

ВЛИЯНИЕ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ И БИОПОЛИМЕРНЫХ ГЕЛЕЙ НА РОСТ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Проф. Т. Г. ГРИГОРЬЕВА¹, канд. биол. наук Е. А. ЩЕГЕЛЬСКАЯ²,
Е. В. МАРКЕЛОВА¹, проф. Г. А. ОЛЕЙНИК¹

¹ Харьковская медицинская академия последипломного образования,

² Харьковский национальный медицинский университет, Украина

Представлены результаты исследования влияния некоторых типов повязок и гелей на рост и жизнеспособность фибробластов человека в культуре. Показано, что мазевая Grassolind neutral (Hartmann) и гидрогелевая «Арма-гель+» («Укртехмед») повязки цитотоксичны для фибробластов. В качестве нетоксичных матриц для культур фибробластов рекомендуется использовать сетку пропиленовую «Арма-тура» («Укртехмед») и отмытую от мазевой массы повязку Grassolind neutral, покрытые фибриновым или коллагеновым гелем.

Ключевые слова: фибробласты кожи, культивирование in vitro, повязки, биополимерные гели, цитотоксичность, раны.

В современном лечении ран различной этиологии, термических и химических ожогов, трофических язв и пролежней широко и успешно применяют различные мазевые, сорбирующие, губчатые и гидрогелевые повязки [1]. К ним можно отнести, например, продукцию фирмы Hartmann (Германия): TenderWet 24 active — повязка с высокими абсорбирующими и гидроактивными свойствами, Grassolind neutral — крупноячеистая воздухо- и скрептопроницаемая мазевая повязка на основе хлопчатобумажной ткани, HydroTas — губчатая повязка с гидрогелевым покрытием, позволяющая эффективно удалять раневой экссудат и обеспечивающая достаточное увлажнение раны. Положительную оценку хирургов при лечении ожогов II и III степени получили повязки из серии «Мепилекс» (Mölnlycke Health Care, Швеция) [2]. Украинская фирма ПП «Укртехмед» предлагает целую серию гидрогелевых повязок «Арма-гель+» на основе полиэтиленгликоля, гуанидина и лекарственных добавок (фурацилина, димексида, метилурацила, нанокремнезита и др.). Гуанидин входит в состав всех типов этих гелей и обладает бактерицидным свойством. Большинство повязок и гелей оказывают на раны бактерицидное, обезболивающее, противовоспалительное, увлажняющее, стимулирующее регенерацию кожи воздействие. Одновременное или последовательное применение повязок в сочетании с культурой фибробластов (ФБ) кожи человека на биополимерных гелях может в несколько раз ускорить процесс заживления ран и ожогов разной степени [3]. Однако наличие в повязках бактерицидных препаратов и других химических веществ может оказывать негативное влияние на рост ФБ кожи. Поэтому актуальной является проблема поиска нетоксичных для ФБ кожи матриц на основе повязок и биополимерных гелей [4].

Цель данной работы — изучение влияния раневых покрытий и биополимерных гелей на рост и жизнеспособность ФБ кожи человека в культуре.

Объектами исследования были мазевая повязка Grassolind neutral и ее отмытая марлевая основа (Hartmann), сетка пропиленовая «Арма-тура», повязка гидрогелевая «Арма-гель+» («Укртехмед»), коллагеновый и фибриновый гели и размноженные в культуре ФБ кожи человека.

ФБ получали из дермы кожи пациентов. После удаления эпидермиса измельченную дерму переносили в пробирку с 5 мл 0,075%-ного раствора коллагеназы (Clostridium, тип II, Sigma-Aldrich) на растворе Хэнкса и инкубировали в нем в течение 2 ч при 37 °С. Раствор коллагеназы удаляли, а к ткани добавляли культуральную среду DMEM с 10%-ной фетальной бычьей сывороткой и тщательно ресуспендировали. Суспензию центрифугировали при 430g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в культуральной среде и рассеивали суспензию ФБ в культуральные флаконы (75 см², Nunc). Через 24 ч среду меняли и продолжали культивировать прикрепившиеся ФБ в течение 10–14 дн до образования клеточного монослоя, меняя среду 2 раза в неделю.

