

DOI: 10.26693/jmbs04.04.280

УДК 611.013.395:577.336:616.5-001.41-092.4

Тихвинская О. А.¹, Роговская Е. Ю.¹,
Васильев Р. Г.², Петренко Ю. А.¹

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛНОСЛОЙНЫХ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЖНЫХ РАН У МЫШЕЙ

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины, Харьков, Украина

²ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев, Украина

tikhvin71@gmail.com

Мезенхимальные стромальные клетки улучшают регенерацию кожи и способствуют ремоделированию внеклеточного матрикса, благодаря иммуномодулирующему и регуляторному действию. В работе визуализировали меченные зеленым флуоресцирующим белком мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани на поверхности полнослойных эксцизионных кожных ран у мышей и оценивали время их жизни методом конфокальной флуоресцентной микроскопии.

На поверхность экспериментальных кожных ран наносили 200-250 тыс. жизнеспособных или летально поврежденных клеток, меченных зеленым флуоресцирующим белком в плазменном геле. Летальное повреждение достигалось путем быстрого замораживания до температуры жидкого азота и быстрого отогрева в среде без криопротекторов. Повреждение клеточной мембраны подтверждалось окрашиванием трипановым синим. Флуоресцентный анализ срезов эксцизионных ран выполнялся через 30 минут после нанесения, затем на 1-е, 3-и и 5-е сутки. Репаративную активность мезенхимальных стромальных клеток оценивали планиметрическим методом на 3, 7 и 14 день эксперимента. Установлено, что трансфицированные меченные зеленым флуоресцирующим белком позитивные клетки, нанесенные на рану, выживали и сохраняли флуоресценцию в течение 5 дней. Гибель клеток сопровождалась полной потерей свечения. Применение мезенхимальных стромальных клеток с высокой жизнеспособностью ускоряло закрытие ран у мышей на 12-14% по сравнению со спонтанным заживлением (контрольная группа) на 3-й день исследования. Положительный репаративный эффект сохранялся в течение 7-ми дней, тогда как летально поврежденные клетки оказывали кратковременное стимулирующее действие.

Таким образом, результаты, полученные в ходе планиметрических измерений и подсчета процента закрытия ран, сочетаются с данными флуоресцентного анализа. Полученные результаты указывают на то, что скорость заживления ран зависит от жизнеспособности мезенхимальные стромальные клетки и коррелирует со сроком их выживания *in vivo*.

Ключевые слова: флуоресценция, зеленый флуоресцентный белок, мезенхимальные стромальные клетки, эксцизионные раны.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Данная работа является фрагментом НИР «Низькотемпературне консервування стовбурових клітин у складі тривимірних структур», № государственной регистрации 0112U003132.

Введение. Заживление ран представляет собой сложный многофакторный процесс, включающий этапы воспаления, образования грануляционной ткани, реэпителизации и ангиогенеза [8, 14]. Однако нормальное течение процесса ранозаживления нарушается при ряде хронических заболеваний, например, при сахарном диабете или почечной недостаточности.

Многочисленные исследования показали, что применение мезенхимальных стромальных клеток (МСК) благоприятно влияет на регенерацию кожи, оказывая иммуномодулирующее действие и способствуя ремоделированию внеклеточного матрикса. МСК ускоряют закрытие ран и реэпителизацию, усиливают ангиогенез, а, следовательно, образование и созревание грануляционной ткани [7].

В ряде работ показано, что МСК, доставленные в поврежденную область, секреторируют цитокины и факторы роста, которые обеспечивают создание благоприятного микроокружения для заживления ран [1, 9, 10, 13]. Кроме того, МСК стимулируют

рекрутирование и дифференцировку эндогенных стволовых клеток, что способствует восстановлению окружающих тканей.

Несмотря на многочисленные работы, подтверждающие ускорение ранозаживления, вопрос о локализации и времени выживания МСК при нанесении на раневую поверхность остается малоизученным и требует отдельного рассмотрения. С момента открытия зеленого флуоресцирующего белка ЗФБ (Нобелевская премия, 2008г.) стало возможным наблюдать живые клетки в движении и оценивать ответ организма на различные стимулы. В отличие от других флуоресцентных меток, ЗФБ для свечения не нужны никакие вспомогательные вещества, кроме молекулярного кислорода, поэтому клетка остаётся живой и неповреждённой. Кроме того, в отличие от других красителей, ЗФБ – это достаточно малая белковая молекула, синтез которой не влияет на функции трансфицированной клетки с флуоресцентной меткой. Таким образом, изучение жизнеспособности клеток в тканях, с помощью ЗФБ, имеет большие перспективы в клеточной биологии.

