

УДК 615.262:615.012:615.458:612.751

Н.О. ВОЛКОВА¹, к. біол. н.; А.М. ГОЛЬЦЕВ¹, академік НАН України, д. мед. н., професор;
Г.І. БОРЩЕВСЬКИЙ², к. фарм. н.; М.І. БОРЩЕВСЬКА², д. фарм. н., професор

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;

²ПАТ «Фармак», Київ/

Вивчення впливу спрею на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів на проліферативні характеристики хондроцитів

Резюме

В роботі досліджували вплив препарату на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів на проліферативні характеристики хондроцитів за умов культивування. Ліпосомальний препарат у формі спрею було розроблено ПАТ «Фармак». Досліджуваний препарат не чинить токсичної дії на хондроцити. Додавання при посіві та на 3-ю добу культивування в ростове середовище досліджуваного препарату в концентраціях від 70 мкг/мл до 1,5 мкг/мл призводило до зниження проліферативної активності у порівнянні з контролем (культивування без додавання препарату). Застосування концентрацій від 0,15 мкг/мл до 1,5 нг/мл не впливало на проліферативні характеристики хондроцитів ($0,1-1,7 \times 10^5$ клітин) за умов культивування.

Ключові слова: ліпосомальний спрей, проліферативні характеристики, хондроцити

Актуальною проблемою медицини є лікування ран різної етіології, що довго не загоюються [1]. Перспективним у даному аспекті було створення оригінального препарату фармакологічної групи стимуляторів регенерації на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней, склад якого захищено патентом України [2].

За фармакологічною дією препарат є тканинспецифічним стимулятором регенерації та впливає на репарацію шкірних покривів. Показаннями до його застосування є трофічні виразки, передгангрена на фоні захворювань периферійних судин (діабетична ангіопатія, варикозне розширення вен), рани, що не загоюються, пролежні, хімічні та термічні опіки, обмороження, променевий дерматит, шкірні виразки [3].

Активна речовина – концентрат депротейнізованого дермального шару шкіри свиней – це низькомолекулярний комплекс фізіологічно активних речовин (пептиди, фосфоліпіди, вуглеводи, вільні амінокислоти, мікроелементи), виділений з дермального шару шкіри свиней, отриманий кислотною екстракцією. Він представляє собою прозору рідину жовтуватого кольору з рН = 4,0–5,5. Концентрат містить низькомолекулярні пептиди і вуглеводи. Сухий залишок становить не менше 3%, молекулярна маса пептидів у комплексі не більше 10 кДа. Основний компонент ліпідного біошару ліпосом – фосфоліпіди, які є головними структурними компонентами біологічних клітинних мембран [2].

Готовий лікарський препарат у формі спрею представляє собою емульсію жовтуватого кольору з рН від 5,2 до 5,6, вміст пептидів не менше 0,12 мкг/мл. Для отримання стабільної лікарської форми були обрані допоміжні речовини: гліцин кристалічний, пропілпарагідроксибензоат натрієва сіль, метилгідроксибензоат натрієва сіль [7].

За даними фармакологічних досліджень препарат не має алергічних властивостей та місцевоподразнюючої дії на шкіру і слизові оболонки [3].

Метою роботи було дослідити вплив препарату на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів на проліферативні характеристики хондроцитів за умов культивування.

Матеріали та методи дослідження

В роботі використовували хондроцити суглобового хряща щурів, які отримували методом ферментативної дезагрегації [5]. Культивування проводили на середовищі IMDM (Sigma, США) з 10% FCS (v/v) виробництва HyClone США з додаванням пеніциліну/стрептоміцину (ПАА, Австрія) і амфотерицину В (ПАА, Австрія). В усіх дослідах посівна концентрація хондроцитів складала $1,2 \times 10^4$ клітин/см². Культивування проводили в умовах стерильного боксового приміщення в інкубаторі Sanjo при $t +37^\circ\text{C}$ з 5% вмістом CO_2 у вологій атмосфе-

рі. Зміна середовища культивування проводилася кожну третю добу. Пасажі проводили після досягнення культурою моношару. Для переведу клітин в суспензійний стан моношар обробляли сумішшю 0,02% розчину Версена (ГУП ІПВЕ ім. М.П.Чумакова РАМН) і 0,25% розчину трипсину (РАА, Австрія) у співвідношенні 4:1. Клітинну концентрацію підраховували в камері Горяєва загальноприйнятим способом [4].

