

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ДЕРМАЛЬНИХ ЕКВІВАЛЕНТІВ, ПРИЗНАЧЕНИХ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТЯЖКИХ ОПІКОВИХ РАН

Проблема лікування ран, що виникають у результаті термічних ушкоджень м'яких тканин тіла, залишається актуальною, незважаючи на велику кількість робіт у цьому напрямку [1]. На сьогодні головним підходом до лікування опікових ран є активна хірургічна тактика: рання некректомія з наступною аутодермопластиком. Однак, якщо загальна площа рани перевищує 30–40 % поверхні тіла, то навіть за використання перфорованих аутотрансплантатів ранева поверхня не може бути повністю закрита. Одним із засобів подолання цієї проблеми є використання біотехнологічних раневих покриттів (еквівалентів шкіри або окремих її шарів). Раневі покриття можна розділити на дві категорії: безклітинні і такі, що містять у своєму складі клітини різного походження і типу. В основному ці клітини представлені фібробластами і кератиноцитами шкіри дорослої людини, а також фетальними клітинами (фібробласти та мезенхімальні стовбурові клітини), що мають високий проліферативний потенціал. Залежно від структурного моделювання шарів шкіри виокремлюють дермальні, епідермальні та дермо-епідермальні біоконструкції. Існують постійні і тимчасові раневі покриття, створені із штучних і натуральних компонентів, а також комбіновані. Оскільки досі не створено ідеальних еквівалентів шкіри, зусилля дослідників спрямовані на пошук нових рішень цього важливого завдання сучасної біомедицини. Ця робота присвячена дослідженню ефективності дермальних покриттів, призначених для лікування опіків в умовах *in vivo*.

Матеріали і методи

Дермальні покриття або еквіваленти дермального шару шкіри являють собою біоконструкції на основі мембрани з натуральної сировини та гідрогелю, що містить мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). Детальний опис біоконструкції не наводиться, оскільки ця розробка знаходиться в процесі опатентування.

Миші лінії ICR, самці масою ≈ 30 г, піддавалися премедикації 2 % ксилазину гідрохлоридом в дозі 0,2 мг/кг шляхом внутрішньом'язового введення препарату. Після настання проявів заспокійливого ефекту препарату тваринам повільно внутрішньовенно вводили 2 % розчин натрію тіопенталу з розрахунку 200 мг/кг маси тіла тварини. Після повного розвитку стану наркозу на каудальній частині спини видаляли шерстний покрив та наносили термічний опік III ступеню за допомогою металевієї пластини $0,5 \times 0,5$ см, нагрітої до $\approx 200^\circ\text{C}$. Тваринам забезпечували перебування в теплі ($28\text{--}30^\circ\text{C}$) до повного виходу з наркозу.

У дослідній групі дермальні еквіваленти наклали на всю поверхню опікової рани та прилягаючі ділянки неураженої шкіри; біоконструкції фіксували до неураженої шкіри за допомогою клею медичного БФ-6. Під дією температури тіла гель, що містить клітини, поступово розплавлявся, а мембрана прилягала до поверхні рани. Тривалість аплікації становила 8 годин. У контрольній групі тварин жодної обробки опікової рани не здійснювали. Чисельність контрольної та дослідної групи становила по 3 тварини.

Фотофіксацію стану опікової рани проводили раз на добу протягом 4 наступних діб до стадії утворення струпа. В подальшому всі фотографії приводили до одного масштабу та вимірювали площу поверхні опікової рани за допомогою спеціалізованої програми ScionImage (beta-версія 4.0.2). Площу рани вимірювали в умовних одиницях, де за одиницю було прийнято значення цього показника на першу добу після індукції опіку. Обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою програми OriginPro 8.1.

Також представлено результати попередніх досліджень ефективності експериментальних дермальних покриттів, апробованих на обмеженій групі пацієнтів з опіковою хворобою в умовах стаціонару (Центр термічних опіків і пластичної хірургії Київської міської лікарні № 2). Раневі покриття, що містили клітини, аплікували

