

activity of extracts from *Acremonium* fungi. In extracts was found natural growth regulators cytokinins, auxines and gibberellins. The received extracts showed antifungal activity against fungi *Fusarium graminearum*, *Cochliobolus sativus* i *Rhizoctonia spp.* and stimulatory activity for wheat and corn plants. **Conclusions.** For the first time it is found that *Acremonium* fungi produce the natural plant growth regulators auxins, gibberellins and cytokinins. The extracts obtained from *Acremonium* fungi were individually estimated against some phytopathogenes.

Key words: *Acremonium*, *Fusarium graminearum*, *Cochliobolus sativus*, *Rhizoctonia spp.*, biological activity.

УДК 616.5:616-089.843

ПАПУГА А.Е.¹, САМЧЕНКО Ю.М.², УЛЬБЕРГ З.Р.², РУБАН Т.А.¹, КОЗИНЕЦ Г.П.³, ЛУКАШ Л.Л.¹

¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,*

Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: alexander.papuga@gmail.com

² *Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины,*

Украина, 03142, г. Киев, бульв. Акад. Вернадского, 42

³ *Центр термических поражений и пластической хирургии Киевской городской клинической больницы № 2,*

Украина, 02094, г. Киев, ул. Краковская, 13

ИСКУССТВЕННЫЙ ЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ НА ОСНОВЕ АКРИЛОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА И КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

По данным ВОЗ ожоги в мире занимают третье место среди травм разного генеза, и число потерпевших в последнее время растёт, особенно в промышленно развитых регионах. Наблюдается тенденция относительного возрастания числа тяжёлых ожоговых повреждений. Общая летальность при этом составляет 8–10 %. В Украине, где достаточно развита металлургическая, угледобывающая и химическая промышленность, проблема ожоговых повреждений весьма актуальна. Ежегодно в Украине требуется стационарное лечение ожоговой болезни для 20000 взрослых и 10000 детей.

При лечении глубоких массивных ожогов требуется хирургическое вмешательство, включающее аутотрансплантации кожи. Однако, если поверхность раны превышает 30–40 % поверхности тела, дефицит донорских ресурсов заставляет прибегать к использованию биотехнологических раневых покрытий (временных или постоянных), которые предотвращают проникновение микроорганизмов, потерю влаги, впитывают экссудат, выделяемый раневой поверхностью и могут содержать различные лекарственные препараты, способствующие процессу регенерации тканей и/или снижению болевых ощущений [1].

Мы сосредоточили своё внимание на создании эквивалентов дермального слоя кожи,

поскольку в процессе хирургического лечения тяжёлых ожоговых ран наиболее актуальным является быстрое закрытие раневых поверхностей и восстановление слоя дермы с целью обеспечения эффективного приживления аутотрансплантатов.

В Украине зарубежные биотехнологические эквиваленты кожи практически не используются, поскольку они являются слишком дорогими и поэтому недоступны для большинства пациентов. На базе ИМБГ НАНУ с 2001 года проводятся исследования по разработке дермальных эквивалентов кожи, имеющих в своём составе стволовые клетки человека. Эти биоконструкции способны действовать как временные биологически активные покрытия для раны, обеспечивающие компоненты экстрацеллюлярного матрикса, цитокины и факторы роста [2, 3]. Благодаря этому стимулируется миграция клеток организма-реципиента в область раны, их пролиферация, регенерация дермального слоя и реэпителизация раны, «кондиционирование» ложа раны для использования кожных трансплантатов. Благодаря этому по сравнению с бесклеточными биоактивными раневыми покрытиями снижается время заживания раны и ингибируется шрамообразование [4].

В качестве носителей клеток (scaffolds) используются разнообразные материалы как синтетического, так и естественного

происхождения. Целью нашей работы является создание новых усовершенствованных биоконструкций «биоматрикс + клетки» с использованием искусственных и природных органических материалов разного типа и клеток человека.