Для изучения цитотоксичности упомянутых повязок и гелей ФБ кожи человека (0 пассаж) рассеивали в 12-луночные культуральные планшеты по 40 тыс. клеток на лунку и культивировали в течение 72 ч в CO₂-инкубаторе в среде DMEM с 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (Sigma-Aldrich). Лунки планшетов были разделены на семь опытов: 1 — ФБ в культуральной среде (контроль); 2 — ФБ + повязка Grassolind; 3 — ФБ + отмытая повязка Grassolind; 4 — ФБ + сетка «Арма-тура»; 5 — ФБ + повязка «Арма-гель+»; 6 — ФБ + фибриновый гель; 7 — ФБ + коллагеновый гель.

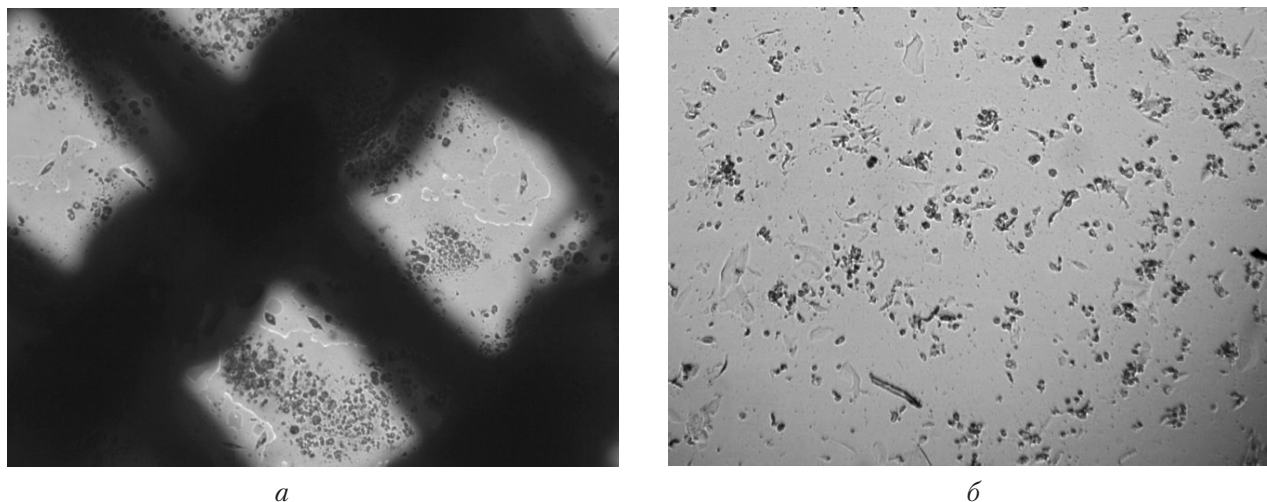


Рис. 1. Токсичное действие мазовой Grassoind neutral (а) и гидрогелевой «Арма-гель+» (б) повязок на фибробласты кожи человека через 24 ч культивирования, $\times 100$

Размер изучаемых матриц, помещенных в лунки, составлял примерно 1 см^2 . Фибриновый гель получали из плазмы крови человека в результате смешивания плазмы и физиологического раствора с добавлением 0,3%-ного хлористого кальция [5]. Для получения коллагенового геля использовали коллаген I типа (Sigma-Aldrich), среду с сывороткой крови и тромбин крови человека.

Количество и жизнеспособность ФБ в каждом варианте изучали через 72 ч культивирования клеток с матрицами. Для этого клетки последовательно обрабатывали растворами Версена и Трипсина (0,25%), ресуспендировали в среде с сывороткой, осаждали центрифугированием при 450g в течение 10 мин. Осадки ресуспендировали в 1 мл раствора Хэнка и считали концентрацию клеток в камере Горяева. Жизнеспособность оценивали после окрашивания клеток 0,1%-ным раствором трипанового синего.

Для изучения адгезивных свойств гелей ФБ рассеивали по 100 тыс. клеток в чашки Петри ($d = 35 \text{ мм}$) с фибриновым и коллагеновым гелями на основе нетоксичных сеток и гидрогелевой повязкой «Арма-гель+», предварительно насыщенной культуральной средой. Состояние ФБ в культуре и гелях оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа (Leica).

