексним і включає в себе багато біологічно активних молекул: хемокіни, рецептори хемокінів, протеази позаклітинного матриксу, тканинні інгібітори матриксних металопротеаз, молекули адгезії [168]. МСК конститутивно експресують такі рецептори хемокінів, як CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 і CXCR6 [169].

Доклінічні та клінічні дослідження впливу МСК на загоєння ран і регенерацію шкіри дають хороші результати. Наприклад, в дослідженні S.Ichioka і співавт. [170] вивчався вплив кісткового мозку, який розміщувався на колагеновому каркасі, на загоєння ран у мишей, і було встановлено значне

посилення ангиогенезу. В роботі V.Falanga і співавт. [171] для збільшення швидкості загоєння гострих і хронічних шкірних ран у мишей, а пізніше і у людей використовували фібриновий спрей, який містив аутологічні МСК, отримані з аспирату кісткового мозку. Повідомлялося про зменшення розміру ран, що хронічно не загоюються [171]. E.V.Badiavas і V.Falanga [172] отримали позитивні клінічні результати із застосуванням аутологічних клітин кісткового мозку для лікування хронічних виразок шкіри у трьох пацієнтів, резистентних до стандартної терапії протягом більше 1 року. У всіх пацієнтів через кілька днів після введення клітин спостерігалось поліпшення стану ран, а саме стійке загальне зменшення розміру рани, збільшення васкуляризації рани і потовщення дермального шару шкіри. T.Yoshikawa і співавт. [173] використовували аутологічні МСК кісткового мозку для лікування 20 пацієнтів з ранами різної етіології (опіки, виразки нижніх кінцівок і пролежні), котрі довго не загоювалися. В деяких випадках одночасно мала місце аутологічна пересадка шкіри. У 18 з 20 пацієнтів шкіряні покрови повністю відновилися, а гістологічне дослідження показало, що завдяки додаванню МСК прискорювалася регенерація нативної тканини.

Ми бачимо, що стимулювальна дія МСК на регенеративні процеси – це не стільки результат диференціювання в клітини шкіри, скільки результат паракринного впливу на пошкоджені тканини. Через це культуральне середовище, яке кондиційоване мезенхімальними стовбуровими клітинами, є привабливим об'єктом для застосування у клініці, оскільки містить весь спектр цитокінів, хемокінів, факторів росту та інших біологічно активних речовин, які МСК секретують. Ін'єкція такого середовища в рану або аплікація на поверхню рани виглядає більш простим і, можливо, більш потужним терапевтичним методом, ніж трансплантація живих МСК. Показано, що середовище, кондиційоване мезенхімальними стовбуровими клітинами, несе хемоаттрактанти для макрофагів, попередників ендотеліальних клітин, власне ендотеліальних клітин і кератиноцитів [150], стимулює проліферацію і міграцію шкірних фібробластів [174], стимулює утворення судин [175], прискорює загоєння і

закриття рани [150]. Введення секрету МСК призводить приблизно до такого ж самого пригнічення запалення і прискорення репаративних процесів, як і трансплантація самих клітин [176].

Були спроби створення біоматеріалів, котрі здатні забезпечити тривале постачання паракринних факторів секрету МСК до ранового ложа. Так, в роботі Y.Peng і співавт. [177] тривимірна мембрана, виготовлена з ліофілізованого середовища, яке було кондиційоване мезенхімальними стовбуровими клітинами, така мембрана при накладенні на рану забезпечувала прискорення загоєння за рахунок поступового вивільнення фізіологічно активних речовин.

R.Tutuianu і співавт. [178] досліджували, як можна покращити терапевтичний потенціал безклітинного пористого каркасу, виготовленого з колагену I типу. Задля покращення вони додавали середовище, яке було кондиційоване мезенхімальними стовбуровими клітинами, до складу колагенового гелю. Експерименти показали, що біологічно активні фактори кондиційованого середовища стимулювали колонізацію колагенового каркасу фібробластами і кератиноцитами, а також стимулювали проліферацію кератиноцитів.

1.4. Використання гелеутворювачів для створення м'яких фармацевтичних форм типу мазі з включенням живих клітин

Проведення патентного пошуку у Спеціалізованій базі даних „Винаходи (корисні моделі) в Україні”, у базі даних Європейської патентної організації (за допомогою Інтернет-сервісу Espacenet) та у базі даних Російського Федерального інституту промислової власності показало, що існує чимало патентів на винаходи або корисні моделі, які описують штучні ранові покриття у вигляді плівкоподібних або пластиноподібних виробів з іммобілізованими живими клітинами на поверхні або у товщі щільного каркасу. Однак ні в українській, ні в загальноєвропейській базах даних не було знайдено патентів на винаходи або корисні моделі, у яких було би описано поєднання живих

клітин саме з мазеподібною субстанцією. Лише в Російській патентній базі нами виявлено два патенти, що дають опис винаходів подібного типу, однак в них не використовувався карбопол.

Патент №2385744 „Способ лечения глубоких ран” (дата публ. 10.04.2010) описує застосування суміші метилцелюлози (1-3 мас.%) та одного із загальновідомих лабораторних культуральних середовищ для створення пластичного гелю, який несе в собі фібробласти людини. Патент №2499603 „Способ лечения глубоких ожогов на ранних этапах” описує застосування суспензії дезагредованих клітин пацієнта у фібриновому клеї „Тисукол” (Tissucol®), який виробляється промислово. Однак, дія обох патентів припинена через несплату в установлений термін мита для підтримки патенту в силі.

Нашу увагу привернув одим із відомих гелеутворювачів – карбомер, інша його назва – карбопол. Відомо, що він не підтримує розмноження мікроорганізмів (на відміну, наприклад, від колагену або желатину), є безпечним, біологічно нейтральним і широко використовується у медицині для створення лікувальних мазей та інших лікарських препаратів, тобто, не потребує окремої сертифікації для клінічного застосування. Прикладами використання карбополового гідрогелю як основи для створення лікарських композицій, можна вказати такі патенти: „Фармацевтична композиція з гемостатичною дією” (патент України на винахід №112099, дата публікації відомостей про видачу патенту 25.07.2016, Бюл.№14), „Противоожоговая композиция” (патент Російської Федерації №2552790, дата початку відліку терміну дії патента 13.01.2014), „Compositions for treatment of burns” (CA2255521 (A1) – 2000-06-09), та ін. Однак, до нашої роботи карбопол не використовувався у сполученні з клітинами.

Отже, карбомер або карбопол – це один із найпоширеніших гелеутворювачів у складі лікарських гідрогелів [179, 180]. Серед найбільш відомих марок карбомерів є такі, як Ultrez (Ультез) (Бельгія), Carborol 940, 941, 980, 2020 і 2001 (Німеччина). Широко використовується Carborol 940. Його

аналог Carbopol 980 можна вважати безпечнішим завдяки тому, що в його виробництві не використовується бензол.

Половко і соавт. [181] вважають, що карбомерні гелі мають зручний рівень в'язкості у діапазоні концентрацій від 0,75% до 2%. В роботі Сірої і соавт. [182] використовувався 1% суміш карбомеру з водою для приготування гідрогелю. Автори зауважують, що, за даними літератури, карбомер найчастіше використовують у концентрації від 0,5% до 2%, а нейтралізація проводиться за допомогою 10% розчину NaOH.

В роботі Сапожкової і соавт. [183] було показано, що якщо використовувати Carbopol 980 і робити рівень карбомеру в гелі більше, ніж 1,7%, то гідрогель стає занадто в'язким. Це ускладнює екструзію препарату із контейнерів і його фіксацію на шкірі. Пуляєв і соавт. [184] досліджували структурно-механічні властивості чотирьох зразків гідрогелю на основі карбомеру Ultrez 10, а саме зразки з концентрацією гелеутворювача 0,5%, 1%, 1,5%, 2%. Результати аналізу одержаних даних вказують на доцільність використання карбополу Ultrez 10 в концентрації 1,5%.

1.5. Дослідження на базі відділу генетики людини ІМБГ НАН України

З 2005 року працівники відділу проводили біотехнологічні дослідження з розробки дермальних еквівалентів шкіри, що мають у своєму складі живі клітини людини. У ролі клітинного компоненту біоконструкцій виступали первинні клітини шкіри людини і клітини лінії 4BL [185]. Останні, як дозволяють припустити результати подальших досліджень, є мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами (ММСК). Пізніше новим джерелом клітин слугувала плацента людини, з якої були отримані первинні ММСК [186, 187, 188]. Роботи по отриманню дермальних еквівалентів шкіри із застосуванням ММСК проводилися у співпраці з Інститутом клітинної терапії (м. Київ), який має ліцензію (АГ 579626) на

створення і підтримання низькотемпературного банку клітин і тканин людини.

Дослідники планували використовувати різноманітні матеріали, як синтетичного, так і природного походження для створення носія клітин (scaffold). Були проведені експерименти з гідрогелевими мембранами, синтезованими в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф.Д.Овчаренко НАНУ (м. Київ) шляхом спільної полімеризації акриламідів і акрилонітрилу [189, 190]. За спеціальним дозволом і спільно з лікарями Центру термічної травми і пластичної хірургії Київської міської лікарні №2 були проведені клінічні дослідження експериментальних дермальних покриттів на обмеженому контингенті пацієнтів з масивними і глибокими опіками. Порівнювалися результати ауто трансплантації перфорованих трансплантатів шкіри у хворих, що піддавалися попередній аплікації дермальних еквівалентів, та у хворих, що отримували лікування за стандартною схемою.

В умовах стаціонару зразки гідрогелів на основі синтетичної поліакриламідної матриці і натуральної колагенової матриці з іммобілізованими ММСК наносили на опікові рани, попередньо очищені від некротичних тканин. Через 1-2 доби тимчасові дермальні покриття видаляли і проводили ауто трансплантацію перфорованих шкірних трансплантатів. Порівняння проводили з групою пацієнтів, які протягом тижня до проведення ауто трансплантації отримували лікування за стандартною схемою (без нанесення на рани гідрогелевих дермальних покриттів). Результати цих клінічних досліджень наведено в таблиці 1.4.

Показано, що як синтетичні, так і натуральні конструкції біоматрикс/клітини були нетоксичними, певною мірою міцними та еластичними, прозорими або напівпрозорими, добре фіксувалися на рані, частково сорбували зайвий тканинний ексудат і були зручними в користуванні. Застосування тимчасових замінників шкіри сприяло більш надійній подальшій фіксації сітчастих ауто трансплантатів, прискорювало їх перехід на судинний тип харчування (тобто їх васкуляризацію) і приблизно в 2 рази збільшувало швидкість епітелізації сітчастих проміжків. У жодного учасника

експериментальної групи не спостерігалось випадків відторгнення трансплантатів, тоді як при лікуванні за традиційною схемою приживлення ауто трансплантатів відбувалося лише у 80% пацієнтів.

Таблиця 1.4

Порівняльні результати ауто трансплантації
перфорованих трансплантатів шкіри

	Традиційна ауто трансплантація (кількість діб)	Ауто трансплантація після накладання покриття (кількість діб)
Васкуляризація ауто трансплатів, доба	7-10	4-5
Відторгнення ауто трансплантатів, %	20	0 (не було)
Інтенсивна епітелізація, доба	12-14	6-7
Повна епітелізація, доба	18-21	7-10

Отже, клітиновмісні тимчасові дермальні покриття виявились ефективними. Частково ці позитивні результати клінічних досліджень були опубліковані раніше [189, 190], були представлені на міжнародній виставці в Парижі у 2008 р. і дозволили отримати два патенти України [191, 192].

Обов'язково слід відзначити, що державна реєстрація медичних препаратів, біотехнологічних конструкцій та інших препаратів, що містять у своєму складі живі клітини ссавців, в Україні проходить довго і важко, якщо порівнювати з безклітинними аналогами. Саме тому хірурги-комбустіологи поставили перед науковцями відділу генетики людини таке соціальне завдання: створити ефективні дермальні покриття – але без використання живих клітин – для лікування масивних опіків. Для того, щоб виконати це завдання, потрібно було обрати оптимальні носії-мембрани або покриття та певні компоненти клітинного походження, що стимулювали б загоєння опікових ран.

1.6. Підсумки до розділу

Ми бачимо, що існуючі в даний час епідермальні, дермальні і дермо-епідермальні еквіваленти на нинішньому рівні розвитку біотехнології не здатні повністю замінити шкірні тканини і слугують як тимчасові біологічно активні покриття, які постачають до пошкодженої ділянки шкіри цитокіни, фактори росту та інші біологічно активні речовини, що сприяє загоєнню ран за рахунок стимуляції регенерації власних тканин пацієнта. Замінники шкіри відіграють обмежену, але в той же час і дуже важливу роль в комплексному лікуванні глибоких і/або масивних ушкоджень шкіри, покращуючи виживаність і якість життя пацієнтів після травми. Аналіз літературних джерел свідчить, що подальші дослідження в цій області залишаються важливими в області біології і медицини, і найактуальнішими є розробки з використанням нових клітинних технологій, особливо з використанням стовбурових клітин.

Отже, ми спрямували нашу увагу на розробку нових еквівалентів дерми з включенням до їхнього складу стовбурових клітин оригінальних постійних ліній, отриманих у відділі генетики людини ІМБГ НАН України. На нашу думку, МСК відіграють важливу роль в процесі загоєння травматичних уражень шкіри, особливо опікових ран, завдяки своїй здатності секретувати різноманітні біологічно активні речовини і впливати на міграцію, проліферацію і функціональну активність клітин організму, що беруть участь у регенерації шкіри. МСК здатні скорочувати терміни відновлення дефектів тканин шкіри, запобігати переходу ранового процесу в хронічну форму або надмірному рубцюванню. Таким чином, біологічні особливості МСК дозволяють розглядати їх як вельми цінний і перспективний матеріал для створення біотехнологічних еквівалентів шкіри або її окремих шарів, наприклад, дермального шару шкіри. Ми поставили перед собою таке питання: чи можна замість самих стовбурових клітин використовувати їх похідні, клітинні лізати або безклітинні кондиційовані середовища (БКС), кондиційовані клітинами при їх розмноженні *in vitro*?

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Створення і використання штучних носіїв клітин і біологічно активних речовин

Серед наших завдань на першому місці стояло наступне: вибір носіїв природного та штучного походження для розробки дермальних еквівалентів з використанням біоматеріалів (клітини людини трьох установлених ліній і кондиційовані ними середовища).

2.1.1. Поліакриламідний гідрогель: синтез і підготовка до експериментів. Зразки поліакриламідного гідрогелю були синтезовані в Інституті біологічної хімії ім. Ф.Д.Овчаренко НАН України (рисунок 2.1). Синтез відбувався на основі акриламіда і акрилонітрила (співвідношення дорівнює 62,5:32,5) шляхом радикальної кополімерізації, концентрація агента для зшивання (N,N'-метилен-біс-акриламід) – 0,654 мас.% (виробник – фірма «MERCK», Німеччина). Раніше досліди показали сумісність цього гідрогелю з клітинами людини [189, 192]. Синтезували гідрогелі у вигляді монолітних пластин товщиною 1 мм з використанням скляних плоскопаралельних шаблонів. Кислотно-лужні параметри полімерів після закінчення синтезу визначали методом статичного рН-метричного титрування («рН-150МА», електрод «ЕСК-10601/4»). Час встановлення рівноваги складав 5 діб.

Після завершення полімерізації зразки промивали в дистильованій воді при її значному надлишку протягом 10 діб при температурі 65°C. Потім рівномірно набухлі зразки витримували при –52°C протягом доби (для збереження структури гідрогелю), із них вирізали окремі круглі фрагменти (форма і розмір фрагментів відповідали формі і розміру чашок Петрі, котрі використовувалися у подальших дослідках) та піддавали ліофільній сушці

(«Alpha 1-4 LD-2», «Christ»). Останнє призводило до того, що круглі гнучкі пластинки гідрогелю зменшували свій діаметр, втрачали гнучкість і ставали твердими; прозорість зменшувалася незначно.

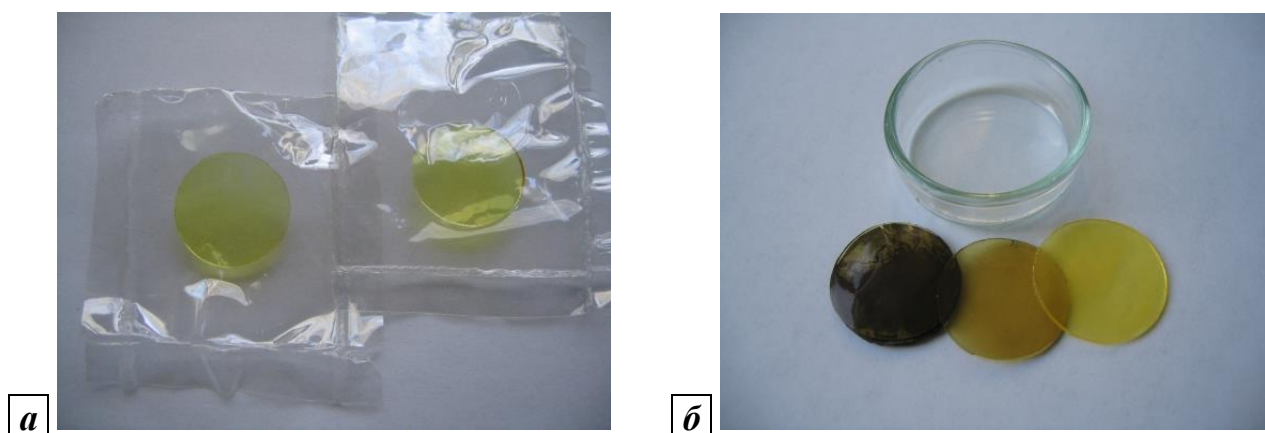


Рис. 2.1. Сухий поліакриламідний гідрогель. *a* – Фрагменти гідрогелю без домішок. *б* – Фрагменти гідрогелю з включенням наночастинок срібла у різній концентрації

Перед проведенням експерименту ми викладали висушені гідрогелі на дно чашок Петрі відповідного діаметру і додавали середовище для культивування клітин, що не містить сироватки. Об'єм доданого середовища був таким, щоб після того, як гідрогель поглинув максимально можливий об'єм середовища, залишався ще надлишок останнього (рисунок 2.2). Слід зазначити, що після всмоктування середовища діаметр фрагментів гідрогелю збільшувався.

Після такої попередньої адаптації надлишки середовища видаляли, і на поверхню гідрогелю наносили суспензію клітин з таким розрахунком, щоб краплі суспензії не стікає на дно чашки. Через дві години інкубації додавали ростове культуральне середовище, об'єм якого відповідав стандартним значенням для чашок Петрі певного розміру.

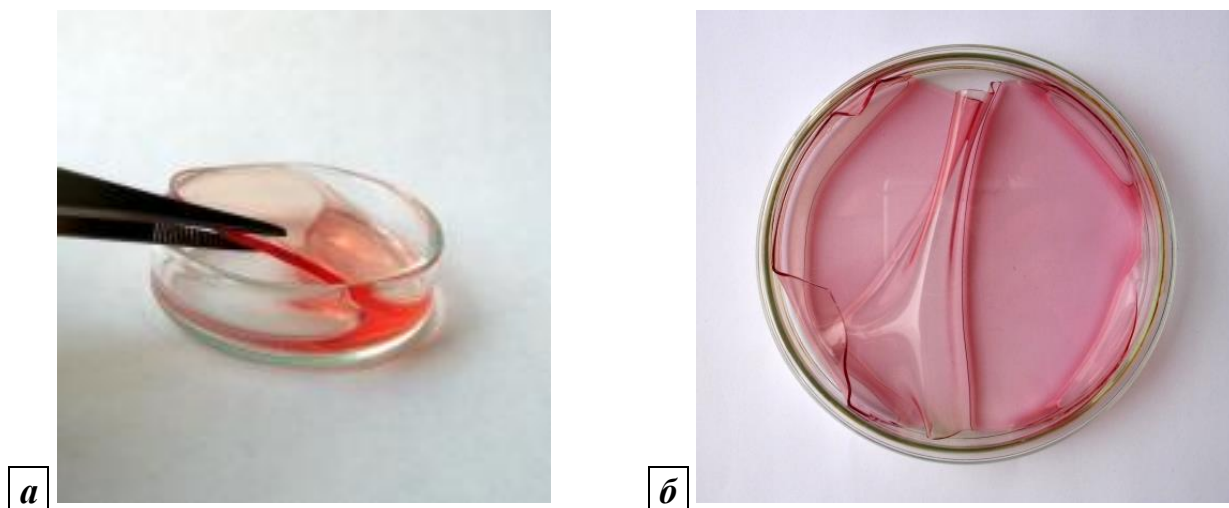


Рис. 2.2. Вологий поліакриламідний гідрогель. **а** – Фрагмент гідрогелю в чашці Петрі (35 мм) із залишками DMEM-High Glucose. **б** – Великий фрагмент гідрогелю в чашці Петрі (90 мм)

В нашій роботі до складу гідрогеля під час синтезу додатково вводили нанорозмірні частинки срібла (30 нм) або заліза (кілька десятків нм). Окремі зразки гідрогелю були рівномірно насичені наночастинками одного виду.

2.1.2. Симбіотичний організм (бактерійно-дріжджове угруповання) *Medusomyces gisevii* (комбуча, kombucha, чайний гриб): підготовка до експериментів. Симбіотичний організм *Medusomyces gisevii* (комбуча) має в собі два складових елементи: дріжджоподібні гриби і бактерії роду *Acetobacter*. Цей матеріал був люб'язно наданий нам лабораторією мікробної екології ІМБГ НАН України (завідувач лабораторії – к.б.н. Н.О.Козировська).

2.1.3. Колагенова плівка „Білкозин”: підготовка до експериментів, адаптація до контакту з клітинами. Плівка „Білкозин” виробляється відкритим акціонерним товариством „Прилуцкий завод "Белкозин"” (м. Прилуки, Україна) і цілком складається з природного матеріалу колагену. Цю плівку люб'язно надав нам науковий співробітник відділу сенсорних пристроїв, систем та технологій безконтактної діагностики №220 Інституту кібернетики ім. В.М.Глушкова НАН України Сергій Іванович Лукаш.

Створюючи тимчасовий еквівалент дермального шару шкіри, ми спеціально обробляли й адаптували плівку „Білкозин” з метою застосування її як носія-мембрани для желатинового гідрогелю з клітинами. Спочатку з плівки вирізали круглі фрагменти за формою чашок Петрі (фірма „Anumbra”, Німеччина). Розпластані в чашках Петрі фрагменти білкозинової плівки інкубували в буферному розчині Хенкса (HBSS) з індикатором феноловим червоним (фірма „РАА”, Австрія) для усунення низькомолекулярних фрагментів колагену, що дають кислу реакцію. Звільнюючись у розчин, ці фрагменти знижують рН розчину, що візуально виглядає як пожовтіння рідини. Розчин змінювали кожну добу доти, доки забарвлення фенолового червоного не досягало необхідного значення рН, і після добової інкубації рН розчину залишався незмінним. Зазвичай вистачало двох замін розчину на свіжу порцію.

Після обробки фрагменти «адаптованої» плівки витримували в морозильній камері при -18°C протягом доби; ця процедура підвищувала м'якість та гнучкість плівки. Після розморожування фрагменти адаптованої плівки занурювали у буферний розчин Хенкса (HBSS) і стерилізували автоклавуванням протягом 30 хвилин при режимі 0,5 додаткових атмосфери. Стерильні фрагменти адаптованої білкозинової плівки розміщували у чашках Петрі відповідного діаметру і добавляли культуральне середовище DMEM-High Glucose для адаптації до подальшого контакту з живими клітинами.

2.1.4. Карбополовий гідрогель: синтез і підготовка до експериментів.

Гідрогель карбомеру або карбополу вироблявся на основі гелеутворювача Carbopol 980 з концентрацією останнього 1,5%. Як розчинник використовувалося культуральне середовище DMEM-High Glucose (фірма «РАА», Австрія), яке застосовується для культивування широкого спектру клітин.

Попередньо готували 3%-ву суспензію карбомеру (ми називаємо цю суміш суспензією, базуючись на її зовнішньому вигляді), тобто певну кількість карбомеру додавали до середовища згідно з розрахунками: 3 г карбомеру на

100 мл DMEM-High Glucose. Суміш перемішували шляхом збовтування та залишали на добу в холодильнику при +4°C; під час цієї інкубації карбопол поглинав рідину та утворював суспензію. Великі фрагменти карбомеру остаточно подрібнювали шляхом збовтування після доби інкубації з розчинником. Ми отримували дисперсну систему, яка на вигляд була суспензією з низьким рівнем в'язкості. Середовище DMEM-High Glucose було дисперсійним середовищем (колір середовища був жовтим завдяки низькому рівню рН), а набухлі частинки карбомеру були дисперсною фазою. Оскільки ми тут маємо справу із суспензією, то безпосередньо перед відмірюванням аліквот зробленої суміші її слід збовтати.

Отримана суспензія карбомеру має низьке значення рН. Якщо штучно підвищувати рН, то при його значеннях, близьких до нейтрального, відбувається фазовий перехід, і суміш стає більш твердою, однорідною та прозорою на вигляд, таким чином перетворюючись на гідрогель.

Для того, щоб перетворити карбополову суспензію у гідрогель, ми додавали до суспензії при перемішуванні 18% розчин NaOH, поки рН не досягне приблизно 7,4. Кількість лужного розчину, необхідного для доведення значення рН до 7,0, розраховується, виходячи із такого співвідношення ваги сухих речовин:

**«1 г карбомеру (молекулярна маса – 86 000-1 000 000 Da) +
0,42 г NaOH в перерахунку на суху речовину».**

Середовище DMEM-High Glucose містило у собі кольоровий індикатор феноловий червоний, який дозволяє візуально оцінювати значення рН рідини. Спостерігаючи за зміною кольору індикатору, ми додавали таку кількість 18% розчину NaOH, щоб довести значення рН гідрогелю до 7,4. Точне значення потрібної кількості доданого лугу неможливо було теоретично розрахувати для загального використання протягом усієї нашої роботи або навіть протягом окремо взятого експерименту. Кожен раз, готуючи порцію карбополового гідрогелю (зазвичай це було кілька мілілітрів на день), ми спочатку додавали однією порцією дещо менше розчину NaOH, ніж потрібно за розрахунками, а

потім при постійному перемішуванні продовжували додавати луг доти, доки рН гідрогелю не досягав значення 7,4.

Після того, як було вироблено 3%-й карбополовий гідрогель вищезазначеним шляхом, він змішувався або з чистим середовищем (контроль у дослідах), або з іншими компонентами (суспензія клітин, суспензія зруйнованих внаслідок лізису клітин, кондиційоване середовище) у об'ємній пропорції 1:1, тому кінцевий гідрогелевий препарат містив 1,5% карбомеру. Таке змішування відбувалося безпосередньо перед використанням даної порції кінцевого гідрогелевого препарату у досліді. Подробиці приготування будуть вказані у розділі "Результати".

2.2. Клітини і біологічно активні компоненти біоконструкцій, створених у нашій роботі

Вище вже було сказано, що найсучаснішими та найефективнішими є біотехнологічні ранові покриття, що містять у своєму складі живі клітини різних типів та походження.

