

БИОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК МАТРИЦА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ЭКСПРЕСС-ПРОДУКТОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОЖИ

Н.В. Калмыкова¹, О.Г. Спичкина¹, В.Н. Эллиниди¹, Р.Р. Рахматуллин², С.И. Моисеев¹

¹Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

²Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

Hyaluronan-based bioplastic material as a scaffold for biomedical cell-based express-product for skin regeneration

N.V. Kalmykova¹, O.G. Spichkina¹, V.N. Ellinidi¹, R.R. Rakhmatullin², S.I. Moiseev¹

¹A.M. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, Saint-Petersburg, Russia

²Orenburg State University, Orenburg, Russia

Представлены результаты исследования возможностей совмещения фибробластов и кератиноцитов кожи человека на биопластическом материале «G-DERM». Определена жизнеспособность и пролиферативная активность клеток кожи на матрице, а также секреция клетками кожи интерлейкина-6 и фактора роста кератиноцитов на разных сроках культивирования. Было показано, что «G-DERM» не является токсичным для клеток кожи обоих типов, обеспечивает их адгезию и распластывание. Гистологический анализ продемонстрировал, что свойства и пористая структура матрицы обеспечивают распределение клеток в соответствии с клеточным типом. Фибробласты в составе матрицы, находясь в состоянии покоя, сохраняют свою синтетическую активность, секретируя характерные для них биологически активные факторы — регуляторы раневого заживления. Результаты выполненной работы позволяют рассматривать материал «G-DERM» как трехмерный клеточный носитель для целей регенеративной медицины.

Ключевые слова: биопластический материал, кератиноциты, фибробласты, кожа, цитокины, тканевая инженерия.

Введение

Кожа является наибольшим по площади поверхности органом человека, ее обширные повреждения приводят к драматическим последствиям и требуют незамедлительного закрытия и восстановления нормальной структуры и функций. Наилучшие результаты достигаются при использовании аутогенной или донорской кожи, однако основной проблемой является ее нехватка или недоступность. В качестве альтернативы рассматривают тканеинженерные продукты, содержащие различные клетки кожи.

Тканевая инженерия как часть регенеративной медицины начала свое успешное распространение именно с создания тканевых аналогов кожи — эпидермального эквивалента «Epicell» (Genzyme Biosurgery, США) и полного эквивалента кожи «Apligraf» (Organogenesis Inc., США). В настоящее время существует большое разнообразие продуктов, являющихся кожными эквивалентами; оно основано на использовании различных типов клеток, разнообразных матриц и их сочетаний [1, 2].

Первые кожные тканеинженерные продукты создавали, стараясь в основных чертах воспроизвести строение кожи, поэтому процесс «созревания» такого продукта с формированием стратифицированного эпидермиса был длительным, трудоемким и затратным. В настоящее время специалисты сходятся во

This study is designed to investigate the behavior of human fibroblasts and keratinocytes on hyaluronan-based bioplastic material «G-DERM». Cell viability, proliferation, interleukin-6 and keratinocytes growth factor secretion were investigated. The results suggested that «G-DERM» was not toxic and supported cell adhesion and spreading. Histological analysis showed that «G-DERM» properties and porous structure provided distribution of skin cells by cell-type manner. Fibroblasts on «G-DERM», being quiescent, kept their synthetic activity and produced tissue-specific factors of wound healing. According to study results «G-DERM» can be used as 3D cell matrix for regenerative medicine.

Key words: bioplastic material, keratinocyte, fibroblast, skin, cytokines, tissue engineered.

мнении, что основное действие, которое продукты с использованием клеток оказывают на раны, заключается в стимуляции репаративных процессов за счет секреции различных факторов (цитокинов, матриксных белков и протеаз). Поэтому затраты на создание сложных тканеинженерных продуктов не всегда оправданы и на рынке появились такие экспресс-продукты, как спреи на основе клеток кожи (линейка продуктов «CellSpray» (Avita Medical, Австралия)) или суспензии клеток в фибриновом клее (продукт «BioSeed-S» (BioTissue Technologies, Германия)). Однако, будучи нанесенными на рану, клетки сами нуждаются в условиях, обеспечивающих их жизнеспособность и функционирование, а именно: влажная среда и механическая защита. Это требует специфического послеоперационного ведения раны (использование неадгезивных повязок, создание влажной камеры, исключение механического травмирования) и является очередным лимитирующим фактором широкого распространения данных технологий. В этой связи нам представляется оптимальной технология использования в качестве носителей для клеток кожи биопластических материалов. Биопластические материалы — это новая группа раневых покрытий, которые разрабатываются на основе макромолекулярных полимеров с учётом следующих критериев: морфологическое сходство

e-mail: kalnv@arcerm.spb.ru

с эквивалентными тканями организма; заданный период биodeградации естественными метаболическими путями; способность поддерживать ключевые физико-химические параметры газообмена и гидробаланса, а также обеспечивать оптимальные условия для адгезии, миграции и пролиферации трансплантируемых клеток.

Целью настоящего исследования было тестирование биопластического материала «G-DERM» (ДЖИ-Групп, Россия) для последующего создания биомедицинского клеточного продукта. Материал «G-DERM» представляет собой биополимер на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты и адгезивного пептидного комплекса (Arg-Gly-Asp) [3]. Материал «G-DERM» соответствует большинству требований, предъявляемых к раневым покрытиям: нетоксичен, проницаем для влаги и газов, механически прочен и эластичен, при этом обладает заданным периодом биodeградации и выраженной адгезией к подлежащим тканям [4, 5]. Данные характеристики делают «G-DERM» подходящим кандидатом для использования в качестве основы при создании клеточного экспресс-продукта для восстановления кожных покровов.