Статистический анализ проводили с использованием Statsoft Statistica 8,0. Для сравнительной оценки количества ФБ в разных опытах определяли среднее количество клеток на лунку в каждом варианте после их подсчета в камере Горяева. Данные выражали в виде средних \pm стандартное отклонение (SD); t -критерий Стьюдента использовали для сравнения; значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

В результате визуальной оценки культур ФБ через 24 ч после добавления к ним повязок и гелей было обнаружено, что в лунках с мазовой Grassoind neutral (Hartmann) и гидрогелевой «Арма-гель+» («Укртехмед») повязками почти

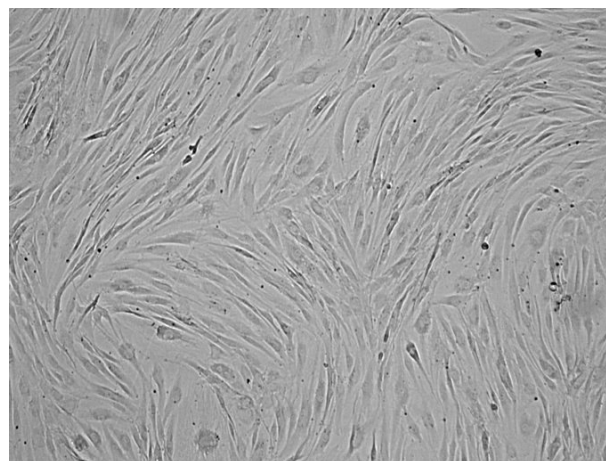


Рис. 2. Фибробласты кожи человека в культуре. Контроль, $\times 100$

все клетки погибли (рис. 1, а, б), в то время как в контрольных лунках (без добавок) ФБ имели нормальный фенотип и продолжали активно делиться (рис. 2). Токсичное действие повязки Grassoind neutral на ФБ может быть вызвано попаданием в культуральную среду вазелина, который является основой ее мазового покрытия. Гидрогелевая повязка «Арма-гель+», по-видимому, становится цитотоксичной для культур благодаря своему свойству поглощать жидкость, меняя при этом осмотические свойства культуральной среды. Кроме того, в состав этой повязки входит гуанидин, который, обладая бактерицидным свойством, токсичен для клеток. Если при лечении ран такие свойства геля являются преимуществом, так как позволяют эффективно бороться с бактериями, очищать рану от экссудата и одновременно сохранять влажную среду в ране, то при культивировании клеток они имеют цитотоксичный эффект.

