

УДК 616.5-001.17-003.93-092.9:611.018.013.395

Д.В. Черкашина*, О.Б. Ревенко, О.Ю. Рогульська, О.Ю. Петренко

Деструктивно-репаративні процеси у шкірі щурів після опіку за присутності біорегуляторів стовбурових і прогеніторних клітин

UDC 616.5-001.17-003.93-092.9:611.018.013.395

D.V. Cherkashina*, O.B. Revenko, O.Yu. Rogulska, O.Yu. Petrenko

Destructive and Reparative Processes in Rat' Skin After Burn in Presence of Stem and Progenitor Cell Bioregulators

Ключові слова: мезенхімальні стромальні клітини, кондиційні середовища, біорегулятори стовбурових і прогеніторних клітин, термічне пошкодження шкіри, загоєння ран.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, кондиционные среды, биорегуляторы стволовых и прогениторных клеток, термическое повреждение кожи, заживление ран.

Key words: mesenchymal stromal cells, conditioned media, bioregulators of stem and progenitor cells, thermal skin injury, wound healing.

Термічні пошкодження – відома медична, соціальна й економічна проблема, яка посідає третє місце у структурі загального травматизму. Корекція опікових пошкоджень неможлива без відновлення цілісності шкірного покриву в короткий термін, коли регенераторні можливості організму ще не виснажені. Важливим критерієм для повної реконвалесценції після термічного пошкодження є повноцінне відновлення всіх шарів шкіри, що ускладнюється необхідністю вирішення не тільки фізіологічних, естетичних, а й пов'язаних із ними психологічних проблем.

На сьогодні використання мезенхімальних стромальних клітин (МСК) є одним із найефективнішим методом лікування ран, що підтверджується великою кількістю експериментальних даних [4, 7]. Однак цей підхід має недоліки, зокрема тривалий термін підготовки аутоклітин до застосування. У зв'язку з цим перспективним є використання біологічно активних речовин, які здатні впливати на репаративно-регенеративні процеси у шкірі [9]. Найбільш привабливим джерелом таких речовин, а саме біорегуляторів стовбурових та прогеніторних клітин (БСПК), є кондиційні середовища (КС), які отримують під час культивування МСК. Перевагою КС є можливість подальшого використання клітин.

Таким чином, наше дослідження було присвячене вивченню впливу застосування КС, отриманих під час

Thermal injuries are the well-known medical, social and economic problems, ranking third in general injury rate. It is impossible to correct burn injuries without restoring the skin integrity in a short time, when body's regenerative possibilities have not been yet exhausted. An integral restoration of all skin layers is an important criterion for a complete reconvalence after thermal injury, complicated by a need for solving not only physiological, aesthetic, but associated psychological problems as well.

Nowadays the use of mesenchymal stromal cells (MSCs) is nearly the most efficient method in wound therapy, as exemplified by a large number of findings [4, 7]. However, this approach has some disadvantages, in particular a long time procedure of autological cell suspension preparation for application. Due to this fact the use of biologically active substances, capable to affect reparative-regenerative processes in skin is promising [9]. The most attractive source of these substances, *i. e.* bioregulators of stem and progenitor cells (BSPCs), are the conditioned media (CM), procured during MSCs culture. The CM advantage is a possible further use of cells.

Thus, our research aim was to study the application effect of CM, procured in human dermal MSCs culture, on burn healing process in rats and regenerative potential of a recipient's skin.

Відділ кріобіохімії, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryobiochemistry, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: daria_cherkashina@ukr.net

Надійшла 26.01.2018

Прийнята до друку 19.02.2018

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: daria_cherkashina@ukr.net

Received January, 26, 2018

Accepted February, 19, 2018

© 2018 D.V. Cherkashina et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

культивування МСК дерми людини, на перебіг процесу загоєння опіків у щурів та регенераторний потенціал шкіри реципієнта.