Материал и методы

Выделение и культивирование клеток кожи человека. Клетки были получены из биоптатов кожи здоровых доноров, полученных в ходе проведения пластических операций. Фибробласты выделяли путем ферментативной обработки кожи с использованием 0,1% раствора коллагеназы (Панэко, Россия) с последующим стандартным культивированием в среде DMEM с 10% сыворотки эмбрионов (плодов) коров (Hyclone, США), содержащей смесь пенициллина/стрептомицина (100 мкг/мл) (Hyclone, США). Пасировали клетки с использованием 0,25% раствора трипсина в 0,02% ЭДТА (Hyclone, США). В эксперименте использовали фибробласты взрослых доноров на 4–6 пассажах культивирования.

Кератиноциты человека были выделены ферментативным методом с использованием смеси ферментов 0,5% диспазы (Gibco, США) и 0,05% коллагеназы (Панэко, Россия). После разделения эпидермиса и дермы по линии базальной мембраны, эпидермис обрабатывали 0,25% раствором трипсина и 0,02% ЭДТА (Hyclone, США) до получения суспензии клеток. Клетки высевали на предварительно сформированный фидерный слой фибробластов. Для формирования фидерного слоя фибробласты за сутки до посева кератиноцитов высевали на чашки Петри с плотностью 10 тыс./см². Так как конечной целью исследования было сформировать на матрице слой синтетически и пролиферативно активных клеток обоих типов, то фибробласты перед посевом не облучали и не обрабатывали митомицином С. Кератиноциты культивировали в специализированной бессывороточной среде с ростовыми добавками для кератиноцитов «Defined keratinocytes-SFM» (Invitrogen, Великобритания).

Формирование трехмерных эквивалентов кожи. Для формирования трехмерных эквивалентов кожи в качестве носителя использовали «G-DERM» (далее по тексту – матрица) или фибриновый гель, заселенные фибробластами. Фибриновый гель готовили из плазмы крови человека при добавлении тромбина 5 МЕ/мл (Ренам, Россия). Фибробласты вноси-

ли в гель/на матрицу в концентрации 100 тыс./мл. На следующие сутки на поверхность эквивалентов высевали клетки первичной культуры кератиноцитов в концентрации 1×10⁶/мл.

Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток кожи. Жизнеспособность и пролиферативную активность клеток кожи оценивали колориметрическим методом с использованием МТТ (-3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид) (Sigma, США). Для определения жизнеспособности фибробластов клетки высевали на чашки Петри в концентрации 20 тыс./см², кератиноциты первичной культуры высевали в концентрации 250 тыс./см² на предварительно сформированный фидерный слой фибробластов. Через определенные промежутки времени в среду культивирования добавляли раствор ММТ (0,5 мг/мл). Жизнеспособность оценивали визуально по формированию в цитоплазме клеток различных окрашенных кристаллов формазана.

Для определения пролиферативной активности культуры фибробластов инкубировали с МТТ в течение 4 ч при 37°C в СО₂-инкубаторе. Клетки промывали PBS и добавляли DMSO (Sigma, США). После полного растворения формазана (30 мин) производили измерение оптической плотности раствора при длине волны 540 нм.

Гистологические и иммуногистохимические исследования. Гистологические и иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах. Образцы эквивалентов кожи фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили стандартную проводку в изопропаноловом спирте с последующей заливкой в парафин. Для гистологического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование проводили полимерным методом с использованием набора полимера Novolink Min Polymer Detection System (Leica Biosystems, Германия). Наличие в клетках виментина – маркера клеток соединительнотканного происхождения – и панцитокератина – маркера эпителиальных клеток – определяли с применением мышиных антител к виментину (Primary antibody Vimentin, Clone SRL 33, Leica Biosystems, Германия) и панцитокератину (Primary antibody Multi-Cytokeratin, Clone AE1/AE3, Leica Biosystems, Германия). Результат реакции проявляли хромогеном диаминобензидином (DAB из набора Novolink Min Polymer Detection System), препараты докрашивали гематоксилином и заключали под покровное стекло. Исследование препаратов проводили при помощи прямого микроскопа Leica DM.

Определение цитокинов в среде культивирования. Секрецию ростовых факторов и цитокинов в среде культивирования оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкции производителей наборов. В работе использовали наборы для определения фактора роста кератиноцитов (ФПК) (Human KGF Quantikine ELISA Kit (R@D, США), набор для определения интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-10 (ИЛ-10) (Цитокин, Россия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 10.0 с использованием параметрических критериев. Результаты представлены в виде значений средних арифметических и стандартных отклонений.

Результаты

Оценка жизнеспособности клеток кожи на матрице. «G-DERM» представляет собой тонкую хрупкую пергаментнообразную пленку, стерильную, хорошо смачиваемую жидкостями. После контакта с водой она становится эластичной. Структура матрицы (пористая, волокнистая) и свойства делают ее непрозрачной, что усложняет визуализацию адгезировавшихся клеток без их предварительной окраски. В качестве красителя был выбран МТТ, который позволяет одновременно оценивать жизнеспособность клеток и окрашивать клетки без фонового прокрашивания самой матрицы. «G-DERM» имеет две разные поверхности: гладкую, обращенную к внешней среде, и шероховатую, обращенную к ране. Клетки высевали на шероховатую поверхность. В качестве контроля использовали культивирование клеток кожи на пластике (Nunc, Дания). Наблюдения показали, что фибробласты, прикрепившиеся к поверхности матрицы, распластываются с характерной для данного типа клеток морфологией и остаются живыми на всем сроке испытания (до 7 сут.) (рис. 1).

Кератиноциты начинают свой рост из агрегатов и растут в виде колоний. В контрольном варианте на фидере из фибробластов колонии легко различимы по округлой морфологии эпителиальных клеток, формирующих «булыжную мостовую» (рис. 2А). В то же самое время кератиноциты на матрице остаются, по-видимому, в виде суспензии и гибнут, что определяется отсутствием эпителиальных клеток, окрашенных МТТ (рис. 2Б). При этом фибробласты фидерного слоя к 5 сут. культивирования на матрице остаются живыми и сохраняют характерную для них веретеновидную морфологию. Окраска МТТ не позволяет четко различить два типа клеток кожи: кератиноциты и фибробласты, — т. к. сам МТТ реагент приводит к постепенному изменению морфологии клеток (округлению). Чтобы сделать окончательный вывод о поведении клеток кожи на «G-DERM», провели гистологические и иммуногистохимические исследования.