2.2.1. Клітини. В роботі були використані наступні типи клітин:

а) Клітинна лінія 4BL (раніше використовували клон 4BL6) – лінія дорослих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) людини, яка була отримана у відділі генетики людини ІМБГ НАН України доктором біологічних наук Л.Л.Лукаш з периферійної крові здорового донора [185, 193]. Клітини цієї лінії охарактеризовані детально з використанням низки методів клітинної і молекулярної біології (проточної цитометрії, імунофлюоресцентного аналізу, звичайної ПЛР та кількісної РТ-ПЛР, аналізу на здатність до мультипотентного диференціювання *in vitro*, а також шляхом визначення проліферативного індексу та колонієутворювальної здатності). Фенотип клітин лінії 4BL такий: CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁻. Це разом з їх здатністю до диференціювання дозволяє припустити, що ці клітини є

стовбуровими клітинами негемопоестичного ряду, а саме мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК).

б) Клітинна лінія E8 також була отримана у відділі генетики людини ІМБГ НАН України і веде своє походження від ембріональних гермінативних клітин людини.

в) Клітинна лінія A102, що люб'язно надана у наше розпорядження професором Дж. МакКорміком (Мічиганський Державний Університет, США) походить від фібробластів шкіри дорослої людини.

2.2.2. Культивування клітин *in vitro*. Моношарові культури клітин культивувалися у чашках Петрі, або багатолункових планшетах, або невентильованих культуральних флаконах з пласким дном (матеріал – скло або пластик). Як ростове середовище була використана суміш стандартного культурального середовища DMEM-High Glucose (фірма «РАА», Австрія), що застосовується для культивування широкого спектру клітин, а також 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (fetal calf serum, FCS, фірма «РАА», Австрія), а також 100 Од/мл бензилпеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Режим інкубації для чашок Петрі і багатолункових планшетів – +37°C, 5% CO₂, режим інкубації для невентильованих культуральних флаконів – +37°C.

Пересів клітин здійснювався з використанням стандартної методики при наближенні конфлюентності клітинного моношару до 80-90%. Для зняття клітин з субстрату (скло або пластик) використовувався 0,25% розчин трипсина (фірма «РАА», Австрія) у версені [194].

2.2.3. Кріоконсервування клітин і виведення їх із кріоконсервованого стану. Для кріоконсервування клітин використовувалася така суміш: 45% DMEM-High Glucose, 45% FCS, 10% ДМСО. Після зняття клітин з субстрату вони осаджувалися шляхом центрифугування при кімнатній температурі при 300 g протягом 5 хв. Далі клітинний осад суспендувався в

суміші для кріоконсервування, яка була охолоджена до +4°C. Отримана суспензія розподілялася на аліквоти в мікропробірках для кріоконсервування. Дані аліквоти клітинної суспензії після інкубації на льоду протягом 30 хвилин заморожували і зберігали в закритому пінопластовому контейнері при температурі -80°C. Розморожування клітин проводили спочатку у водяній бані при температурі +39°C до моменту, коли в аліквоті залишався невеличкий фрагмент льоду, після чого розморожування закінчувалося при кімнатній температурі (без розгерметизації пробірки).

Якщо клітини розморожували для культивування, то далі в стерильних умовах розморожену клітинну суспензію переносили в культуральний посуд, і додавали ростове середовище.

Якщо клітини розморожували з метою створення біоконструкцій, то цю процедуру проводили безпосередньо перед використанням. Клітини в такому разі осаджувалися шляхом центрифугування при кімнатній температурі при 300 g протягом 5 хв, після чого ресуспендувалися у середовищі DMEM-High Glucose таким чином, щоб кінцева концентрація клітин становила 2 млн/мл.

2.2.4. Отримання клітинних лізатів. Для отримання лізатів клітинні суспензії у середовищі DMEM-High Glucose з концентрацією клітин 1 млн/мл 10-кратно швидко заморожували і розморожували. Клітинний детрит видалявся шляхом центрифугування. Потім клітинні лізати ділили на аліквоти і зберігали в замороженому стані при -80°C. Розморожування аліквот відбувалося у лабораторному термостаті при +37°C, і цю процедуру проводили безпосередньо перед використанням у досліді.

2.2.5. Отримання безклітинного кондиційованого середовища (БКС). Для приготування кондиційованого клітинами середовища використовували клітинні культури (лінії 4BL, E8, A102) з фіксованою величиною конфлюентності клітинного моношару ($\approx 25\%$, $\approx 50\%$, $\approx 90\%$). Після досягнення

бажаної конфлюентності ростове середовище видаляли, замість нього додавали такий самий об'єм свіжого середовища DMEM-High Glucose, але без FCS і без антибіотиків. Після інкубації протягом доби (або протягом іншого часу, якщо це було передбачено в схемі експерименту) за стандартних умов (для чашок Петрі і багатолункових планшетів – $+37^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$, для невентильованих культуральних флаконів – $+37^{\circ}\text{C}$) кондиційоване середовище збирали. Клітини, що могли випадково відкріпитися і потрапити у рідину, видаляли шляхом центрифугування при кімнатній температурі при 300 g протягом 10 хв . Потім безклітинне кондиційоване середовище (БКС) ділили на аліквоти і зберігали в замороженому стані при -80°C або в інших умовах (в замороженому стані при -20°C , або при $+4^{\circ}\text{C}$, або при $+20^{\circ}\text{C}$), якщо це було передбачено схемою експеримента. Розморожування аліквот відбувалося у лабораторному термостаті при температурі $+37^{\circ}\text{C}$, це робили безпосередньо перед використанням у досліді.

2.3. Визначення якості та ефективності біоконструкцій, створених у нашій роботі

Якість та ефективність біоконструкцій визначали, підраховуючи життєздатність клітин, кількість клітин, метаболічну активність клітин і визначаючи динаміку загоєння опікових ран.

2.3.1. Визначення життєздатності клітин. Визначення життєздатності клітин проводилося за допомогою забарвлення клітинної суспензії 1% розчином трипанового синього з наступним підрахунком незабарвлених та забарвлених клітин у камері Горяєва. Підрахунок проводили одразу після змішування клітинної суспензії з фарбою. Якщо визначення життєздатності проводилося після кріоконсервування, то клітинна суспензія не відмивалася від суміші для кріоконсервування. Життєздатність клітин вимірювали в відсотках (в межах от 0% до 100%) і розраховували за формулою:

$$\text{viability} = \frac{n_L}{n_D + n_L} \times 100\%$$

де viability – життєздатність клітин у суспензії,

n_L – число живих (live), тобто незабарвлених клітин у камері,

n_D – число мертвих (dead), тобто забарвлених клітин у камері.

Якщо число клітин у камері є завеликим, то зазвичай обмежуються фіксацією стану (тобто забарвленості) близько 200 клітин. Якщо в усій камері число клітин суттєво менше, ніж 200 штук, то потрібно проводити підрахунок клітин у декількох камерах.

2.3.2. Підрахунок клітин на поверхні твердого гідрогеля. Для рахування кількості клітин на поверхні твердого гідрогеля ми переносили фрагменти гідрогеля в стерильні чашки Петрі. Потім за допомогою 0,25% розчину трипсина у версені клітини знімали з поверхні гідрогелю та осаджували в окремих пробірках (скляні центрифужні пробірки або пластикові мікропробірки Eppendorf на 1,5 мл) шляхом центрифугування при кімнатній температурі при 300 g протягом 5 хв. Далі супернатант обережно видаляли, а осад клітин обережно суспендовали в невеликій аліквоті культурального середовища DMEM-High Glucose. Дана клітинна суспензія вносилася в камеру Горяєва.

Якщо число клітин у камері є надто великим, то зазвичай рахують клітини в кількох маленьких квадратах, обираючи їх таким чином, щоб вони були рівномірно розподілені серед усіх інших маленьких квадратів. Загальне число клітин, що підраховані, зазвичай має бути не менш, ніж 200 штук. Якщо в усій камері число клітин суттєво менше, ніж 200 штук, то рахують усі клітини в камері.

Загальна кількість клітин у камері Горяєва (отримана шляхом прямого рахування клітин у всій камері або шляхом рахування клітин в окремих маленьких квадратах і наступним розрахунком числа клітин, що має бути в усій камері) помножується на 1100, в результаті ми отримуємо значення

концентрації клітин, тобто число клітин в 1 мл аліквоти, в якій було суспендовано клітинний осад. Знаючи об'єм аліквоти, ми знаходимо кількість клітин, що була на поверхні окремого фрагменту гідрогеля.

2.3.3. Наночастинки оксиду заліза. В експериментах по вивченню біологічної активності наночастинок оксиду заліза (II, III) Fe_3O_4 (має феромагнітні властивості), використовувалися порошки, які були отримані в Інституті проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевіча НАН України. В експериментах по вивченню впливу нанорозмірних частинок оксиду заліза (II,III) на виживання і проліферацію клітин використовувалися чотири типи порошоків з розмірами частинок 10 нм, 20 нм, 60 нм і 200 нм.

2.3.4. МТТ-тест метаболічної активності клітин під впливом різних чинників. МТТ-тест заснований на тому, що в метаболічно активних клітинах дегідрогенази мітохондрій здатні перетворювати МТТ-реактив в забарвлені кристали формазану [195].

Клітини лінії 4BL або Нер-2 розсівали на 96-лунковий планшет з плоским дном із розрахунку 5 тис. клітин на лунку і культивували на стандартному ростовому середовищі за стандартних умов протягом доби. Далі ростове середовище замінювалося, і здійснювалося титрування досліджуваних зразків кондиційованого середовища або в лунки додавалися певні кількості порошку оксиду заліза Fe_3O_4 (не менше 3 лунок на варіант). За контрольні брали клітини, що культивували в ростовому середовищі. Загальний об'єм живильного середовища в кожній лунці становив 100 мкл. Після інкубації протягом трьох діб ($+37^{\circ}C$, 5% CO_2) з кожної лунки видаляли рідину і додавали 115 мкл суміші «ростове середовище + 0,5%-ний розчин МТТ (співвідношення 100 мкл : 15 мкл)», після чого інкубували протягом 4 годин ($+37^{\circ}C$, 5% CO_2). По завершенні інкубації в кожну лунку додавали по 200 мкл ДМСО і інкубували на планшетному шейкері при кімнатній температурі до повного розчинення утворених кристалів формазану. Оптичну густину отриманих розчинів

визначали за допомогою планшетного спектрофотометра BioTek ELx800 при довжині хвилі 570 нм.

2.3.5. Визначення концентрації низки регуляторних білків у тварин.

Для визначення концентрації фактору росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor, VEGF), фактору росту нервів (nerve growth factor, NGF), матриксної металопротеїнази 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2, желатиназа А) та гіпоксієіндукованого фактору-1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) в тканинах щурів (а саме в ділянці шкіри, де відбувалося загоєння опікової рани) використовували імуноферментний метод за допомогою комерційних наборів “GE Healthcare: Amersham” (Великобританія).

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 \times 1 см. Цей фрагмент вкладали в пробірку типу Eppendorf (1,5 мл), додаючи фізіологічний розчин (0,9% NaCl), і заморожували. Після збору усіх зразків кожен з них гомогенізували за допомогою електромеханічного пристрою у фізіологічному розчині на холоді. Гомогенат фільтрували крізь чотири шари нейлонової сітки.

В гомогенаті шкіри щурів визначався вміст загального білку за методом Бредфорд [196]. Після визначення вмісту загального білку проби розводилися з використанням TBS до концентрації білку 20 мкг/мл. Вміст чотирьох вищезазначених біологічно активних факторів в гомогенаті шкіри щурів визначали за допомогою імуноферментного аналізу ELISA [197]. В лунки 96-лункових імунологічних планшетів внесли по 100 мкл зразка (гомогенат шкіри), далі провели інкубацію при 37 $^{\circ}$ C протягом 1 год. Всі зразки були проаналізовані в трьох повторах. Тричі промили лунки розчином TBS-T (розчин 0,05% Tween 20 у TBS). Для блокування неспецифічних місць зв'язування додали в лунки по 200 мкл молока, далі провели інкубацію при 37 $^{\circ}$ C протягом 1 год. Тричі промили лунки розчином TBS-T. В лунки внесли по 100 мкл відповідних моноклональних мишачих антитіл (первинні антитіла), а

саме anti-VEGF, anti-NGF, anti-MMP2 anti-HIF-1 α (Santa Cruz, USA), далі провели інкубацію при 37°C протягом 1 год. Тричі промили лунки розчином TBS-T. В лунки внесли по 100 мкл вторинних антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому (Bio-Rad, США), далі провели інкубацію при 37°C протягом 1 год. Тричі промили лунки розчином TBS-T. В лунки внесли по 100 мкл фарбника o-phenylenediamine + hydrogen peroxide і провели інкубацію в темряві протягом 10-15 хв. Далі внесли в лунки по 100 мкл стоп-реагенту – 0,5Н H₂SO₄ – і провели визначення оптичної густини на планшетному спектрофотометрі (планшетному рідері) Synergy HT (BioTek, USA) при довжині хвилі 492 нм. Концентрацію біологічно активних факторів визначали за допомогою формули в інструкції до комерційного набору і виражали в умовних одиницях на 1 мг білку (ОУ/мг білку).

2.3.6. Експериментальні тварини. Дослідження із залученням тварин проводилися на базі віваріїв Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (йдеться про залучення мишей) і Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (йдеться про залучення щурів).

Використовувалися тварини власного розведення, а саме:

– лабораторні білі щури лінії Wistar дорослого віку (вага приблизно 170-200 г.),

– лабораторні білі миші лінії ICR (сублінія ICR-IMBG) віком 3 місяці (вага приблизно 30 г.).

В приміщенні для утримання тварин витримувались наступні умови: температура – 20-24°C, вологість – 30-70%, природний світловий день. Тварини утримувалися на стандартному раціоні для лабораторних гризунів згідно з документом «Стандартні правила по впорядкуванню, обладнанню й утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)», мали постійний доступ до води і комбікорму. Всі роботи з тваринами проводилися у відповідності з етичними нормами і правилами роботи з лабораторними тваринами [198], у

відповідності з законом України від 21.02.2006 №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та (при роботі у віварії ІМБГ НАН України) згідно стандартних лабораторних протоколів, затверджених комітетом з біоетики ІМБГ НАН України.

Поза експериментом щури утримувалися групами по 4-5 тварин, а миші утримувалися групами по 4-6 тварин.

Перед експериментом всі тварини піддавалися ветеринарному огляду. Щури рандомно розподілялися на групи необхідного розміру, будучи пронумерованими і поміченими відповідним чином, після чого проходили акліматизацію в новостворених групах протягом 5 днів задля звикання тварин одна до одної. Серед мишей аналогічний перерозподіл проходив тільки у випадках використання самиць (акліматизація була тоді не потрібна, оскільки самиці зазвичай не конфліктують між собою). Самці мишей не перегруповувалися, оскільки перегруповання дорослих самців призводить до перманентних конфліктів та бійок із загибеллю тварин.

Якщо по закінченню експерименту тварин не можна було залишати живими, то їх умертвляли гуманним методом при мінімальних фізичних і психологічних стражданнях, використовуючи метод цервікальної дислокації або шляхом передозування CO₂.

2.3.7. Моделювання опікової хвороби у мишей і щурів. Миші лінії ICR (вік 3 місяці, вага \approx 30 г) або щури лінії Wistar (дорослі, вага 170-200 г.) піддавалися премедикації: їм внутрішньом'язово вводили комерційний препарат "Ксила", що містить 2% ксилазину гідрохлориду. Миші отримували по 20 мкл, а щури отримували по 150 мкл препарату "Ксила". Після проявлення заспокійливого ефекту від дії препарату тваринам інтраперитонеально і повільно вводили 1%-й водний розчин натрію тіопенталу з розрахунку "60 мг діючої речовини на 1 кг ваги тіла тварини".

Після входження тварини у наркотичний стан видаляли шерстний покрив на каудальній частині спини. Потім за допомогою квадратної металевої

пластини 1×1 см, нагрітої до $\approx 200^\circ\text{C}$, наносили термічний опік III ступеню.

Коли у досліді використовувалися миші, то аплікація пластини до голої шкіри проводилася протягом 2 с. Коли у досліді використовувалися щури, то аплікація пластини до голої шкіри проводилася протягом 4 с.

Тваринам забезпечували перебування в теплі ($28\text{-}30^\circ\text{C}$) до повного виходу з наркозу.

2.3.8. Визначення динаміки загоєння опікових ран. Під час дослідження загоєння 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 (рисунок 2.3).

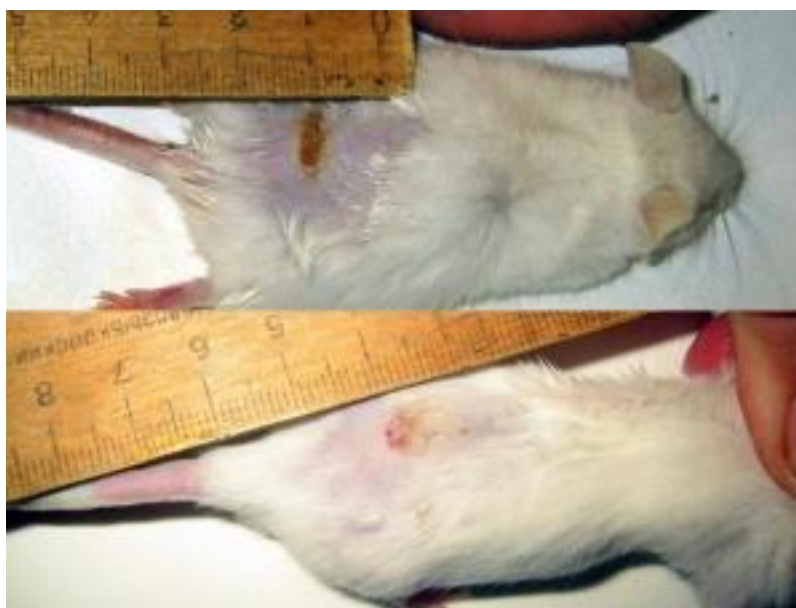


Рис. 2.3. Фотофіксація стану опікової рани

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. Обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою програми OriginPro 8.1.

2.3.9. Програмна і 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 вважались вірогідними при рівні значущості $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3.

РОЗРОБКА НОВИХ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ НОСІЇВ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ТИМЧАСОВИХ ЕКВІВАЛЕНТІВ ДЕРМИ З ВКЛЮЧЕННЯМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН АБО ЇХ ПОХІДНИХ

3.1. Модифікація поліакриламідного гідрогелю як носія для клітинного компоненту дермального ранового покриття

На базі ІМБГ НАН України з 2005 року проводяться біотехнологічні дослідження з розробки тимчасових еквівалентів дерми або дермальних ранових покриттів, що містять у своєму складі живі клітини людини. Для розробки носіїв цих біоконструкцій пропонувались різноманітні органічні матеріали як синтетичного, так і природного походження. Раніше у відділі генетики людини ІМБГ НАН України були створені й апробовані гідрогелеві покриття на основі зшитого сополімеру акриламідну і акрилонітрилу. Цей сополімер був синтезований шляхом спільної радикальної полімеризації в Інституті біоколоїдної хімії ім.Ф.Д.Овчаренко НАН України (м. Київ) [189, 190, 191, 192]. Було показано, що зразки такого гідрогелю не є цитотоксичними: через добу після висівання клітин на відповідні гідрогелеві носії у вигляді мембран спостерігалось прикріплення і розпластування клітин на поверхні з подальшим розмноженням до утворення клітинного моношару [190]. Як клітинний компонент у дослідженнях використовували первинні фібробласти шкіри людини або лабораторних тварин і мультипотентні клітини оригінальної лінії 4BL [185]. В окремих експериментах для наших біоконструкцій використовували клітинний матеріал плаценти людини як багатого джерела стовбурових клітин, що є перспективним в майбутньому [186, 187, 188].

Пориста структура поліакриламідних гідрогелів зумовлює значну вологовмістну здатність: у вологому стані цей матеріал вміщує до 80% води або водного розчину, зокрема культурального середовища, яке використовується

для лабораторного культивування клітин. Як виявилось в процесі нашої подальшої роботи, насичення гідрогелів свіжим або кондиційованим культуральним середовищем (адаптація до культивування клітин) є необхідним етапом при розробці біоконструкцій і важливим для досягнення біосумісності компонентів.

Працівниками відділу генетики людини ІМБГ НАН України спільно з лікарями Центру термічної травми та пластичної хірургії Київської міської лікарні №2 було проведено клінічні дослідження різних дермальних покриттів на обмеженому контингенті пацієнтів. Зразки гідрогелів на основі синтетичної поліакриламідної або натуральної колагенової матриці з іммобілізованими клітинами лінії 4BL наносили на попередньо очищені від некротичних тканин рани. Через добу тимчасові дермальні покриття знімали і проводили аутотрансплантацію шкіри. У контрольних випадках аутотрансплантація шкіри проводилася без попереднього нанесення на рани гідрогелевих дермальних покриттів.

Показано, що біоконструкції «матрикс + клітини» як на синтетичній, так і на натуральній основі були нетоксичними, міцними, еластичними, прозорими або напівпрозорими і зручними в користуванні, добре фіксувалися на рані, частково поглинали зайвий тканинний ексудат. Застосування тимчасових замінників шкіри сприяло більш надійній подальшій фіксації сітчастих аутотрансплантантів і приблизно в 2 рази збільшувало швидкість епітелізації сітчастих проміжків. Позитивні результати клінічних досліджень дозволили отримати два патенти України [191, 192]. Отже, біотехнологічні ранові покриття у вигляді мембран з нанесеними клітинами добре зарекомендували себе в медичній практиці при лікуванні глибоких масивних опіків.

Основним завданням цієї частини роботи було оптимізувати створення біоконструкцій на основі щільних гідрогелевих носіїв (мембран) для того, щоб поліпшити адгезію і проліферацію клітин на поверхні поліакриламідного гідрогелю. Ці процеси можуть стимулюватися внаслідок введення домішок до складу гідрогелю. Зокрема такими домішками можуть бути наночастинки

різного походження. Ми вирішили дослідити вплив деяких металевих наночастинок на життєдіяльність клітин лінії 4BL, які включені до складу наших біоконструкцій на основі поліакриламідну. В першу чергу ми звернули увагу на наночастинок срібла та оксиду заліза. В даній роботі ми вирішили дослідити можливість введення наночастинок срібла та оксиду заліза до складу наших поліакриламідних біоконструкцій.

Нами було досліджено вплив наночастинок срібла (розмір – 30 нм) на морфологію і розмноження клітин лінії 4BL на поверхні поліакриламідних гідрогелевих матриць. Було використано такі концентрації колоїдного срібла: 5, 25, 50, 100, 250 мкг/г маси сухої речовини (рисунок 3.1).

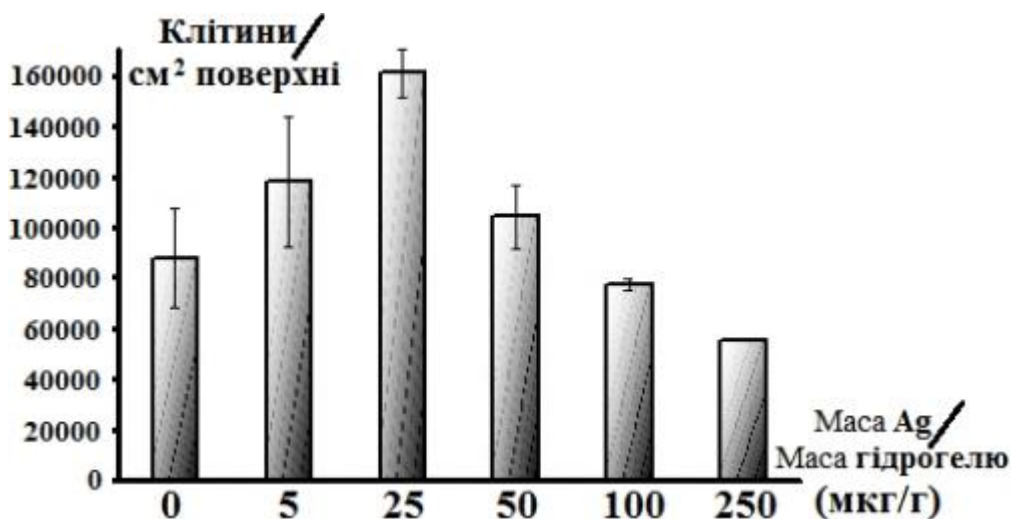


Рис. 3.1. Вплив наночастинок колоїдного срібла в складі поліакриламідного гідрогеля на проліферацію клітин лінії 4BL на поверхні гідрогелевого носія. Дані отримано на третю добу культивування. $p \leq 0,05$

Найефективнішою в плані стимуляції проліферації клітин лінії 4BL виявилася 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 (рисунок 3.2).

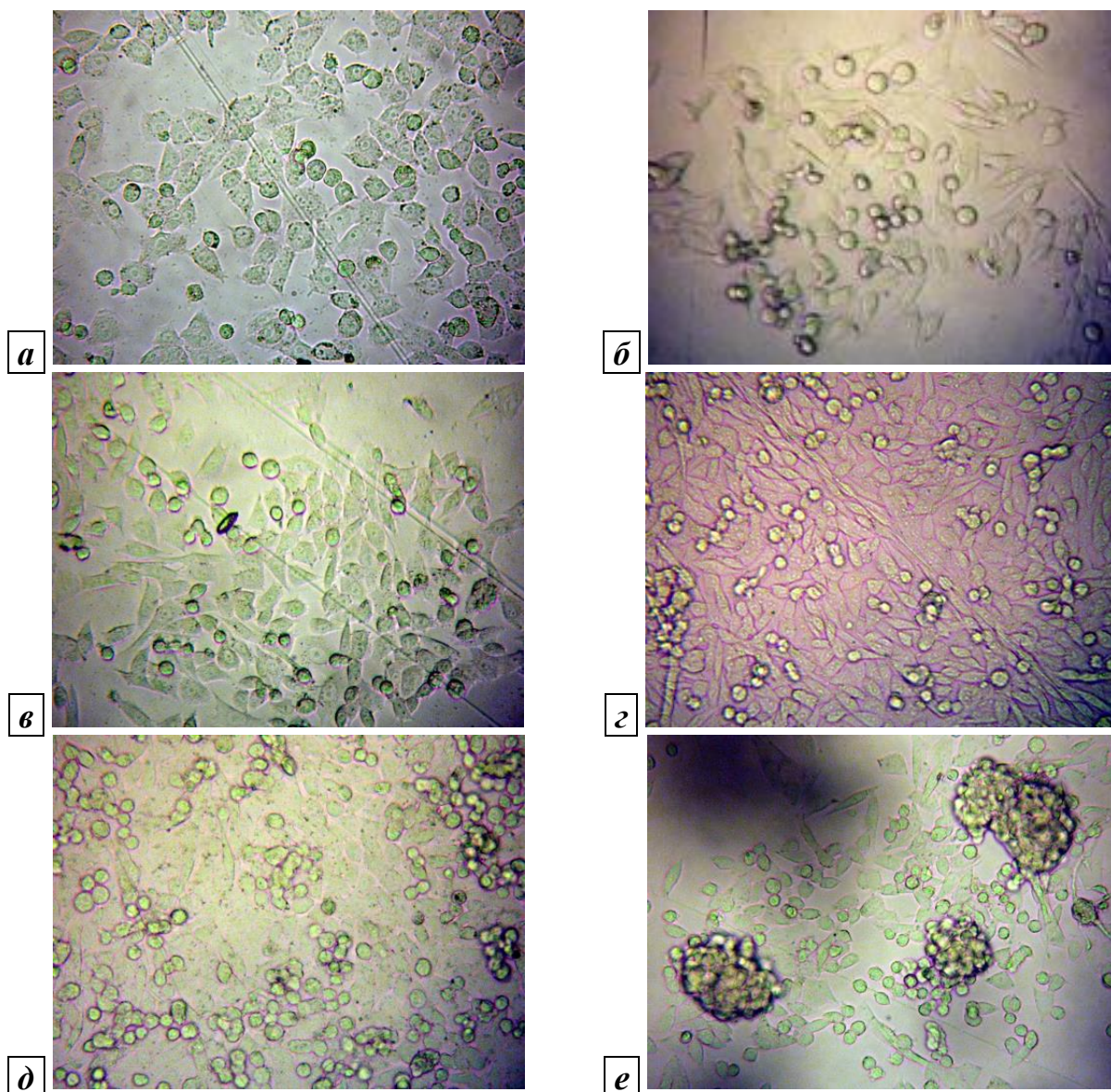


Рис. 3.2. Клітини лінії 4BL на поверхні скла або поліакриламідного гідрогелю. *a* - Поверхня скляної чашки Петрі (контроль). *б* - Поверхня гідрогелю без наночастинок срібла (адекватний контроль). *в* - Поверхня гідрогелю з наночастинками срібла у концентрації 5 мкг/г. *г* - Поверхня гідрогелю з наночастинками срібла у концентрації 25 мкг/г. *д* - Поверхня гідрогелю з наночастинками срібла у концентрації 100 мкг/г. *е* - Поверхня гідрогелю з наночастинками срібла у концентрації 250 мкг/г

Срібло у концентраціях 5 мкг/г і 50 мкг/г теж призводило до збільшення числа клітин у порівнянні з контролем, проте ці зміни не були статистично

достовірними. Збільшення концентрації колоїдного срібла до 100 мкг/г і 250 мкг/г призводило до формування клітинних агрегатів і, можливо, цитотоксичному ефекту.