В роботі був використаний препарат з концентрацією пептидів 0,137мг/мл. Діапазон досліджених концентрацій – 70; 13,7; 7,6; 1,5; 0,15 мкг/мл та 75; 15; 7; 1,5 нг/мл. Препарат додавали до середовища культивування клітин при посіві та на 3 добу культивування. Контролем були культури хондроцитів, культивування яких проводили в тих же умовах, тільки без додавання препарату.

Для визначення наявності/відсутності токсичного впливу досліджуваного препарату проводили інкубацію хондроцитів з визначеними концентраціями препарату при 37°C впродовж 18 годин (15 хв, 1 год, 3 год, 18 год). Життєздатність клітин (цілісність мембрани) оцінювали за тестом на виключення суправітального барвника трипанового синього (Sigma, США). До суспензії клітин додавали 0,4% розчин трипанового синього та підраховували в камері Горяєва за допомогою світлового мікроскопа кількість клітин, які вклю-

чили барвник (кількість ушкоджених клітин) та не включили барвник (кількість живих клітин). Визначали відсоток живих клітин до загальної кількості клітин. Методом ФАКС-аналізу на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur фірми Becton-Dickinson (США) досліджували процеси некрозу в хондроцитах при взаємодії з досліджуваним препаратом протягом однієї та 18 годин. Проникаючий барвник 7-аміноактиноміцин D (7-AAD) зв'язується з нуклеїновими кислотами та використовується для визначення життєздатних/некротичних клітин [6]. Аналіз результатів проводили за допомогою програми Win MDI v.2.8. При культивуванні вивчали здатність до адгезії та динаміку проліферації хондроцитів за умов взаємодії з досліджуваним препаратом. Для визначення приросту кількості клітин підраховували їх кількість на 1-шу, 3-ю та 7-му доби шляхом фермен-