Оценка пролиферативной активности фибробластов. Как видно на графике оптической плотности (рис. 3), фибробласты в контроле активно пролиферируют, демонстрируя достоверный прирост клеток

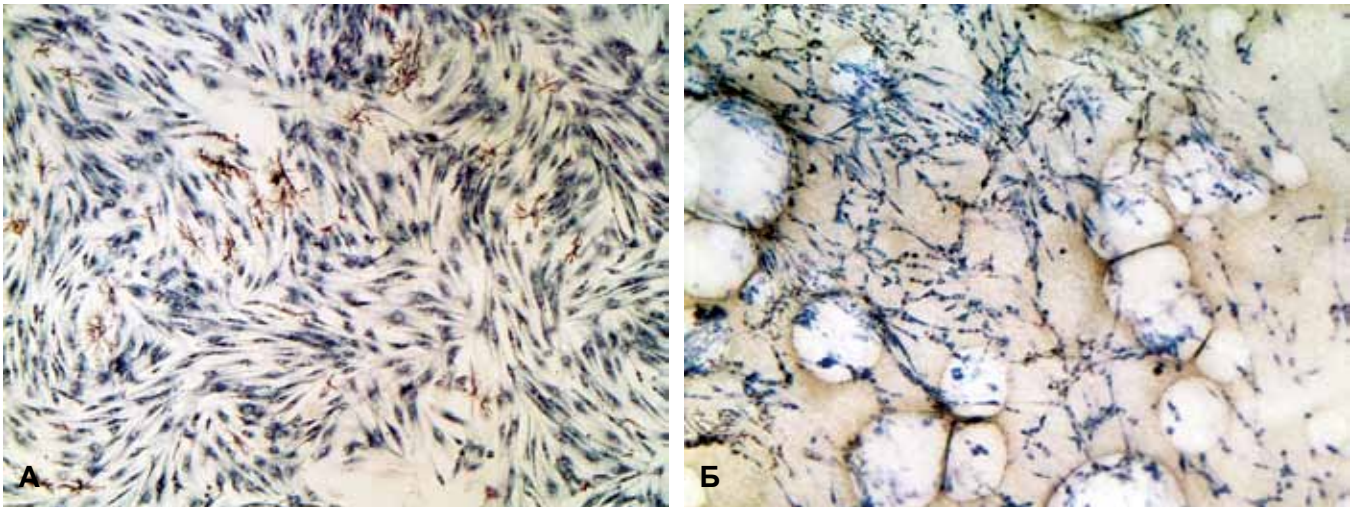


Рис. 1. Фибробласты кожи человека на пластике (А) и на матрице «G-DERM» (Б), 3 сут. культивирования. Окраска: МТТ. Ув. $\times 25$

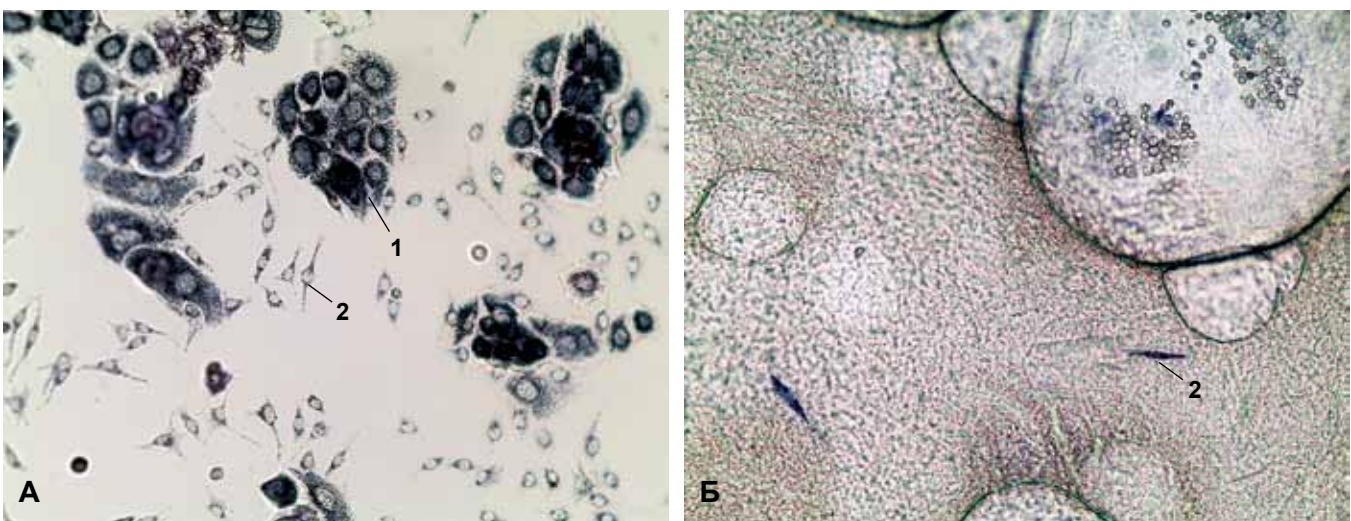


Рис. 2. Кератиноциты человека на фидере из фибробластов: А — контроль; Б — «G-DERM», 5 сут. 1 — кератиноциты, 2 — фибробласты. Окраска: МТТ. Ув. $\times 125$

каждые двое суток, при этом значения оптической плотности раствора, отражающие количество клеток на матрице, за 7 сут. культивирования не изменились. На основании этих данных можно сделать вывод, что «G-DERM» не способствует активному размножению фибробластов кожи.