На рисунку 3.2 наведено вплив наночастинок колоїдного срібла у складі поліакриламідної гідрогелевої матриці на проліферацію клітин, що знаходяться на поверхні гідрогелю. Мікрофотографії були зроблені на третю добу культивування. На рисунку 3.2.а показано клітини, що росли на поверхні скляної чашки Петрі і слугували контрольним зразком. Далі на рисунку 3.2.б показано клітини, частина яких округлились, що свідчить про їхній поділ, на поверхні гідрогелю, що не містить наночастинок срібла у своєму складі (адекватний контроль). Наступні рисунки (3.2.в, 3.2.г, 3.2.д, 3.2.е) демонструють дозозалежне збільшення кількості округлих клітин в залежності від концентрації наночастинок колоїдного срібла. Як вже відзначалось, збільшення кількості клітин підтверджувалось також прямим підрахунком клітин в камері Горяєва. Слід відзначити, що значним недоліком мембраносіїв, які містять наночастинок срібла, є те, що вони втрачають прозорість.

Вплив наночастинок оксиду заліза Fe_3O_4 на проліферацію клітин 4BL вивчався в інших умовах культивування порівняно з вивченням впливу наночастинок срібла. Клітини вирощували в 96-лункових планшетах у присутності наночастинок оксиду заліза Fe_3O_4 в різних концентраціях. На третю добу культивування проводився МТТ-тест. Результати представлено на рисунку 3.3.

На рисунку 3.3.а показано зворотну 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 зниження кількості живих клітин (статистично достовірний ефект), і зі збільшенням їх концентрації цитотоксична дія значно посилювалася.

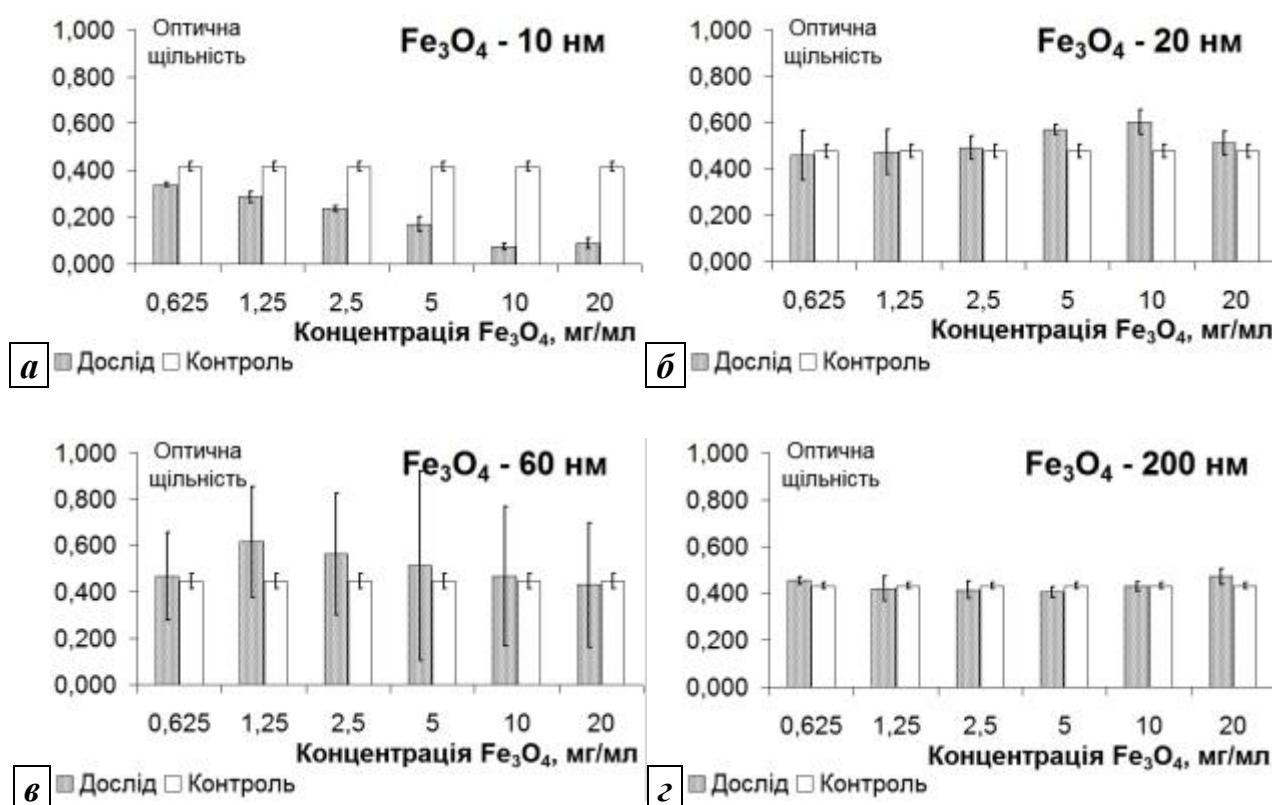


Рис. 3.3. Вплив наночастинок Fe₃O₄ на проліферацію клітин ($p \leq 0,05$).
 а - Вплив частинок розміром 10 нм. б - Вплив частинок розміром 20 нм.
 в - Вплив частинок розміром 60 нм. г - Вплив частинок розміром 200 нм

Наночастинки оксиду заліза більшого розміру, а саме 20 нм (рисунок 3.3.б) і 60 нм (рисунок 3.3.в) при деяких концентраціях призводили до збільшення кількості метаболічно активних клітин у порівнянні з контролем. У дослідях з наночастинками розміром 20 нм статистично достовірний ефект стимуляції метаболічної активності клітин спостерігався при концентраціях 5 мг/мл і 10 мг/мл. Використання наночастинок розміром 60 нм супроводжувалося значним розкидом результатів вимірювання, тому статистично достовірна різниця між досвідом і контролем не виявлена.

Наночастинки оксиду заліза розміром 200 нм (рисунок 3.3.г) не чинили істотного впливу на життєздатність клітин. Не виявлено позитивних або негативних тенденцій впливу наночастинок на виживання і проліферацію клітин. Ми припускаємо, що наночастинки розміром 200 нм взагалі не проникають в досліджувані клітини, але це питання потребує подальшого вивчення.

Присутність наночастинок срібла або оксиду заліза у складі мембран-носіїв призводила до втрати прозорості поліакриламідних мембран.

На наш погляд, різниця біологічної активності наночастинок оксиду заліза (Fe_3O_4) різного розміру, пов'язана, зокрема, з їх різною здатністю до того, щоб взаємодіяти з клітинними рецепторами, проникати в клітини і впливати на клітинні процеси. Слід відзначити, що наночастинок оксида заліза мають магнітні властивості, і не виключено, що завдяки цьому вони могли здійснювати певний вплив на метаболічну активність клітин. В спільній роботі із співробітниками Інституту кібернетики ім. В.М.Глушкова НАН України ми показали (див. пункти №8 і №9 в списку наукових праць, який надано в кінці цього розділу), що навіть клітини лінії 4BL самі собою виявляють невисокий рівень магнітної активності. Але ця цікава робота виходить за межі даного дослідження.

3.2. Використання біоплівки симбіотичного організму *Medusomyces gisevii* як мембрани-носія для створення тимчасових дермальних еквівалентів

Симбіотичний організм *Medusomyces gisevii* (комбуча, чайний гриб) має в собі два складових елементи: дріжджі і бактерії роду *Acetobacter*. Ми спробували використати біоплівку даного симбіотичного організму як носій живих клітин. Від товстого шару біоплівки відділяли тонкі пласкі фрагменти. Ці фрагменти занурювали у дистильовану воду і у такому стані піддавали термічній обробці в автоклаві з метою знищення живих симбіотичних бактерій. Далі фрагменти біоплівки на 3 доби переносили в культуральне середовище DMEM-High Glucose (фірма «РАА», Австрія) з додаванням антибіотиків (100 Од/мл бензилпеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину). Після інкубації в культуральному середовищі фрагменти переносили в скляну чашку Петрі (рисунок 3.4). Зверху на біоплівку наносили суспензію клітин 4BL із розрахунку приблизно 100 000 клітин/см² плівки.

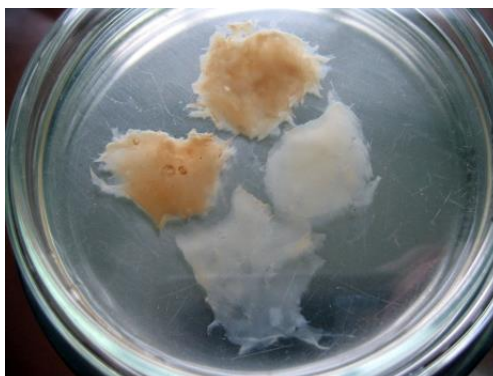


Рис. 3.4. Фрагменти стерилізованої біоплівки в чашці Петрі з водою. Темний колір вказує на те, що фрагмент був узятий з поверхні (а не з середини) загального шару біоплівки

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 трипанового синього і підрахунок співвідношення живих і мертвих клітин. Клітини рівномірно розподілялися всередині шару біоплівки. У більшості випадків розпластування і поділу клітин не спостерігалось, клітини зазвичай залишалися сферичними протягом 6 днів від дня початку експерименту (рисунок 3.5.а). Тільки невелика частина клітин розпластувалася по волокнам біоплівки, утворюючи форму, схожу на ту, якої клітини набувають при культивуванні на склі (рисунок 3.5.б).

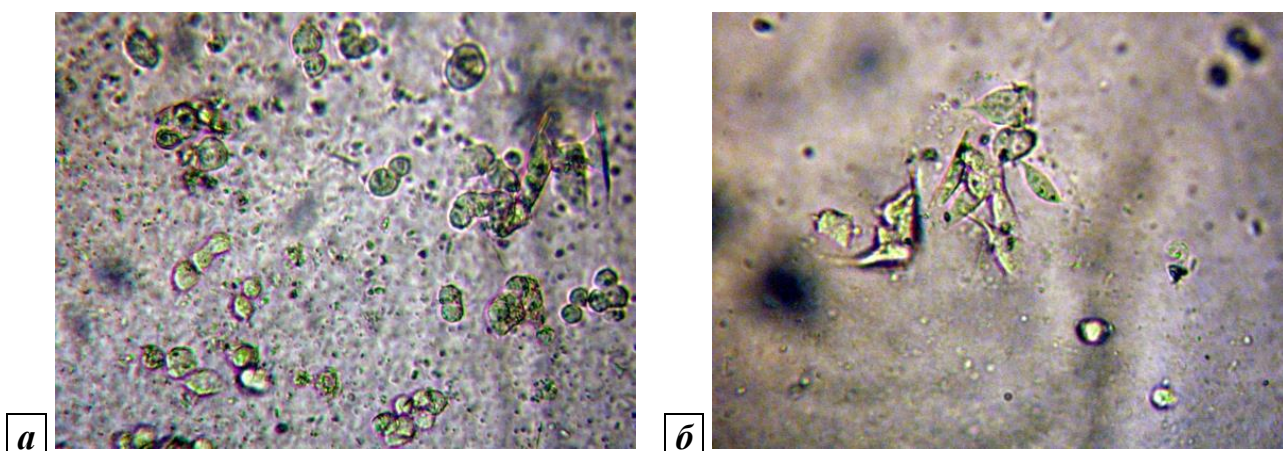


Рис. 3.5. Клітини лінії 4BL, що знаходяться на поверхні біоплівки.
а – Форма клітин сфероподібна. **б** – Клітини розпластані на поверхні біоплівки

При додаванні фарбника трипанового синього в культуральне середовище переважна більшість клітин залишалася незабарвленою, тобто вони були живими (рисунок 3.6).

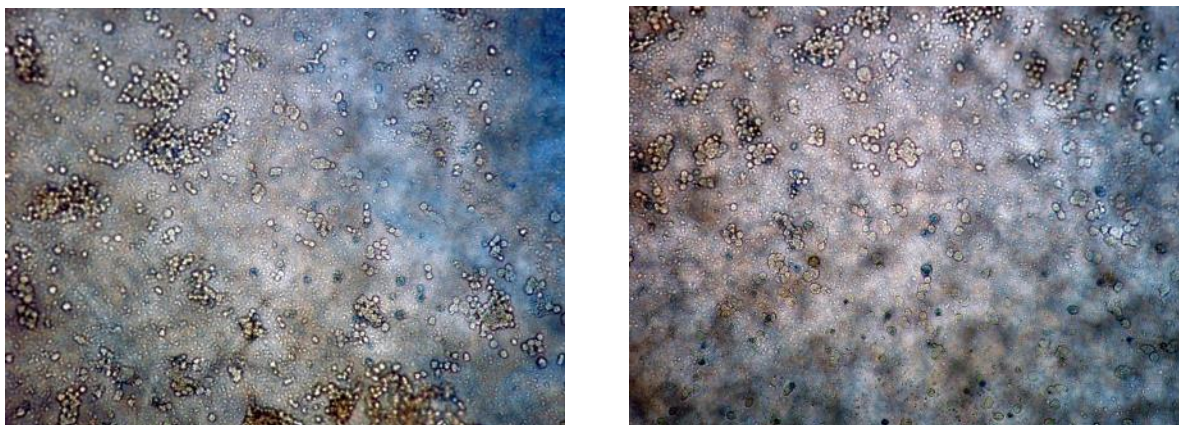


Рис. 3.6. Клітини лінії 4BL, що знаходяться на поверхні біоплівки, при додаванні фарбника трипанового синього

Однак слід сказати, що точний підрахунок клітин та обчислення співвідношення живих і мертвих клітин в цих умовах був утрудненим.

3.3. Розробка і дослідження ефективності *in vivo* тимчасових еквівалентів дерми 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 в широких масштабах. Єдиним недоліком плівки «Білкозин» як носія-мембрани виявився надто кислий для існування клітин рН середовища. Однак нам вдалося «адаптувати» цю плівку природного походження до клітинного компоненту (див. підрозділ «2.1.3. Колагенова плівка „Білкозин”: підготовка до експериментів»). Крім того, виявилось доцільним застосовувати клітинний компонент не у вигляді суспензії в культуральному середовищі, а в желатиновому гелі, який є гідролізованим

продуктом колагену.

3.3.1. Створення еквівалентів дерми із включенням стовбурових клітин на основі колагенової плівки „Білкозин”. Клітинним компонентом дермальних еквівалентів були клітини лінії 4BL, які культивували у середовищі DMEM із додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (фірма „РАА”, Австрія), а також антибіотиків пеніциліну (100 Од/мл) та стрептоміцину (100 мкг/мл). Безпосередньо, перед використанням клітини культивували до утворення субконфлюентного моношару (приблизно 70% поверхні культурального посуду). Потім їх знімали з культуральних поверхонь у стані активної проліферації. Культуральне середовище відбирали, культуральну поверхню з клітинами промивали фосфатним буферним розчином (PBS) з метою видалення залишків сироватки. Потім розчин PBS відбирали з культурального посуду і додавали 0,25% розчин трипсину (фірма „РАА”, Австрія) у версені. Після того, як клітини набували шароподібної форми і відкріплювались від поверхні, у культуральний посуд додавали стандартне середовище DMEM-High Glucose, але без сироватки. За допомогою камери Горяєва підраховували концентрацію клітин у суспензії і розводили вихідну суспензію клітин до значення 2 млн. клітин/мл, додаючи середовище DMEM-High Glucose. Далі суспензію клітин 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 шару рідини над плівкою дорівнювала приблизно 5 мм. Білкозинова плівка мала покривати всю внутрішню поверхню чашки Петрі для того, щоб желатиновий розчин з клітинами не підтікав під плівку.

Далі виготовлені бішарові конструкції інкубували у холодильнику при температурі +4°C протягом двох годин; впродовж цього часу розчин желатини, що містить живі клітини, застигав, перетворюючись на гідрогель. При цьому

гідрогель міцно зчеплювався з поверхнею білкозинової плівки, оскільки желатина має хімічний склад, наближений до складу колагену, бо желатин є продуктом часткової деградації колагену. Безпосередньо після утворення желатинового гідрогелю тимчасовий заміник дермального шару шкіри був вже готовий для практичного використання.

Ми перевірили життєздатність клітин у складі 10% желатинового гідрогелю протягом трьох діб зберігання у холодильнику при температурі +4°C. Отримані дані наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Життєздатність клітин у складі желатинового гідрогелю

Час після створення комплексу "гідрогель + клітини"	Доля життєздатних клітин серед усіх наявних у гідрогелі, % (при $p \leq 0,95$)
1 доба	95 ± 0,4
2 доби	91 ± 1,1
3 доби	85,5 ± 0,9

Для перевірки життєздатності клітин у складі 10% желатинового гідрогелю ми змішували невеличкий об'єм гідрогелю з рівним об'ємом барвника трипанового синього, перемішували (важливо не утворювати піну під час перемішування), наносили на мірну поверхню камери Горяєва, накривали покривним склом і рахували живі та мертві клітини у певних ділянках камери.

Протягом двох діб виживаність клітин зберігалась на дуже високому рівні, більше 90%. На третю добу вона дещо знижувалась, але залишалась на досить високому рівні, 85,5%.

3.3.2. 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. На каудальній

частині спини мишей після видалення шерстного покриву були зроблені термічні опіки III ступеню. Чисельність дослідної та контрольної груп становила по 3 тварини в кожній. В дослідній групі кожній тварині одразу після нанесення опіку здійснювали аплікацію фрагмента дермального покриття на всю поверхню опікової рани (рисунок 3.7). Біоконструкції накладали таким чином, щоб поверхня гелю щільно прилягала до поверхні рани, та фіксували до неуражених ділянок шкіри за допомогою медичного клею БФ-6.



Рис. 3.7. Вигляд інтактних ран та ран з накладеними експериментальними біоконструкціями. Зліва направо: №1, №4 – контрольна група, №2, №3, №5 – дослідна група

Під дією температури тіла желатиновий гідрогель, 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 3.8). 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.

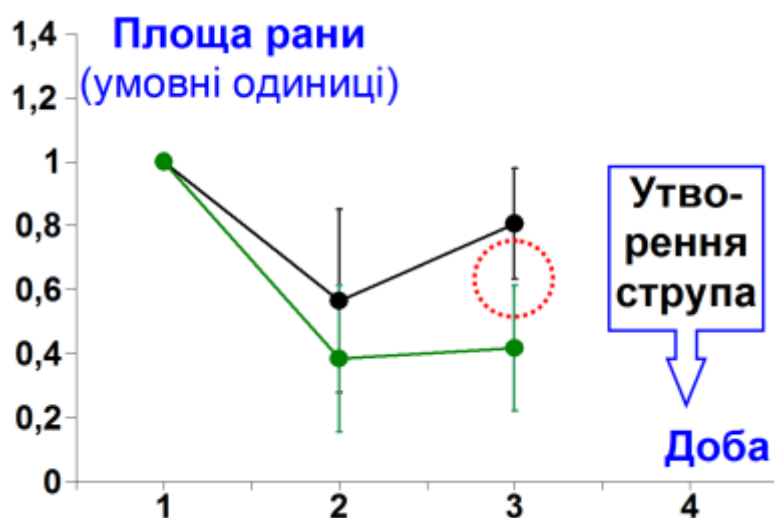


Рис. 3.8. Вплив аплікації тимчасового дермального еквіваленту на основі білкозину на динаміку розвитку опікової рани. Площа рани вимірювалася в умовних одиницях. На першу добу після індукції опіку площа рани після усунення біоконструкції з поверхні рани прийнята за одиницю. $p \leq 0,05$

Проте на периферії опікової рани (поза межами струпу) існувала ділянка ранової поверхні, котра була доступною для візуального спостереження. У всіх тварин експериментальної групи на цій ділянці вже на четверту добу спостерігали ознаки розвитку епітелізації, тоді як в контрольній групі у жодної тварини початок епітелізації цих зон не мав місця.

Підсумки до розділу 3

1. Проведено порівняння властивостей трьох типів щільних матеріалів, придатних бути носіями клітин для створення тимчасових дермальних еквівалентів.

2. Встановлено, що наночастинки срібла і оксиду заліза при певних концентраціях у складі поліакриламідних гідрогелів і в культуральному середовищі здатні впливати на метаболічну активність клітин лінії 4BL. При цьому виявлено, що недоліками поліакриламідних гідрогелевих матриць із вмістом наночастинок металів у певних концентраціях (до 250 мкг/г) є, по перше, зниження прозорості гідрогеля внаслідок присутності неорганічних

наночастинок, а по друге, певний ступінь крихкості зволжених пласких гідрогелевих фрагментів.

3. Показано, що недоліком целюлозної біоплівки симбіотичного організму *Medusomyces gisevi* є той факт, що живі клітини не розпластуються і не розмножуються на цій матриці, а це викликає сумніви стосовно наявності умов для їх нормальної життєдіяльності.

4. 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.

5. Встановлено, що аплікація створеного нами тимчасового дермального еквівалента на основі адаптованої колагенової мембрани «Білкозин + желатин + живі клітини» на опікові рани модельних тварин стимулює регенерацію дермального шару шкіри і відновлення епітелію. Отримано патент України на винахід.

Основні результати досліджень опубліковані у наступних роботах:

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.Danyilevsky. 28-29 May 2013 // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29 (Special Issue). – P. 18.

7. Vasylieva 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.

8. Лукаш Л.Л., Папуга О.Є., Уварова І.В., Рубан Т.П., Лукаш С.І., Будник В.М., Будник М.М. Культивування та дослідження культур стовбурових клітин з магнітними наночастинками // Біологічна і медична інформатика та кібернетика. Збірник наукових праць. Київ – 2019. – С.52-50.

9. Будник В.М., Папуга О.Є., Лукаш С.І., Зенич А.В., Лукаш Л.Л., Будник М.М. Дослідження культур клітин з магнітними наночастинками методом сквід-магнітометрії // Біологічна і медична інформатика та кібернетика. Збірник наукових праць. Київ – 2019. – С.61-70.

РОЗДІЛ 4.

СТВОРЕННЯ ПЛАСТИЧНИХ МАЗЕПОДІБНИХ ГЕЛЕЙ, ЩО МІСТЯТЬ КЛІТИНИ ЛЮДИНИ АБО БЕЗКЛІТИННІ КУЛЬТУРАЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА, КОНДИЦІЙОВАНІ ЦИМИ КЛІТИНАМИ

4.1. 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, який використовується в медичній практиці, на основі гелеутворювача Carbopol 980 з концентрацією 1,5%.

Як зазначено в розділі «Матеріали і методи», культуральне середовище фабричного виготовлення DMEM-High Glucose (фірма «РАА», Австрія), яке застосовується для культивування широкого спектру клітинних ліній, було розчинником для приготування гідрогелю. Такий вибір розчинника натомість, наприклад, води або фізіологічного розчину було зроблено, оскільки ми вважали, що наявність компонентів цього культурального середовища, по-перше, буде позитивно впливати на загоєння ран, які будуть лікуватися за допомогою наших гідрогелевих препаратів, і, по-друге, буде позитивно впливати на життєздатність клітин, що будуть інкорпоровані у гідрогель.

Загалом у наших експериментах ми використовували три види біологічно активних компонентів у складі карбополового гідрогелю, а саме:

- а) живі клітини різного походження,
- б) клітинні лізати,
- в) безклітинні культуральні середовища (БКС), кондиційовані клітинами *in vitro*.

В трьох дослідних групах карбополовий гідрогель був наповнений клітинами однієї з трьох ліній, які вказані у розділі «Матеріали і методи» (тобто

було три окремих препарати). Для створення біоконструкції, яка містила у собі живі клітини, спочатку ми готували 3%-й карбополовий гідрогель (див. розділ «Матеріали і методи») і суспензію кожного виду клітин окремо у середовищі DMEM-High Glucose з концентрацією клітин 2 млн/мл. Зберігали клітинні суспензії окремими аліквотами у стані кріоконсервації при -80°C , виводили клітини із цього стану безпосередньо перед дослідом, осаджували шляхом центрифугування при кімнатній температурі при 300 g протягом 5 хв, ресуспендували в свіжому середовищі DMEM-High Glucose таким чином, щоб кінцева концентрація клітин становила 2 млн/мл. Ми передбачаємо, що в клініці при рутинному застосуванні клітиновмісних препаратів клітинний компонент буде зберігатися аналогічним чином. Потім змішували рівні об'єми отриманої суспензії клітин і 3%-го карбополового гідрогелю. В результаті ми отримували порцію 1,5%-го карбополового гідрогелю, який містив у собі живі клітини у концентрації 1 млн/мл.

У трьох інших дослідних групах карбополовий гідрогель містив у собі культуральне середовище DMEM-High Glucose, що було кондиційоване клітинами однієї з трьох ліній (тобто було три окремих препарати БКС). Для створення біоконструкції, яка містила у собі безклітинне кондиційоване середовище (БКС), спочатку ми готували 3%-й карбополовий гідрогель (див. розділ «Матеріали і методи») і аліквоту певного БКС. Зберігали БКС окремими аліквотами у стані кріоконсервації при -80°C і розморожували безпосередньо перед дослідом. Потім ми змішували рівні об'єми 3%-го карбополового гідрогелю і окремо кожного виду БКС. В результаті ми отримували порцію 1,5%-го карбополового гідрогелю, котрий містив у собі БКС. Останнє таким чином було розведено вдвічі, оскільки при розрахунку в даному випадку можна вважати, що об'єм порції нашого карбополового гідрогелю еквівалентний рівному об'єму DMEM-High Glucose.