Отмытая от мазовой основы с помощью кипячения повязка Grassoind neutral и сетка

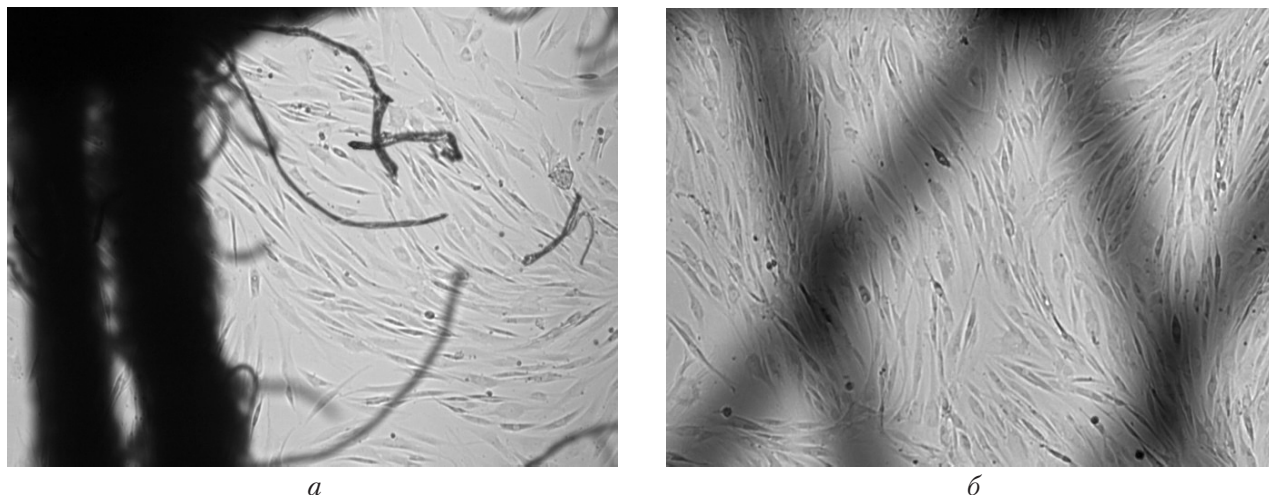


Рис. 3. Фибробласты кожи человека после инкубации с отмытой марлевой повязкой Grassolind neutral (а) и сеткой «Арма-тура» (б), $\times 100$

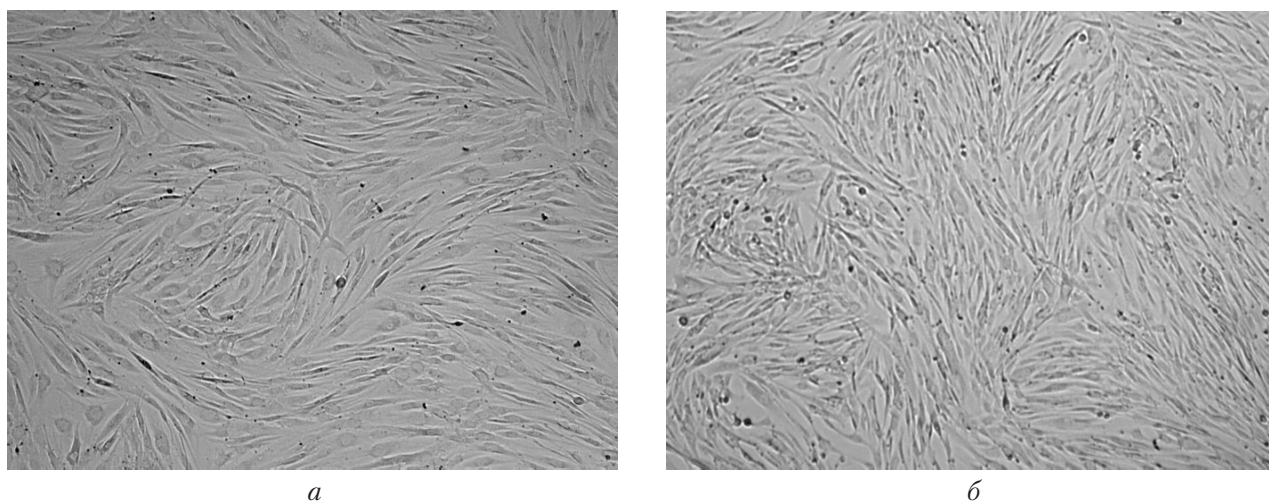


Рис. 4. Культуры фибробластов кожи человека через 72 ч культивирования с коллагеновым (а) и фибриновым (б) гелями, $\times 100$

«Арма-тура» («Укртехмед»), а также фибриновый и коллагеновый гели не оказывали токсичного действия на рост ФБ кожи в культуре (рис. 3, 4).

После подсчета количества и жизнеспособности клеток во всех опытах через 72 ч культивирования было установлено, что в опытах 2 и 5 нет живых клеток, в опытах 3, 4 и 7 количество клеток достоверно не отличалось от контроля (1) и 98% клеток в них были жизнеспособны. В лунках из опыта 6 с фибриновым гелем было обнаружено в 2,5 раза больше ФБ, чем в контроле (рис. 5). Вероятно, фибриновый гель выделяет в культуральную среду факторы, активизирующие процессы деления ФБ. Такие свойства фибринового геля могут объяснить преимущество трансплантатов на его основе, которое было показано при лечении экспериментальных ожогов у крыс [5, 6].