Отримання та використання МСК людини проводилося з письмової згоди проінформованих донорів згідно з рекомендаціями Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації з проведення біомедичних досліджень. Стромальні клітини виділяли з біоптатів шкіри діаметром до 3 мм за методом експлантації фрагментів і культивували за стандартним протоколом [5]. Для колекціонування КС у культурах стромальних клітин 5–7 пасажу заміняли на 24 години живильне середовище на мінімальне, яке не містило сироватки або індукторів диференціювання. Зібрані середовища концентрували та знесолювали за допомогою фільтрів «Amicon Ultracel-3 membrane» («Merck-Millipore», Ірландія), а також стандартизували за вмістом білка. Для досліджень *in vivo* КС змішували із 1,8%-ою гіалуроновою кислотою (ГК) (Корпорація «Артеріум», Україна).

Експерименти були проведені на безпородних білих щурах-самцях (150–200 г, $n = 42$), які утримувалися за стандартних умов віварію ІПКіК НАН України. Усі маніпуляції проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Модель дермального опіку формували у щурів шляхом прикладання протягом 10 с на шкіру стегна розігрітої до 200°C мідної пластинки розміром 2,5 × 2,5 см [1].

Тварини були розділені на наступні групи: 1 – інтактна; 2 – контрольна (самостійне загоєння); 3 – тварини, яким на зону опіку наносили 0,5 г препарату порівняння «Пантестин-Дарниця» («Дарниця», Україна); 4 – тварини, яким зону опіку вкривали носієм; 5, 6 – тварини, яким на зону опіку наносили 0,5 г ГК, яка містила БСПК у складі концентрованих КС, із розрахунку 100 і 25 мкг/г носія відповідно.

За допомогою макроскопічного методу вивчали загальний стан опіків та їхню площу, яку вимірювали після фотографування ран. Для вивчення вмісту колагенів I та III типів гістологічні зрізи шкіри фарбували барвником «Picosirius Red» («Abcam», Велика Британія) [6]. Забарвлені зрізи вивчали у поляризованому світлі на мікроскопі «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина). Площу ран та кількісний вміст колагенів визначали за допомогою програмного забезпечення з відкритим кодом «ImageJ».

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми «Origin 9.1» («OriginLab Corporation», США), використовуючи непараметричний критерій

The human MSCs were procured and applied with the written informed consent of donors in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki of the World Medical Association for Biomedical Research. Stromal cells were isolated from skin biopsies of up to 3 mm diameter according to the explant method and cultured by the standard protocol [5]. To collect CM the nutrient medium in stromal cell cultures of 5–7 passages was replaced for 24 hrs to the minimum one, which contained neither serum nor differentiation inducers. The collected media were concentrated and desalinated using the Amicon Ultracel-3 membrane filters (Merck-Millipore, Ireland), and standardized by protein content. For *in vivo* studies, the CM were mixed with 1.8% hyaluronic acid (HA) (Arterium Corporation, Ukraine).

Experiments were carried out in outbred white male rats (150–200 g, $n = 42$), housed in the animal facility at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine. All the manipulations were done in accordance with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruelty’ (№ 3447-IV of February 21, 2006), in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute, agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Dermal burn was simulated in rats by applying a copper plate of 2.5 × 2.5 cm, heated to 200°C, onto femoral skin for 10 s [1].

