

## Штучний еквівалент шкіри на основі кополімерних гідрогелевих мембран з іммобілізованими мезенхімними стовбуровими клітинами людини

О. О. Косенко, Л. Л. Лукаш<sup>1</sup>, Ю. М. Самченко, Т. А. Рубан<sup>1</sup>,  
С. І. Лукаш<sup>1</sup>, З. П. Ульберг, Н. П. Галаган<sup>2</sup>

Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України  
Бульв. Вернадського, 42, Київ, 03132, Україна

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології та генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup> Інститут хімії поверхні НАН України  
Вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна

zulberg@bioco.kiev.ua

---

*Оптимізовано базові параметри гідрогелевих мембран, важливі для їхньої характеристики як потенційних біосумісних недеградувальних ранових покриттів. Показано, що помірно гідрофобні та одночасно помірно гідрофільні мембрани, одержані кополімеризацією акриламідів та акрилонітрилу, є біосумісними для мезенхімних стовбурових клітин. Продемонстровано, що високодисперсний кремнезем, інкорпорований у гідрогелеві мембрани в невеликих концентраціях, позитивно впливає на культивування клітин. Визначено технологічні умови, необхідні для ефективного і довготривалого культивування клітин на поверхні гідрогелевих мембран з покращеними експлуатаційними властивостями.*

---

*Ключові слова: еквівалент шкіри, гідрогель, мезенхімні стовбурові клітини, іммобілізація, культивування, поживне середовище.*

---

Вступ. Як відомо, ранові покриття у вигляді гідрогелевих мембран мають багато переваг: прозорість, щільний контакт з ранною, висока сорбційна здатність відносно ранового ексудату, можливість аерації і міграції продуктів метаболізму, атравматичність використання та видалення з поверхні тіла [1]. Нині активно розробляють гідрогелеві мембрани для культивування аутологічних та алогенних клітин.

© О. О. КОСЕНКО, Л. Л. ЛУКАШ, Ю. М. САМЧЕНКО,  
Т. А. РУБАН, С. І. ЛУКАШ, З. П. УЛЬБЕРГ,  
Н. П. ГАЛАГАН, 2006

Для потреб медицини, як правило, використовують диференційовані клітини шкіри, фібробласти та кератиноцити [1–4]. Однак гідрогелеві мембрани часто є малоєфективними внаслідок низької механічної міцності, схильності до пересихання, малої сорбційної здатності.

Використання мезенхімних стовбурових клітин (МСК) як клітинного компонента гідрогелевих мембран при конструюванні штучних еквівалентів шкіри є перспективним, тому що у відповідному мікрооточенні вони здатні диференціюватися в різ-

ні типи клітин, у тому числі в епітеліальні, сполучнотканинні, м'язові тощо [5].

Раніше методом радикальної кополімеризації нами синтезовано низку гідрогелевих мембран на основі акриламід, акрилонітрилу та акрилової кислоти, придатних для культивування МСК [6]. У результаті порівняльних досліджень встановлено, що оптимальні параметри з точки зору іммобілізації МСК людини притаманні неіоногенним кополімерним гідрогелям на основі акриламід та акрилонітрилу. Виявилося, що використання гідрогелів зі значним вмістом акрилової кислоти обмежене через істотне зниження рН культурального середовища, несумісне з життєдіяльністю досліджуваних клітин.

Одержані дані підтвердили, що розроблений нами гідргель з включенням МСК та/або диференційованих клітин шкіри потенційно можна використовувати як ефективний тимчасовий штучний замітник шкіри при лікуванні опіків (особливо масивних, з поверхнею, ураженою більш ніж на 70 %, та глибоких, що зачіпають підшкіряні тканини), а також інших пошкоджень шкіряного покриву. Тому ми продовжили експериментальні дослідження з оптимізації параметрів гідрогелевих мембран, важливих для їхньої характеристики як біосумісних недеградувальних ранових покриттів. У цьому повідомленні представлено дані із визначення технологічних умов, необхідних для ефективного та довготривалого культивування клітин на поверхні гідрогелевих мембран.