В опыте по изучению адгезивных свойств гидрогелевой повязки «Арма-гель+» («Укртехмед»),

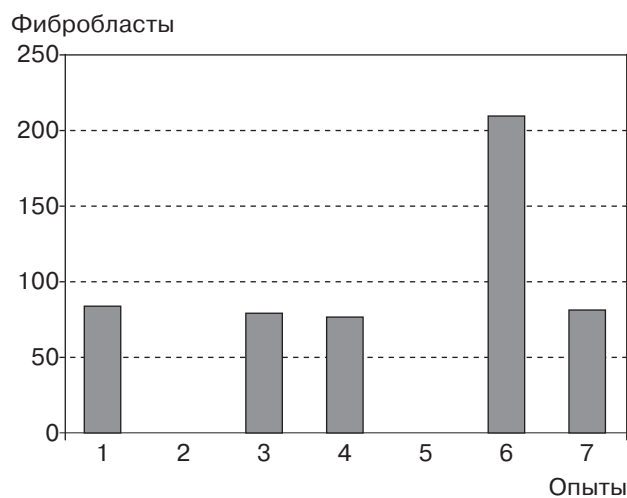


Рис. 5. Количество фибробластов в опытах через 72 ч культивирования с образцами повязок и биополимерных гелей: ■ — количество ФБ (тыс. в лунке)

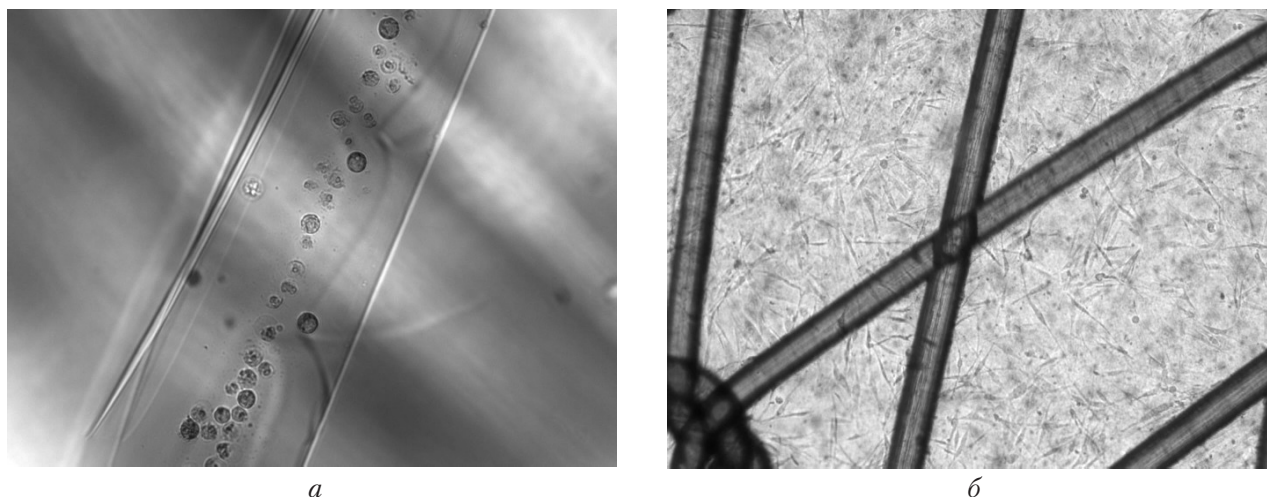


Рис. 6. Дегенерируюшие фибробласты кожи на поверхности гидрогелевой повязки «Арма-гель+» (а). Культура фибробластов кожи в фибриновом геле на сетке «Арма-тура» (б), $\times 100$

фибринового и коллагенового гелей было показано, что ФБ не прикрепляются к «Арма-гелю+» даже после его насыщения средой и остаются на его поверхности в быстро дегенерирующей суспензионной культуре, в то время как на матрицах из коллагенового и фибринового гелей на сетке «Арма-тура» можно получить монослойные культуры жизнеспособных ФБ кожи (рис. 6, а, б).

Таким образом, наши опыты показали, что оптимальными для переноса ФБ кожи человека на поверхность раны являются фибриновый или коллагеновый гели, залитые на марлевую или пропиленовую сетку («Укртехмед») и засеянные культурой ФБ.

Проведенное нами исследование позволило сделать следующие выводы.

Мазевая Grassolind neutral (Hartmann) и гидрогелевая «Арма-гель+» («Укртехмед») повязки

оказывают сильное цитотоксичное действие на ФБ кожи человека в культуре.