4.2. Перевірка біологічної сумісності карбополового гідрогелю і живих клітин

Одним із основних завдань була перевірка біологічної сумісності карбополового гідрогелю з живими клітинами людини. З цією метою ми провели спеціальне дослідження співвідношення живих та загиблих клітин в карбополовому гідрогелі в залежності від терміну його зберігання і за різних умов навколишнього середовища. Отримання карбополового гідрогелю описано у розділі «Матеріали і методи». Як клітинний компонент використовували мультипотентні клітини лінії 4BL, що зберігалися в рідкому азоті. Ми розморожували їх стандартним шляхом, відмивали від залишків кріоконсерванту, потім визначали життєздатність клітин в суспензії. У всіх досліджуваних зразках життєздатність клітин була вище, ніж 90%.

Як вказано вище, ми змішували 3% гідрогель з клітинною суспензією, і у приготованому клітиновмісному гідрогелі з концентрацією карбомеру 1,5% визначали життєздатність клітин одразу після приготування препарату, а також через 1, 3, 5 та 24 години. Невеличкий об'єм гідрогелю ми змішували з рівним об'ємом барвника трипанового синього, перемішували (важливо не утворювати піну під час перемішування), наносили на мірну поверхню камери Горяєва, накривали покривним склом і рахували живі та мертві клітини у певних ділянках камери.

Було передбачено два варіанта інкубації клітиновмісного гідрогелю, а саме:

- при температурі +20°C і за умов денного освітлення (умови, у яких знаходиться клітиновмісний гідрогель при аплікації на поверхню рани);
- при температурі +37°C і за умов відсутності освітлення (фактично при інкубації в термостаті).

Спочатку ми перевірили життєздатність клітин у складі гідрогелю при температурі +20°C і за умов денного освітлення, тобто за умов наближених до таких при аплікації на поверхню рани. Експеримент проводився в трьох

повторах, усереднені дані наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Частка живих клітин в клітиновмісному карбополовому гідрогелі, що інкубувався при температурі +20°C і за умов денного освітлення

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

Відразу після внесення клітинної суспензії в гідрогель спостерігалось різке зниження життєздатності клітин на 10-20%. У подальшому зниження сягало 50% і більше, що стосувалось обох експериментів, тобто це спостерігалось як в цьому варіанті, так і в тому, що описаний нижче. З часом частка живих клітин знижувалася. Статистичний аналіз даних, що нами отримано, дозволяє зробити висновок, що це зниження життєздатності клітин в залежності від терміну експозиції клітиновмісного препарату за даних умов не є випадковим: $\eta^2=0,36$, $p \leq 0,05$. Проте протягом першої години ми не спостерігали статистично вірогідного зменшення життєздатності.

Також нами було проведено дослідження життєздатності клітин у складі гідрогелю при температурі +37°C і за умов відсутності освітлення, тобто при інкубації в термостаті. Експеримент теж проводився в трьох повторах, усереднені дані наведено в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Частка живих клітин в клітиновмісному карбополовому гідрогелі, що інкубувався при температурі +37°C і за умов відсутності освітлення

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

Таким чином, інкубація клітиновмісного карбополового гідрогелю при температурі, яка зазвичай використовується при вирощуванні клітинних культур, теж призводить до зниження життєздатності клітин. Нами була показана статистично достовірна залежність частки живих клітин від температури зберігання клітиновмісного гідрогелю, а саме: зниження температури зберігання готового препарату сприяє ефективнішому збереженню життєздатності клітин у його складі: $\eta^2=0,26$, $p \leq 0,05$.

4.3. Дослідження терапевтичної ефективності клітиновмісних покриттів на основі карбополового гідрогелю *in vivo*

Дослідження терапевтичної ефективності клітиновмісних покриттів на основі карбополового гідрогелю були проведені *in vivo* із залученням щурів лінії Wistar і мишей лінії ICR (сублінія ICR-IMBG).

4.3.1. Експерименти із залученням щурів. Завданням цього фрагменту експериментальної роботи було дослідити можливу терапевтичну дію живих клітин лінії 4BL, лізату клітин лінії 4BL та їхньої суміші у складі карбополових гідрогелей. В пілотному експерименті з використанням щурів лінії Wistar було сформовано 6 експериментальних груп щурів, по 2 тварини в групі. Комбінації чинників в композиціях і номера композицій, що використовувалися в експерименті, вказані в таблиці 4.3.

Протягом години після нанесення опіку у тварин груп 1-5 ми здійснювали обробку ураженої ділянки шкіри композицією з відповідним номером. Препарат наносили на рану щоденно раз на добу до повного загоєння рани.

Для створення 1,5%-го карбополового гідрогеля, котрий використовувався для обробки ран в контрольній групі 1, ми застосовували не культуральне середовище DMEM-High Glucose, а фізіологічний розчин (0,9% NaCl). Таким чином, в цій групі гідрогелевий препарат лише фізично впливав на шкіру тварин, не вносячи у ложе рани ніяких біологічно активних речовин.

Тварини групи 6 слугували за інтактний контроль, і жодної обробки ран у них не проводили.

Таблиця 4.3

Чинники, досліджувані в експерименті із залученням щурів лінії Wistar

№ композиції (і умовна назва)	Наявність компонентів			
	карбопол	середови- ще 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 – група інтактного контролю	–	–	–	–

На першому етапі загоєння, тобто на 1-7 добу експерименту первинне зростання площі опікової рани було відсутнє (варіанти №2, №3, №4) або слабковиражене (варіант №5). Це вказує на позитивний характер впливу сумішей, що містять клітини, речовини клітинного походження та компоненти культурального середовища. При цьому тривалість загоєння рани була найменшою для варіанту №3 (карбопол + DMEM + 4BL).

Результати двохфакторного дисперсійного аналізу динаміки загоєння опікових ран за найкритичніший перший період експерименту – 2-11 доба – наведені в таблиці 4.4.

Було проаналізовано вплив складу композиції, вплив часу загоєння і сумарний вплив цих двох чинників. Дивлячись на показники впливу складу і

сумарного впливу, ми сформуваємо таку гіпотезу: серед усіх досліджених варіантів композиція №3 (карбопол + DMEM + 4BL) найкращим чином впливає на процес загоєння ран.

Таблиця 4.4

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

Номер групи або номер композиції	№1 (карбо- пол)	№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 (дів 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

4.3.2. Експерименти із залученням мишей. Схема пілотного експерименту, яку описано в попередній частині підрозділу, була повторена нами із залученням мишей лінії ICR (сублінія ICR-IMBG). Розмір експериментальних груп ми збільшили до 6 тварин з метою отримання вірогідніших статистичних даних.

Порівняння динаміки загоєння опікових ран у мишей із різних груп (рисунок 4.1) також вказує на те, що склад досліджуваної композиції (таблиця 4.3) 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 тривалість загоєння опікових ран у мишей під впливом окремих досліджуваних композицій (рисунок 4.2) і зміну ваги тіла експериментальних тварин (рисунок 4.3) протягом 22 дів експерименту.

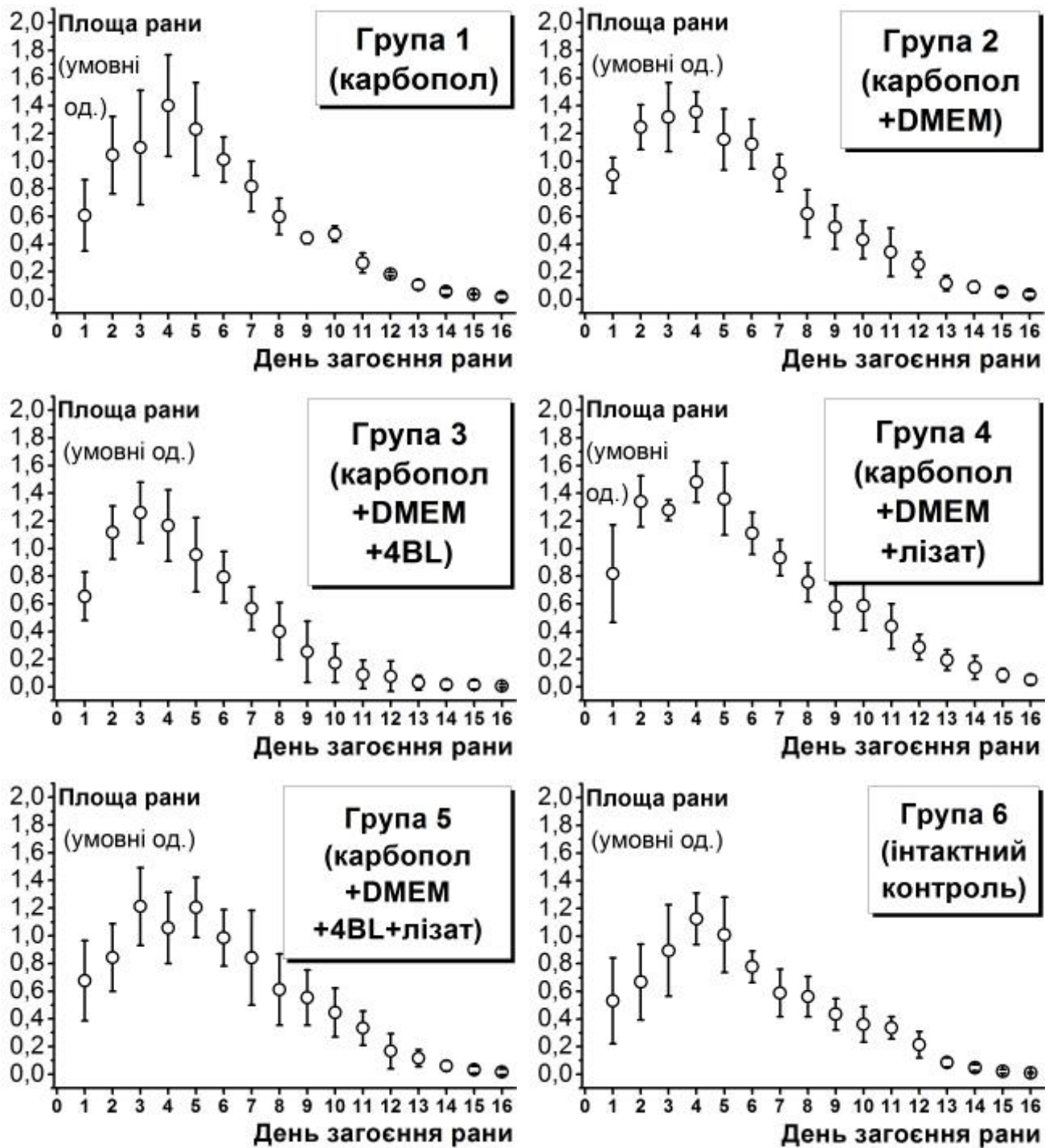


Рис. 4.1. Динаміка загоєння опікових ран у мишей лінії ICR (сублінія ICR-IMBG) під впливом складників різних композицій на основі карбополового гідрогелю. По осі ординат площа опікової рани, що рахується в умовних одиницях відносно первинної площі ураження

Якщо брати до уваги лише групи, в яких тварини в процесі експерименту піддавалися терапії, то тільки в групі №3 спостерігався приріст ваги мишей. Дисперсійний аналіз підтвердив статистичну вірогідність закономірності, що

спостерігалася: показник впливу η^2 становив 0,66 при $p \leq 0,05$.

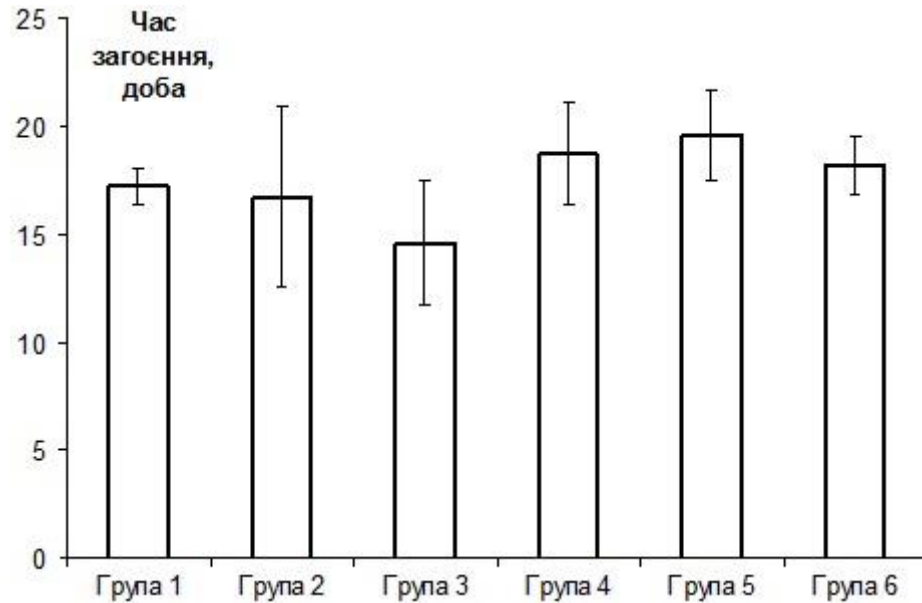


Рис. 4.2. Тривалість загоєння опікових ран у мишей під впливом окремих досліджуваних композицій

Використання композиції №3 мало ще один помітний і позитивний наслідок, а саме стимулювання росту шерсті на ділянках шкіри, що безпосередньо прилягали до опікової рани. Це спостерігалася у всіх тварин групи 3, а в інших групах цей ефект не проявлявся.

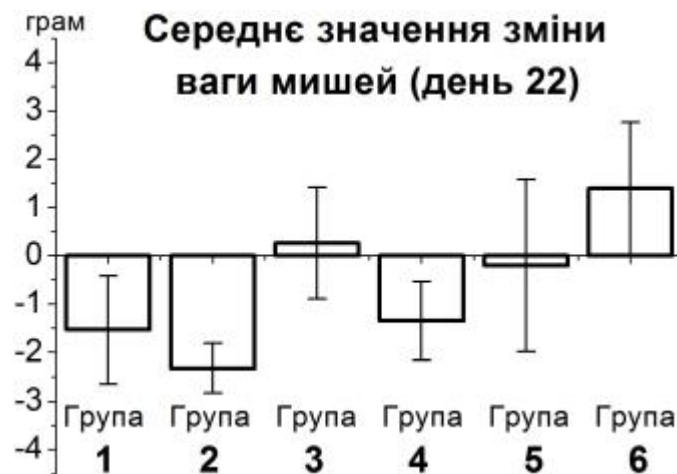


Рис. 4.3. Зміна ваги у мишей з експериментальними опіками наприкінці експерименту під впливом окремих досліджуваних композицій. Показник впливу $\eta^2=0,66$ при $p \leq 0,05$

4.4. Порівняння можливостей терапевтичного використання клітин людини різних ліній та їхніх похідних у складі карбополових гідрогелів

Було вирішено порівняти ранозагоювальні властивості клітин людини різного походження, а також безклітинних культуральних середовищ (БКС), кондиційованих цими типами клітин.

4.4.1. Створення терапевтичних біоконструкцій з використанням клітин трьох ліній та їхніх похідних, середовищ, кондиційованих клітинами. Ми продовжили дослід з використанням лабораторних тварин задля того, щоб порівняти можливості терапевтичного використання клітин людини різного походження, а також безклітинних культуральних середовищ (БКС), кондиційованих цими типами клітин. Було вирішено застосувати клітини трьох ліній: 4BL, E8, A102 та відповідні БКС. В експерименті використовували самців мишей лінії ICR (сублінія ICR-IMBG), які були поділені на 7 груп, в кожній групі було по 6 тварин, котрі отримали опікову рану стандартним методом, як описано у розділі 2 «Матеріали і методи».

Карбополові гідрогелі з різними наповненнями правили за досліджувані терапевтичні препарати. В трьох дослідних групах 1,5%-й карбополовий гідрогель був наповнений клітинами однієї з трьох ліній (тобто було три окремих препарати). У трьох інших дослідних групах 1,5%-й карбополовий гідрогель містив у собі культуральне середовище DMEM-High Glucose, що було кондиційоване клітинами однієї з трьох ліній (тобто було три окремих препарати, приготовані з використанням БКС). В групі адекватного контролю карбополовий гідрогель не містив клітинного компоненту або БКС. Методика приготування таких біоконструкцій описана в підрозділі «4.1. Створення пластичного мазеподібного препарату на основі карбополового гідрогелю».

Кожного дня ми наносили певні препарати на опікові рани відповідних груп, доки не відбувалося повне загоєння опікових ран.

4.4.2. Терапевтична дія живих клітин різного походження. Загальна терапевтична ефективність гідрогелевих біоконструкцій, які містили живі клітини усіх трьох ліній, була підтверджена за допомогою двохфакторного дисперсійного аналізу, де фактором №1 була наявність клітинного компоненту, а фактором №2 – чинник часу. На рисунку 4.4 можна побачити певні особливості кожного з цих трьох препаратів.

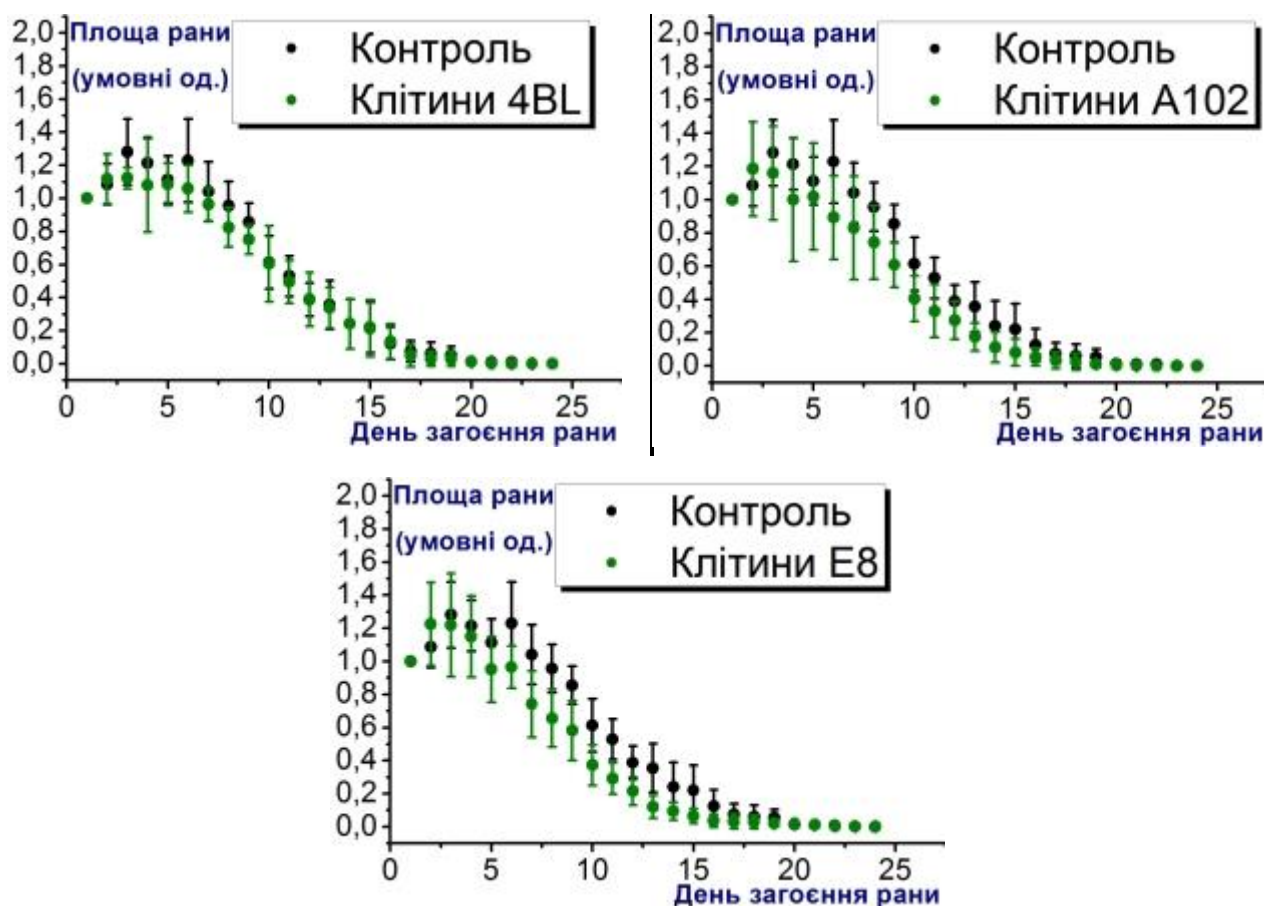


Рис. 4.4. Загоєння опікових ран у мишей під впливом гідрогелевих біоконструкцій, що містять клітини людини різного походження. В групі контролю карбополовий гідрогель містить DMEM-High Glucose і не містить клітинного компоненту або БКС

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 ($\eta^2=0,10$, $p \leq 0,05$). Лише в цій групі тварин

була ненульова смертність, а саме на 5-ту добу експерименту одна тварина загинула. Навіть у контрольній групі не було загибелі тварин. Біоконструкція з клітинами лінії A102 впливала на швидкість загоєння ран однаково протягом всього експерименту ($\eta^2=0,07$, $p \leq 0,05$).

Спостереження за часом початку епітелізації рани, часом повного загоєння рани і подальший дисперсійний аналіз результатів цих спостережень також дають нам можливість побачити деякі тенденції дії окремих гідрогелевих препаратів з клітинами. В групі, де було використано клітини лінії 4BL, у 2/3 числа тварин перші прояви епітелізації виникали на 7-му добу експерименту, а у решти тварин з цієї групи епітелізація розпочиналася на 8-10 добу. В групі, де була обробка ран з використанням клітин E8, епітелізація розпочиналася на 8-10 добу експерименту з модою на 8-9 добу. В групі, де було використано клітини лінії A102, епітелізація розпочиналася на 7-9 добу з модою на 8 добу експерименту. У частини контрольних тварин початок процесу епітелізації дещо затримувався у часі, і загалом епітелізація розпочиналася на 8-12 добу.

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; $p \leq 0,05$).

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.

Таким чином, нами зроблено висновок, що при використанні гідрогелевих препаратів з клітинами ліній 4BL та A102 спостерігалися такі статистично достовірні ефекти, як більш ефективно та/або більш швидке

заживлення опікових ран у мишей. При цьому препарати з клітинами лінії 4BL демонстрували статистично достовірний позитивний вплив на динаміку загоєння опікових ран під час найбільш критичної для організму першої стадії опікової хвороби. Клінічна ефективність препаратів на основі клітин лінії E8 залишається під знаком питання, оскільки в групах тварин, що отримували цей клітиновмісний препарат, спостерігалася незначна, але ненульова смертність тварин, відсутня навіть в контрольній групі. Причини цієї смертності потребують подальшого уточнення.

4.4.3. Порівняння терапевтичної дії живих клітин різного походження і культуральних середовищ, кондиційованих відповідними клітинами. Ми порівнювали терапевтичні властивості препаратів, які містять живі клітини трьох зазначених вище ліній, з терапевтичними властивостями таких препаратів, які замість клітин містять культуральне середовище, кондиційоване клітинами відповідних ліній (рисунок 4.5).

Найцікавіші результати були отримані при порівнянні дії клітин лінії 4BL і середовища, кондиційованого цими клітинами: гідрогелевий безклітинний препарат, приготований з використанням кондиційованого середовища, 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 середовища, кондиційованого клітинами лінії 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 середовищем, що кондиційоване цими клітинами.

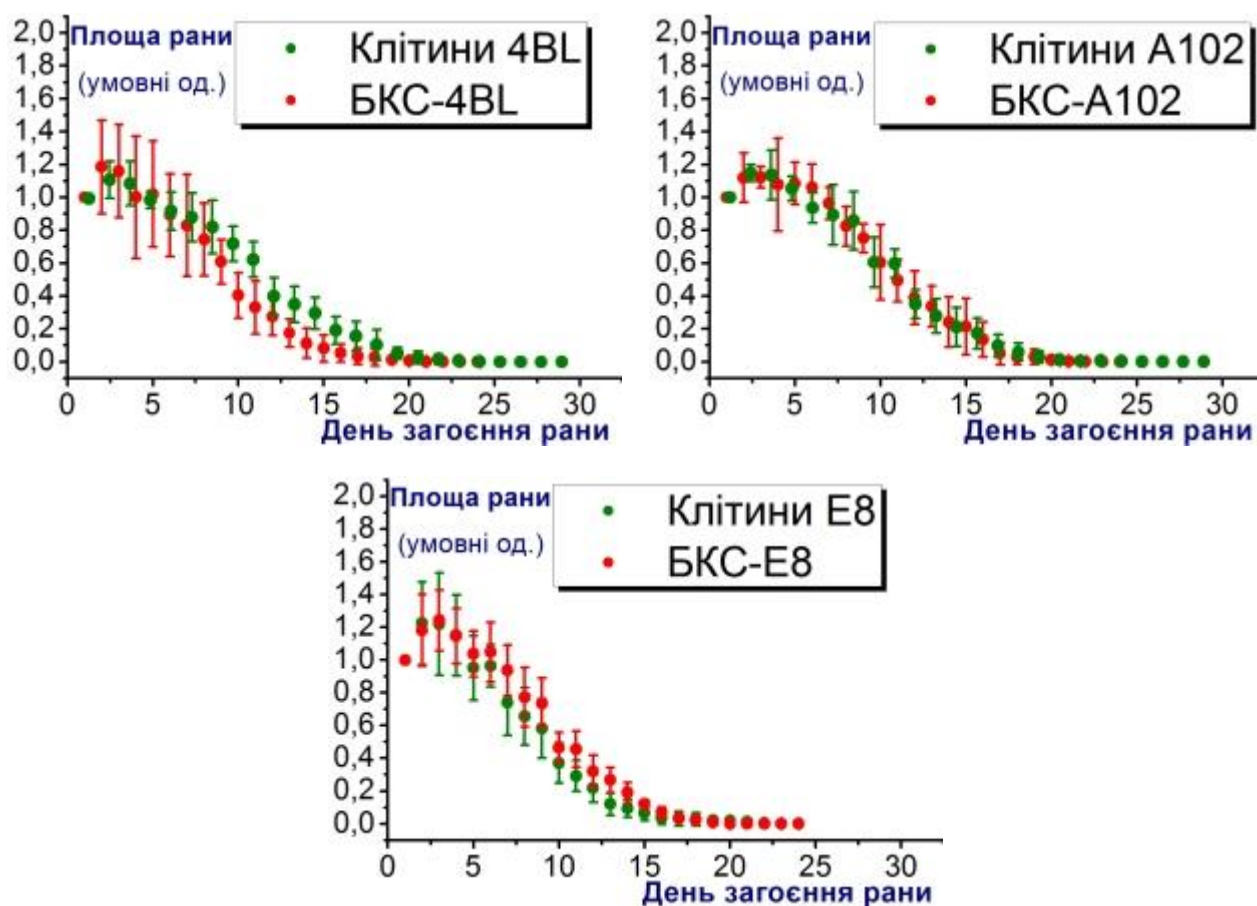


Рис. 4.5. Порівняння швидкості загоєння опікових ран у мишей під впливом гідрогелевих біоконструкцій, що містять клітини або відповідні БКС. В групі контролю карбополовий гідрогель містить DMEM-High Glucose і не містить клітинного компоненту або БКС

Отже, серед усіх гідрогелевих біоконструкцій, досліджених в цьому експерименті, найефективнішою виявилася біоконструкція, яка була приготована з використанням середовища, кондиційованого клітинами лінії 4BL.