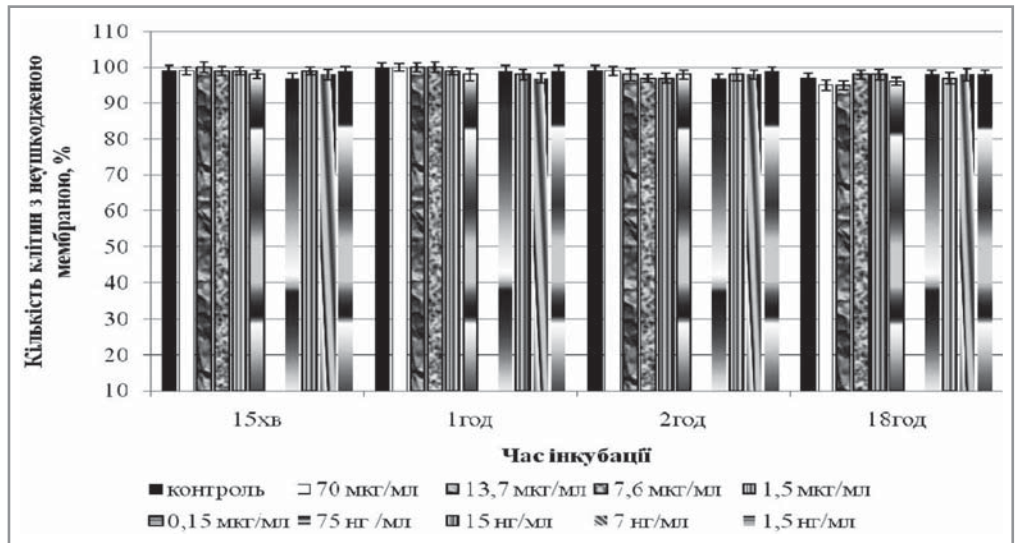


Рис. 1. Цілісність мембрани хондроцитів при взаємодії з досліджуваним препаратом

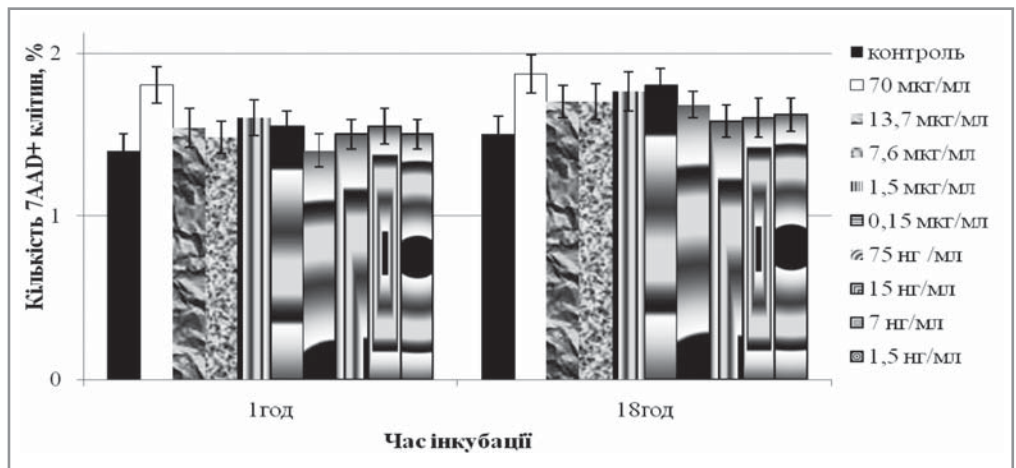


Рис. 2. Кількість хондроцитів з ушкодженим ядром при взаємодії з досліджуваним препаратом

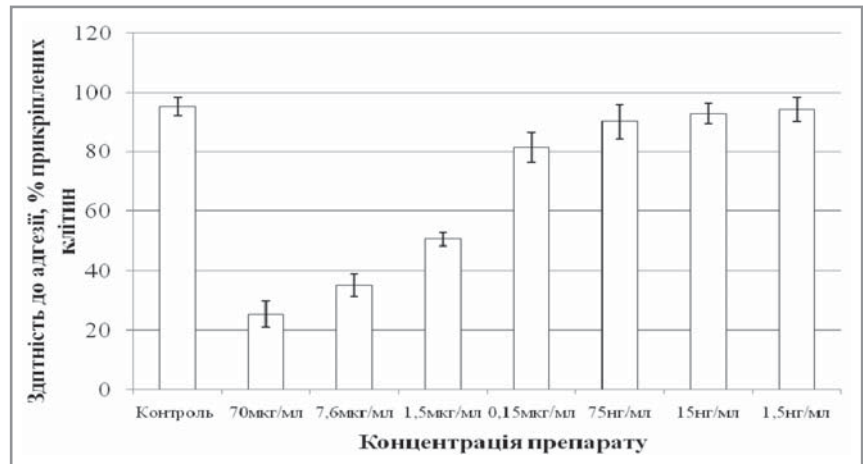


Рис. 3. Здатність до адгезії хондроцитів при взаємодії з досліджуваним препаратом (додавання при посіві), 1-ша доба культивування

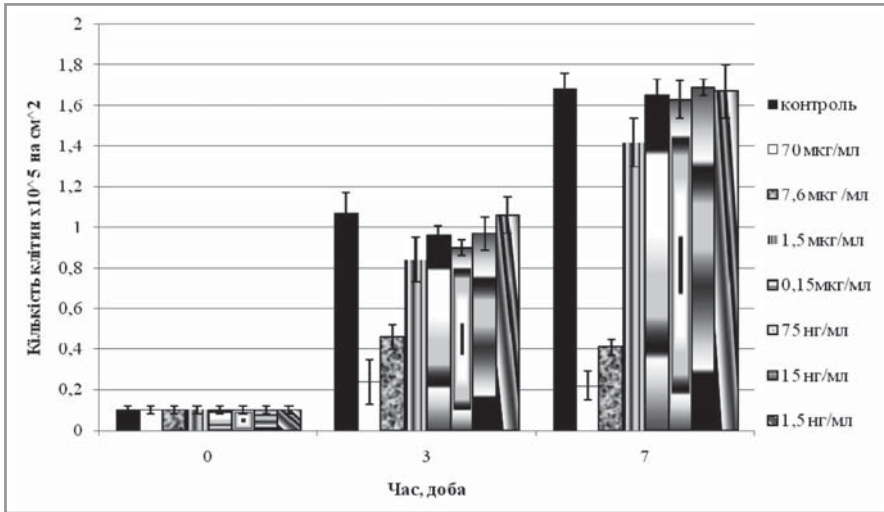


Рис. 4. Вплив препарату на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів на динаміку росту хондроцитів (додавання при посіві)

тативного знімання з культурального пластику [4]. При статистичній обробці результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і t-критерій Стьюдента за допомогою програми Excel.