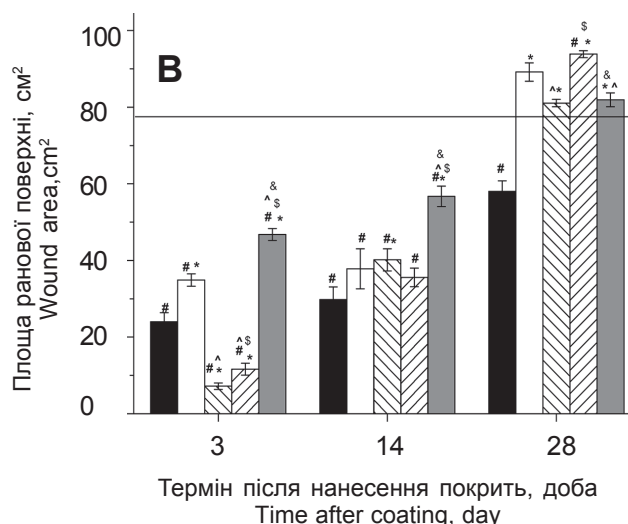
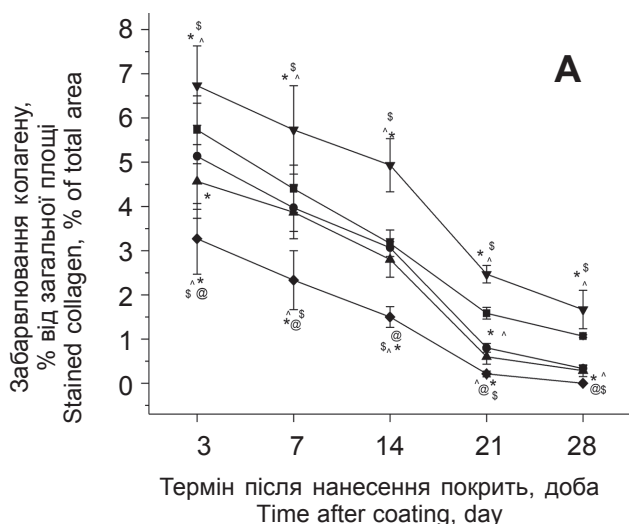
Animals were divided into the following groups: 1 – intact; 2 – control (self-healing); 3 – animals, whose burn areas were covered with 0.5 g of reference drug Pantestin-Darnitsa (Darnitsa, Ukraine); 4 – animals with burn areas covered with carrier; 5, 6 – animals with administered 0.5 g of HA, containing BSPCs within the concentrated CM, onto the burn areas, assumed as 100 and 25 µg/g of carrier, respectively.

Using macroscopic method we studied the general condition of burns and their areas, measured after wound photographing. To study the content of collagen types I and III the histological sections of skin were stained with Picosirius Red (Abcam, UK) [6]. Stained sections were studied in polarized light with Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany). The wound area and quantitative collagen content were determined using the ImageJ open source image processing program.

The findings were statistically processed with the Origin 9.1 software (OriginLab Corporation, USA) using Mann-Whitney’s non-parametric criterion. The data were expressed as $M \pm m$, the results were considered as significantly different when $p \leq 0.05$.

The formation of a large wound surface was observed in all the animals in 24 hrs after thermal injury applying. In the control the burn area reduced slowly, so to day





Вплив ранових покриттів на площу ранової поверхні (А), кількісний вміст колагенів I та III типів (В) у шкірі щурів із термічним пошкодженням; # – різниця статистично значуща порівняно з нормою; * – контрольною групою (■); ^ – групою з використанням препарату «Пантестин-Дарниця» (●); § – групою з ГК (▲); & – групою з БСПК-100 (▼) та з групою з БСПК-25 (◆), $p < 0,05$.

Effect of wound coatings on wound surface area (A) and quantitative content of collagen types I and III (B) in rat skin with thermal injuries; # – the difference is statistically significant as compared with the norm (#); * – control group (■); ^ – group with Pantestine-Darnitsa (●); § – group with HA (▲); & – group with BSPCs-100 (▼) and group with BSPCs-25 (◆), $p < 0.05$.

Манна-Уїтні. Дані виражали у вигляді $M \pm m$, значуще відмінними вважали результати при $p < 0,05$.

Через 24 години після нанесення термічного пошкодження у всіх тварин спостерігали формування значної ранової поверхні. У контролі площа опіку скорочувалася повільно, тому на 28-у добу повного загоєння не відбувалося. Після нанесення на опік «Пантестину-Дарниця» значущі відмінності з контролем було виявлено тільки на 21- та 28-у доби. У групі з ГК динаміка зменшення площі була схожою, але статистична різниця з'являлася вже на 3-ю, а потім на 21- та 28-у доби. Після застосування БСПК у дозі 100 мкг/г ГК площа рани була значуще вищою, ніж у всіх інших групах на всіх етапах експерименту. Після використання дози 25 мкг/г виявлявся дзеркальний ефект – площа рани була суттєво меншою, а швидкість загоєння значно перевищувала таку у решті експериментальних груп, і процес повністю завершувався вже на 21-у добу спостережень (рисунк, А).