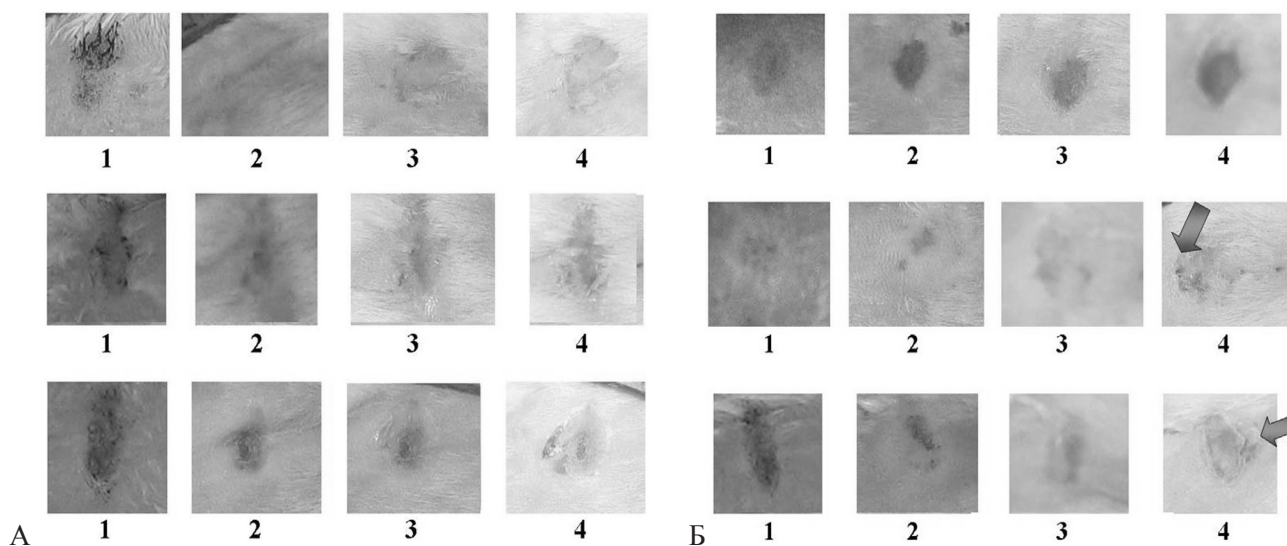


Рис. 1. Опікові рани у тварин контрольної (А) та дослідної (Б) груп. Стрілками вказано на видимі зони початкової епітелізації рани. *Примітка.* Під кожним знімком вказано час фотофіксації – 1, 2, 3 чи 4 доба досліді. Електронна версія статті містить рисунки в кольоровому зображенні

на поверхню опікової рани протягом 2 діб, після чого на поверхню рани здійснювали аутографтацію перфорованих шкірних графтрансплантаців. Порівняння проводили з групою пацієнтів, що до проведення аутографтації отримували лікування за класичною схемою без використання раневих покриттів.

Результати та обговорення

Результати попередньої апробації експериментальних дермальних покриттів на тваринах наведено на рис. 1 та рис. 2.

Як у контрольній, так і в експериментальній групі на третій день спостереження на поверхні рани розпочалося утворення струпа; на четверту добу струп було повністю сформовано, і безпосереднє спостереження за всією поверхнею рани ставало неможливим. Проте на периферії опікової рани внаслідок процесів контракції утворювалася ділянка раневої поверхні, що була доступною для візуального контролю. На цій ділянці у всіх тварин експериментальної групи вже на четверту добу спостерігали ознаки епітелізації, тоді як у жодної тварини в контрольній групі епітелізація цих зон не мала місця (рис. 1).

Результати вимірювання площі опікової рани в контрольній та дослідній групах наведено на рис. 2.

Тенденція до зменшення площі поверхні опікової рани порівняно з контролем спостерігалася вже на другу добу досліді, а на третю добу цей показник у контрольній та дослідній групах

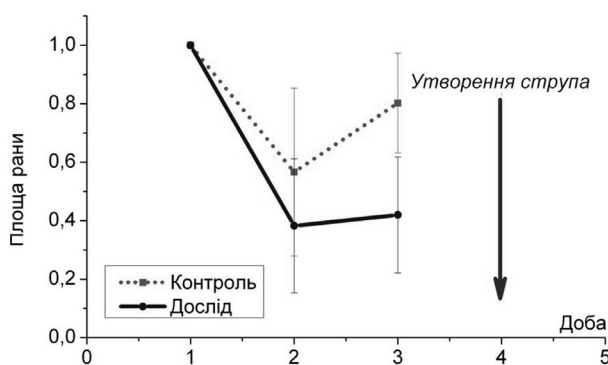


Рис. 2. Вплив аплікації дермального еквіваленту на динаміку розвитку опікових ран у експериментальних тварин. *Примітка.* Електронна версія статті містить рисунки в кольоровому зображенні

відрізнявся статистично вірогідно. Результати статистичної обробки за допомогою двофакторного ANOVA також вказують на статистично вірогідні відмінності в динаміці розвитку опікової рани в контрольній та дослідній групах. На основі одержаних даних представлено патент, який нині знаходиться на розгляді.

Результати клінічних досліджень, проведених на обмеженій групі хворих з опіковою хворобою в Центрі термічних опіків і пластичної хірургії Київської міської лікарні № 2, наведено в табл. Частково результати клінічних досліджень були опубліковані нами раніше [1, 2] і представлені на міжнародній виставці в Парижі 2008 р. та ін.

Таблиця

Результати аутотрансплантації перфорованих трансплантатів шкіри у хворих, що піддавалися попередній аплікації дермальних еквівалентів, та хворих, що отримували лікування за класичною схемою

	Традиційна аутотрансплантація	Аутотрансплантація після накладання покриття
Васкуляризація автотрансплатів, доба	7-10	4-5
Відторгнення автотрансплантатів,%	20	-
Інтенсивна епітелізація, доба	12-14	6-7
Повна епітелізація, доба	18-21	7-10

У пацієнтів, що отримували лікування з використанням дермальних еквівалентів, процеси васкуляризації та епітелізації рани розпочиналися значно раніше, повне загоєння рани прискорювалося вдвічі, а відторгнення трансплантатів не спостерігалось у жодного учасника експериментальної групи, тоді як при лікуванні за традиційною схемою приживлення аутотрансплантатів мало місце лише у 80 % пацієнтів.