Результати та їх обговорення

На першому етапі роботи було проведено дослідження наявності/відсутності токсичної дії препарату на основі концентрату

депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну. Взаємодія хондроцитів з препаратом протягом 18 годин не призводила до вірогідних змін кількості клітин з цілісною мембраною. Досліджуваний показник залишався на рівні $95,2 \pm 4,1\%$ протягом всього дослідження та всіх використаних концентрацій препарату.

Паралельно з визначенням цілісності мембрани проводили оцінку стану процесів некрозу шляхом визначення кількості клітин з дефрагментованою ДНК. Отримані результати свідчили (рис. 2), що кількість некротичних клітин при взаємодії з препаратом не перевищує $1,8 \pm 0,4\%$. Вірогідних змін токсичного впливу концентрацій препарату не встановлено.

Проведені дослідження показали, що препарат на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів не має токсичної дії на хондроцити. Інкубація клітин з дослідженим препаратом не призводить до вірогідних змін кількості клітин з ушкодженою мембраною і дефрагментованою ДНК.

Базуючись на отриманих результатах ми вважали доцільним звужити діапазон досліджуваних концентрацій, а саме – 70; 7,6; 1,5; 0,15 мкг/мл та 75; 15; 1,5 нг/мл. Другим етапом роботи було дослідження впливу препарату на здатність хондроцитів до адгезії та наступної проліферації. Отримані результати наведені

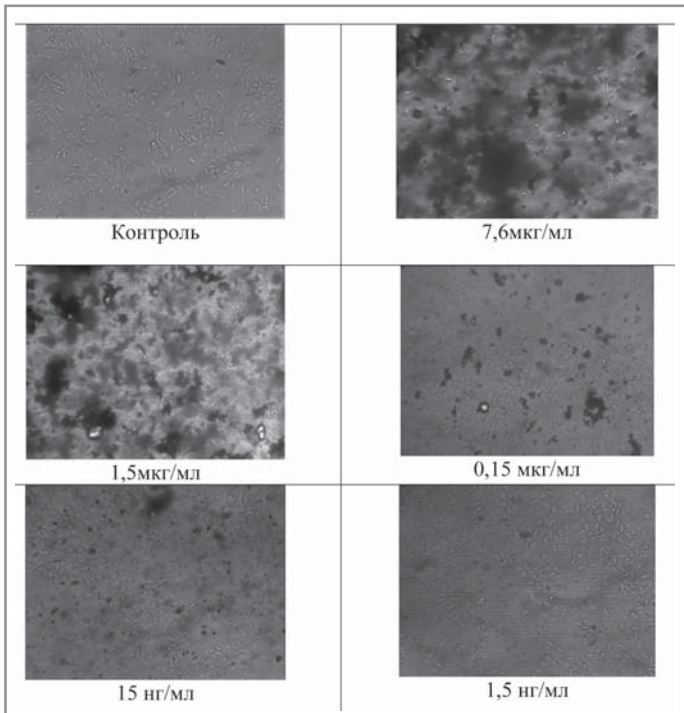


Рис. 5. Вплив препарату на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів на морфологічні характеристики хондроцитів (додавання при посіві, 3-тя доба культивування). Світлова мікроскопія, зб. $\times 200$