Материалы и методы

Ранее нами были синтезированы и апробированы гидрогелевые покрытия на основе сшитого сополимера акриламида и акрилонитрила, имеющие определённый гидрофильно-гидрофобный баланс и полученные посредством радикальной сополимеризации [5, 6]. Данные гидрогели не являются цитотоксичными для клеток, через сутки после посева клеток на соответствующие гидрогелевые подложки наблюдалось прикрепление и распластывание клеток на поверхности с последующим размножением до образования монослоя [7]. Указанные гидрогелевые покрытия хорошо зарекомендовали себя в медицинской практике при лечении глубоких и массивных ожогов. В данной работе в состав указанных гидрогелей были дополнительно введены наночастицы или ионы металлов. В качестве клеточного компонента использовались: а) стволовые клетки человека линии 4BL; б) первичные фибробласты кожи человека.

В данной работе мы проводили исследования с включением в состав гидрогелей наночастиц серебра или ионов цинка и марганца. Изучались иммобилизация, адгезия и пролиферация клеток в зависимости от введения в состав гидрогелей наночастиц или ионов металлов.

Результаты и обсуждение

Эксперименты *in vitro* показали, что синтезированные сополимерные гидрогели нетоксичны для клеток, являются прочными, эластичными и прозрачными, их пористость обеспечивает способность абсорбировать излишний тканевый экссудат. Кроме того, весьма важным свойством сополимерных гидрогелей на основе акриловых мономеров является их способность к иммобилизации различных биологически активных веществ. Включение в состав гидрогелей наночастиц серебра, ионов цинка и марганца призвано

способствовать пролиферации клеток в составе биоконструкций, а также стимулировать естественные регенеративные процессы в повреждённых тканях ожоговых ран.

Наиболее детально было изучено влияние наночастиц серебра, адсорбированного на силикагеле или в виде коллоидных частиц на клетки человека 4BL (рис. 1). Показано, что введение комплекса серебра и силикагеля приводило к стимуляции размножения клеток на поверхности гидрогелевой мембраны, при этом наиболее эффективной была концентрация серебра 100 мкг/г массы сухого вещества. Дальнейшее увеличение концентрации серебра приводило к снижению количества выросших клеток. Более эффективным в отношении стимуляции пролиферации клеток линии 4BL оказалось коллоидное серебро, статистически достоверный эффект увеличения числа клеток зарегистрирован при концентрации серебра 25 мкг/г массы сухого вещества.

При концентрации серебра 25 мкг/г (рис. 2, Б) уже на 3-й день культивирования отмечено формирование конфлюэнтного клеточного монослоя на поверхности гидрогеля в отличие от контроля, где наблюдались лишь островки делящихся клеток (рис. 2, А). Увеличение концентрации коллоидного серебра до 250 мкг/г приводило к формированию клеточных агрегатов и, возможно, цитотоксическому эффекту (рис. 2, В).

По предварительным данным обнаружена тенденция стимуляции пролиферации клеток под влиянием ионов цинка и марганца при концентрациях 0,5 и 0,9 мкг/г соответственно.

Выводы

Наиболее значительный эффект стимуляции пролиферации клеток зарегистрирован при введении коллоидного серебра с концентрацией 25 мкг/г в состав умеренно гидрофобного и, в то же время, достаточно гидрофильного гидрогеля на основе сополимера акриламида и акрилонитрила. Наночастицы серебра, адсорбированные на поверхности силикагеля, оказались менее эффективными и вызывали стимуляцию пролиферации при использовании значительно большей концентрации 100 мкг/г массы сухого вещества.