Слід відзначити, що раніше нами проводились експерименти зі штучними гідрогелями на основі полімеризації акриламиду і акрилонітрилу, синтезованими в Інституті біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України. На основі цих даних було отримано два патенти України (№ 20134, 15.01.2007 та № 82583, 10.01.2008).

Порівняння даних, отриманих у представленій роботі, з результатами клінічних досліджень комерційних дермальних еквівалентів, що використовуються у світовій клінічній практиці [1, 3, 4], вказує на перспективність досліджуваної біоконструкції на основі природних компонентів та необхідність проведення повноцінних преклінічних та клінічних досліджень. За деякими пара-

метрами дермальний еквівалент, що пропонується нами, може перевищувати навіть сучасні закордонні комерційні покриття: так, наприклад дермальний еквівалент Apligraf®, попри підтверджену клінічну ефективність як штучного раневого покриття, не стимулює приживлення аутотрансплантатів [5]. До переваг досліджуваної нами біоконструкції належить також використання стандартизованого клітинного матеріалу.

Висновки

Отримані результати вказують на наявність сприятливого впливу аплікації досліджуваної біоконструкції на розвиток опікового процесу, що проявляється у стимуляції регенерації дермального шару шкіри і епітелізації, полегшення стану опікового хворого і підвищення ефективності приживлення аутотрансплантатів. Ефект впливу досліджуваних біоконструкцій на перебіг захворювання, ймовірно, пов'язаний із частковою абсорбцією токсичних продуктів розпаду клітин та сприятливим впливом біологічно активних речовин, секретованих клітинами, що входять до складу біоконструкції, на регенерацію дермального шару шкіри пацієнтів. Це свідчить про перспективність застосування таких біоконструкцій у складі комплексної терапії опікової хвороби та вказує на доцільність проведення повноцінних преклінічних та клінічних випробувань.

Ця експериментальна робота, в тому числі клінічні дослідження, виконувалась у рамках спільного проекту між установами НАН України і СО РАН.

Автори висловлюють щире подяку головному комбустіологу Міністерства охорони здоров'я України, завідувачу кафедри комбустіології та пластичної хірургії НМАПО імені П.Л. Шупика Козинцю Георгію Павловичу та співробітникам Центру термічних опіків і пластичної хірургії Київської міської лікарні № 2 (головний лікар – Воронін Анатолій Васильович).

ЛІТЕРАТУРА

1. Papuga A.Ye., Lukash L.L. Different types of biotechnological wound coverages created with the application of alive human cells // *Biopolym. Cells.* – 2015. – 31, № 2. – P. 83–96.
2. Kosenko O.O., Lukash L.L., Samchenko Yu.M., Ruban T.A., Lukash S.I., Ulberg Z.R., Galagan N.P. Artificial skin equivalent based on copolymeric hydrogel membranes with immobilized human mesenchymal stem cells // *Biopolym. Cells.* – 2006. – 22, № 6. – P. 446–451.
3. Sheridan R.L., Tompkins R.G. Skin substitutes in burns // *Burns.* – 1999. – 25, № 2. – P. 97–103.
4. Nyame T.T., Chiang H.A., Orgill D.P. Clinical applications of skin substitutes // *Surgical Clinics of North America.* – 2014. – 94, № 4. – P. 839–850.
5. 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 // *Burns.* – 2000. – 26, № 7. – P. 609–619.

PAPUGA A.YE., MATSEVICH L.L., RUBAN T.A., LUKASH L.L.

Institute of molecular biology and genetics of NASU, Ukraine,

Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua

INVESTIGATION OF DERMAL EQUIVALENTS EFFICACY FOR THE TREATMENT OF SEVERE BURN WOUNDS

Aim. The aim was to estimate the efficiency of a new dermal equivalent *in vivo*. **Methods.** We carried out the application of wound coverages containing hydrogels with mesenchymal stem cells (MSCs) on the third degree burns of ICR line mice. The duration of application was 8 hours. In the control group animals had no treatment. Photofixation of burn wound station was carried out once a day. The results were estimated by two-way ANOVA approach. **Results.** There was a statistically significant difference of burn wounds development on the third day after treatment in experimental groups of animals comparing with the control. Clinical investigations realized at the Center of thermal burns and plastic surgery confirmed beneficial effects of our dermal coverages on skin regeneration. In patients after treatment processes of vascularization and epithelialization of the wound started earlier and efficiency of autografts engraftment was improved. **Conclusions.** It has been shown high effectiveness of dermal equivalents containing MSCs in the experiments with animals *in vivo* and *in clinicum*.

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