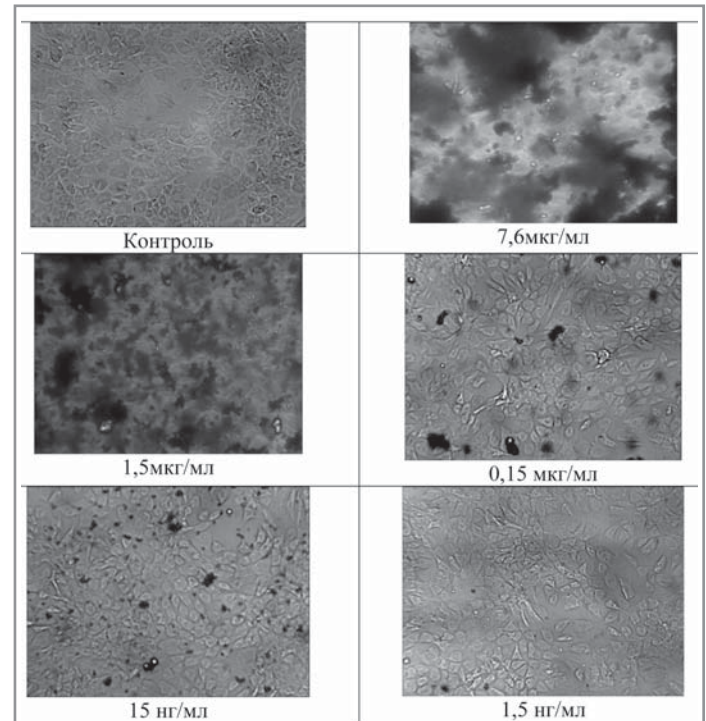


Рис. 6. Вплив досліджуваного препарату на морфологічні характеристики хондроцитів (додавання при посіві, 7-ма доба культивування). Світлова мікроскопія, зб. $\times 200$

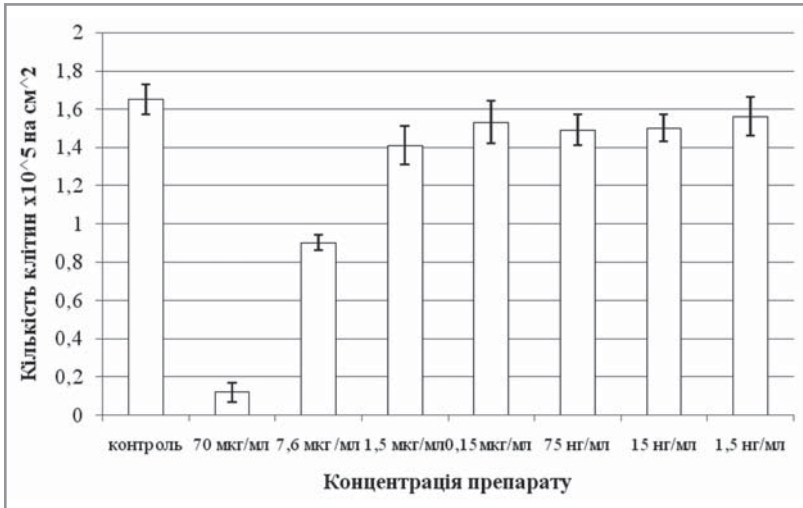


Рис. 7. Проліферативна активність хондроцитів у присутності препарату на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів (додавання на 3-тю добу культивування при острівковому рості), 7-ма доба культивування