**Матеріали і методи.** Синтез кополімерних гідрогелів. Кополімерні гідрогелі на основі акрилових мономерів синтезовано методом радикальної кополімеризації акриламід та акрилонітрилу у водному середовищі за кімнатної температури. Як зшивальний агент використовували N,N'-метиленбіс-акриламід, а гелеутворення ініціювали за допомогою окиснювально-відновлювальної системи персульфат калію—метабісульфіт натрію. Концентрацію зшивального агента при синтезі гідрогелів варіювали в широкому діапазоні. Досліджували зразки, які містили 0,188; 0,375; 0,654 та 0,750 % N,N'-метиленбіс-акриламід.

Синтезовано також серію гідрогелевих мембран із включенням високодисперсного кремнезему (ВДК) «Силікс» (ЗАТ «Біофарма», Україна). Для цього до складу гідрогелю, що містить 37,5 % ланки акрилонітрилу та 62,5 % ланки акриламід при концентрації зшивального агента 0,654 %,

попередньо вводили 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 та 1,25 % ВДК.

**Механічні властивості гідрогелевих мембран.** Механічні параметри кополімерних гідрогелевих мембран у рівноважно набухлого стані визначали з використанням модифікованого приладу Вейлера-Рейндера. Для вимірів використовували гідрогелеві мембрани-зразки у вигляді пластин таких розмірів (мм): товщина — 0,3, ширина — 10, довжина — 20. Точні геометричні параметри визначали в кожному конкретному випадку з використанням лінійки та мікрометра. Для отримання середніх значень механічних показників випробовували по 10 зразків. Набухлі до рівноважного стану гідрогелеві мембрани-зразки прикріплювали до пружини динамометра за допомогою спеціальних м'яких зажимів. Завдяки тому, що під час досліду зразок перебував у кюветі з водою, виключалося випаровування води та обумовлена цим зміна геометричних розмірів зразка. Швидкість розтягнення зразків складала  $1,53 \cdot 10^{-3}$  м/с. Визначали міцність на розрив гідрогелів та відносне подовження. Міцність на розрив вираховували за формулою

$$\sigma_p = F/S = F/(a \cdot b),$$

де  $F$  — навантаження;  $S$  — площа перетину зразка;  $a$ ,  $b$  — ширина та товщина зразка.

Відносне подовження гідрогелевих зразків визначали за формулою

$$\gamma = \frac{\lambda - \lambda_0}{\lambda_0} \cdot 100,$$

де  $\lambda_0$  — початкова довжина зразка;  $\lambda$  — довжина зразка на момент розриву.

**Оптичні властивості гідрогелевих мембран.** Показник заломлення кополімерних гідрогелевих мембран різного складу досліджували з використанням рефрактометра ИРФ-454 БМ. Гідрогелеві зразки товщиною 1 мм вміщували між призмами рефрактометра. Виміри проводили при кімнатній температурі. Виразували середнє значення з результатів трьох послідовних вимірів.

**Змочування гідрогелевих мембран.** Величини крайових кутів змочування гідрогелевих мембран отримано проектуванням краплини, нанесеної на їхню поверхню, на екран та обрахунком кута за співвідношенням висоти сегмента кола та довжини хорди (метод Б. Д. Сумма та Ю. В. Горюнова, неопубліковані дані).

*Сорбційні властивості гідрогелевих мембран.*

Для дослідження набухання зразки занурювали в дистильовану воду та розчин культурального середовища ДМЕМ з додаванням 5 % сироватки крові новонароджених телят. Через визначені проміжки часу зразки виймали, видаляли за допомогою фільтрувального паперу надлишок вологи з поверхні та зважували на терезах ВЛА-200-М. Кількість вологи, сорбованої гелем (г/г), визначали за формулою

$$Q = (m_n - m_c) / m_c,$$

де  $m_n$  і  $m_c$  — маса рівноважно набухлого та сухого зразків.

Рівноважний вміст води у гідрогелях можна розраховувати, як  $W = (m_n - m_c) / m_c \cdot 100$  %, тоді вміст зшитого полімеру в гідрогелі буде складати  $\chi = 100 - W$ .