Гистологические и иммуногистохимические исследования. Биопластический материал «G-DERM» имеет толщину 350 мкм и пористую структуру и может рассматриваться как матрица для трехмерного культивирования. В качестве контроля поведения клеток в трехмерной матрице использовали фибриновый гель. Как видно на гистологическом препарате (рис. 4А), фибриновый гель с клетками кожи представляет собой классический пример полного эквивалента кожи, так как в основных чертах воспроизводит ее гистологическое строение. Полный эквивалент состоит из двух слоев – дермального, сформиро-

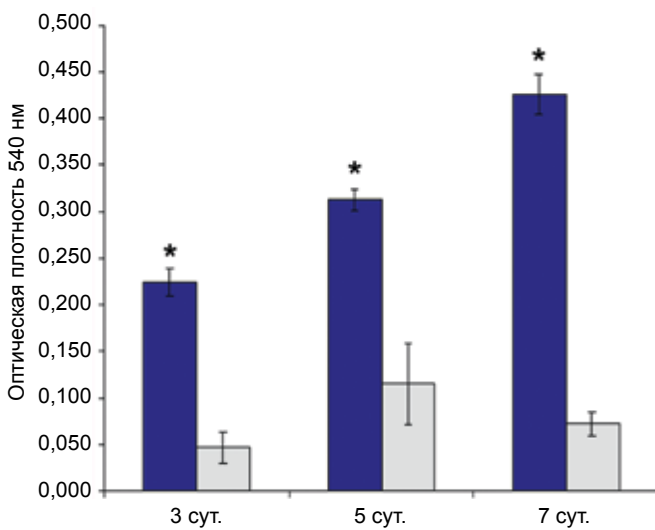


Рис. 3. Проллиферативная активность нормальных фибробластов кожи человека на культуральном пластике (синим) и материале «G-DERM».
* – различия между группами статистически значимы, $p \leq 0,01$

ванного из геля и фибробластов, и эпидермального слоя, сформированного в результате дифференцировки и стратификации эпидермальных клеток. В эпидермальном слое видны многочисленные клетки с пикнотическими ядрами и гипертрофированные клетки с разрушенными ядрами, что отражает нормальную картину клеток, проходящих терминальную дифференцировку (рис. 4Б). При этом на границе с гелем видны растущие кератиноциты с четко очерченными ядрами, формирующие колонию. На этом же самом сроке (7 сут.) гистологическая картина клеток кожи на матрице «G-DERM» сильно отличается (рис. 5А). При сохранении дермального слоя, в данном варианте отсутствует многослойный пласт кератиноцитов. Эпидермальный слой представлен отдельными мелкими агрегатами, среди которых можно наблюдать только клетки с пикнотическими или разрушенными ядрами (рис. 5Б). Эти агрегаты могут быть как результатом клеточной дифференцировки, так и результатом гибели клеток после посева. Для того, чтобы подтвердить распределение клеток в образцах, было произведено иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к виментину и панцитокератину.

Распределение маркеров соответствует характеру расположения клеточных типов в трехмерных образцах: виментин преимущественно выявляется в клетках, распределенных по всей толщине образцов – фибробластах (рис. 6А и 7А), панцитокератин – в клеточных агрегатах и многослойных пластах на поверхности образцов – кератиноцитах (рис. 6Б и 7Б). При этом в препаратах «G-DERM» при окраске антителами на кератин, кроме агрегатов, выявляются участки, содержащие по несколько клеток, распластавшихся на поверхности матрицы (рис. 7Б). Очевидно, что это базальные кератиноциты, прикрепившиеся и распластавшиеся на поверхности матрицы, но не сформировавшие полного монослоя. Эти исследования показали, что клетки кожи, будучи посеянными на «G-DERM», распределяются характерным для их клеточного типа способом: фибробласты проникают в толщу матрицы, кератиноциты распластываются на ее поверхности.

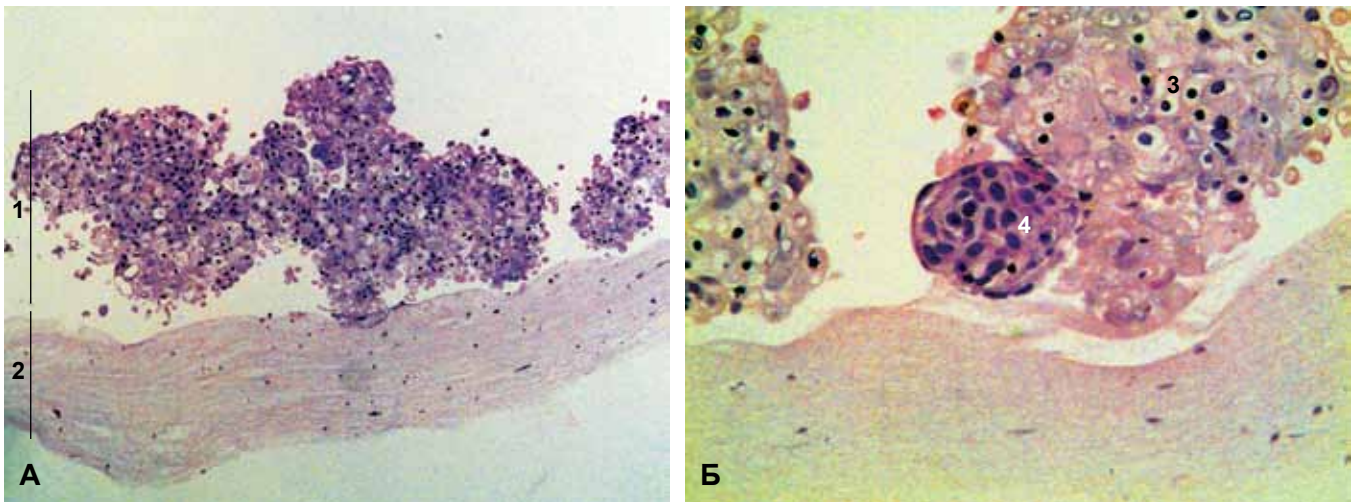


Рис. 4. Клетки кожи в составе трехмерного эквивалента на основе, фибринового геля, 7 сут.:
1 – эпидермальный слой; 2 – дермальный слой; 3 – пикноз ядер; 4 – агрегат кератиноцитов.
Окраска: гематоксилин и эозин. Ув.: А $\times 125$; Б $\times 250$