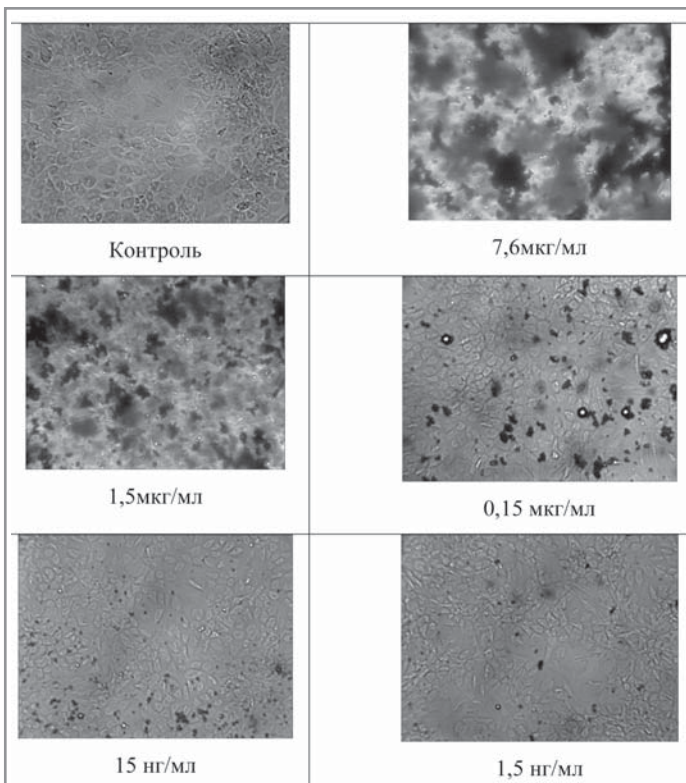


Рис. 8. Вплив досліджуваного препарату (додавання на 3-тю добу культивування при острівковому рості), 7-ма доба культивування. Світлова мікроскопія, зб. $\times 200$

на рисунку 3. Додавання препарату в середовище культивування при посіві хондроцитів в концентраційному діапазоні 70–1,5 мкг/мл призводило до зниження кількості клітин, які прикріплювались до культурального пластику. Застосування концентрацій 0,15 мкг/мл–1,5 нг/мл не викликало вірогідних змін показника,

що досліджувався, стосовно контрольних зразків (без препарату). Слід зазначити, що використання високих концентрацій препарату при культивуванні є досить проблематичним, оскільки він погано розчиняється у середовищі.

Здатність до проліферації хондроцитів при доданні концентрацій досліджуваного препарату наведені на рисунку 4. Проліферативна активність хондроцитів при подальшому культивуванні в присутності препарату в концентраціях 70–1,5 мкг/мл вірогідно знижувалась, порівняно з відповідними показниками у контролі. Застосування концентрацій 0,15 мкг/мл–1,5 нг/мл не призводило до вірогідних змін в прирості клітин на 3-ю та 7-му доби культивування.

Морфологічні характеристики хондроцитів за умов культивування (на 3 та 7 добу) з препаратом у досліджуваних концентраціях наведені на рисунках 5 та 6. При застосуванні концентрацій 70–1,5 мкг/мл спостерігали зниження кількості прикріплених клітин в полі зору та відсутність утворення моношару на 7 добу. Застосування препарату в концентраціях 0,15 мкг/мл–1,5 нг/мл не впливало на морфологію та проліферацію хондроцитів. За дослідженими характеристиками (прикріплення до культурального пластику, форма клітин, швидкість утворення моношару) клітини не відрізнялись від контролю.

В усіх досліджуваних концентраціях препарату, що додавався при посіві, на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів не призводило до підвищення адгезивної і проліферативної активності хондроцитів. При взаємодії хондроцитів з препаратом в концентраціях 70–1,5 мкг/мл спостерігали виражене зниження процесів адгезії і, як наслідок, відсутність утворення моношару, при цьому концентрації 0,15 мкг/мл–1,5 нг/мл не призводять до вірогідних змін в морфологічних характеристиках хондроцитів, порівняно з контролем.

У наступній серії експерименту додавання препарату проводили після закінчення процесів адгезії клітин та утворення 30% моношару (3 доба культивування, острівковий ріст). Оцінювали вплив препарату на приріст клітин та їх морфологію. Отримані результати наведені на рисунках 7 та 8.

Отримані дані свідчать, що додавання препарату на основі концентрату депротейнізованого дермального шару шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів при острівковому рості хондроцитів не призводить до збільшення проліферативної активності клітин. Застосування препарату в концентраціях 70–7,6 мкг/мл зумовлює пригнічення приросту клітин. При застосуванні концентрацій 0,15 мкг/мл–1,5 нг/мл досліджувані показники залишалися на рівні контролю.

Висновки

Досліджуваний препарат не має токсичної дії на хондроцити за умов інкубації впродовж 18 годин. Додавання при посіві та на 3 добу культивування в ростове середовище препарату на основі концентрату депротейнізованого дермального шару

шкіри свиней та фосфатидилхоліну з соєвих бобів в концентраціях від 70 мкг/мл до 1,5 нг/мл призводило до зниження проліферативної активності, порівняно з контролем (культивування без додавання препарату).

Застосування концентрацій від 0,15 мкг/мл до 1,5 нг/мл не впливало на ростові характеристики хондроцитів ($0,1-1,7 \times 10^5$ клітин) за умов культивування. Рекомендованою концентрацією препарату для подальших досліджень є діапазон від 0,15 мкг/мл до 1,5 нг/мл на $0,1-1,2 \times 10^5$ клітин.