4.4.4. Терапевтична дія культуральних середовищ, кондиційованих живими клітинами різного походження. Результати аналізу динаміки загоєння ран в усіх семи групах показані на рисунку 4.6.

Препарат, приготований з використанням середовища, кондиційованого клітинами 4BL, у 80% тварин спричиняв повне загоєння рани на 16-18 добу експерименту, а решта тварин в групі повністю одужала до 21 доби досліджу.

Препарат, приготований з використанням середовища, кондиційованого клітинами E8, спричиняв повне загоєння рани на 19-21 добу експерименту. Препарат, приготований з використанням середовища, кондиційованого клітинами A102, у 80% тварин спричиняв повне загоєння рани на 17-21 добу експерименту, а решта тварин в групі повністю одужала на 22 добу дослідю. В контрольній групі тварин, як вже було вказано вище, загоєння рани у тварин сталося протягом періоду з 17 по 24 добу дослідю.

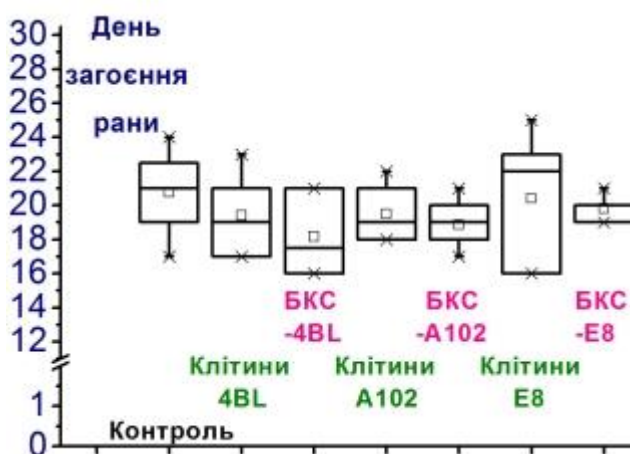


Рис. 4.6. Тривалість загоєння опікових ран у мишей під впливом біотехнологічних препаратів на основі карбополового гідрогелю

Застосування однофакторного дисперсійного аналізу дозволяє нам виявити статистично вірогідний вплив середовища, кондиційованого клітинами лінії 4BL, на тривалість загоєння опікових ран ($\eta^2=0,34$, $p \leq 0,05$). Таким чином, найефективнішим щодо загоєння опікових ран у мишей виявився препарат, що містив середовище, кондиційоване стовбуровими клітинами лінії 4BL.

4.4.5. Порівняльні 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. Як було показано вище на моделі опікової хвороби у мишей лінії ICR, найкращі терапевтичні результати досягаються при використанні біоконструкцій, які

містять або живі клітини лінії 4BL, або культуральне середовище, кондиційоване цими клітинами. Тому ми вирішили провести ще одне тестування ранозагоювальної здатності цих двох біологічно активних агентів *in vivo* на моделі опікової хвороби у лабораторних щурів лінії Wistar. Терапевтичним препаратом знов був карбополовий гідрогель з різним наповненням.

Лабораторні щури отримали опікову рану стандартним для наших досліджень методом. В групі інтактного контролю тварини мали опіки, але ці опіки не піддавалися будь-якій обробці. В групі контролю носія карбополовий гідрогель не містив клітинного компоненту або кондиційованого клітинами середовища. В групі тестування дії живих клітин ми перевіряли активність 1,5%-го карбополового гідрогелю, котрий містив у собі клітини у концентрації 1 млн/мл. В групі тестування дії безклітинного кондиційованого середовища (БКС) ми перевіряли активність 1,5%-го карбополового гідрогелю, що містив у собі БКС, яке було кондиційовано клітинами 4BL в культурі і розведено вдвічі в процесі вироблення порції гідрогелю даного типу.

Усі три типи гідрогелевих препаратів робилися безпосередньо перед нанесенням на рану. Кожного дня ми наносили певні препарати на опікові рани відповідних груп, доки не відбувалося повне загоєння опікових ран.

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 досліджу, 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. Результати дослідження показано на рисунку 4.7.

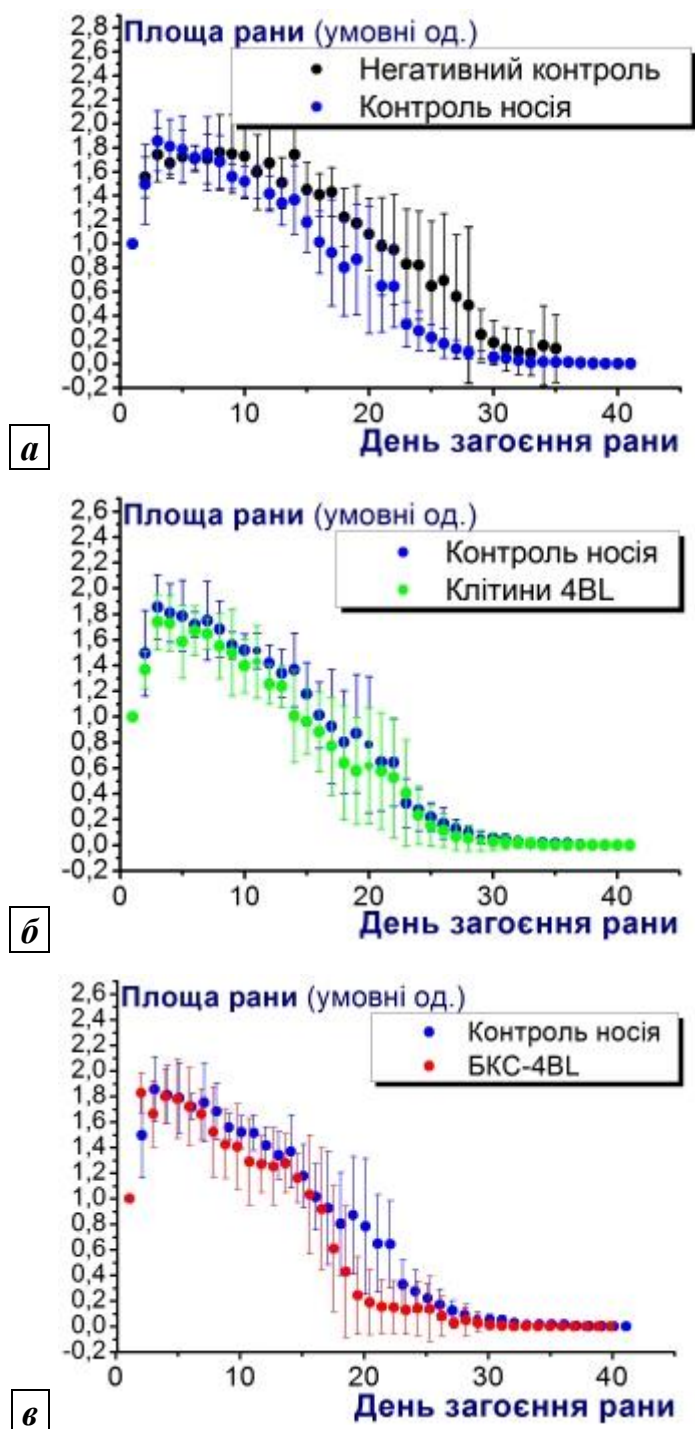


Рис. 4.7. Ранозагоювальна активність препаратів, що є похідними від клітин лінії 4BL, на моделі опікової хвороби у лабораторних щурів лінії Wistar: **а** - Порівняння негативного контролю і контролю носія; **б** – Оцінка дії клітиновмісного препарату; **в** – Оцінка дії безклітинного препарату

В таблиці 4.5 показано результати дисперсійного аналізу динаміки загоєння опікових 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

Ці результати вказують на те, що обидва препарати, які ми досліджували у даному експерименті (клітиновмісний і безклітинний), позитивно впливали на динаміку регенерації шкіри протягом всього періоду загоєння ран.

4.4.6. 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 (експеримент описано в підпункті 4.4.5), ми також провели мікроскопічне дослідження ложа опікової рани у щурів з метою визначити, чи впливає клітиновмісний препарат або препарат з БКС на утворення судин в процесі загоєння опікових ран.

Мікроскопічне спостереження ранової поверхні здійснювалося на 7-й день експерименту після штучного видалення струпа (зазвичай струп відходив від ранової поверхні пізніше, якщо не було спеціального хірургічного втручання). Результати представлено на рисунку 4.8. В контрольній групі не спостерігалось утворення нових капілярів у ложі рани. В групі з контролем носія було помічено утворення окремих капілярів. В групах з перевіркою дії живих клітин і дії безклітинного кондиційованого середовища (БКС) ефект капіляроутворення було значно інтенсивнішим, і, на наш погляд, найінтенсивніша васкуляризація спостерігалася у тварин, які отримували терапію препаратом, що містив БКС.

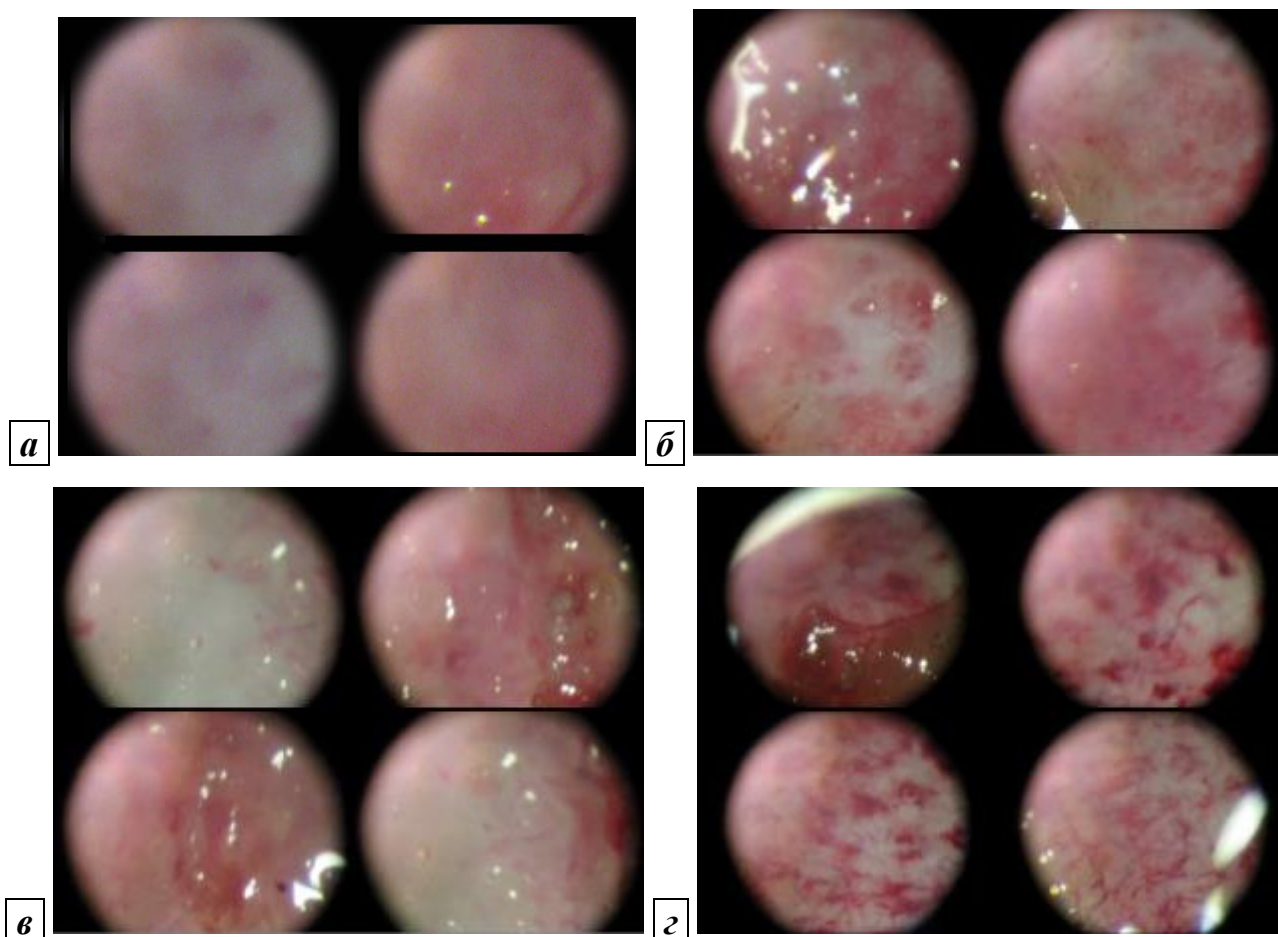


Рис. 4.8. Стимуляція утворення нових капілярів у ложі рани тварин під дією живих клітин лінії 4BL та безклітинного кондиційованого середовища (БКС-4BL). *a* - Контрольна група. *б* - Група з контролем носія. *в* - Група з перевіркою дії живих клітин. *г* - Група з перевіркою дії безклітинного кондиційованого середовища (БКС-4BL)

Отже, нами виявлено стимуляцію капіляроутворення у ложі рани при терапії опікових ран за допомогою м'яких біоконструкцій, що містять безклітинне кондиційоване середовище БКС-4BL

4.4.7. 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. Наприкінці експерименту з порівнянням ранозагоювальної активності клітин лінії 4BL та культурального середовища, кондиційованого цими клітинами (експеримент описано в

підпункті 4.4.5), ми також провели дослідження вмісту таких ростових/регуляторних чинників, як VEGF, NGF, MMP2 та HIF-1 α , у шкірі тварин після загоєння опікових ран (а саме у тій ділянці, де попередньо була нанесена рана, що загоїлася) під впливом лікування клітинним препаратом, що містить клітини 4BL, або безклітинним препаратом, що містить БКС-4BL. Отримані дані наведено в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6

Вміст VEGF, NGF, MMP2 та HIF-1 α
в шкірі щурів 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
Норма (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
Біоконструкція із клітинами 4BL	0,49 \pm 0,06	0,53 \pm 0,07	0,30 \pm 0,04	0,35 \pm 0,06
Біоконструкція із БКС-4BL	0,52 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	0,44 \pm 0,13	0,41 \pm 0,13

Результати дисперсійного аналізу отриманих даних наведено в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

Результати дисперсійного аналізу вмісту VEGF, NGF, MMP2 та HIF-1 α
в шкірі щурів після загоєння опікових ран

Фактор впливу		VEGF	NGF	MMP2	HIF-1 α
Наявність лікування	η^2	0,03	0,05	0,22	0,23
	p	$\geq 0,05$	$\geq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$
Вид препарату	η^2	0,03	0,05	0,23	0,23
	p	$\geq 0,05$	$\geq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$

Примітка: Контролем була група контролю носія.

Таким чином, в шкірі всіх тварини, що отримували лікування препаратами, які містять або клітини лінії 4BL, або кондиційоване ними середовище, спостерігалось статистично достовірне зниження вмісту регуляторних білків MMP2 та HIF-1 α .

4.5. Вплив особливостей напрацювання та зберігання безклітинного кондиційованого середовища на його властивості

Низку наших завдань завершує наступне: оптимізація умов вирощування клітин і виготовлення безклітинних середовищ (БКС), кондиційованих клітинами різних ліній, а також оптимізація тривалого зберігання отриманих біоматеріалів.

4.5.1. Дослідження можливого впливу конфлюентності клітинного моношару на властивості безклітинного кондиційованого середовища. Як було вказано раніше, безклітинне кондиційоване середовище, отримане з використанням клітин лінії 4BL (БКС-4BL), спричиняло найкращий ранозагоювальний ефект в дослідях з використанням модельних тварин. Ми провели дослідження з метою встановити залежність терапевтичних властивостей БКС даного походження від ступеню конфлюентності клітинного моношару. Для напрацювання БКС-4BL були використані три варіанта стану клітинних культур лінії 4BL:

— такі культури, що знаходилися на початку стадії активної проліферації, і конфлюентність клітинного моношару складала близько 30%;

— такі культури, що в своєму розвитку були близьки до стану контактного інгібування, і конфлюентність клітинного шару складала близько 97%;

— такі культури, що були у стані активної проліферації, і конфлюентність клітинного шару складала близько 50%.

Метаболічну активність клітин під впливом БКС досліджували з

використанням МТТ-тесту. Клітини лінії 4ВL культивувалися протягом доби в 96-лунковому планшеті з плоским дном. Далі ростове середовище прибиралося, і в лунки додавали або зразки БКС, що знімали при різному стані клітин, або – якщо це були контрольні лунки – культуральне середовище без додавання сироватки. Загальна кількість рідини в кожній лунці становила 100 мкл. Після стандартного проведення МТТ-тесту ми отримали значення оптичної густини в кожній лунці планшету. Результати аналізу отриманих даних показані на рисунку 4.9.

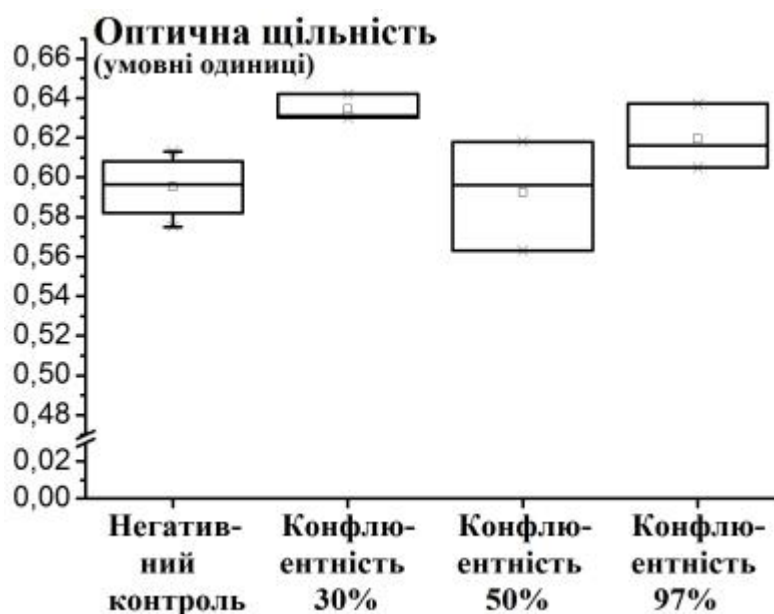


Рис. 4.9. Дослідження впливу БКС, продукованого клітинною культурою лінії 4ВL, що знаходиться на різних стадіях росту, на метаболічну активність клітин у МТТ-тесті

Ці результати вказують на наявність статистично достовірної різниці між контрольним і дослідними варіантами ($\eta^2=0,56$, $p \leq 0,05$). У той же час ми не виявили впливу ступіні конфлюентності клітинного моношару при напрацюванні БКС на метаболічну активність клітин, оскільки різниця між зразками БКС, отриманими з використанням культур, які знаходилися на різних стадіях росту, не була статистично достовірною. Отже, ймовірно, і терапевтичні властивості зразків БКС-4ВL не різняться.

4.5.2. Дослідження можливого впливу температурних умов зберігання безклітинного кондиційованого середовища на його властивості. Ми припустили, що умови зберігання безклітинного препарату можуть впливати на збереження його ростових властивостей і перевірили це в експерименті. З цією метою ми напрацювали певний об'єм безклітинного кондиційованого середовища, розділили його на аліквоти і протягом одного тижня зберігали їх при різних температурних умовах, а саме:

при -80°C (за умов лабораторного кельвінатору),

при -20°C (за умов лабораторної морозильної камери),

при $+4^{\circ}\text{C}$ (за умов звичайного лабораторного холодильника),

при $+20^{\circ}\text{C}$ (за умов кімнатної температури).

Далі за допомогою стандартного МТТ-тесту ми перевірили здатність зразків, що зберігались за різних умов, стимулювати метаболічну активність клітин. Контролем був зразок свіжовиробленого БКС. Результати наведено на рисунку 4.10.

Аналіз експериментальних даних показує наявність залежності стимулювальних властивостей зразків БКС від температурних умов його зберігання. В тих випадках, коли відсоток БКС в лунці становив 100% від загального об'єму (рисунок 4.10.D), спостерігається стимулювання метаболічної активності, тобто зберігання препарату в умовах глибокого заморожування (при -80°C) сприяє зберіганню здатності стимулювати метаболічну активність клітин. Зберігання в умовах менш низьких температур (при -20°C) дещо знижує стимулювальні властивості БКС, після розморожування цей препарат виявився менш активним. Зі зростанням температури зберігання зразка безклітинного кондиційованого середовища спостерігалася подальша його інактивація. Аналогічне падіння стимулювальних властивостей БКС зі зростанням температури зберігання мало місце і в тому випадку, коли вміст БКС в лунці становив 50% від загального об'єму (тобто БКС було вдвічі розбавлене культуральним середовищем), але це падіння не було таким різким (рисунок 4.10.C). Ще менш суттєвою різниця між

результатами зберігання при різних температурах була тоді, коли вміст безклітинного кондиційованого середовища в лунках планшету становив 25% або 12,5% (відповідно, рисунки 4.10.В і 4.10.А).

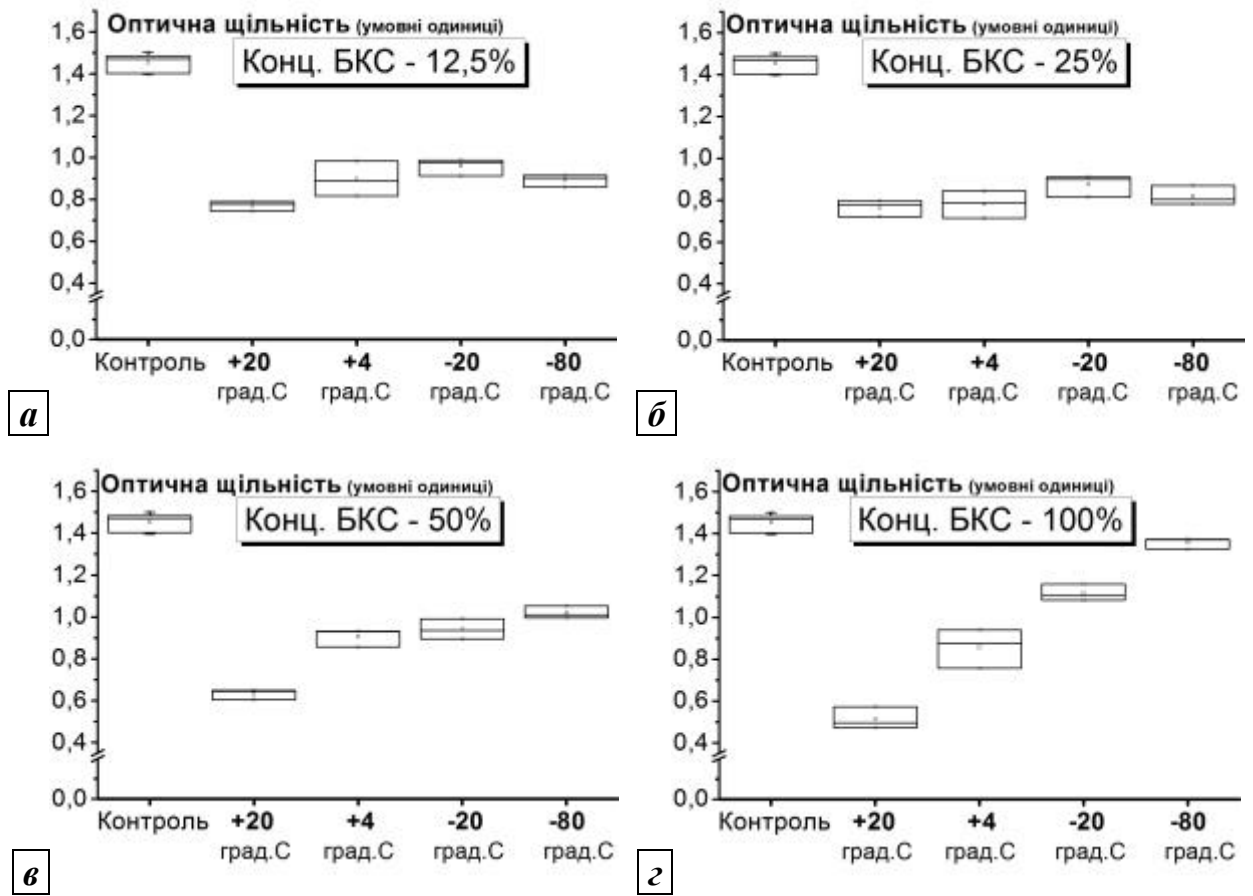


Рис. 4.10. Дослідження стимулювальних властивостей БКС в залежності від температурних умов його зберігання: **а** - Концентрація БКС в лунці – 12,5%; **б** - Концентрація БКС в лунці – 25%; **в** - Концентрація БКС в лунці – 50%; **г** - Концентрація БКС в лунці – 100%

Двохфакторний дисперсійний аналіз числових даних підтверджує статистично достовірний характер відмінностей, про які було сказано ($\eta^2=0,51$, $p \leq 0,05$). Також існує певна залежність активності БКС від концентрації ($\eta^2=0,08$, $p \leq 0,05$). Між цими двома чинниками (температура зберігання і концентрація в лунці) існує статистично достовірна взаємодія: $\eta^2=0,36$, $p \leq 0,05$.

Підсумки до розділу 4

1. Вперше розроблено методику отримання мазеподібного гідрогеля карбополу, який міг би слугувати субстратом для іммобілізації клітин, і показано, що карбополовий гідрогель, приготований із застосуванням стандартного культурального середовища DMEM-HG, може слугувати об'ємним носієм живих клітин і підтримувати їх життєдіяльність на високому рівні протягом кількох годин. Проте задля кращого збереження життєздатності клітин слід проводити поєднання гідрогелю і клітинного компоненту *ex tempore*, безпосередньо перед застосуванням. Отримано патент на корисну модель.

2. З використанням моделі опікових ран у тварин (миші) вперше встановлено, що виразна стимуляція регенерації тканин після термічного опіку здійснюється за допомогою біоконструкцій на основі гідрогеля карбополу, які містять живі клітини лінії 4BL, у той час як позитивний терапевтичний ефект від аналогічних біоконструкцій, що несуть у собі клітинний лізат, ефект є незначним, тобто таким, що не заслуговує на подальшу увагу.

3. Вперше проведено порівняльне дослідження (з використанням моделі опікових ран у мишей) ранозагоювальних властивостей клітин людини трьох установлених ліній (4BL, E8, A102) і безклітинних середовищ (БКС), кондиційованих клітинами цих ліній, у складі біоконструкцій на основі карбополового гідрогелю. Показано, що ранозагоювальна властивість притаманна клітинам різного походження, але більш ефективною є оригінальна клітинна лінія 4BL, яка стимулює загоєння ран на ранніх стадіях.