Фибриновый гель стимулирует рост ФБ кожи в культуре в 2,5 раза по сравнению с контролем.

В качестве нетоксичных матриц для подготовки монослойных культур ФБ кожи человека для цитопластики могут быть использованы сетка пропиленовая «Арма-тура» («Укртехмед») и отмытая от мазевой массы повязка Grassolind neutral (Hartmann), покрытые фибриновым или коллагеновым гелем.

В комплексной терапии ран и ожогов, включающей трансплантацию дермальных эквивалентов на основе ФБ, следует учитывать цитотоксичные свойства некоторых повязок и гелей и не применять их одновременно с цитопластикой.

Список литературы

1. Burn wound healing and treatment: review and advancements / M. P. Rowan, L. C. Cancio, E. A. Elster [et al]. // Crit. Care.— 2015.— Vol. 19.— P. 243.
2. Алексеев А. А. Особенности использования повязок серии Мепилекс для лечения обожженных / А. А. Алексеев, А. Э. Бобровников, Н. Б. Малютин // Комбустиология.— 2014.— № 4.— С. 52–53.
3. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи / В. Л. Зорин, А. И. Зорина, О. С. Петракова [и др.] // Гены и клетки.— 2009.— № 4 (54).— С. 26–40.
4. Papuga A. Ye. Different types of biotechnological wound coverages created with the application of alive human cells / A. Ye. Papuga, L. L. Lukash // Biopolym. Cell.— 2015.— Vol. 31, № 2.— P. 83–96.
5. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, фибробласты и аутокератиноциты в лечении послеожоговых ран у крыс / Е. В. Маркелова, Т. Г. Григорьева, Е. А. Щегельская [и др.] // Теоретична і експериментальна медицина.— 2012.— № 1 (54).— С. 30–35.
6. Восстановление соединительной ткани в результате трансплантации на раны экспериментальных животных дермального эквивалента на основе фибрина / Н. М. Юдинцева, Н. М. Плескач, Л. В. Смагина [и др.] // Цитология.— 2010.— № 9 (52).— С. 724–728.

ВПЛИВ РАНЕВИХ ПОКРИТТІВ І БІОПОЛІМЕРНИХ ГЕЛІВ НА ЗРОСТАННЯ І ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ФІБРОБЛАСТІВ ШКІРИ ЛЮДИНИ IN VITRO

Т. Г. ГРИГОР'ЄВА, О. А. ЩЕГЕЛЬСЬКА, О. В. МАРКЕЛОВА, Г. А. ОЛІЙНИК

Подано результати дослідження впливу деяких типів пов'язок і гелів на зростання і життєздатність фібробластів людини в культурі. Показано, що мазева Grassolind neutral (Hartmann) і гідрогелева «Арма-гель+» («Укртехмед») пов'язки є цитотоксичними для фібробластів. Як нетоксичні

матриці для культур фібробластів рекомендовано використовувати сітку пропіленову «Арматура» («Укртехмед») і відмиту від мазевої маси пов'язку Grassolind neutral, вкриті фібриновим або колагеновим гелем.

Ключові слова: фібробласти шкіри, культивування *in vitro*, пов'язки, біополімерні гелі, цитотоксичність, рани.

**THE INFLUENCE OF WOUND DRESSINGS AND BIOPOLYMER GELS
ON THE GROWTH AND VIABILITY OF HUMAN SKIN FIBROBLASTS IN VITRO**

T. H. HRYHORIEVA, O. A. SHCHEHELSKA, O. V. MARKELOVA, H. A. OLIINYK

The authors report the results of investigation of influence of some types of dressings and gels on the growth and viability of fibroblasts (FB) in human culture. The dressing Grassolind neutral (Hartmann) and hydrogel Arma-gel+ (Ukrtechmed) are shown to be cytotoxic for FB. Propylene mesh Arma-tura (Ukrtechmed) and the washed from ointments dressing Grassolind neutral, coated with fibrin or collagen gel, are recommended as non-toxic matrices for FB cultures.

Key words: skin fibroblasts, *in vitro* culture, dressing, biopolymer gels, cytotoxicity, wounds.

Поступила 03.06.2016