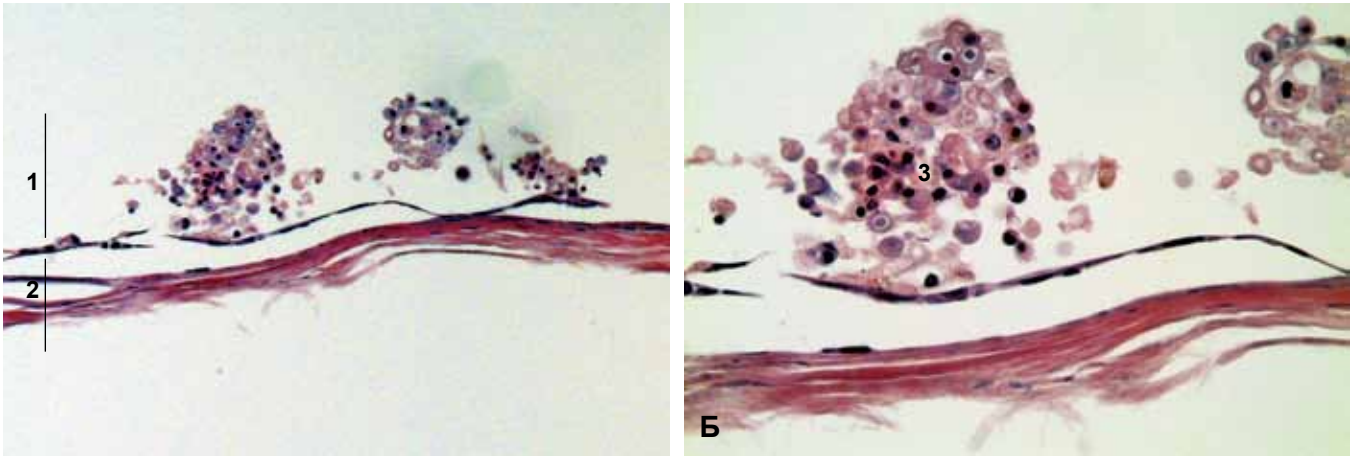


Рис. 5. Клетки кожи в составе трехмерного эквивалента на основе матрицы «G-DERM», 7 сут.:
1 – эпидермальный слой; 2 – дермальный слой; 3 – пикноз ядер. Окраска: гематоксилин и эозин.
Ув.: А ×125; Б × 250

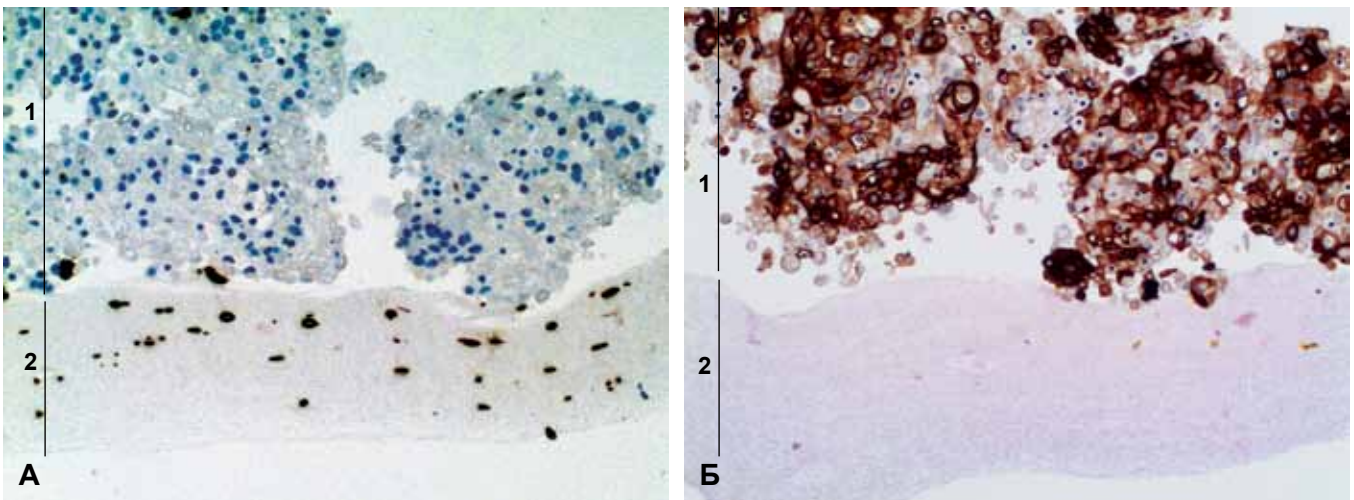


Рис. 6. Клетки кожи в составе трехмерного эквивалента основе фибринового геля. 7 сут.:
результат иммуногистохимической реакции с антителами к виментину (А) и панцитокератину (Б).
1 – эпидермальный слой, 2 – дермальный слой. Докраска гематоксилином. Ув. ×125