*Біосумісність гідрогелевих мембран.* МСК лінії 4BL2 культивували в стандартному середовищі ДМЕМ («Sigma», США) з додаванням 5 % сироватки новонароджених телят («Sigma»), а також антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину (по 100 ОД/мл) за температури 37 °С в умовах термостакування. При звичайному пасивуванні клітини культивували з формуванням моношару на поверхні скляних флаконів або чашок Петрі («Apim-bra», Чехія) діаметром 35 мм. Для тестування біосумісності гідрогелевих мембран на поверхні чашок Петрі спочатку розміщували зразки висушених стерильних мембран, потім їх заливали стандартним культуральним середовищем не менш ніж на 5—6 год для набухання. Після цього видаляли надлишок культурального середовища і наносили на адаптовані мембрани клітинну суспензію ( $10^5$  клітин у 2 мл культурального середовища). Детальніше методику тестування біосумісності гідрогелів різного складу описано нами раніше [6]. За клітинними культурами спостерігали під інвертованим мікроскопом і оцінювали здатність МСК до іммобілізації на досліджуваних гідрогелевих мембранах, адгезивні властивості, можливості росту й розмноження та їхню морфологію. Контролем слугувала скляна поверхня чашок Петрі.

*Результати і обговорення.* Синтезовано велику низку кополімерних гідрогелів — у межах від гомополіакриламідного гелю до гідрогелю з еквімолекулярним співвідношенням ланок акриламідну та акрилонітрилу. Подальше підвищення концентрації акрилонітрилу виявилось неможливим внаслідок його обмеженої розчинності у водному середовищі.

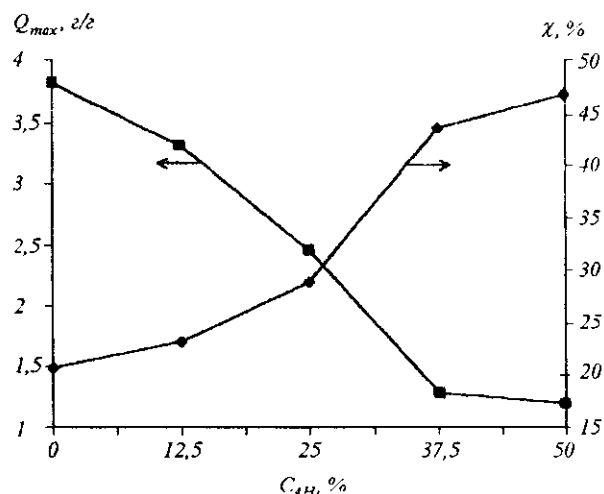


Рис. 1. Залежність рівноважного ступеня набухання гідрогелів і вмісту зшитого полімеру в них від концентрації ланок акрилонітрилу

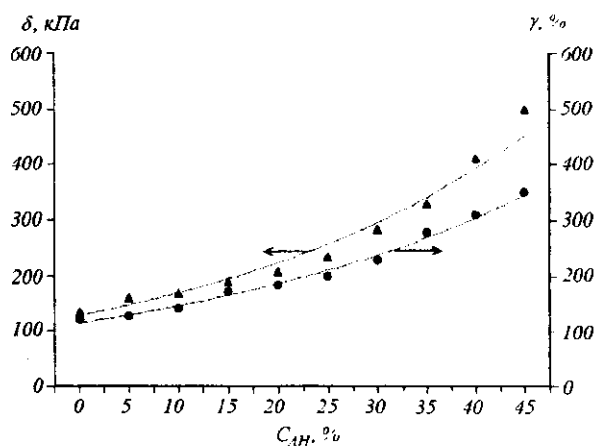


Рис. 2. Залежність міцності на розрив та відносного подовження гідрогелів від концентрації ланок акрилонітрилу

Проведені дослідження продемонстрували, що варіювання співвідношення мономерів суттєво впливає на фізико-хімічні властивості гідрогелів. Так, із даних рис. 1 (крива 1) видно, що по мірі заміщення гідрофільних ланок акриламідну на гідрофобні акрилонітрильні ланки рівноважна кількість води, яку вони можуть утримувати, зменшується. Аналогічним чином впливає на рівноважний вміст води в гідрогелях і концентрація зшивального агента. Вміст твердої фази в гідрогелях, відповідальної за їхні фізико-механічні характеристики, при цьому, навпаки, збільшується (рис. 1, крива 2). З підвищенням вмісту зшитого полімеру в гідрогелі і, отже, із зростанням частки