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

5. На іншій моделі опікових ран у тварин (щури) підтверджено ранозагоювальну здатність клітин лінії 4BL і середовища, кондиційованого

клітинами цієї лінії (БКС-4BL), що, вочевидь, містить комплекс біологічно активних сполук клітинного походження.

6. Показано, що терапія опікових ран з використанням біоконструкцій, що містять середовище, кондиційоване клітинами лінії 4BL (БКС-4BL), супроводжується стимуляцією капіляроутворення у ложі рани. Крім того 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.

8. Показано, що напрацьований біоматеріал БКС-4BL має зберігатися у замороженому стані, притому оптимальним є глибоке заморожування отриманого БКС та зберігання його при -80°C (умови, що забезпечуються, наприклад, лабораторним кельвінатором), а менш прийнятним, проте допустимим є зберігання в стандартній морозильній камері при -20°C .

Основні результати досліджень опубліковані у наступних роботах:

1. 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.

2. 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.

3. Спосіб одержання тимчасового пластичного раневого 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.

РОЗДІЛ 5.

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Як вже відзначалось, особливе значення біотехнологічні дермальні еквіваленти мають для лікування масивних опіків. Одна з основних проблем при лікуванні опікової хвороби – це потреба обробляти глибокі та значні за площею пошкодження шкіряного покриву з подальшим стимулюванням – наскільки це можливо при сучасному розвитку медицини – регенерації тканин. Такі рани мають великий ризик інфікування і часто потребують коштовного лікування шляхом аутотрансплантації шкіри або аутодермопластики. Сучасні комбустіологи теоретично (тобто при наявності значної кількості грошових ресурсів) мають можливість користуватися різноманітними біотехнологічними тимчасовими рановими покриттями, які містять у своєму складі живі клітини різних типів та походження. Серед існуючих закордонних епідермальних еквівалентів шкіри можна назвати такі продукти, як Epicel, EPIBASE, EpiDex, MySkin, Laserskin, Bioseed-S та CellSpray. Відомими закордонними дермальними еквівалентами є, наприклад, TransCyte та Hyalograft 3D. Всі ці біотехнологічні ранові покриття є тимчасовими. Незважаючи на наявність за кордоном різноманітних комерційних продуктів такого типу (еквівалентів шкіри, еквівалентів епідерміса або дерми), в тому числі таких, що містять клітини людини, вони надто дорогі і практично не доступні для пацієнтів України.

Отже, необхідність створення нових біотехнологічних ранових покриттів (а саме штучних еквівалентів дерми) з включенням клітин людини різних установлених ліній або їхніх похідних, що призначені для лікування опікової хвороби, є, умовно кажучи, соціальним замовленням в умовах нинішньої ситуації в медичній, зокрема, в комбустіологічній галузі України. Це зумовило спрямування наших зусиль на розробку нових біотехнологічних дермальних еквівалентів з використанням природних матеріалів і стовбурових клітин

людини, які, з одного боку, були би достатньо ефективні при лікуванні опіків, безпечні для організму і мали покращені експлуатаційні властивості, а з другого боку, недорогі, прості у виробництві й експлуатації та, що найголовніше, доступні для більшості пацієнтів України. У даному розділі дисертаційної роботи мова йде про оптимізацію створення нових дермальних покриттів: особливості відбору матеріалів для клітинного носія, а також клітинного компоненту, клітин та/або їхніх похідних, у порівнянні з відомими літературними даними.

Першим кандидатом на роль носія клітин у складі наших тимчасових еквівалентів дерми був поліакриламідний гідрогель. На початку досліджень в галузі клітинних технологій поліакриламідні гідрогелі не використовувалися для створення штучних ранових покриттів. Дещо пізніше з'явилися роботи, в яких пропонувалося використання поліакриламідну тим чи іншим способом. Першою можна назвати роботу 2014-го року, виконану в Канаді [199], в якій науковці пропонували використовувати тонкий поліакриламідний шар на тій поверхні штучного ранового покриття, яке торкається шкіри. Такий шар мав знизити міцність контакту між шкірою і покриттям задля того, щоб при заміні останнього на шматки власної шкіри пацієнта уникнути мікротравм та болю. Також передбачалося, що поліакриламідний гідрогелевий шар може нести в собі якісь біоактивні або антимікробні агенти, які будуть поступово вивільнюватись і поступати до ранового ложа. Члени тієї ж наукової групи, продовжуючи працювати в цьому напрямку, через два роки [200] запропонували до розгляду ранове покриття з таким же поліакриламідним шаром, але з додатковим навантаженням сріблом у вигляді наночастинок або у вигляді додаткового срібного шару.

Протягом кількох останніх років (з 2017-го по 2021-й роки) різні групи китайських науковців пропонували різні варіанти штучних ранових покриттів, до складу яких входить поліакриламід. Іншими речовинами, що додавались як композитний матеріал у запропоновані біоконструкції були:

– полідофамін (polydopamine), 2017 р. [201],

- комплекс дофаміна і окисненого альгінату натрія (dopamine-grafted oxidized sodium alginate), 2018 р. [202],
- гідроксипропілметилцелюлоза (hydroxypropylmethylcellulose), 2019 р. [203],
- власне поліакрилова кислота і фероцен (polyacrylicacid-functionalized with ferrocene), 2021 р. [204],
- полідофамін (polydopamine) і бактеріальна целюлоза (bacterial cellulose), 2021 р. [205],
- водорозчинні полісахариди з *Enteromorpha prolifera* (вид зелених морських водорослей), поперечно зшиті борною кислотою (water-soluble polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* cross-linked with boric acid), 2021 р. [206].

В останній роботі 2021-го року один із запропонованих варіантів був найактивнішим серед усіх, на які ми вище дали посилання. Автори навантажили створений гідрогель епідермальним фактором росту людини, і такі зразки ранового покриття, за словами авторів, сприяли проліферації та міграції клітин *in vitro* та значно прискорювали загоєння ран *in vivo* на модельних щурах.

Слід відзначити, що всі варіанти щільних ранових покриттів, описані раніше (літературні посилання в «Огляді літератури» і в даному розділі), до складу яких входив поліакриламід, суттєво відрізнялись від біоконструкцій, які стали об'єктом даної роботи. Ми запланували створити нові еквіваленти дерми і провести їх дослідження – спочатку лабораторні, потім доклінічні – з використанням поліакриламідного гідрогелевого покриття, на поверхні якого іммобілізовані живі клітини, що безпосередньо культивуються на цій мембрані. Такими клітинами мали бути стовбурові клітини людини, дозволені для використання у медичній практиці. І саме в цьому полягає основна відмінність даної роботи від згаданих вище літературних джерел.

Як зазначено в розділі 3, одним із основних завдань першої частини роботи була оптимізація виготовлення біоконструкцій на основі щільних

гідрогелевих носіїв (мембран) для того, щоб поліпшити іммобілізацію, адгезію і проліферацію клітин на поверхні даних носіїв. Наночастинки металів або оксидів металів є одним із можливих модифікуючих компонентів, які можна застосовувати при виготовленні поліакриламідних мембран. Деякі дані свідчать, що біологічна відповідь на потрапляння в живий організм наночастинок металів відрізняється від реакції на іони металів [207]. Наприклад, показано, що певні дози металевих наночастинок стимулюють метаболічні процеси і також проявляють бактеріостатичну та бактерицидну активність [207].

Широко відомими є антибактеріальні властивості срібла. Цей ефект, його прояви і механізми є предметом дослідження багатьох науковців. Пошук статей, наприклад, у електронній базі PubMed, які мають одночасно містити слова "*silver*" і "*antibacterial*" або в заголовку, або серед ключових слів (тобто, запит виду (*silver[Title] AND antibacterial[Title]*) OR (*silver[OT] AND antibacterial[OT]*)) дає нам перелік посилань на більш ніж дві тисячі статей, в яких досліджується бактерицидність срібла в тому чи іншому вигляді. Крім того, срібло може впливати на проліферацію клітин ссавців. Ще у 2007 році науковці Гонконгу [208] зауважили, що "нещодавна поява нанотехнологій надала [нам] новий метод терапії опікових ран за допомогою наночастинок срібла", дослідили ранозагоювальні властивості наночастинок срібла на тваринній моделі (використовувалися миші BALB/C) і виявили, що швидкість загоєння рани і косметичних покращень раневої ділянки є дозозалежним ефектом. Вони ж показали, що наночастинки срібла надають позитивний ефект завдяки своїм протимікробним властивостям, зменшенню запального процесу у рані та модуляції фіброгенних цитокінів. Німецькі науковці Greulich et al. [209] і Hackenberg et al. [210] працювали з людськими мезенхімальними стовбуровими клітинами (hMSCs) і показали, що наночастинки срібла у високих концентраціях можуть здійснювати цитотоксичний вплив на hMSCs, але при субтоксичних концентраціях срібла індукується активація клітин.

Вплив наночастинок заліза, оксиду заліза або деяких залізовмісних

сполук на живі клітини також є предметом вивчення у багатьох роботах. Магнітні наночастинки магнетиту, тобто оксиду заліза (II, III) визнані багатообіцяючим інструментом для виконання багатьох медичних завдань. Такий статус вони набули, зокрема, завдяки своїм магнітним властивостям. Ці властивості використовується, наприклад, в роботі британських науковців [211], які винайшли цікавий варіант використання суперпарамагнітних наночастинок оксиду заліза (II, III) (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs), покритих термочутливим полімером. Такі наночастинки виявилися здатними захоплювати протеїни, а потім після нагрівання за допомогою магнітного поля протеїни вивільняються у навколишнє середовище. Також показано, що наночастинки магнетиту теж, як і наночастинки срібла, мають антибактеріальні властивості [212]. Вплив наночастинок оксиду заліза (II, III) на клітини залежить від типу клітин, концентрації і терміну дії наночастинок на клітини [213, 214].

Отже, ми перевіряли, як впливає наявність наночастинок срібла та оксиду заліза (II, III) на клітинний компонент поліакриламідних гідрогелевих покриттів: іммобілізацію, адгезію і проліферацію клітин лінії 4BL. Нами показано, що введення до складу гідрогеля наночастинок срібла (Ag) розміром 30 нм в концентрації 25 мкг/г або введення до складу гідрогеля наночастинок оксиду заліза (II, III) (Fe_3O_4) розміром 20 нм в концентрації 5-10 мг/мл стимулює життєдіяльність клітин, іммобілізованих в біоконструкціях на основі поліакриламідних гідрогелевих матриць. Проте додавання наночастинок Ag або Fe_3O_4 до складу поліакриламідних гідрогелей знижує їх прозорість, що не тільки заважає стеженню за станом рани, що особливо важливо при використанні таких гідрогелевих покриттів у клініці, а і за станом та поведінкою клітин (морфологія та проліферація) під час експериментів.

Таким чином, суттєвими недоліками поліакриламідних носіїв з наночастинками срібла у певних концентраціях виявились: по-перше, зниження прозорості зразків внаслідок введення до їхнього складу неорганічних наночастинок, а по-друге, поява такої ознаки як крихкість зволжених плоских

гідрогелевих фрагментів, що виявилось в ході проведення експериментів.

Наступним кандидатом на роль носія клітин у складі наших тимчасових еквівалентів дерми була біоплівка бактерійно-дріжджового угруповання «комбуча» («kombucha», *Medusomyces gisevii*). Основу цієї біоплівки складає бактерійна целюлоза, котра вже використовується для створення біодеградувальних антимікробних композитів для широкого застосування [215]. Важливим є те, що клітинна стінка дріжджів містить у собі хітин у кількості 1-3%, який здатен сприяти регенерації дермального шару шкіри [216]. Хоча більшість клітин лінії 4BL, які ми використовували, на поверхні такої матриці залишалася живою протягом 6 днів (що набагато перевищує можливі терміни клінічного використання одного окремо взятого зразка ранового покриття), проте лише невелика частка клітин набувала розпластанної форми, яка є типовою для життєздатних МСК на поверхні твердих носіїв. Тож ми не можемо впевнено сказати, що життєдіяльність клітин у складі такої біоконструкції була б аналогічна тій, що має місце у нормальних умовах. Це питання потребує подальших досліджень.

Отже, ми можемо зробити висновок, що біоплівка гриба *Medusomyces gisevi* може розглядатися як матеріал, який, маючи низьку вартість, може слугувати носієм для стовбурових клітин людини у складі нових біотехнологічних еквівалентів дерми. Проте слід проводити подальші дослідження з цим матеріалом для того, щоб, зокрема, дізнатися про особливості життєдіяльності клітин (секретування цитокінів і факторів росту) у складі таких біоконструкцій.

Третій тип носія клітин, що досліджувався нами, – колагенова плівка «Білкозин», яка вже давно виробляється в промислових умовах. Взагалі спроби використання колагену для вироблення дермальних або дермо-епідермальних еквівалентів багаторазово зустрічалися в біотехнологічних дослідженнях. Колаген не входить до складу саме комерційних дермальних покриттів із вмістом живих клітин, які вже існують і широко, наскільки це дозволено технологічними потужностями виробників і фінансовими можливостями

лікарень, використовуються в лікарській практиці. Однак, інші біотехнологічні дермо-епідермальні еквіваленти («Apligraf Organogenesis Inc.», USA) і OrCell («OrCel Ortec International, Inc.», USA), що розглянуті в «Огляді літератури», містять гідрогель бичачого колагену типу I. Обидва біотехнологічні продукти несуть клітини двох типів: фібробласти і кератиноцити, алогенні по відношенню до конкретного пацієнта. Ми спеціально зазначаємо наявність диференційованих клітин у комерційних продуктах, оскільки предметом нашої цікавості і метою наших досліджень були еквіваленти дермального шару шкіри, що містять стовбурові клітини людини. Також існує чимало експериментальних робіт по створенню композитних клітиновмісних замінників дерми та шкіри, в яких основою або одним з головних компонентів основи є колаген в тому чи іншому вигляді (гідрогель, волокниста колагенова матриця, зроблена за допомогою «електропрядіння» і таке інше). Такі різноманітні спроби створення композитних клітиновмісних замінників дерми та шкіри детально описані в «Огляді літератури» [78-86, 89-99]. Якщо припустити, що всі ці експерименти з колагеновими матрицями матимуть результатом промисловий випуск відповідних біоінженерних клітиновмісних дермальних або дермо-епідермальних еквівалентів, то для розгортання виробництва потрібним буде налагодження широкомасштабного процесу вироблення власне колагеновмісного носія клітин. Пам'ятаючи про це, ми вирішили спробувати використати готову колагенову плівку як носій стовбурових клітин людини, яка вже виробляється промислово. Таке рішення дозволить при необхідності значно спростити і зменшити затрати на процес налагодження промислового виробництва.

Отже, створена нами біоконструкція «білкозин + желатин + живі клітини» була придатна для проведення доклінічних досліджень: аплікації на термічні опіки, індуковані у модельних тварин, і стеження за процесом загоєння ран. Ми підготували зразки для досліджень *in vivo*, спираючись на результати експериментів з визначення життєздатності клітин в желатиновому гідрогелі, які показали, що таке біотехнологічне ранове покриття може зберігатися

протягом двох-трьох діб; проте час зберігання готових зразків дермальних покриттів до початку хірургічних процедур має бути якомога меншим, щоб максимально уникнути загибелі клітин, імобілізованих у гідрогелі.

Результати попереднього експеримента із залученням лабораторних білих мишей лінії ICR свідчили про наявність сприятливого впливу аплікації створеного нами тимчасового дермального еквівалента на процес загоєння ран. Це проявлялось у стимуляції регенерації (васкуляризації й епітелізації) дермального шару шкіри, що детально описано в експериментальних розділах. Нами було висловлено припущення, що ефект нашої біоконструкції на перебіг захворювання, ймовірно, є, по-перше, наслідком сприятливого впливу комплексу біологічно активних речовин, секретованих стовбуровими клітинами у складі біоконструкції, на регенерацію дермального шару шкіри, і по-друге, наслідком часткової абсорбції токсичних продуктів розпаду клітин. Ці питання досліджувались нами в подальших експериментах.

Отже, ми обрали як носій або тверду основу наших тимчасових клітиновмісних дермальних еквівалентів колагенову плівку «Білкозин». Однак важливо було оцінити ефективність різних компонентів розроблених нами еквівалентів дерми в доклінічних дослідженнях з використанням достатньої кількості модельних тварин. Тому ми провели експерименти із залученням дрібних лабораторних тварин (лабораторні білі щури лінії Wistar, лабораторні білі миші лінії ICR) в більш широких масштабах, ніж у вищезгаданому експерименті.

При значному збільшенні кількості експериментальних тварин ми стикнулися з такою проблемою: на покриттях гризунів практично неможливо закріпити фрагменти щільних дермальних еквівалентів. Якщо механічно закріплювати такі фрагменти на рані за допомогою, наприклад, тканинних пов'язок, то, по-перше, тварини будуть відчувати постійний значний стрес від щоденних маніпуляцій такого роду, і, по-друге, постійно буде наявним ризик або накласти пов'язку надто слабо, через що вона буде знята твариною, або накласти пов'язку надто туго і пошкодити внутрішні органи, чи, припустимо,

ребра, тварини.

Забезпечення надійної фіксації клітинної суспензії на рановій поверхні може бути досягнуто за рахунок того, що клітини будуть іммобілізовані на поверхні плівкоподібного ранового покриття (наприклад, на поліакриламідній або колагеновій мембранах) або розподілені у м'якій фармацевтичній формі типу мазі. На нашу думку, перевагами мазеподібних субстанцій для закриття ранових поверхонь є:

- зручність їх застосування у випадку, коли опікова рана займає поверхню тіла зі складною формою;

- можливість вільно контролювати товщину нанесеного шару мазі, наслідком чого буде контроль кількості біологічно активних речовин в перерахунку на одиницю площини поверхні рани;

- можливість, за бажанням лікаря або пацієнта, зменшувати кількість мазі на одиницю площини ранової поверхні у певних випадках (наприклад, коли виникає брак необхідних речовин внаслідок того, що лікування проводиться на базі малих медичних пунктів з невеликим запасом лікарських речовин, або внаслідок великої кількості пацієнтів в опіковому центрі).

Отже, надалі ми вирішили дещо змінити напрямок наших досліджень, зосередившись на використанні м'яких фармацевтичних форм типу мазі окремо від твердого носія. Аналіз всіх літературних даних, наведених в підрозділі 1.4 «Огляду літератури», дав нам змогу зробити такий висновок: в наших експериментах саме карбополовий гідрогель на основі гелеутворювача Carbopol 980 з концентрацією карбомеру 1,5% слугуватиме м'якою фармацевтичною формою.

При розробці клітиновмісного препарату на основі м'якого мазеподібного гідрогеля (карбополового гідрогеля, який використовується в медицині) першочерговим було питання про тривалість збереження клітинами життєздатності при існуванні у складі такої фармацевтичної форми. Це важливо не тільки для створення самого клітиновмісного покриття, але і для вирішення практичних питань щодо допустимого проміжку часу між його приготуванням і

застосуванням, а також щодо можливості його зберігання. Аналіз даних, отриманих в ході спостереження за змінами життєздатності клітин, інкорпорованих у карбополовий гідрогель, вказував на поступове зниження частки життєздатних клітин в залежності від терміну експозиції готового клітиновмісного препарату. Статистичний аналіз показав, що зниження життєздатності не є випадковим: при кімнатній температурі фактор впливу становив $\eta^2=0,36$ ($p \leq 0,05$), а при температурі, яка зазвичай надається клітинам під час їх культивування *in vitro* і є для них природною, життєздатність знижується скоріше, і фактор впливу становив $\eta^2=0,26$ ($p \leq 0,05$).

Таким чином, обмеження терміну зберігання клітиновмісних гідрогелевих біоконструкцій на основі карбополу і терміну аплікації на рані є необхідними умовами для уникнення втрати терапевтичної ефективності цих біоконструкцій. Звісно, клітинний компонент має зберігатися окремо, в умовах кріобанку. Приготування дермальних покриттів, які будуть містити клітиновмісний карбополовий гідрогель, тобто поєднання розморожених за стандартною схемою кріоконсервованих клітин і 2-кратного (3%) карбополового гідрогелю є оптимальним *ex tempore*, безпосередньо перед застосуванням. Готовий продукт має бути використаний протягом 2-3 годин після виготовлення.

Визначивши можливість існування життєздатних клітин всередині гідрогелю, ми вирішили перш за все порівняти терапевтичні можливості таких двох можливих компонентів наших біоконструкцій, як живі клітини і клітинний лізат. Було зроблено припущення, що лізат клітин містить у собі ті ж самі біологічно активні речовини, зокрема фактори росту, які виділяються живими клітинами у навколишнє середовище, а також клітинний детрит, який може бути токсичним. Тому ми припускали, що клітинний лізат здатен так само або приблизно так само стимулювати регенерацію тканин у ложі рани, як і живі клітини штучного дермального еквіваленту. В літературі вже описані випадки (хоча їх зовсім небагато) вивчення впливу лізату клітин на процес загоєння ран шкіри. Бельгійські науковці D.I.Roseeuw і співавт. [217] ще у 1995 р. робили

експериментальне поранення повної товщини на спинках мишей і на такій моделі вивчали ранозагоювальну активність ліофілізованого лізату із культивованих кератиноцитів людини. Цей лізат був приготований у сольовому розчині з фосфатним буфером. Автори показали певні позитивні зміни в процесі загоєння ран, збільшення товщини дермального шару шкіри у порівнянні з контрольною групою тварин. Однак вплив на відновлення епідермального шару був відсутній. При цьому слід зауважити, що культивування кератиноцитів є досить затратним процесом, а отримання суспензії цих клітин з власних тканин пацієнта – це певною мірою травматична для нього самого процедура. Як свідчать літературні дані, подальших досліджень з клітинними лізатами, зокрема, з лізатами кератиноцитів, ця група науковців не проводила.

В 2012 році канадські науковці А.Аквагі і співавт. [218] вивчали вплив лізату еритроцитів на експресію компонентів позаклітинного матрикса. Як пишуть автори, еритроцити вважаються «інертними спостерігачами» на ранній та запальній фазі загоєння ран. Проте під впливом еритроцитного лізату було продемонстровано значне підвищення рівня металопротеїназ MMP-1, 2, 3, зниження експресії колагену I типу і α -актину гладкої мускулатури, підвищення експресії фібронектину в фібробластах шкіри.

Отже, ми вирішили перевірити нашу гіпотезу про можливість рівного терапевтичного потенціалу у живих клітин і лізату живих клітин. Для цього ми провели два експерименти із залученням двох видів лабораторних тварин: перший, пілотний – із залученням невеликої кількості щурів, наступний – із залученням мишей в більшій кількості. В другому експерименті нами було проаналізовано не тільки зміни площини рани у тварин, але і тривалість загоєння опікових ран та зміну ваги тіла протягом 22 діб експерименту. Лише в групі, де була застосована гідрогелева композиція із включенням живих клітин 4VL, спостерігався сумарний приріст ваги тіла мишей (якщо при цьому не брати до уваги групу «інтактний контроль», в якій опікові рани взагалі ніяк не оброблялися), показник впливу становив $\eta^2=0,66$ ($p \leq 0,05$). Середній час

загоєння ран в цій групі, хоч і не відрізнявся статистично достовірно від аналогічного показника в контрольній групі, проте все ж варто взяти до уваги, що це середнє значення було найменшим серед усіх груп. Що стосується зміни площини рани, то і тут найбільша ефективність спостерігалася у тієї біоконструкції, яка несла в собі живі клітини 4BL і не містила лізату клітин (показник впливу $\eta^2=0,60$, $p \leq 0,05$).

Таким чином, на цій стадії досліджень нами було зроблено висновок, що терапевтична дія, притаманна саме живим клітинам у складі біоконструкцій, і вона суттєво перевищує позитивний ефект від застосування клітинних лізатів як додаткових компонентів досліджуваних дермальних покриттів.

Далі ми поставили собі за мету порівняння терапевтичних можливостей використання клітин людини різного походження. Нам потрібно було вирішити, які клітини серед доступних для нас постійних клітинних ліній, що ведуть походження від здорових донорів, слід використовувати у подальших дослідках (апріорі ми передбачали, що терапевтичні властивості різних типів клітин будуть різними). Крім того, ми вважали, що краще для промислового виготовлення дермальних покриттів використовувати стандартизовані клітини постійних ліній, ніж первинні клітини, отримання і підтримка яких є вартісними процедурами.

Також ми вважали за потрібне перевірити гіпотезу стосовно того, що терапевтичний ефект може бути пов'язаний з комплексом біологічно активних сполук, секретованих клітинами у культуральне середовище. З цією метою ми використовували безклітинні середовища (БКС), кондиційовані клітинами різних ліній, в тому числі стовбуровими клітинами *in vitro*. У доступній для нас літературі ми не знайшли відомостей про створення біотехнологічних дермальних покриттів з використанням середовищ, кондиційованих стовбуровими клітинами людини.

Однак ідея використання такого середовища, зокрема, з метою поліпшити регенерацію тканин шкіри, вже висловлювалася різними науковцями. Перш за все варто взяти до уваги роботи, в яких використовувались головні клітини

шкіри, а саме фібробласти. У 2017-му році науковці Південної Кореї [219], зауважуючи: «... повідомляється, що кондиційоване середовище, отримане з використанням фібробластів людини, містить різноманітні фактори, які, як відомо, важливі для росту шкіри», намагалися за допомогою такого середовища стимулювати секрецію колагена типу I стовбуровими клітинами жирового походження. Результат був позитивним, а ще, крім того, стимульовані стовбурові клітини, позитивно впливали на регенерацію тканин з використанням моделі рани повної товщини у мишей.

Група малайзійських науковців кілька останніх років вивчала середовище, кондиційоване фібробластами людини [220-222]. Перша з них, що вийшла у 2018-му році, продемонструвала дані протеомного аналізу середовища, кондиційованого дермальними фібробластами людини в культурі. В статті 2019-го року описано створення дермального замітника шкіри з використанням колагенового гідрогелю і середовища, кондиційованого фібробластами шкіри людини в культурі. Випробування на моделі рани повної товщини у мишей давало позитивні результати. В статті 2021-го року показано продовження експериментів, описаних у попередній друкованій праці, проте у структуру носія було додано хондроїтин-4-сульфат. Експерименти з використанням модельних тварин в цій статті не згадуються.

Культуральне середовище, кондиційоване стовбуровими клітинами, виглядає ще більш привабливим у терапевтичному плані. Ще у 2010-му році британські науковці [223] за допомогою методу «scratch assays» перевіряли *in vitro* біологічну активність безклітинного середовища, яке було кондиційоване МСК. В роботі зазначено, що у середовищі, кондиційованому МСК було виявлено колаген типу I, фібронектин, а також ряд медіаторів загоєння ран. Автори припускають, що секреторна активність МСК у живому організмі може відігравати певну роль у закритті шкірної рани, впливаючи як на міграцію фібробластів шкіри, так і на міграцію кератиноцитів, разом із внеском у формування позаклітинного матриксу.