Список використаної літератури

1. Некоторые вопросы патогенеза и патоморфологии ожогового шока / Р.В. Вашетко, В.А. Ильина, Е.А. Бородай, М.М. Ермолаева // Скорая медицинская помощь. – 2006. – Т. 7, №3. – С. 48–49.
2. Патент № 101235, Україна А61К9/127, А61К31/56, А61Р17/06. Спосіб отримання фармацевтичної композиції ранозагоюючої та регенеруючої дії на основі пептидів дермального шару шкіри свиней / Ф.І. Жебровська, Г.В. Костюк, Г.І. Борщевський, М.І. Борщевська, В.В. Бігуняк, №а201107335; заявл. 10.06.2011; опубл. 11.03.2013, Бюл. №5.
3. Ранозагоювальна дія препарату «Ефіаль» / Борщевський Г.І., Лісничук Н.Є. [та ін.] // Фарм. часопис. – 2013. – №3. – С. 29–34.
4. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. – М.: Мир, 1989. – 333 с.
5. Fernandes A.M., Herlofsen S.R., Karlsen T.A. et al. Similar Properties of Chondrocytes from Osteoarthritis Joints and Mesenchymal Stem Cells from Healthy Donors for Tissue Engineering of Articular Cartilage // May 2013. – Vol. 8, Issue 5. – P. 62–94.
6. Lecoeur H. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods / Lecoeur H., Ledru E., Prevost M.C., Gougeon M.L. // J. Immunol. Methods. – 1997. – Dec 1. – 209 (2). – P. 111–123.
7. Torcholin V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers / V.P. Torcholin // Nature reviews. Drugdiscovery. – 2013. – №4. – P. 145–160.

Резюме

Изучение влияния спрея на основе концентрата депротенизированного дермального слоя кожи свиней и фосфатидилхолина из соевых бобов на пролиферативные характеристики хондроцитов

Н.А. Волкова¹, А.Н. Гольцев¹, Г.И. Борщевский², М.И. Борщевская²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков
²ПАО «Фармак», Киев

В работе исследовали влияние препарата на основе концентрата депротенизированного дермального слоя кожи свиней и фосфатидилхолина из соевых бобов на пролиферативные характеристики хондроцитов в условиях культивирования. Липосомальный препарат в форме спрея был разработан ПАТ «Фармак». Исследуемый препарат не обладает токсическим действием на хондроциты. Добавление при посеве и на 3 сутки культивирования в питательную среду исследуемого препарата в концентрациях от 70 мкг/мл до 1,5 мкг/мл приводило к снижению пролиферативной активности по сравнению с контролем (культивирование без добавления препарата). Использование концентраций от 0,15 мкг/мл до 1,5 нг/мл не влияло на пролиферативные характеристики хондроцитов ($0,1-1,7 \times 10^5$ клеток) в условиях культивирования.

Ключевые слова: липосомальный спрей, пролиферативные характеристики, хондроциты

Summary

Study of Spray Based on Concentrate of Deproteinised Dermal Layer of the Skin of Pigs and Phosphatidylcholine From Soy Bean Influence on Proliferative Properties of Chondrocytes

N.A. Volkova¹, A.N. Gol'cev¹, G.I. Borschevskiy², M.I. Borschevskaya²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv,
²Farmak Joint-Stock Company, Kyiv

In the work investigated the influence of medicine based on concentrate of deproteinised dermal layer of the skin of pigs and phosphatidylcholine from soy bean on proliferative properties of chondrocytes in the conditions of cultivation. Liposome medicine in the form of spray was developed at PAT «Farmak».

The investigated medicine does not possess the toxic action on chondrocytes. Adding at sowing and on the 3-rd day of cultivation in the nourishing medium of investigated medicine in concentrations from 70 mcg/ml to 1,5 mcg/ml declined proliferative activity comparing with the control (cultivation without adding of the medicine). Using concentrations from 0,15 mcg/ml to 1,5 ng/ml does not influence on proliferative properties of chondrocytes ($1,7 \times 10^5$ cells) in the terms of cultivation.

Key words: liposome spray, proliferative properties, chondrocytes

Додаткова інформація. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.