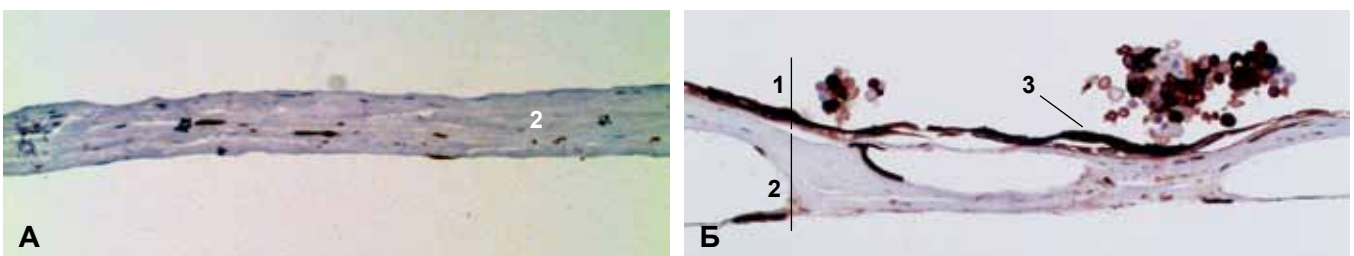


Рис. 7. Клетки кожи в составе трехмерного эквивалента на основе матрицы «G-DERM», 7 сут.:
результат иммуногистохимической реакции с антителами к виментину (А) и панцитокератину (Б):
1 – эпидермальный слой, 2 – дермальный слой; 3 – базальные кератиноциты. Докраска гематоксилином.
Ув. ×125

Определение секреции цитокинов. Предварительный анализ данных показал, что ФРК выявляется только в вариантах с фибробластами, но не с кератиноцитами. Количество ФРК, синтезируемое фибробластами в контроле (пластик) и на матрице через сутки культивирования не различаются ($68 \pm 2,8$ и $68 \pm 20,4$ пг/мл соответственно) (рис. 8). К трем суткам культивирования наблюдается тенденция

к увеличению концентрации в обоих вариантах, однако эти значения статистически не достоверны ($79 \pm 13,6$ и $103 \pm 16,8$ пг/мл соответственно).

Анализ данных секреции ИЛ-6 показал, что наибольшие значения ИЛ-6 определяются в вариантах с фибробластами (рис. 9), но не кератиноцитами. При этом различия между матрицей и контролем нет ($1070 \pm 10,0$ и $1110 \pm 17,3$ пг/мл соответственно),

также нет разницы между 1 и 3 сут. культивирования. По-видимому, при данной плотности посева фибробластов, уже к первым суткам культивирования достигается максимум концентрации интерлейкина. В контрольном варианте кератиноцитов на фидере на первые сутки культивирования в среде появляется детектируемый уровень ИЛ-6 ($40 \pm 17,3$ пг/мл), который увеличивается к третьим суткам до $193 \pm 51,3$ пг/мл, однако его количество существенно ниже вариантов с одними фибробластами. Данные различия вполне объяснимы. В качестве фидерных клеток фибробласты сеяли в плотности в 10 раз ниже плотности, используемой в других вариантах, соответственно, при начальном низком уровне цитокина, его значение в среде по мере роста клеток постепенно нарастало. В аналогичном варианте с матрицей ИЛ-6 не обнаружен.

В среде культивирования клеток кожи, вне зависимости от варианта (матрица, контроль, сроки, комбинация клеток) ИЛ-10 не выявлен. ИЛ-10 использовали в качестве негативного контроля, его секреция присуща клеткам кроветворного ряда (моноцитам и лимфоцитам).

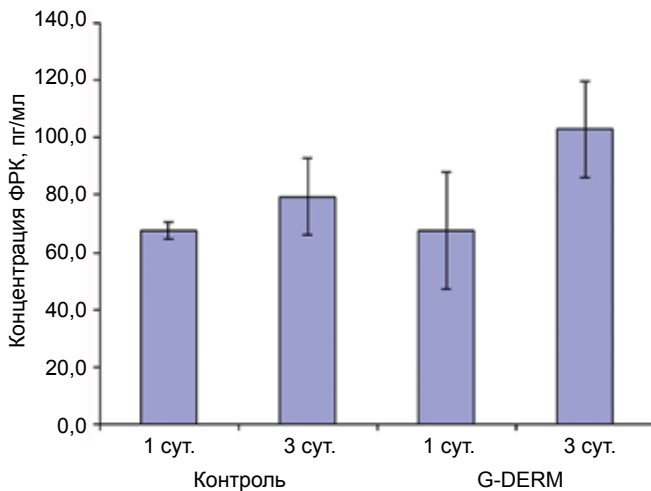


Рис. 8. Содержание ФРФ в среде культивирования фибробластов

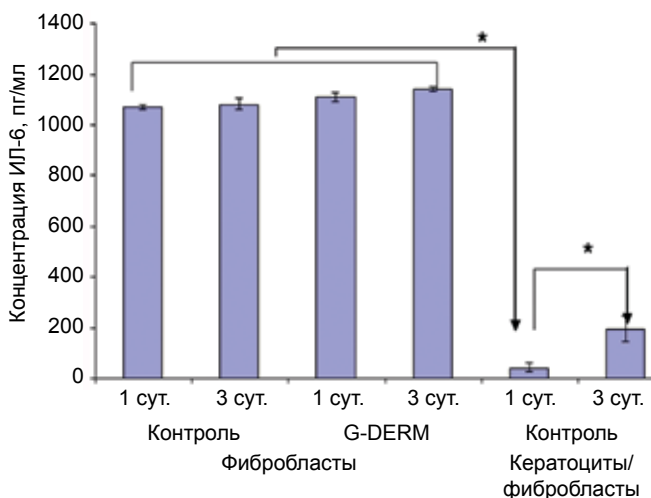


Рис. 9. Содержание ИЛ-6 в среде культивирования клеток кожи.

* — различия между группами статистически значимы, $p \leq 0,01$

Таким образом, при культивировании клеток кожи на биопластическом материале «G-DERM» выявлена секреция фибробластами двух цитокинов — ФРК и ИЛ-6. При этом уровень секреции данных цитокинов не отличается в вариантах фибробластов, посеянных на культуральный пластик и на матрицу.