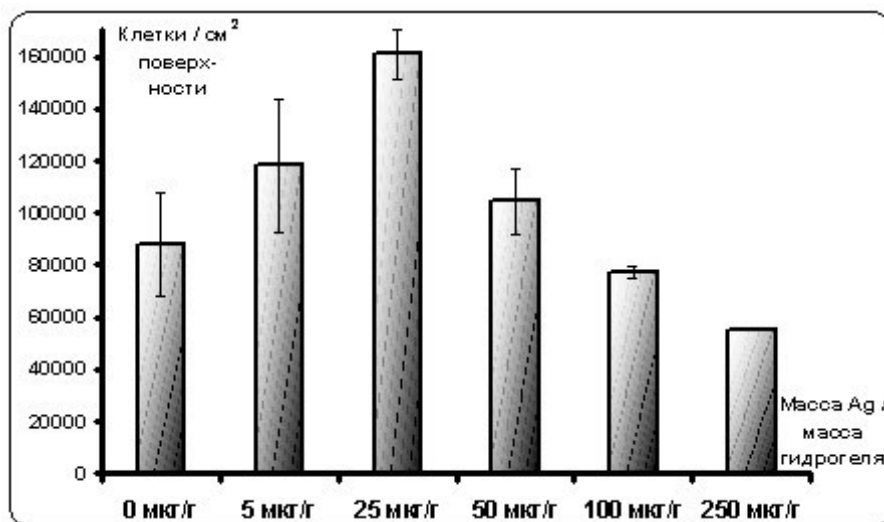


Рис 1. Влияние наночастиц металлического коллоидного серебра в составе полиакриламидного гидрогеля на пролиферацию культивируемых клеток 4BL

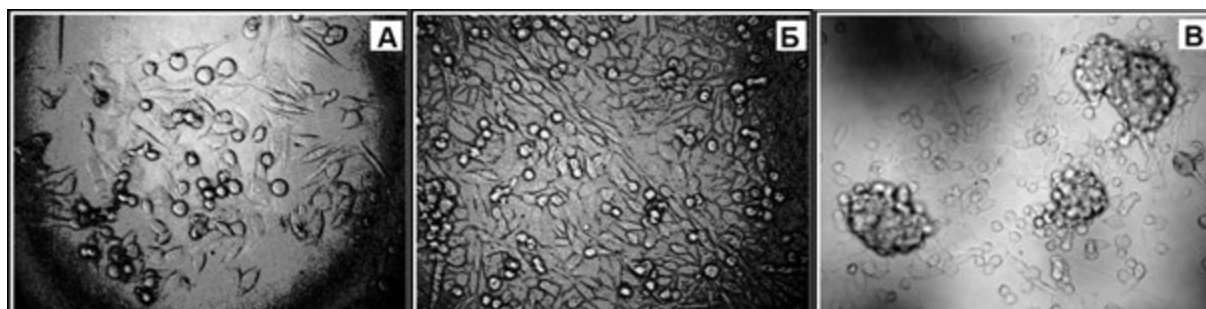


Рис.2. Общий вид клеток 4BL на 3-й день культивирования на поверхности сополимерного гидрогеля на основе акриламида и акрилонитрила, содержащего наночастицы металлического коллоидного серебра

Литература

1. Gynter C.I., Machens H.G. New strategies in clinical care of skin wound healing // *Eur Surg Res.* – 2012. – 49, N 1. – P. 16–23.
2. Eaglstein W.H., Falanga V. Tissue engineering for skin: an update // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 1998. – 39, N 6. – P. 1007–1010.
3. Ehrenreich M., Ruszczak Z. Update on tissue-engineered biological dressings // *Tissue Eng.* 2006. – 12, N 9. – P. 2407–2424.
4. Still J., Glat P., Silverstein P., Griswold J., Mozingo D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients // *Burns.* – 2003. – 29, N 8. – P. 837–841.
5. Косенко О.О., Лукаш Л.Л., Самченко Ю.М., Рубан Т.А., Ульберг З.Р., Лукаш С.И. Кополімерні гідрогелеві мембрани для іммобілізації і культивування стовбурових клітин людини // *Biopolymers and cell.* – 2006. – 22, № 2. – С. 143–148.
6. Самченко Ю.М., Лукаш Л.Л., Косенко О.О., Ульберг З.Р., Рубан Т.А., Козинець Г.П. Біосумісний гідрогель біомедичного призначення та спосіб його одержання. Патент України на винахід № а2006 07473 від 10.01.08. Бюл. № 1.
7. Косенко О.О., Лукаш Л.Л., Самченко Ю.М., Рубан Т.А., Лукаш С.І., Ульберг З.Р., Галаган Н.П. Штучний еквівалент шкіри на основі кополімерних гідрогелевих мембран з іммобілізованими мезенхімальними стовбуровими клітинами людини // *Biopolymers and cell.* – 2006. – 22, № 6. – С. 446–451.