У контрольній групі рани загоювалися за класичною схемою: значна плазморея на ранніх етапах, поява грануляційної тканини на 7–14-у доби експерименту; сильна запальна реакція із лейкоцитарною інфільтрацією некротично змінених осередків тканини та набряком. На 14-у добу зона ушкодження була представлена гнійно-некротичною ранною, яка відмежовувалася лейкоцитарним валом від грануляційної тканини. На 28-у добу рани епітелізувалися. У групах після нанесення «Пантестину-Дарниця» або тільки ГК

28 no complete healing occurred. After Pantestine-Darnitsa drug applying onto the burn the significant differences vs. the control were revealed to days 21 and 28 only. In HA group the dynamics of area reduction was similar, but statistical difference appeared even to day 3, and then to days 21 and 28. After using BSPCs in a dose of 100 $\mu\text{g/g}$ HA the wound area was significantly larger than in all other groups at all experimental stages. With 25 $\mu\text{g/g}$ dose we revealed a mirror effect, *i. e.* the wound area was much smaller, healing rate significantly exceeded that in all other experimental groups, and the process was completed to day 21 of observation (Figure A).

In the control group the wounds were healed by the standard scheme: high plasmorrhhea at early stages, appearance of granulation tissue to days 7–14 of experiment; strong inflammatory response with leukocyte infiltration of necrotic islets of tissue and edema. To day 14 the injured area represented a purulonecrotic wound, separated with leukocyte bank from granulation tissue. To day 28 the wounds were epithelized. In groups after applying either Pantestine-Darnitsa drug or HA only, the granulation tissue started its formation even to day 7, no plasmorrhhea was revealed, the wounds were dry. To day 28 the wounds were epithelized, but no full-layer epidermal layer was formed, and wound healing was completed by skin defect replacement with a dense scar. After covering the wound surface with HA and BSPCs in a dose of 100 $\mu\text{g/g}$, the wound surface reduction and granulation tissue formation were



грануляційна тканина починала утворюватися вже на 7-у добу, плазморея не виявлялася, рани були сухими. На 28-у добу рани епітелізувалися, однак повношаровий епідермальний пласт не сформувався, а процес загоєння ран завершувався заміщенням дефекту шкіри щільним рубцем. Після нанесення на ранову поверхню ГК із БСПК у дозі 100 мкг/г також спостерігалось скорочення ранової поверхні та формування грануляційної тканини вже на 7-у добу експерименту. Однак ці процеси були досить повільними, тому повного загоєння ран до кінця експерименту не відбувалося. Після нанесення на опікову поверхню ГК, яка містила БСПК у дозі 25 мкг/г, плазморея не виявлялася, рани були сухі та чисті, а вже на 7-у добу спостерігалось формування грануляційної тканини із ознаками епітелізації. На 21-у добу експерименту рани загоювалися повністю.

За фізіологічних умов шкіра містить біля 70% колагену I типу. Після опіку швидкий розвиток запальної реакції та повільний перехід до стадії репарації є чинником утворення рубцевої тканини, яка відбувається шляхом надмірної продукції компонентів позаклітинного матриксу [8]. Встановлено, що МСК та БСПК здатні попереджувати утворення рубців, ймовірно, шляхом регуляції продукції цитокінів, які сповільнюють міграцію патологічних фібробластів та синтез колагенів [2, 3].

На рисунку, В наведено результати кількісного аналізу вмісту колагенів I та III типів. Зріз нормальної шкіри інтенсивно та рівномірно забарвлювався «Picrosirius Red». На 3-ю добу експерименту в контролі спостерігалось значне зменшення вмісту колагену, при цьому поверхневі шари майже не забарвлювалися. Нанесення на ранову поверхню «Пантестину-Дарниця» частково попереджувало деградацію колагену, і його рівень був на 50% вище контролю. Після застосування тільки носія кількість колагену в дермі падала до рівня, значуще нижчого порівняно із усіма іншими групами. Після нанесення БСПК у дозі 100 мкг білка/г носія спостерігалася схожа картина, хоча й показник перевищував значення у групі з ГК на 60%. Використання біорегуляторів у дозі 25 мкг білка/г ГК суттєво попереджувало деградацію колагенів, що було помітно вже при візуальному аналізі: показник був нижчим від нормальних значень тільки у 1,7 рази та вищим, ніж у контролі – майже у 2 рази (рисунок, В).