Обсуждение

Использование клеток кожи для восстановления кожных покровов является признанным и широко используемым методом в лечении ожогов, трофических язв и других кожных ран [6–8]. Разработка продуктов с использованием клеток кожи идет в двух направлениях — в направлении усложнения состава и упрощения применения базовых продуктов. Усложнение заключается в максимальном приближении тканеинженерных продуктов по клеточному и внеклеточному составу к строению нормальной кожи с их предварительной васкуляризацией [9–12]. Полагают, что усложнение технологии должно окупиться получением результата, сравнимого с трансплантацией донорской кожи. Упрощение технологии идет по пути минимизации расходов, времени и используемых компонентов и основано на понимании механизмов действия клеточных продуктов. В таких экспресс-продуктах используют один-два типа клеток; эпидермальные клетки часто используют в виде первичной культуры или с минимальным сроком культивирования [13–16]. В настоящем исследовании использовали протокол смешанной культуры кератиноцитов и фибробластов (в соотношении 10 к 1) без предварительного культивирования эпидермальных клеток и без облучения фидерных клеток [17, 18]. В такой системе фибробласты выступают, с одной стороны, как фидерные клетки для кератиноцитов, с другой стороны, как самостоятельные полноценные биологически активные агенты.

Биопластический материал «G-DERM» (на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты и особого пептидного комплекса) продемонстрировал высокую клиническую эффективность при лечении длительных и рефрактерных к традиционной терапии трофических язв на фоне варикозной болезни и сахарного диабета I типа, а также при термических травмах [19, 20]. Гиалуроновая кислота является одним из элементов внеклеточного матрикса соединительной ткани, сама кислота и ее производные активно используют при создании тканеинженерных продуктов, в том числе и с клетками кожи [21]. Так, итальянская фирма Fidia Advased Biopolymers производит два вида продуктов для оптимизации заживления кожных ран: эпидермальный аналог «Laserskin» в виде пористой мембраны с растущими кератиноцитами и дермальный эквивалент «Hyalograft 3D» в форме геля, заселенный фибробластами.

В целях клинического использования достаточно 1–2 сут., чтобы получить готовый экспресс-продукт из свежeweделенных или криоконсервированных клеток. В нашем исследовании фибробласты на матрице на всем сроке испытания (до 7 сут.) оставались жизнеспособными, но находились в состоянии покоя. В норме в организме активно пролиферируют только клетки постоянно обновляющихся тканей, в том числе клетки эпидермиса, в то время как резидентные клетки дермы — фибробласты — находятся в состоянии покоя. Стимулом для пролиферации фибробластов может служить изменение

нормального гомеостаза ткани, приводящее к изменению микроокружения, в частности, в процессе повреждение кожи. Перевод клеток в условия *in vitro* также является стимулом для активного размножения. К факторам, влияющим на размножение клеток, относятся практически все составляющие микроокружения, начиная от ростовых факторов и цитокинов, заканчивая элементами матрикса, их химией и архитектурой. Поверхность культуральной посуды представляет собой модель двухмерного культивирования. Материал «G-DERM» предоставляет возможности одновременно как двухмерного, так и трехмерного культивирования (на поверхности и в толще матрицы). Особенностью «G-DERM» является его двухфазная система, при которой внутренняя сторона формирует гидроколлоид. По литературным данным, влияние гиалуроновой кислоты на клетки в культуре, в том числе на их пролиферацию, может быть в разных модельных системах прямо противоположным и определяется физико-химическими свойствами ее производных [22]. В классических работах F. Grinnel (2008) по поведению фибробластов в коллагеновом геле было показано, что пролиферативная активность и синтез белков внеклеточного матрикса напрямую зависят от сил натяжения в геле. При слабом натяжении фибробласты находятся в состоянии покоя, что соответствует состоянию клеток в «мягких тканях» в обычных условиях. Напротив, сильное механическое натяжение приводит к формированию стресс-фибрилл и активации фокальных киназ, результатом является стимуляция пролиферации и синтез (или) ремоделирование белков матрикса [23]. Данное состояние отражает процессы, происходящие с фибробластами при заживлении ран. По-видимому, физические свойства гидроколлоида «G-DERM» не обеспечивают должных механических свойств и, соответственно, сигналов для клеточной пролиферации клеток. По этим показателям материал «G-DERM» будет неэффективен при создании полных эквивалентов кожи, так как не обеспечивает пролиферации кератиноцитов и, соответственно, формирования полноценного эпидермального слоя. С другой стороны, активное размножение клеток в матрице, предназначенной для трансплантации, и последующее размножение клеток в организме после трансплантации — явление неоднозначное с точки зрения онкобезопасности.

Известно, что клетки кожи в культуре синтезируют ряд биологически активных факторов: ФРФ (факторов роста фибробластов), ФРГ (фактор роста гепатоцитов), ФРТ (фактор роста тромбоцитов), ФРК, ТФР β (трансформирующий фактор роста бета), ИЛ-6, ИЛ-8 и другие [24–26]. При культиви-

ровании клеток кожи на материале «G-DERM» выявлена секреция фибробластами двух цитокинов — ФРК и ИЛ-6.

ФРК, известный также как ФРФ-7, экспрессируется клетками мезенхимного происхождения (фибробластами, мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, гладкомышечными клетками и др.), оказывает паракринное действие на клетки эпителиального происхождения. Так, в частности, в коже ФРК синтезируется дермальными фибробластами и стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки эпидермальных клеток. При раневом заживлении под влиянием факторов воспаления, таких как ИЛ-6 и ИЛ-1, происходит стимуляция секреции ФРК фибробластами [27]. ИЛ-6 продуцируется клетками лимфоидного и нелимфоидного происхождения, в том числе фибробластами и кератиноцитами. Являясь основным медиатором воспаления, он обладает множественным биологическим действием. Было показано, что ИЛ-6 вызывает пролиферацию кератиноцитов и его повышенная экспрессия связана с патологическими состояниями кожи [28]. В нашем исследовании синтез ИЛ-6 в варианте с кератиноцитами на матрице, в отличие от контроля, не обнаружен. Судя по контрольному варианту, присутствие цитокина в среде обеспечивается на данных сроках, по-видимому, только секреторной активностью фидерных фибробластов. Матрица имеет поры со средним размером $252,16 \pm 98,73$ мкм, часть посеянных клеток пассивно проходит сквозь матрицу. Клеточные потери при изначально низкой плотности посева фидера могли сказаться на суммарном синтезируемом количестве цитокина в среде. Учитывать клеточные потери в образцах не представляется возможным, т. к. поры в матрице имеют гетерораспределение.