PAPUGA A.YE., SAMCHENKO YU.M., ULBERG Z.R., RUBAN T.A., KOZINETS G.P., LUKASH L.L.

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: alexander.papuga@gmail.com.

² F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloids Chemistry of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03142, Kyiv, Acad. Vernadsky boulevard, 42

³ Centre of thermal injuries and plastic surgery in Kiev City Clinical Hospital № 2, Ukraine, 02094, Kyiv, Cracow str., 13

THE ARTIFICIAL SKIN EQUIVALENT BASED ON ACRYLIC HYDROGEL WITH IMMOBILIZED SILVER NANOPARTICLES AND HUMAN CELLS

Aims. The purpose of this work was to create new and improved dermal equivalents which could be used for therapy of massive burns. **Methods.** As the scaffolds we used polyacrylamide hydrogels. Additional components (nanoparticles or metal ions) were added into the hydrogels. Biocompatibility of obtained specimens and their influence on cell survival was investigated by using microscopic examinations and cytochemical staining. As a cell component of the dermal equivalents we used: 1) original cell line 4BL; 2) primary human skin fibroblasts. **Results.** I was obtained maximum stimulation of cell proliferation at the presence in scaffold of colloid silver at the concentration of 25 ug/g dry weight. **Conclusions.** A positive effect of silver nanoparticles in the composition of hydrogels on cell survival and proliferation was demonstrated.

Key words: scaffold, dermal equivalents, human cells, hydrogel, burn.

УДК 575.127

РАТУШНЯК Я.І., ДУПЛІЙ В.П.

Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: yakivr@yahoo.com

ДЕЯКІ ОСОБЛИВОСТІ РИЗОГЕНЕЗУ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL., *LYCOPERSICON PERUVIANUM* VAR. *DENTATUM* DUN. ТА ЇХ ЦИБРИДІВ

Ризогенез як процес коренеутворення *in vitro* відбувається в два етапи. Спочатку на експлантах формуються ризоїдні горбики, а потім з них розвиваються корені. Цей процес можна індукувати практично для кожного органу, тканини чи калюсу за допомогою додавання ауксинів. Спонтанний ризогенез є більш вибірковим щодо типу експланта і, як правило, можливий лише для тих органів рослин, які здатні укорінюватися *in vivo*. Це стосується в першу чергу стеблових пагонів, що можуть укорінюватись без присутності відповідних фітогормонів. Проблемі ризогенезу *in vitro* як одному з видів морфогенезу вищих рослин присвячено чимало досліджень, проте вона залишається актуальною до останнього часу. Особливо це стосується декоративних та лікарських рослин, які є комерційно привабливими для розробки технологій їх мікроклонального розмноження [1–3]. Ще більш гостро стоїть питання щодо створення ефективних протоколів укорінення деревних видів рослин, зокрема лісових, плодово-ягідних

та горіхових культур, що мають значну господарську та харчову цінність [4–7].

Генетичний контроль ризогенезу здійснюється чималою кількістю ядерних генів. Останнім часом ідентифіковано більше 10 генів, які кодують протеїни відповідальні за певні етапи розвитку кореневої системи, зокрема за ініціацію та ріст у довжину головного, бокових коренів чи кореневих волосків або ж, навпаки, за їх редукцію [8]. Один з таких протеїнів, що індукуює елонгацію корончатих та бокових коренів *Oryza sativa*, має постійну мітохондріальну локалізацію [9]. Зважаючи на цивілізаційне прагнення людства до перманентного збільшення продуктивності агрономічно важливих видів рослин, зокрема зернових культур, інтерес до системного генетичного аналізу ознак, пов'язаних з розвитком їх кореневої системи, буде лише зростати [10].

У даній роботі ми вивчали особливості індукованого та спонтанного ризогенезу *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* var.