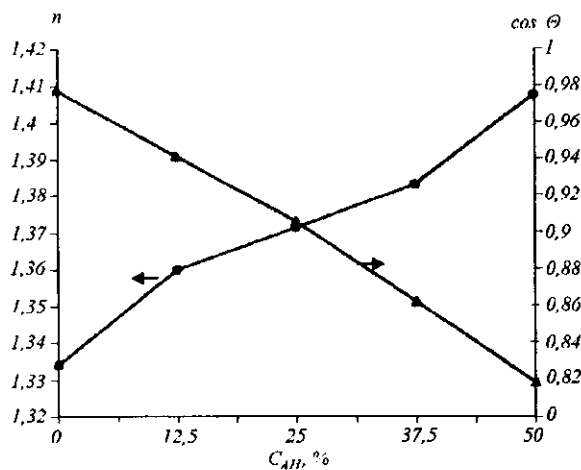


Рис. 3. Залежність коефіцієнта заломлення та крайового кута змочування гідрогелів від концентрації ланок акрилонітрилу

полімерних ланок, що несуть механічне навантаження, корелює збільшення міцності на розрив та еластичності гідрогелів (рис. 2).

Із підвищенням гідрофобності гідрогелів корелює також зростання показника їхнього кута заломлення та зменшення  $\cos \theta$  — косинуса крайового кута змочування їхньої поверхні (рис. 3). Вказані параметри можна використовувати для експрес-оцінки гідрофільно-гідрофобного балансу кополімерних гідрогелів, оскільки проведеними дослідженнями продемонстровано, що саме помірно гідрофільні і в той же час помірно гідрофобні гелі набувають комплексу властивостей, оптимального для культивування мезенхімних клітин.

Так, аналіз наведених на рис. 4 мікрофотографій клітинних популяцій на поверхні гідрогелевих зразків залежно від їхнього хімічного складу свідчить, що для мономерів у всьому дослідженому діапазоні концентрацій характерно прикріплення, розпластування та розмноження МСК. Проте утворення суцільного клітинного моношару спостерігалось лише на поверхні помірно гідрофільного та помірно гідрофобного зразка, що містив 37,5 % акрилонітрилу з рівнем зшивання 0,654 %.

Разом з тим варто зазначити, що гідрогелям з вказаним комономерним складом притаманні і оптимальні фізико-механічні характеристики (рис. 2), оскільки гідрогелі з більшим вмістом акрилонітрилу хоча й міцніші, однак уже не набувають прозорості, яка дозволяла б контролювати процес загоєння рани. Тому подальші дослідження з оптимізації складу гідрогелевих мембран для іммо-

білізації та культивування МСК стосувалися саме зразка з 37,5 %-м вмістом акрилонітрилу.

З літератури відомо [7], що ВДК вступає у адсорбційну взаємодію з поверхнею клітин, причому така взаємодія зумовлена, перш за все, електростатичними силами, що виникають між негативно зарядженими частками кремнезему та кватернізованими амонійними групами мембранних фосфоліпідів. У подальшому утворені контакти між клітинами та високодисперсним кремнеземом можуть зміцнюватися за рахунок водневих і Ван-дер-Ваальсових зв'язків. У той же час ВДК може спричинювати денатурацію мембранних білків [8]. У зв'язку з вищезазначеним логічним було дослідити вплив кремнезему на культивування МСК.

Виявлено, що подібний вплив має яскраво виражений концентраційно залежний характер. Якщо введення до гідрогелю ВДК у концентрації 0,25 % призводить до майже 5-разового (у порівнянні з контролем) зростання популяції життєздатних клітин, то при наступному додаванні кремнезему (0,5 та 0,75 %) спостерігається лише незначне зростання популяції МСК, а концентрація кремнезему, більша за 1 %, призводить до загибелі клітин.

Таким чином, можна дійти висновку, що при мінімальному вмісті кремнезему у гідрогелях будуть превалювати адсорбційні взаємодії, сприяючи взаємодії клітин з гідрогелевою поверхнею та поживним середовищем, тоді як високі концентрації кремнезему викликать руйнування клітинних мембран. Проміжні концентрації кремнеземів у гідрогелевих носіях характеризуються конкурентним впливом обох зазначених процесів.