На 14-у добу вміст колагенів у контролі залишався на низькому рівні. «Пантестин-Дарниця» дещо покращував стан шкіри, але було встановлено тенденцію до збільшення цього показника. Незвичайний ефект ГК нівелювався до рівня групи фармпрепарату, але забарвлення виявлялося тільки у поверхневих шарах дерми. Схожа картина була й після застосування БСПК у дозі 100 мкг/г носія, тільки забарвлення було

observed even to day 7 of experiment. However, these processes were quite slow, so no complete wound healing up to experiment end occurred. After applying HA, containing 25 $\mu\text{g/g}$ BSPCs onto the burn surface no plasmorrhhea was revealed, wounds were dry and clean, but granulation tissue formation with epithelialization signs was even observed to day 7. Wounds were completely healed to day 21 of experiment.

Under physiological conditions the skin contains about 70% of collagen type I. A rapid progress of inflammatory response and a slow passage to reparation stage after burn is a factor of scar tissue formation, which occurs through excessive production of extracellular matrix components [8]. The MSCs and BSPCs were established as able to prevent scarring, probably by regulating cytokine production, which slowed down the migration of pathological fibroblasts and collagen synthesis [2, 3].

The Figure B shows the findings of quantitative analysis of collagen types I and III content. The normal skin section was intensively and evenly stained with Picrosirius Red (Abcam, UK). A significant decrease in collagen content was observed to day 3 of experiment, here-with the surface layers were scarce scarcely stained. The wound surface covering with Pantestine-Darnitsa drug partially prevented collagen degradation, and its level was 50% higher than control. After applying the carrier only, the collagen amount in dermis fell down to the level significantly lower as compared to that in all other groups. After applying BSPCs in a dose of 100 μg protein/g of carrier, a similar pattern was observed, although the index exceeded the value in HA group by 60%. The use of bioregulators in a dose of 25 μg protein/g HA significantly prevented collagen degradation, which was noted even with visual analysis: the index was lower than normal values in 1.7 times only and higher almost twice than control (Figure B).

To day 14 the collagen content in control remained low. The Pantestine-Darnitsa drug slightly improved skin condition, but there was the tendency to this index increase. An unusual effect of HA was leveled down to the rate of group with pharmaceutical use, but staining was revealed only in surface dermal layers. A similar pattern was also observed after applying BSPCs in a dose of 100 $\mu\text{g/g}$ carrier, only staining was distributed among all the skin layers. The use of bioregulators in a dose of 25 $\mu\text{g/g}$ HA remained the most efficient: the collagen content was lower than norm by 37% only, twice and 1.5 times higher than control and other groups, respectively (Figure B).

At the end of experiment, the collagen content in control remained significantly lower the norm. The use of both Pantestine-Darnitsa drug and HA contributed to this index normalization. The BSPCs application in a dose of 100 $\mu\text{g/g}$ carrier resulted in a slight, but statis-

розподілено між всіма шарами шкіри. Використання біорегуляторів у дозі 25 мкг/г ГК залишалося найбільш ефективним: вміст колагенів був нижчим від норми тільки на 37%, вищим від контролю у 2 рази, а в інших групах – у 1,5 рази (рисунок, В).

Наприкінці експерименту вміст колагенів у контролі залишався значуще нижчим, ніж у нормі. Застосування як «Пантестину-Дарниця», так і ГК, сприяло нормалізації цього показника. Нанесення БСПК у дозі 100 мкг/г носія призводило до невеликого, але статистично значущого перевищення рівня, притаманного інтактній шкірі. Біорегулятори у дозі 25 мкг/г ГК повністю відновлювали вміст колагенів у дермі щурів (рисунок, В).