Таким образом, совместное действие ФРК и ИЛ-6 при их секреции клетками кожи в составе клеточных продуктов должны способствовать нормальному течению процессов раневого заживления, начиная с фазы воспаления и заканчивая эпителизацией раневой поверхности.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что биопластический материал «G-DERM» является подходящим и доступным для использования в качестве матрицы для создания экспресс-продуктов на основе клеток кожи. Свойства и пористая структура покрытия обеспечивают прикрепление и распластывание клеток кожи не только на его поверхности, но и в толще, при этом клетки сохраняют свою жизнеспособность и синтетическую активность, секреторию характерные для них биологические факторы-регуляторы раневого заживления.

ЛИТЕРАТУРА:

1. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 2007; 44: 874–80.
2. Shevchenko R.V., James S.L., James S.E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J.R. Soc. Interface* 2010; 7 (43): 229–58.
3. Бурлуцкая О.И., Рахматуллин Р.Р., Бурцева Т.И., Адельшин А.И. Гистозэквивалент-биопластический материал. Патент RU2513838. 20.04.2014.
4. Рахматуллин Р.Р. Биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты: биофизические аспекты фармакологических свойств. *Фармация* 2011; 4: 37–9.
5. Зиновьев Е.В., Рахматуллин Р.Р., Османов К.Ф. и др. Биопластические дерматотерапевтические системы на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса. *Вест-*

ник Российской Военно-медицинской академии 2014; 1 (45): 147–51.

6. Boyce S.T., Kagan R.J., Yakuboff K.P. et al. Cultured skin substitutes reduce donor skin harvesting for closure of excised, full-thickness burns. *Ann. Surg.* 2002; 235: 269–79.

7. Спичкина О.Г., Калмыкова Н.В., Моисеев С.И. Клеточные технологии в лечении трофических язв и длительно незаживающих ран. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях* 2012; 4: 61–9.

8. Wong V., Gurtner G. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. *Exp. Dermatol.* 2012; 21: 729–34.

9. Regnier M., Patwardhan A., Scheynius A. et al. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998; 36: 821–4.

10. Ponec M., Ghalbzouri E., A., Dijkman R. et al. Endothelial network formed with human dermal microvascular endothelial cells in autologous multicellular skin substitutes. *Angiogenesis* 2004; 7: 295–305.
11. Tonello C., Vindigni V., Zavan B. et al. In vitro reconstruction of an endothelialized skin substitute provided with a microcapillary network using biopolymer scaffolds. *FASEB J.* 2005; 19: 1546–8.
12. Dezutter-Dambuyant C., Black A., Bechetoille N. et al. Evolutionary skin reconstructions: from the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin. *Biomed. Mater. Eng.* 2006; 16: S85–S94.
13. Mulekar S.V. Long-term follow-up study of 142 patients with vitiligo vulgaris treated by autologous, non-cultured melanocyte-keratinocyte cell transplantation. *Int. J. Dermatol.* 2005; 44: 841–5.
14. James S.E., Booth S., Dheansa B., et al. Sprayed cultured autologous keratinocytes used alone or in combination with meshed autografts to accelerate wound closure in difficult to-heal burns patients. *Burns* 2010; 36: 10–20.
15. Currie L. J., Martin R., Sharpe J. R. et al. A comparison of keratinocyte cell sprays with and without fibrin glue. *Burns* 2003; 29: 677–85.
16. Herson C.A., Dawson R.A., Freedlander E. et al. 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: 809–21.
17. Sun T., McMinn P., Holcombe M. et al. Agent based modeling helps in understanding the rules by which fibroblasts support keratinocytes colony formation. *PLoS ONE* 2008; 3(5): e2129.
18. Jubin K., Martin Y., Lawrence-Watt D.J. et al. A fully autologous co-culture system utilizing non-irradiated autologous fibroblasts to support the expansion of human keratinocytes for clinical use. *Cytotechnology* 2011; 63: 655–62.
19. Зиновьев Е.В., Кисленко А.М., Сивожелезов К.Г. и др. Возможности биопластики трофических язв гистозэквивалент-биопластическим материалом на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты. *Хирург* 2014; 4: 14–21.
20. Рева Г.И., Усов В.В., Митряшов К.В. Применение материала «G-DERM» для лечения «пограничных» ожогов. Сборник научных трудов IV съезда комбустиологов России 2013; 114–5.
21. Vindigni V., Cortivo R., Iacobellis L. et al. Hyaluronan benzyl ester as a scaffold for tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10: 2972–85.
22. Solis M.A., Chen Y-H., Wong T.Y. et al. Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells. *Biochem. Res. Int.* 2012; 2012: 346972.
23. Grinnel F. Fibroblast mechanics in three dimensional collagen matrices. *J. Bodyw. Mov. Ter.* 2008; 12 (3): 191–3.
24. Brem H., Young J., Tomic-Canic M. et al. Clinical efficacy and mechanism of bilayered living human skin equivalent (HSE) in treatment of diabetic foot ulcers. *Surg. Technol. Int.* 2003; 11: 23–31.
25. Kubo K., Kuroyanagi Y. A study of cytokines released from fibroblasts in cultured dermal substitute. *Artif. Organs.* 2005; 29 (10): 845–9.
26. Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Investig. Dermatol.* 2007; 127: 998–1008.
27. Tang A., Gilchrist B.A. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 1996; 11 (1): 41–50.
28. Grossman, R. M., Krueger J., Yourish D. et al. Interleukin-6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *PNAS USA* 1989; 86: 6367.

Поступила 01.07.2014