**Висновки.** Отже, у цій роботі оптимізовано параметри гідрогелевих мембран, важливі для їхньої характеристики як потенційних біосумісних недеградувальних ранових покриттів.

Підтверджено, що саме помірно гідрофобні та одночасно помірно гідрофільні мембрани, одержані на основі кополімеризації мономерів акриламідів та акрилонітрилу, є біосумісними для МСК.

Продемонстровано, що мінімальні концентрації високодисперсного кремнезему сприяють розмноженню мезенхімних стовбурових клітин.

Визначено технологічні умови, необхідні для ефективного та довготривалого культивування клітин на поверхні гідрогелевих мембран з покращеними експлуатаційними властивостями.

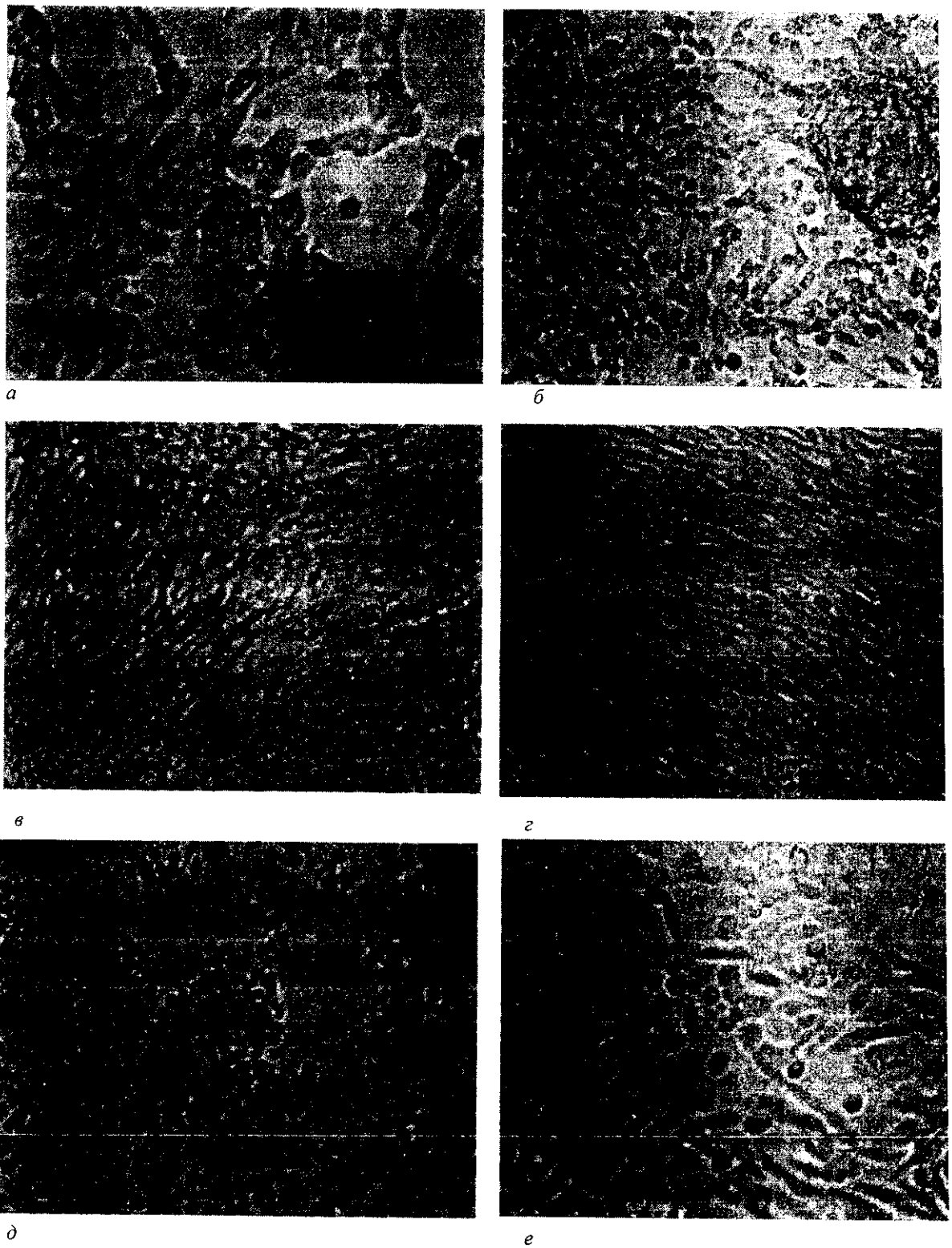


Рис. 4. Вигляд клітин на гідрогелевих матрицях з різним вмістом (%) акрилонітрилу: *a* — 0; *б* — 12,5; *в* — 25; *г* — 37,5  
*е* — контроль ( $\times 100$ )