Таким чином, можна стверджувати, що БСПК у складі КС здатні ефективно попереджувати утворення рубців, зокрема шляхом стимуляції раннього відновлення фізіологічного стану позаклітинного матриксу. Збільшення дози біорегуляторів призводить до надмірного накопичення колагену, що може свідчити про перебіг патологічних процесів у дермі. Крім того, залежність ефекту БСПК від концентрації свідчить про необхідність ретельного вибору оптимальної дози біорегуляторів. Існує вірогідність, що ця доза може коливатися у значних межах залежно від етіології дефекту, а також фази деструктивно-репаративних процесів. Ці припущення вимагають більш детальних досліджень і використання інших експериментальних моделей.

Література

1. Abdullahi A., Amini-Nik S., Jeschke M. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(17): 3241–3255.
2. Du L., Lv R., Yang X. et al. Hypoxic conditioned medium of placenta-derived mesenchymal stem cells protects against scar formation. *Life Sciences* 2016; 149: 51–57.
3. Fang F., Huang R., Zheng Y. et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit the proliferative and profibrotic phenotype of hypertrophic scar fibroblasts and keloid fibroblasts through paracrine signaling. *J Dermatol Sci* 2016; 83(2): 95–105.
4. Gurtner G., Chapman M. Regenerative medicine: charting a new course in wound healing. *Adv Wound Care* 2016; 5(7): 314–328.
5. Koller M., Palsson B., Masters J. Human cell culture. Dordrecht: Springer; 2011.
6. Lattouf R., Younes R., Lutomski D. et al. Picrosirius red staining. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(10): 751–758.
7. Lim M. Use of stem cells in burn wound healing. *Science Insights* 2016; 2016(2016): 1–6.
8. Takeo M., Lee W., Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5(1): a023267–a023267.
9. Tamama K., Kerpedjieva S. Acceleration of wound healing by multiple growth factors and cytokines secreted from multipotential stromal cells/mesenchymal stem cells. *Adv Wound Care* 2012; 1(4): 177–182.

tically significant excess of the intact skin inherent level. Bioregulators in a dose of 25 $\mu\text{g/g}$ HA completely restored the collagen content in rat dermis (Figure B).

Thus, we may state that BSPPCs within CM are able for efficient prevention of scarring, in particular via stimulating an early recovery of physiological state of extracellular matrix. Increasing the dose of bioregulators results in excessive accumulation of collagen, that may testify to the course of pathological processes in dermis. In addition, the dependency of BSPPCs effect on concentration indicates the need for careful choice of the optimal dose of bioregulators. It is very likely that this dose may strongly vary, depending on defect etiology, as well as phase of destructive-reparative processes. These assumptions require more detailed research and involvement of other experimental models.

References

1. Abdullahi A., Amini-Nik S., Jeschke M. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(17): 3241–3255.
2. Du L., Lv R., Yang X. et al. Hypoxic conditioned medium of placenta-derived mesenchymal stem cells protects against scar formation. *Life Sciences* 2016; 149: 51–57.
3. Fang F., Huang R., Zheng Y. et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit the proliferative and profibrotic phenotype of hypertrophic scar fibroblasts and keloid fibroblasts through paracrine signaling. *J Dermatol Sci* 2016; 83(2): 95–105.
4. Gurtner G., Chapman M. Regenerative medicine: charting a new course in wound healing. *Adv Wound Care* 2016; 5(7): 314–328.
5. Koller M., Palsson B., Masters J. Human cell culture. Dordrecht: Springer; 2011.
6. Lattouf R., Younes R., Lutomski D. et al. Picrosirius red staining. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(10): 751–758.
7. Lim M. Use of stem cells in burn wound healing. *Science Insights* 2016; 2016(2016): 1–6.
8. Takeo M., Lee W., Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5(1): a023267–a023267.
9. Tamama K., Kerpedjieva S. Acceleration of wound healing by multiple growth factors and cytokines secreted from multipotential stromal cells/mesenchymal stem cells. *Adv Wound Care* 2012; 1(4): 177–182.