Різні групи науковців вказують, що середовище МСК має здатність

позитивно впливати на загоєння опікових ран [224] та діабетичних виразок [225], стимулює загоєння ран завдяки прискоренню міграції і проліферації фібробластів та кератиноцитів [226], перешкоджає утворенню шрамів [227] і покращує ангиогенез [228, 229]. Існують оглядові статті, присвячені обговоренню терапевтичних можливостей МСК та кондиційованих ними середовищ, наприклад, [230, 231].

Порівнюючи клітиновмісні і безклітинні препарати, до переваг останніх можна віднести наступне:

- спрощення технології зберігання (зокрема криозберігання);
- відсутність необхідності у спеціальних криопротекторах у складі препарату;
- полегшення стандартизації технології отримання;
- полегшення контролю відсутності патогенних агентів у складі;
- виключення потенційних ризиків, пов'язаних з трансплантацією клітин.

Порівняння впливу клітин різних ліній на загоєння опікових ран у гризунів дозволяє зробити висновок, що найбільш виражена стимуляція регенерації тканин у рані спостерігалася при використанні живих клітин людини лінії 4BL (мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини) і лінії A102 (фібробласти шкіри). Цей позитивний вплив клітин на загоєння опікових ран у тварин при ксенотрансплантації, вочевидь, опосередковується біологічно активними сполуками, які клітини секретують в культуральне середовище, що, ймовірно, і призводить до стимуляції проліферації клітин в зоні ураження. Найбільш виражений ефект спостерігався при використанні фібробластів шкіри.

Як було зазначено вище, використання безклітинного кондиційованого середовища є привабливішим з практичної точки зору, ніж використання живих клітин. Тому ми порівняли терапевтичну дію клітиновмісних і безклітинних біоконструкцій, створених із застосуванням клітин кожної з трьох ліній, і результати порівняння детально описали в Розділі 4. Було показано, що

безклітинний препарат на основі клітин E8 виявився менш ефективним за клітиновмісний; для безклітинного та клітиновмісного препаратів на основі клітин A102 не було виявлено різниці в їхніх ранозагоювальних властивостях. А препарат, приготований на основі культурального середовища, кондиційованого клітинами 4BL, був значно ефективніший за відповідний клітиновмісний продукт.

Також слід зазначити, що статистичний аналіз показав наступне: медіана тривалості загоєння була найменшою в групі, де застосовувалося безклітинне кондиційоване середовище, отримане з використанням клітин лінії 4BL при одночасному порівнянні тривалості загоєння опікових ран у мишей шести дослідних груп (використання клітин E8, A102, 4BL і БКС-E8, БКС-A102, БКС-4BL) і в контролі.

Отже, ми показали на моделі опікової хвороби у мишей лінії ICR, що найефективнішими серед усіх шести досліджених біоконструкцій виявилися такі, що містять у собі стовбурові клітини лінії 4BL або БКС-4BL. У той же час, як було зазначено в попередньому розділі, в даній парі гідрогелевих препаратів безклітинна біоконструкція, приготована з використанням кондиційованого середовища, була ефективнішою за клітиновмісну на всіх етапах загоєння рани і загалом найефективнішою з усіх досліджених в експерименті з шістьма типами терапевтичних агентів.

Змінивши вид лабораторних тварин (взявши щурів замість мишей) в моделі опікової хвороби, ми вирішили ще раз протестувати *in vivo* і порівняти ранозагоювальну активність клітин лінії 4BL і середовища, кондиційованого клітинами лінії 4BL. Ефективність обох препаратів знов була підтверджена, і не тільки за оцінкою зменшення площі рани, але також завдяки мікроскопічному спостереженню за станом васкуляризації ранової поверхні і завдяки дослідженню вмісту у шкірі деяких ростових/регуляторних факторів. Було показано, що і живі клітини 4BL, і БКС-4BL стимулюють капіляроутворення у ложі рани, причому стимулювальний ефект безклітинного кондиційованого середовища, на наш погляд, виявляється найвиразнішим. У всіх тварин, що

отримували лікування препаратами на основі клітин 4BL і БКС-4BL, спостерігалось 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.

Порівняння та узагальнення отриманих результатів вказує на те, що найефективнішою гідрогелевою біоконструкцією серед всіх досліджених нами виявляється така, що містить у собі безклітинне середовище, кондиційоване клітинами лінії 4BL (БКС-4BL).

Ми вважали за потрібне дослідити залежність властивостей безклітинного кондиційованого середовища від умов його напрацювання та зберігання.

Експеримент з варіюванням ступеню конфлюентності клітинної культури лінії 4BL показав, що густина клітин у моношарі культури-продуцента, ймовірно, не є критичною для якості отриманого БКС. Як вже було сказано, між контрольним і дослідними варіантами була статистично достовірна різниця, проте різниця між зразками 4BL-БКС з різним ступенем конфлюентності не була статистично достовірною. Втім ми можемо висловити деякі припущення щодо причин відмінностей між різними частинами графіку, що відповідають тому чи іншому ступеню конфлюентності (тобто між різними коробками) на рисунку 4.10. Найбільший рівень стимуляції росту клітин у МТТ-тесті був показаний, коли конфлюентність клітинного шару складала 30%, тобто тоді, коли досить активно відбувалася проліферація клітин 4BL. Ми припускаємо, що при зростанні числа клітин у моношарі відбувається гальмування як проліферації, так і загального метаболізму клітин, через що продукція ростових факторів, які стимулюють регенерацію тканин у ложі рани, зменшувалась. Коли конфлюентність наближалась до 100%, тобто клітини ще проліферували, але зайняли майже всю доступну їм площу, тоді деяке зростання стимулювальних властивостей БКС, згідно з нашими припущеннями, було наслідком того, що загальна маса «мікросинтезаторів», як можна умовно назвати клітини, була

відносно великою і, відповідно, синтезувала і секретувала достатньо велику кількість біологічно активних речовин.

Умови зберігання напрацьованого комплексу біологічно активних речовин у складі гідрогелевого безклітинного препарату виявляються більш значущими для збереження його ранозагоювальної активності, ніж ступінь конфлюентності клітинної маси. Виходячи з експериментальних даних, ми вважаємо оптимальним глибоке заморожування отриманого БКС та зберігання його при -80°C (умови, що забезпечуються лабораторним кельвінатором). Менш прийнятним, проте допустимим є зберігання в стандартній морозильній камері при -20°C . Подальше зростання температури зберігання безклітинного кондиційованого середовища призводить до значної втрати його активності. Отже, хоча безклітинні препарати, точніше їх біологічно активні компоненти набагато менш вибагливі до умов кріозберігання, ніж живі клітини, проте ми вважаємо за необхідне в подальшому продовжити пошук форми БКС, яка була б ще менш чутливою до умов зберігання.

Отже, у даній роботі нами було встановлено, що живі клітини лінії 4BL, яка була отримана у відділі генетики людини ІМБГ НАН України з периферійної крові здорового донора і є лінією дорослих мультипотентних стромальних клітин людини, а також безклітинне культуральне середовище (БКС), кондиційоване клітинами цієї лінії в культурі, можуть бути поєднані з такою м'якою лікарською формою, як гідрогель на основі штучного полімеру карбомеру (карбополовий гідрогель), і отримана пластична біоконструкція здатна стимулювати регенерацію тканин при загоєнні опікових ран. Було показано, що практичне використання БКС-4BL є більш вигідним як в плані ранозагоювальної активності, так і в плані зручності зберігання. Вказана біоконструкція, карбополовий гідрогель і такі компоненти, як живі клітини лінії 4BL або безклітинне культуральне середовище, кондиційоване клітинами лінії 4BL, можуть застосовуватись для виробництва тимчасових штучних еквівалентів дермального шару шкіри з використанням носіїв природного («Білкозин») та штучного (поліакриламід) походження.

Враховуючи результати наших досліджень на модельних тваринах і попередні дані, отримані раніше в клініці на обмеженому контингенті осіб, в подальшому використання в клініці розроблених нами тимчасових еквівалентів дерми з включенням стовбурових клітин оригінальної лінії 4BL і, особливо безклітинного препарату БКС-4BL, дозволить покращити такі життєво важливі показники як стимуляція регенерації дермального шару шкіри, підвищення ефективності приживлення аутотрансплантантів і, як наслідок, призведе до значного поліпшення стану пацієнтів з опіковою хворобою.

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, іммобілізованих 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Powar R, Prabhu M, Sudhir M, Mallapur B. Epidemiological study of pediatric burns at a tertiary care centre in South India. *International Journal of Community Medicine and Public Health*. 2016; 1242-1246.
2. "Центр громадського здоров'я України | МОЗ"
<https://phc.org.ua/news/naykrasche-likuvannya-opikiv-ce-ikh-profilaktika>.
3. "Міністерство охорони здоров'я України"
<https://moz.gov.ua/article/health/jak-zahistiti-ditinu-vid-opikiv>.
4. Atiyeh BS, Ibrahim A, Hayek SN. Burn wound cleansing: an efficient evidence-based treatment modality or a ritualistic practice. *J Wound Technol*. 2010; 7: 6-10.
5. Agbenorku P, Agbenorku M, Fiiifi-Yankson KP. Pediatric burns mortality risk factors in a developing country's tertiary burns intensive care unit. *Int J Burns Trauma*. 2013; 3: 151-158.
6. Jeng JC, Miller SF. How Patients Enter the Burn Care System is Changing: A Glimmer from the National Burn Repository. *Journal of Burn Care & Research*. 2007; 28(2): 220-221.
7. Enoch S, Roshan A, Shah M. (2009). Emergency and early management of burns and scalds. *BMJ*. 2009 Apr 8; 338: b1037.
8. Grossoehme RH. Burn Center Referral Patterns to Pastoral Care. *Journal of Burn Care & Rehabilitation*. 2001; 22: S155.
9. Herndon DN. (2012). Chapter 4: Prevention of burn injuries. In *Total Burn Care*. New York: Saunders Elsevier. Retrieved from: www.sciencedirect.com/science/book/9781437727869.
10. Vons BV, Chubka MB, Groshovyi TA. Market analysis of semisolid dosage forms registered in Ukraine and research of excipients included to their formulas. *Farmatsevychnyi chasopys*. 2015; 1: 55-61. [in Ukrainian].
11. Herndon DN. (2012). Chapter 1: A brief history of acute burn care management. In *Total Burn Care*. New York: Saunders Elsevier. Retrieved from:

www.sciencedirect.com/science/book/9781437727869.

12. Lacroix M, Bovy T, Nusgens BV, Lapiere CM. Keratinocytes modulate the biosynthetic phenotype of dermal fibroblasts at a pretranslational level in a human skin equivalent. *Arch. Dermatol. Res.* 1995; 287(7): 659-664.

13. Archambault M, Yaar M, Gilchrist BA. Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 104(5): 859-867.

14. Eaglstein WH, Falanga V. Tissue engineering for skin: an update. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1998; 39(6): 1007-1010.

15. Ehrenreich M, Ruszczak Z. Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue Eng.* 2006; 12(9): 2407-2424.

16. Still J, Glat P, Silverstein P, Griswold J, Mazingo D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns.* 2003; 29(8): 837-841.

17. Hebda PA, Dohar JE. Transplanted fetal fibroblasts: survival and distribution over time in normal adult dermis compared with autogenic, allogenic, and xenogenic adult fibroblasts. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1999; 121(3): 245-251.

18. Sandulache VC, Zhou Z, Sherman A, Dohar JE, Hebda PA. Impact of transplanted fibroblasts on rabbit skin wounds. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2003; 129(3): 345-350.

19. Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127(5): 1018-1029.

20. Pruitt BA Jr, Levine NS. Characteristics and uses of biologic dressings and skin substitutes. *Arch. Surg.* 1984; 119(3): 312-322.

21. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975; 6(3): 331-343.

22. Gallico GG III, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human

epithelium. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311(7): 448-451.

23. Carsin H, Ainaud P, Le Bever H, Rives J, Lakhel A, Stephanazzi J, Lambert F, Perrot J. Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. *Burns.* 2000; 26(4): 379-387.

24. Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns.* 2007; 33(4): 405-413.

25. Chester DL, Balderson DS, Papini RP. A review of keratinocyte delivery to the wound bed. *J. Burn Care Rehab.* 2004; 25(3): P. 266-275.

26. Williamson JS, Snelling CF, Clugston P, Macdonald IB, Germann E. Cultured epithelial autograft: five years of clinical experience with twenty-eight patients. *J. Trauma.* 1995; 39(2): 309-319.

27. Hernon CA, Dawson RA, Freedlander E, Short R, Haddow DB, Brotherston M, MacNeil S. Clinical experience using cultured epithelial autografts leads to an alternative methodology for transferring skin cells from the laboratory to the patient. *Regen. Med.* 2006; 1(6): 809-821.

28. Compton CC, Gill JM, Bradford DA, Regauer S, Gallico GG, O'Connor NE. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab. Invest.* 1989; 60(5): 600-612.

29. Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, Carsin H, Barrandon Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation.* 2000; 70(11): 1588-1598.

30. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature. *Burns.* 2006; 32: 395-401.

31. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: eleven years of clinical experience. *Burns.* 2006; 32(4): 538-544.

32. Vacher D. Autologous epidermal sheets production for skin cellular therapy. *Ann. Pharm. Fr.* 2003; 61(3): 203-206.

33. Tausche AK, Skaria M, Böhlen L, Liebold K, Hafner J, Friedlein H, Meurer M, Goedkoop RJ, Wollina U, Salomon D, Hunziker T. An autologous epidermal equivalent tissue-engineered from follicular outer root sheath keratinocytes is as effective as split-thickness skin autograft in recalcitrant vascular leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2003; 11(4): 248-252.

34. Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J. Cell Mol. Med.* 2005; 9(3): 592-608.

35. Moustafa M, Simpson C, Glover M, Dawson RA, Tesfaye S, Creagh FM, Haddow D, Short R, Heller S, MacNeil S. A new autologous keratinocyte dressing treatment for non-healing diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabet. Med.* 2004; 21(7): 786-789.

36. Ramos-e-Silva M, Ribeiro de Castro MC. New dressings, including tissue-engineered living skin. *Clin. Dermatol.* 2002; 20(6): 715-723.

37. Grant I, Warwick K, Marshall J, Green C, Martin R. The co-application of sprayed cultured autologous keratinocytes and autologous fibrin sealant in a porcine wound model. *Br. J. Plast. Surg.* 2002; 55(3): 219-227.

38. Navarro FA, Stoner ML, Park CS, Huertas JC, Lee HB, Wood FM, Orgill DP. Sprayed keratinocyte suspensions accelerate epidermal coverage in a porcine microwound model. *J. Burn Care Rehab.* 2000; 21(6): 513-518.

39. Zhu N, Warner RM, Simpson C, Glover M, Hernon CA, Kelly J, Fraser S, Brotherston TM, Ralston DR, MacNeil S. Treatment of burns and chronic wounds using a new cell transfer dressing for delivery of autologous keratinocytes. *Eur. J. Plast. Surg.* 2005; 28: 319-330.

40. Moustafa M, Bullock AJ, Creagh FM, Heller S, Jeffcoate W, Game F, Amery C, Tesfaye S, Ince Z, Haddow DB, MacNeil S. Randomized, controlled, single-blind study on use of autologous keratinocytes on a transfer dressing to treat nonhealing diabetic ulcers. *Regen. Med.* 2007; 2(6): 887-902.

41. Lam PK, Chan ES, To EW, Lau CH, Yen SC, King WW. Development and

evaluation of a new composite Laserskin graft. *J. Trauma*. 1999; 47(5): 918-922.

42. Myers SR, Partha VN, Soranzo C, Price RD, Navsaria HA. Hyalomatrix: a temporary epidermal barrier, hyaluronan delivery, and neodermis induction system for keratinocyte stem cell therapy. *Tissue Eng*. 2007; 13(11): 2733-2741.

43. Price RD, Das-Gupta V, Leigh IM, Navsaria HA. A comparison of tissue-engineered hyaluronic acid dermal matrices in a human wound model. *Tissue Eng*. 2006; 12(10): 2985-2995.

44. Johnsen S, Ermuth T, Tanczos E, Bannasch H, Horch RE, Zschocke I, Peschen M, Schöpf E, Vanscheidt W, Augustin M. Treatment of therapy-refractive ulcera cruris of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant. *Vasa*. 2005; 34(1): 25-29.

45. Vanscheidt W, Ukat A, Horak V, Brüning H, Hunyadi J, Pavlicek R, Emter M, Hartmann A, Bende J, Zwingers T, Ermuth T, Eberhardt R. Treatment of recalcitrant venous leg ulcers with autologous keratinocytes in fibrin sealant: a multinational randomized controlled clinical trial. *Wound Repair Regen*. 2007; 15(3): 308-315.

46. Kim PJ, Dybowski KS, Steinberg JS. Feature: a closer look at bioengineered alternative tissues. *Podiatry Today*. 2006; 19(7): 38-55.

47. Stark HJ, Willhauck MJ, Mirancea N, Boehnke K, Nord I, Breitzkreutz D, Pavesio A, Boukamp P, Fusenig NE. Authentic fibroblast matrix in dermal equivalents normalises epidermal histogenesis and dermoepidermal junction in organotypic co-culture. *Eur. J. Cell Biol*. 2004; 83(11-12): 631-645.

48. Stark HJ, Boehnke K, Mirancea N, Willhauck MJ, Pavesio A, Fusenig NE, Boukamp P. Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc*. 2006; 11(1): 93-105.

49. Demling RH. Use of Biobrane in management of scalds. *J. Burn Care Rehab*. 1995. 16(3, Pt 1): 329-330.

50. Barret JP, Dziewulski P, Ramzy PI, Wolf SE, Desai MH, Herndon DN. Biobrane versus 1% silver sulfadiazine in second-degree pediatric burns. *Plast. Reconstr. Surg*. 2000; 105(1): 62-65.

51. Pape SA, Byrne PO. Safety and efficacy of TransCyte for the treatment of partial-thickness burns. *J. Burn Care Rehab.* 2000; 21(4): 390.

52. Marston WA, Hanft J, Norwood P, Pollak R. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care.* 2003; 26(6): 1701-1705.

53. Omar AA, Mavor AI, Jones AM, Homer-Vanniasinkam S. Treatment of venous leg ulcers with Dermagraft. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2004; 27(6): 666-672.

54. Caravaggi C, De Giglio R, Pritelli C, Sommaria M, Dalla Noce S, Faglia E, Mantero M, Clerici G, Fratino P, Dalla Paola L, Mariani G, Mingardi R, Morabito A. HYAFF 11-based autologous dermal and epidermal grafts in the treatment of noninfected diabetic plantar and dorsal foot ulcers: a prospective, multicenter, controlled, randomized clinical trial. *Diabetes Care.* 2003; 26(10): 2853-2859.

55. What is Apligraf? www.apligraf.com/professional/what_is_apligraf

56. Xiao YL, Riesle J, Van Blitterswijk CA. Static and dynamic fibroblast seeding and cultivation in porous PEO/PBT scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999; 10(12): 773-777.

57. El Ghalbzouri A, Lamme EN, van Blitterswijk C, Koopman J, Ponc M. The use of PEGT/PBT as a dermal scaffold for skin tissue engineering. *Biomaterials.* 2004; 25(15): 2987-2996.

58. Uccioli L. A clinical investigation on the characteristics and outcomes of treating chronic lower extremity wounds using the tissuetech autograft system. *Int. J. Low Extrem. Wounds.* 2003; 2(3): 140-151.

59. Waymack P, Duff R. G, Sabolinski M. The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds. The Apligraf Burn Study Group. *Burns.* 2000; 26(7): 609-619.

60. Hayes DW Jr, Webb GE, Mandracchia VJ, John KJ. Full-thickness burn of the foot: successful treatment with Apligraf. A case report. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 2001; 18(1): 179-188.

61. Meier S, Hay ED. Control of corneal differentiation by extracellular

materials. Collagen as a promoter and stabilizer of epithelial stroma production. *Dev Biol.* 1974; 38(2): 249–270.

62. Gey GO, Svoelis M, Foard M, Bang FB. Long-term growth of chicken fibroblasts on a collagen substrate. *Exp Cell Res.* 1974; 84(1): 63–71.

63. Neumann P, Zur B, Ehernreich Y. Gelatin-based sprayable foam as a skin substitute. *J Biomed Mater Res.* 1981; 15(1): 9–18.

64. Lee S, Kim Y, Chong M, Hong S, Lee Y. Study of gelatin-containing artificial skin. V. Fabrication of gelatin scaffolds using salt-leaching method. *Biomaterials.* 2005; 26(14): 1961-1968.

65. Zhang Y, Venugopal J, Huang ZM, Lim C, Ramakrishna S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer.* 2006; 47(8): 2911-2917.

66. Tomihata K, Burczak K, Shiraki K, Ikada Y.. Shalaby SW, Ikada Y, Langer RS, Williams J, editors. *Polymers of biological and biomedical importance.* American Chemical Society Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society, 1994; Vol. 540: 275-286.

67. Rose PJ, Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G, Kroschwitz JI, editors. *Encyclopedia of polymer science and engineering.* New York: Wiley; 1989; Vol. 7, 2nd ed.: 488-513.

68. Lee SB, Jeon HW, Lee YW, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS, Ahn HCh. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-3),(1-6)- β -glucan. *Biomaterials.* 2003; 24(14): 2503-2511.

69. Bohn JA, BeMiller JN. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 1995; 28(1): 3-14.

70. Powell HM, Boyce ST. Fiber density of electrospun gelatin scaffolds regulates morphogenesis of dermal-epidermal skin substitutes. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008; 84(4): 1078-1086.

71. Park JS. Electrospinning and its applications. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology.* 2010; 1: 043002.

72. Huang S, Lu G, Wu Y, Jirigala E, Xu Y, Ma K, Fu X. Mesenchymal stem

cells delivered in a microsphere-based engineered skin contribute to cutaneous wound healing and sweat gland repair. *Journal of Dermatological Science*. 2012; 66(1): 29-36.

73. Quan R, Zheng X, Xu S, Zhang L, Yang D. Gelatin-chondroitin-6-sulfate-hyaluronic acid scaffold seeded with vascular endothelial growth factor 165 modified hair follicle stem cells as a three-dimensional skin substitute. *Stem Cell Res Ther*. 2014 Oct 20; 5(5): 118.

74. Shevchenko RV, Eeman M, Rowshanravan B, Allan IU, Savina IN, Illsley M, Salmon M, James SL, Mikhalovsky SV, James SE. The *in vitro* characterization of a gelatin scaffold, prepared by cryogelation and assessed *in vivo* as a dermal replacement in wound repair. *Acta Biomater*. 2014; 10(7): 3156-3166.

75. George J, Onodera J, Miyata T. Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2008; Part A, 87(4): 1103-1111.

76. Kinsner A, Lesiak-Cyganowska E, Sladowski D. *In vitro* reconstruction of full thickness human skin on a composite collagen material. *Cell and Tissue Banking*. 2001; 2(3): 165-171.

77. Ahn SH, Yoon H, Kim GH, Kim YYo, Lee SH, Chun W. Designed Three-Dimensional Collagen Scaffolds for Skin Tissue Regeneration. *Tissue Engineering*. 2010; Part C: Methods, 16(5): 813-820.

78. El Ghalbzouri A, Commandeur S, Rietveld MH, Mulder AA, Willemze R. Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. *Biomaterials*. 2009; 30(1): 71-78.

79. Hu K, Shi H, Zhu J, Deng D, Zhou G, Zhang W, Cao Y, Liu W. Compressed collagen gel as the scaffold for skin engineering. *Biomed Microdevices*. 2010; 12(4): 627-635.

80. Helary C, Zarka M, Giraud-Guille MM. Fibroblasts within concentrated collagen hydrogels favour chronic skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012; 6(3): 225-237.

81. Powell HM, Boyce ST. Wound closure with EDC cross-linked cultured

skin substitutes grafted to athymic mice. *Biomaterials*. 2007; 28(6): 1084-1092.

82. Powell HM, Supp DM, Boyce ST. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. *Biomaterials*. 2008; 29(7): 834-843.

83. Kempf M, Miyamura Yu, Liu P-Yu, Chen AC-H, Nakamura H, Shimizu H, Tabata Ya, Kimble RM, McMillan JR. A denatured collagen microfiber scaffold seeded with human fibroblasts and keratinocytes for skin grafting. *Biomaterials*. 2011; 32(21): 4782-4792.

84. Dai N.-T, Williamson MR, Khammo N, Adams EF, Coombes AGA. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. *Biomaterials*. 2004; 25(18): 4263-4271.

85. Dai N.-T, Yeh M.-K, Liu DD, Adams EF, Chiang Ch.-H, Yen Ch.-Ya, Shih Ch.-M, Sytwu H.-K, Chen T.-M, Wang H.-J, Williamson MR, Coombes AGA. A co-cultured skin model based on cell support membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 329(3): 905-908.

86. Dai N.-T, Yeh M.-K, Chiang Ch.-H, Chen K.-Ch, Liu T.-H, Feng A.-Ch, Chao L.-L, Shih Ch.-M, Sytwu H.-K, Chen Sh.-L, Chen T.-M, Adams EF. Human single-donor composite skin substitutes based on collagen and polycaprolactone copolymer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009; 386(1): 21-25.

87. Ng KW, Hutmacher DW, Schantz JT, Ng CS, Too HP, Lim TC, Phan TT, Teoh SH. Evaluation of Ultra-Thin Poly(ϵ -Caprolactone) Films for Tissue-Engineered Skin. *Tissue engineering*. 2001; 7(4): 441-455.

88. Pitt CG, Chasalow FI, Hibionada YM, Kilmas DM, Schindler A. Aliphatic polyesters. 1. The degradation of poly(ϵ -caprolactone) *in vivo*. *J. Appl. Polym. Sci*. 1981; 26(11): 3779-3787.

89. Venugopal J, Ramakrishna S. Biocompatible Nanofiber Matrices for the Engineering of a Dermal Substitute for Skin Regeneration. *Tissue engineering*. 2005; 11(5-6): 847-854.

90. Sharif S, Ai J, Azami M, Verdi J, Atlasi MA, Shirian S,

Samadikuchaksaraei A. Collagen-coated nano-electrospun PCL seeded with human endometrial stem cells for skin tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 May;106(4):1578-1586.

91. Ababzadeh S, Farzin A, Goodarzi A, Karimi R, Sagharjoghi Farahani M, Eslami Farsani M, Gharibzad K, Zahiri M, Ai J. High porous electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin/MgO scaffolds preseeded with endometrial stem cells promote tissue regeneration in full-thickness skin wounds: An *in vivo* study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020 Oct; 108(7): 2961-2970.

92. Ma K, Liao S, He L, Lu J, Ramakrishna S, Chan CK. Effects of nanofiber/stem cell composite on wound healing in acute full-thickness skin wounds. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17(9-10): 1413-1424.

93. Ananta M, Brown RA, Mudera V. A rapid fabricated living dermal equivalent for skin tissue engineering: an *in vivo* evaluation in an acute wound model. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(3-4): 353-361.

94. Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N, Lu W, Geng X, Huang S, Jin Y. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif Organs*. 2008; 32(12): 925-931.

95. Zomer HD, Jeremias TDS, Ratner B, Trentin AG. Mesenchymal stromal cells from dermal and adipose tissues induce macrophage polarization to a pro-repair phenotype and improve skin wound healing. *Cytherapy*. 2020 May; 22(5): 247-260.