O. O. Kosenko, L. L. Lukash, Yu. M. Samchenko, T. A. Ruban, S. I. Lukash, Z. R. Ulberg, N. P. Galagan

Artificial skin equivalent based on copolymeric hydrogel membranes with immobilized human mesenchymal stem cells

#### Summary

*The basic parameters of hydrogel membranes, which are important for their characteristics as potential biocompatible non-degradable wound coverings, have been optimized. Moderately hydrophobic and at the same time moderately hydrophilic membranes obtained on the basis of copolymerization of acrylamide and acrylonitrile were demonstrated to be biocompatible with mesenchymal stem cells. Small concentrations of highly dispersed silica introduced into a composition of hydrogel membranes were demonstrated to influence the cell cultivation positively. The technological conditions necessary for more effective and prolonged cultivation of cells on the surface of hydrogel membranes with improved exploitation parameters have been established.*

*Keywords: skin equivalent, hydrogel, mesenchymal stem cells, immobilization, cultivation, nutrient medium.*

O. O. Косенко, Л. Л. Лукаш, Ю. М. Самченко, Т. А. Рубан, С. И. Лукаш, З. Р. Ульберг, Н. П. Галаган

Искусственный эквивалент кожи на основе сополимерных гидрогелевых мембран с иммобилизованными мезенхимальными стволовыми клетками человека

#### Резюме

*Оптимизированы базовые параметры гидрогелевых мембран, которые важны для их характеристики в качестве потенциальных биосовместимых недеградирующих раневых покрытий. Показано, что умеренно гидрофобные и одновременно умеренно гидрофильные мембраны, полученные на основе сополимеризации акриламида и акрилонитрила, являются биосовместимыми для мезенхимальных стволовых клеток. Показано, что небольшие концентрации высокодисперсного кремнезема, вводимого в состав гидрогелевых мембран, положительно*

*влияют на размножение клеток. Установлены технологические условия, необходимые для более эффективного и длительного культивирования клеток на поверхности гидрогелевых мембран с улучшенными эксплуатационными качествами.*

*Ключевые слова: эквивалент кожи, гидрогель, мезенхимные стволовые клетки, иммобилизация, культивирование, питательная среда.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Парамонов Б. А., Порембский Я. О., Яблонский В. Г. Ожоги.—Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000.—488 с.
2. Пат. RU 2152800 C1, А 61 К 39/39, 48/00. Method of culturing and modification of heterogeneous mammalian cells / D. V. Zybin, A. G. Kotelevits // Publ. 2000-07-20.
3. Пат. UA 67880 C2, С 08 F 220/56, А 61 К 35/48, А 61 L 27/52. A transplant removing defects and restoring functions of biological tissues, and a method for the preparation thereof / I. O. Zavorodnii, P. S. Moisieiev // Publ. 2004-07-15.
4. Пат. WO 81/01290, С 08 F 220/56, С 08 L 33/26. Polyacrylamide gel for medical and biological application and method of its preparation / V. Gashinsky, A. Sokolyuk // Publ. 1981-05-14.
5. Jiang Y. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow // Nature.—2002.—418.—Р. 41—49.
6. Косенко О. О., Лукаш Л. Л., Самченко Ю. М., Рубан Т. А., Ульберг З. Р., Лукаш С. И. Кополімерні гідрогелеві мембрани для іммобілізації та культивування стовбурових клітин людини // Біополімери і клітина.—2006.—22, № 2.—С. 143—148.
7. Depasse J., Warlus J. Relation between the toxicity of silica and its affinity for tetraalkylammonium groups // J. Colloid and Interface Sci.—1976.—56.—Р. 618—621.
8. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А. А. Чуйко.—Киев: Наук. думка.—2003.—414 с.

УДК 541.182.644

Надійшла до редакції 01.09.06