96. Keck M, Haluza D, Lumenta D.B, Burjak S, Eisenbock B, Kamolz L.-P, Frey M. Construction of a multi-layer skin substitute: Simultaneous cultivation of keratinocytes and preadipocytes on a dermal template. *Burns*. 2011; 37(4): 626-630.

97. Cui B, Zhang C, Gan B, Liu W, Liang J, Fan Z, Wen Y, Yang Y, Peng X, Zhou Y. Collagen-tussah silk fibroin hybrid scaffolds loaded with bone mesenchymal stem cells promote skin wound repair in rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020 Apr; 109: 110611.

98. Chan RK, Zamora DO, Wrice NL, Baer DG, Renz EM, Christy RJ, Natesan S. Development of a vascularized skin construct using adipose-derived stem cells from debrided burned skin. *Stem Cells Int*. 2012; 2012: Article ID 841203,

11 pages.

99. Itoh M, Umegaki-Arao N, Guo Z, Liu L, Higgins CA, Christiano AM. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PLoS One*. 2013 Oct 11; 8(10): e77673.

100. Pianigiani E, Andreassi A, Taddeucci P, Alessandrini C, Fimiani M, Andreassi L. A new model for studying differentiation and growth of epidermal cultures on hyaluronan-based carrier. *Biomaterials*. 1999; 20(18): 1689-1694.

101. Domard A, Rinaudo M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol*. 1983; 5(1): 49-52.

102. Tomihata K, Ikada Y. *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*. 1997; 18(7): 567-575.

103. Mikhailov GM, Lebedeva MF, Pinaev GP, Iudintseva NM, Blinova MI, Panarin EF. New woven matrix made of resorbed natural chitin polysaccharide for culturing and transplantation of human skin cells. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2006; № 4 (6): 56-61.

104. Hilmi AB, Halim AS, Hassan A, Lim CK, Noorsal K, Zainol I. *In vitro* characterization of a chitosan skin regenerating template as a scaffold for cells cultivation. *Springerplus*. 2013 Dec; 2(1): 79.

105. Revi D, Paul W, Anilkumar TV, Sharma CP. Chitosan scaffold co-cultured with keratinocyte and fibroblast heals full thickness skin wounds in rabbit. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Sep; 102(9): 3273-3281.

106. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, Han C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 2003 Nov; 24(26): 4833-4841

107. Tangsadthakun C, Kanokpanont S, Sanchavanakit N, Banaprasert T, Damrongsakkul S. Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Journal of Metals, Materials and Minerals*. 2006; 16(1): 37-44.

108. Bolshakov IN, Kirichenko AK, Ereemeev AV, Vlasov AA. Application of a collagen-chitosan wound covering with cultured embryonic fibroblasts in the local treatment of deep burns. *Fundamental research*. 2008; №10: 59-60.

109. Ereemeev AV, Svetlakov AV, Bolshakov IN, Vlasov AA, Arapova VA. Function of cultivating embryonic cells on collagen-chitosan matrix. *Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2009; IV(2): 55-62.
110. Mao J, Zhao L, De Yao K, Shang Q, Yang G, Cao Y. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2003; 64A(2): 301-308.
111. Han CM, Zhang LP, Sun JZ, Shi HF, Zhou J, Gao CY. Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2010; 11B(7): 524-530.
112. Shen Y, Dai LB, Li XJ, Liang R, Guan GX, Zhang Z, Cao WJ, Liu ZH, Mei S, Liang WG, Qin SN, Xu JK, Chen HH. Epidermal Stem Cells Cultured on Collagen-Modified Chitin Membrane Induce *In Situ* Tissue Regeneration of Full-Thickness Skin Defects in Mice. *PLoS One*. 2014; 9(2): e87557.
113. Soriano-Ruiz JL, Gálvez-Martín P, López-Ruiz E, Suñer-Carbó J, Calpena-Campmany AC, Marchal JA, Clares-Naveros B. Design and evaluation of mesenchymal stem cells seeded chitosan/glycosaminoglycans quaternary hydrogel scaffolds for wound healing applications. *Int J Pharm*. 2019 Oct 30; 570: 118632.
114. Ikemoto S, Mochizuki M, Yamada M, Takeda A, Uchinuma E, Yamashina S, Nomizu M, Kadoya Y. Laminin peptide-conjugated chitosan membrane: Application for keratinocyte delivery in wounded skin. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Dec 1; 79(3): 716-722.
115. Chen H, Huang J, Yu J, Liu S, Gu P. Electrospun chitosan-graft-poly (ϵ -caprolactone)/poly (ϵ -caprolactone) cationic nanofibrous mats as potential scaffolds for skin tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2011 Jan 1; 48(1): 13-19.
116. Shalumon KT, Anulekha KH, Chennazhi KP, Tamura H, Nair SV, Jayakumar R. Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011; 48(4): 571-576.
117. Price RD, Berry MG, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg*. 2007; 60(10): 1110-1119.

118. Wang TW, Sun JS, Wu HC, Tsuang YH, Wang WH, Lin FH. The effect of gelatin-chondroitin sulfate-hyaluronic acid skin substitute on wound healing in SCID mice. *Biomaterials*. 2006; 27(33): 5689-5697.

119. Liu H, Mao J, Yao K, Yang G, Cui L, Cao Y. A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin *in vitro* and its tissue engineering applications. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*. 2004; 15(1): 25-40.

120. Liu H, Yin Y, Yao K. Construction of Chitosan-Gelatin-Hyaluronic Acid Artificial Skin *In Vitro*. *J. Biomater. Appl*. 2007; 21(4): 413-430.

121. Wang HM, Chou YT, Wen ZH, Wang CZ, Chen CH, Ho ML. Novel biodegradable porous scaffold applied to skin regeneration. *PLoS One*. 2013 Jun 10; 8(6): e56330.

122. Scuderi N, Onesti MG, Bistoni G, Ceccarelli S, Rotolo S, Angeloni A, Marchese C. The clinical application of autologous bioengineered skin based on a hyaluronic acid scaffold. *Biomaterials*. 2008; 29(11): 1620-1629.

123. Enrione J, Osorio F, Lopez D, Weinstein-Oppenheimer C, Fuentes MA, Ceriani R, Brown DI, Albornoz F, Sanchez E, Villalobos P, Somoza RA, Young ME, Acevedo CA. Characterization of a Gelatin/Chitosan/Hyaluronan scaffold-polymer. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2010 September; 13(5).

124. Kondo Sh, Kuroyanag Y. Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge with epidermal growth factor. *Journal of Biomaterials Science*. 2012; 23(5): 629-643.

125. Chandrasekaran AR, Venugopal J, Sundarrajan S, Ramakrishna S. Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration. *Biomed Mater*. 2011 Feb; 6(1): 015001.

126. Blackwood KA, McKean R, Canton I, Freeman CO, Franklin KL, Cole D, Brook I, Farthing P, Rimmer S, Haycock JW, Ryan AJ, MacNeil S. Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement. *Biomaterials*. 2008; 29(21): 3091-3104.

127. Kumbar SG, Nukavarapu SP, James R, Nair LS, Laurencin CT. Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering.

Biomaterials. 2008; 29(30): 4100-4107.

128. Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Fuzina NH, Norhayati MM, Fauziah O, Isa MR, Saim L, Ruszymah BHI. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns*. 2007; 33(3): 355-363.

129. Kim SS, Song CK, Shon SK, Lee KY, Kim CH, Lee MJ, Wang L. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell Tissue Res*. 2009; 336(1): 59-66.

130. Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Xiuju D, Tohyama M, Hanakawa Y, Hirakawa S, Sayama K, Hashimoto K. Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. *J Dermatol Sci*. 2009 Dec; 56(3): 188-195.

131. Sánchez-Sánchez R, Brena-Molina A, Martínez-López V, Melgarejo-Ramírez Y, Tamay de Dios L, Gómez-García R, Reyes-Frías Mde L, Rodríguez-Rodríguez L, Garciadiego-Cázares D, Lugo-Martínez H, Ibarra C, Martínez-Pardo ME, Velasquillo-Martínez C. Generation of Two Biological Wound Dressings as a Potential Delivery System of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ASAIO J*. 2015 Nov-Dec; 61(6): 718-725.

132. Liu F, Zhou H, Du W, Huang X, Zheng X, Zhang C, Hu H, Wang J, Quan R. Hair follicle stem cells combined with human allogeneic acellular amniotic membrane for repair of full thickness skin defects in nude mice. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020 May; 14(5): 723-735.

133. Castagnoli C, Fumagalli M, Alotto D, Cambieri I, Casarin S, Ostorero A, Casimiri R, Germano P, Pezzuto C, Stella M. Preparation and Characterization of a Novel Skin Substitute. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 840363.

134. Yeum CE, Park EY, Lee SB, Chun HJ, Chae GT. Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Apr; 7(4): 279-291.

135. Kiiskinen J, Merivaara A, Hakkarainen T, Kääriäinen M, Miettinen S, Yliperttula M, Koivuniemi R. Nanofibrillar cellulose wound dressing supports the

growth and characteristics of human mesenchymal stem/stromal cells without cell adhesion coatings. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Sep 23; 10(1): 292.

136. Chen S, Shi J, Zhang M, Chen Y, Wang X, Zhang L, Tian Z, Yan Y, Li Q, Zhong W, Xing M, Zhang L, Zhang L. Mesenchymal stem cell-laden anti-inflammatory hydrogel enhances diabetic wound healing. *Sci Rep.* 2015 Dec 8; 5: 18104.

137. Rode MP, Batti Angulski AB, Gomes FA, da Silva MM, Jeremias TDS, de Carvalho RG, Iucif Vieira DG, Oliveira LFC, Fernandes Maia L, Trentin AG, Hayashi L, de Miranda KR, de Aguiar AK, Rosa RD, Calloni GW. Carrageenan hydrogel as a scaffold for skin-derived multipotent stromal cells delivery. *J Biomater Appl.* 2018 Sep; 33(3): 422-434.

138. Gao YM. Adipose-derived stem cells embedded in platelet-rich plasma scaffolds improve the texture of skin grafts in a rat full-thickness wound model *Burns.* 2020 Mar; 46(2): 377-385.

139. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A, Poz A, Baccarani U, Damiani D, Fanin R, Mariuzzi L, Finato N, Masolini P, Burelli S, Belluzzi O, Schneider C, Beltrami CA. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood.* 2007 Nov 1; 110(9): 3438-3446.

140. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol.* 2008; 36(5): 642–654.

141. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev Rep.* 2009 Dec; 5(4): 378-386.

142. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 2006; 119(Pt 11):

2204–2213.

143. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007 Mar; 327(3): 449-462.

144. Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature.* 2009; 460: 60–65.

145. Klimczak A, Kozłowska U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 4285215.

146. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): 315-317.

147. Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, Isik F. Contribution of bone marrow derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 2004; 22(5): 812–822.

148. Han SK, Yoon TH, Lee DG, Lee MA, Kim WK. Potential of human bone marrow stromal cells to accelerate wound healing *in vitro*. *Ann Plast Surg* 2005; 55(4): 414-419.

149. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells.* 2008 Jan; 26(1): 99-107

150. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One.* 2008; 3(4): e1886.

151. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation.* 2004; 109(12): 1543–1549.

152. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011 May 19; 473(7347): 298-307

153. Akino K, Mineda T, Akita S. Early cellular changes of human mesenchymal stem cells and their interaction with other cells. *Wound Repair Regen* 2005; 13(4): 434–440.

154. Basiouny HS, Salama NM, El Maadawi ZM, Farag EA. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on healing of induced full-thickness skin wounds in albino rat. *Int. J. Stem Cells*. 2013; 6(1): 12–25.

155. Kim JW, Lee JH, Lyoo YS, Jung DI, Park HM. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet Dermatol*. 2013 Apr; 24(2): 242-e53.

156. Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. The effect of bone-marrow-derived stem cells and adipose-derived stem cells on wound contraction and epithelization. *Adv. Wound Care*. 2014; 3(6): 405–413.

157. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007; 25(10): 2648–2659.

158. Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*. 2009 Jul-Aug; 17(4): 540-547.

159. Huang S, Wu Y, Gao D, Fu X. Paracrine action of mesenchymal stromal cells delivered by microspheres contributes to cutaneous wound healing and prevents scar formation in mice. *Cytotherapy*. 2015; 17(7): 922–931.

160. Wu Y, Peng Y, Gao D, Feng C, Yuan X, Li H, Wang Y, Yang L, Huang S, Fu X. Mesenchymal stem cells suppress fibroblast proliferation and reduce skin fibrosis through a TGF- β 3-dependent activation. *Int. J. Low Extrem. Wounds*. 2015; 14(1): 50–62.

161. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, Matthay MA. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells*. 2010; 28(12): 2229–2238.

162. Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, Liles WC, Stewart DJ. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182(8): 1047–1057.

163. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. 2004. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004 Jul 1; 94(1): 92-95.

164. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol.* 2000 Jun; 28(6): 707-715.

165. Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, Isik F. Contribution of bone marrow–derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells.* 2004; 22(5): 812-822.

166. Deng W, Han Q, Liao L, Li C, Ge W, Zhao Z, You S, Deng H, Murad F, Zhao RC. Engrafted bone marrow-derived β k-(1+) mesenchymal stem cells regenerate skin tissue. *Tissue Eng.* 2005; 11(1–2): 110-119.

167. Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, Magae J, Ochiai A. *In vivo* characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells.* 2005; 23(5): 699-706.

168. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 2009; 4(3): 206-216.

169. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 2006; 24(4): 1030-1041.

170. Ichioka S, Kouraba S, Sekiya N, Ohura N, Nakatsuka T. Bone marrow-impregnated collagen matrix for wound healing: experimental evaluation in a microcirculatory model of angiogenesis, and clinical experience. *Br J Plast Surg.* 2005; 58(8): 1124-1130.

171. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, Shroyer D, Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.* 2007; 13(6): 1299-1312.

172. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol* 2003; 139(4): 510-516.

173. Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, Sen Y, Kawanishi K, Inada Y, Takakura Y, Okuchi K, Nonomura A. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg.* 2008 Mar; 121(3): 860-877.

174. Arno AI, Amini-Nik S, Blit PH, Al-Shehab M, Belo C, Herer E, Tien CH, Jeschke MG. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Res. Ther.* 2014; 5(1): 28.

175. Shohara R, Yamamoto A, Takikawa S, Iwase A, Hibi H, Kikkawa F, Ueda M. Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. *Cytotherapy.* 2012; 14(10): 1171-1181.

176. Tamari M, Nishino Y, Yamamoto N, Ueda M. Acceleration of wound healing with stem cell-derived growth factors. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2013; 28(6): e369-e375.

177. Peng Y, Xuan M, Zou J, Liu H, Zhuo Z, Wan Y, Cheng B. Freeze-dried rat bone marrow mesenchymal stem cell paracrine factors: a simplified novel material for skin wound therapy. *Tissue Eng. Part A.* 2015b; 21(5-6): 1036-1046.

178. Tutuianu R, Rosca AM, Albu Kaya MG, Pruna V, Neagu TP, Lascar I, Simionescu M, Titorencu I. Mesenchymal stromal cell-derived factors promote the colonization of collagen 3D scaffolds with human skin cells. *J Cell Mol Med.* 2020 Sep; 24(17): 9692-9704.

179. Ляпунов МО, Воловик НВ, Безугла ОП, Зинченко ОА, Лібіна ВВ, Орлова ІМ. Вплив деяких розчинників та карбомерів на властивості гелів. *Фармаком.* 2003; №3: 55-61

180. Hackley VA, Ferraris CF. Guide to Rheological Nomenclature:

Measurements in Ceramic Particulate Systems // NIST Special Publication 946, National Institute of Standards and Technology (NIST). – Washington DC, 2001. – 35 p.

181. Половко НП, Башура ОГ. Дослідження властивостей поліетиленоксидних гелів карбомерів. Український журнал клінічної та лабораторної медицини. 2010; 5(1): 46-48.

182. Сіра НГ, Солдатов ДП, Чуєшов ВІ. Дослідження реологічних властивостей гелей, утворених карбомером і натрію альгінатом. Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи: матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 вересня. 2016 р.; 1: 413-414.

183. Сапожкова МБ, Калмыкова ТП, Суслина СН. Разработка технологии получения противоварикозного геля. Химико-фармацевтический журнал. 2012; 46(5): 35-38.

184. Пуляев ДС, Ковалевська ІВ, Чуєшов ВІ. Обґрунтування концентрації карбомера у складі гелю "Альгозан". Вісник фармації. 2010; №2: 22-25.

185. Лукаш ЛЛ, Яцишина АП, Кушнирук ВО, Пидпала ОВ. Репрограммирование соматических клеток взрослого человека *in vitro*. Збірник наукових праць Міжнародної наукової конференції "Фактори експериментальної еволюції організмів". К.: Логос, 2011; 11: 493-498.

186. Shablii VA, Kuchma MD, Kyryk VM, Onishchenko AN, Lukash LL, Lobitseva GS. Cryopreservation human placental tissue as source of hematopoietic and mesenchymal stem cells. Cell Transplantation and Tissue Engineering. 2012; VII(1): 54-62.

187. Shablii VA, Kuchma MD, Kyryk VM, Onishchenko AN, Areshkov PO, Skrypnyk N, Lukash LL, Lobyntseva GS. Characteristics of placental multipotent mesenchymal stromal stem cells. Cell Transplantation and Tissue Engineering. 2012; VII(4): 55-61.

188. Shablii VA, Kuchma MD, Kyryk VM, Svitina HM, Shablii YM, Lukash LL, Lobintseva GS. Mesenchymal and trophoblast immunophenotype of multipotent stromal cells from human placenta. Biopolymers and Cell. 2014; 30(2): 118-121.

189. Kosenko OO, Lukash LL, Samchenko YM, Ruban TA, Ulberg ZR, Lukash SI. Copolymeric hydrogel membranes for immobilization and cultivation of human stem cells. *Biopolymers and Cell*. 2006; 22(2): 143-148.

190. Kosenko OO, Lukash LL, Samchenko YM, Ruban TA, Lukash SI, Ulberg ZR, Galagan NP. Artificial skin equivalent based on copolymeric hydrogel membranes with immobilized human mesenchymal stem cells. *Biopolymers and Cell*. 2006; 22(6): 446-451.

191. Полімерний гідрогель біомедичного призначення. Патент України на корисну модель №20134, опубліковано 15.01.2007, бюл. №1. Самченко Ю. М, Лукаш Л. Л, Косенко О. О, Ульберг З. Р, Рубан Т. О, Козинець Г. П.

192. Біосумісний гідрогель біомедичного призначення та спосіб його одержання. Патент України на винахід №82583, опубліковано 25.04.2008, бюл. №8. Самченко Ю. М, Лукаш Л. Л, Косенко О. О, Ульберг З. Р, Рубан Т. А, Козинець Г. П.

193. Akopyan HR, Huleyuk NL, Kushniruk VO, Mykytenko DO, Iatsyshyna AP, Lukash LL. Comparative analysis of the karyotype of new human cell line 4BL at long-term cultivation: Ploidy of the chromosomal set. *Cytology and genetics*. 2013 Sep 1; 47(5). 305-317.

194. Harrison M, Rae I. *General Techniques of Cell Culture* / Cambridge University Press, 1997 – 162 P.

195. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983 Dec 16; 65(1-2): 55-63.

196. Bradford MM. *Analyt Biochem* 1976; 72: 248-254

197. Crowther JR. *The ELISA Guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2001, pp. 436.

198. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. – Washigton DC: National Academy Press, 1996.

199. Ning CC, Logsetty S, Ghughare S, Liu S. Effect of hydrogel grafting, water and surfactant wetting on the adherence of PET wound dressings. *Burns*. 2014

Sep; 40(6): 1164-71.

200. Asghari S, Logsetty S, Liu S. Imparting commercial antimicrobial dressings with low-adherence to burn wounds. *Burns*. 2016 Jun; 42(4): 877-883.

201. Han L, Lu X, Liu KZ, Wang KF, Fang LM, Weng LT, Zhang HP, Tang YH, Ren FZ, Zhao CC, Sun GX, Liang R, Li ZJ. Mussel-Inspired Adhesive and Tough Hydrogel Based on Nanoclay Confined Dopamine Polymerization. *ACS Nano*. 2017 Mar 28; 11(3): 2561-2574.

202. Chen T, Chen YJ, Rehman HU, Chen Z, Yang Z, Wang M, Li H, Liu HZ. Ultratough, Self-Healing, and Tissue-Adhesive Hydrogel for Wound Dressing. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Oct 3; 10(39): 33523-33531.

203. Wu Z, Hong YL. Combination of the Silver-Ethylene Interaction and 3D Printing To Develop Antibacterial Superporous Hydrogels for Wound Management. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Sep 18; 11(37): 33734-33747.

204. Peng YL, Wang ZF, Zhou Y, Wang FY, Zhang SN, He DG, Deng L. Ferrocene-functionalized hybrid hydrogel dressing with high-adhesion for combating biofilm. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Jun; 125: 112111.

205. Yang ZF, Huang RK, Zheng BN, Guo WT, Li CK, He WY, Wei YQ, Du Y, Wang HM, Wu DC, Wang H. Highly Stretchable, Adhesive, Biocompatible, and Antibacterial Hydrogel Dressings for Wound Healing. *Adv Sci (Weinh)*. 2021 Mar 5; 8(8): 2003627.

206. Jiang F, Chi Z, Ding YY, Quan ML, Tian Y, Shi J, Song FL, Liu CG. Wound Dressing Hydrogel of *Enteromorpha prolifera* Polysaccharide-Polyacrylamide Composite: A Facile Transformation of Marine Blooming into Biomedical Material. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2021 Mar 31; 13(12): 14530-14542.

207. Глущенко НН, Богословская ОА, Ольховская ИП. Физико-химические закономерности биологического действия высокодисперсных порошков металлов. *Химическая физика*. 2002; 21(4): 79-85.

208. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PK. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*.

2007 Jan; 2(1): 129-136.

209. Greulich C, Kittler S, Epple M, Muhr G, Köller M. Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs). *Langenbecks Arch Surg.* 2009 May; 394(3): 495-502.

210. Hackenberg S, Scherzed A, Kessler M, Hummel S, Technau A, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Hagen R, Kleinsasser N. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett.* 2011 Feb 25; 201(1): 27-33

211. Walker M, Will I, Pratt A, Chechik V, Genever P, Ungar D. Magnetically triggered release of entrapped bioactive proteins from thermally responsive polymer-coated iron oxide nanoparticles for stem cell proliferation. *ACS Appl Nano Mater.* 2020 Jun 26; 3(6): 5008-5013.

212. Tran N, Mir A, Mallik D, Sinha A, Nayar S, Webster TJ. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine.* 2010 Apr 15; 5: 277-183.

213. Cheng FY, Su CH, Yang YS, Yeh CS, Tsai CY, Wu CL, Wu MT, Shieh DB. Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials.* 2005; 26(7): 729-738.

214. Brunner T, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass R, Limbach L, Bruinink A, Stark W.J. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40(14): 4374-4381.

215. Kukharenko O, Bardeau J-F, Zaets I, Ovcharenko L, Tarasyuk O, Porhyn S, Mischenko I, Vovk A, Rogalsky S, Kozyrovska N. Promising low cost antimicrobial composite material based on bacterial cellulose and polyhexamethylene guanidine hydrochloride. *European Polymer Journal.* 2014 November; 60: 247-254.

216. Pianigiani E, Andreassi A, Taddeucci P, Alessandrini C, Fimiani M, Andreassi L. A new model for studying differentiation and growth of epidermal cultures on hyaluronan-based carrier. *Biomaterials.* 1999; 20: 1689-1694.

217. Roseeuw DI, de Coninck AL, Vanpée ES, Delaey BM, Verbeken GL, Draye JP. Healing of full-thickness wounds treated with lyophilized cultured

keratinocyte cell lysate in genetically diabetic mice. *Wound Repair Regen.* Oct-Dec 1995; 3(4): 500-505.

218. Akbari A, Li Y, Kilani RT, Ghahary A. Red blood cell lysate modulates the expression of extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2012 Nov; 370(1-2): 79-88.

219. Hur W, Lee HY, Min HS, Wufuer M, Lee CW, Hur JA, Kim SH, Kim BK, Choi TH. Regeneration of full-thickness skin defects by differentiated adipose-derived stem cells into fibroblast-like cells by fibroblast-conditioned medium. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Apr 20; 8(1): 92.

220. Maarof M, Lokanathan Y, Ruszymah HI, Saim A, Chowdhury SR. Proteomic Analysis of Human Dermal Fibroblast Conditioned Medium (DFCM). *Protein J.* 2018 Dec; 37(6): 589-607.

221. Maarof M, Fauzi MB, Lokanathan Y, Idrus RBH, Rajab NF, Chowdhury SR. Safety and efficacy of dermal fibroblast conditioned medium (DFCM) fortified collagen hydrogel as acellular 3D skin patch. *Drug Deliv Transl Res.* 2019 Feb; 9(1): 144-161.

222. Maarof M, Nadzir MM, Mun LS, Fauzi MB, Chowdhury SR, Idrus RBH, Lokanathan Y. Hybrid Collagen Hydrogel/Chondroitin-4-Sulphate Fortified with Dermal Fibroblast Conditioned Medium for Skin Therapeutic Application. *Polymers (Basel).* 2021 Feb 8; 13(4): 508.

223. Walter MNM, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WEB. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res.* 2010 Apr 15; 316(7): 1271-81.

224. Kaita Y, Tarui T, Yoshino H, Matsuda T, Yamaguchi Y, Nakagawa T, Asahi M, Ii M. Sufficient therapeutic effect of cryopreserved frozen adipose-derived regenerative cells on burn wounds. *Regen Ther.* 2019 Feb 1; 10: 92-103.

225. Yang JY, Chen ZY, Pan DY, Li HZ, Shen J. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Combined Pluronic F127 Hydrogel Promote Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration. *Int J*

Nanomedicine. 2020 Aug 11; 15: 5911-5926.

226. Kim MH, Wu WH, Choi JH, Kim JH, Hong S-H, Jun JH, Ko Y, Lee JH. Conditioned medium from the three-dimensional culture of human umbilical cord perivascular cells accelerate the migration and proliferation of human keratinocyte and fibroblast. *J Biomater Sci Polym Ed.* May-Jun 2018; 29(7-9): 1066-1080.

227. Li MR, Luan FX, Zhao YL, Hao HJ, Liu JJ, Dong L, Fu XB, Han WD. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars. *Int Wound J.* 2017 Feb; 14(1): 64-73.

228. Zhang B, Wu XD, Zhang X, Sun YX, Yan YM, Shi H, Zhu YH, Wu LJ, Pan ZJ, Zhu W, Qian H, Xu WR. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ β -catenin pathway. *Stem Cells Transl Med.* 2015 May; 4(5): 513-522.

229. Komaki M, Numata Yu, Morioka Ch, Honda I, Tooi M, Yokoyama N, Ayame H, Iwasaki K, Taki A, Oshima N, Morita I. Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Oct 3; 8(1): 219.

230. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 25; 18(9): 1852.

231. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol.* 2018 Dec 4; 9: 2837.

ДОДАТОК А.
ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

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.

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.

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. – P. 83-96.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.Danyilevsky. 28-29 May 2013 // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29 (Special Issue). – P. 18.

12. Vasylieva 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.