Целью данного исследования была визуализация ЗФБ меченных мезенхимальных стромальных клеток на поверхности полнослойных эксцизионных кожных ран у мышей и определение их выживаемости методом конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Материал и методы исследования. Эксперименты на животных были проведены в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447-IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований Комитета по биоэтике Института, согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

МСК, полученные из жировой ткани мышей линии FVB-Cg-Tg (GFPU) 5Nagy, трансгенных по зеленому флуоресцентному белку (ЗФБ), наносили на поверхность эксцизионных кожных ран. Для этого локальной доставки клетки заключали в гель на основе плазмы крови (ГП) в соответствии с методом [11]. Время полимеризации геля в ране составляло 15 минут. В качестве отрицательного контроля использовали летально поврежденные ЗФБ позитивные МСК. Летальное повреждение достигалось 3-5 кратным циклом быстрого замораживания до температуры жидкого азота и быстрого отогрева в среде без криопротекторов. В результате этой процедуры целостность мембран клеток нарушалась, что подтверждалось окрашиванием трипановым синим. Флуоресценцию ЗФБ позитивных клеток исследовали при помощи конфокально-

го микроскопа Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия).

Полнослойные эксцизионные кожные раны моделировали на мышках-самцах линии Balb/c 5-6 месячного возраста. После введения мышей в наркоз в лопаточной области с помощью дермопанча диаметром 6 мм одновременно получали 2 полнослойные раны [5,17]. Контракцию предотвращали, фиксируя края ран с помощью полимерного медицинского пластыря (Dr. House, Китай) и клея БФ-6 (Лубныфарм, Украина).

На экспериментальные эксцизионные раны наносили 200-250 тыс. жизнеспособных или летально поврежденных ЗФБ позитивных МСК в плазменном геле. Контролем служили раны, поверхность которых заполняли ГП без клеток. Таким образом, эксцизионные раны (n=30) были распределены на 3 группы: 1 – контроль (К), самостоятельно заживающие раны; 2 – раны с нанесением культивированных жизнеспособных МСК (Ж-МСК) в ГП; 3 – раны с нанесением летально поврежденных МСК (ЛП-МСК) в ГП.

Присутствие клеток в ранах отслеживали через полчаса, на 1-е, 3-и и 5-е сутки. Для этого кожные лоскуты из области раны иссекали и исследовали без дополнительных манипуляций с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). До окончания эксперимента раны закрывали полупроницаемой пленкой (Tegaderm Film, Германия), поверх которой накладывали повязки из эластичного бинта (Coban, Германия). Мыши содержались в индивидуальных клетках в стандартных условиях вивария.

Скорость заживления оценивали планиметрическим методом. Измерение площади ран проводили на фотоснимках, полученных с использованием фотокамеры Digital IXUS 80 IS (Canon, Япония). Для анализа фотографий применяли программу ImageJ v. 1.5b (National Institutes of Health, США). Процент закрытия раневой поверхности оценивали по формуле:

$$\frac{S_0 - S_t}{S_0} \times 100\%,$$

где S_0 – начальная площадь раны; S_t – площадь раны на день t .

Измерения проводили на 3-и, 7-е сутки, так как на эти сроки приходится активное образование и созревание грануляционной ткани, а также начальные этапы эпителизации ран.

Нормальность распределения полученных результатов оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Учитывая нормальное распределение, данные выражали как среднее значение \pm стандартное

отклонение. Для оценки достоверности различий между группами использовался t-критерий Стьюдента для независимых переменных. Достоверно отличными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Перед проведением экспериментов *in vivo* флуоресцентно светящиеся ЗФБ позитивные клетки были исследованы *in vitro*. Культивированные клетки, нанесенные на предметное стекло, излучали яркое зеленое флуоресцирующее свечение (рис. 1А). После 3-х циклов быстрого замораживания и быстрого отогрева все клетки окрашивались витальным красителем трипановым синим, что свидетельствовало о повреждении плазматической мембраны. Нарушение целостности клеток сопровождалось потерей флуоресценции (рис. 1Б).

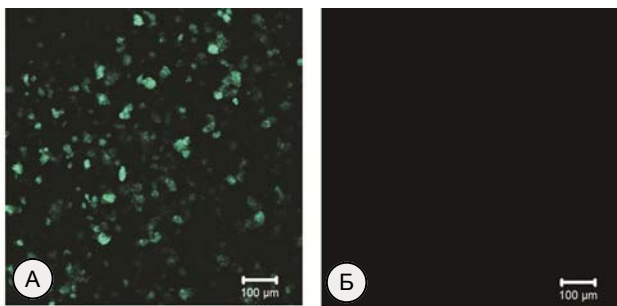


Рис. 1. Флуоресцирующие ЗФБ позитивные клетки на поверхности предметных стекол:
А – жизнеспособные; Б – летально поврежденные

Эти данные согласуются с результатами работы [16], в которой показано, что гибель клеток как путем апоптоза, так и некроза, сопровождается потерей флуоресценции ЗФБ. При этом в результате гибели путем некроза - а именно такой механизм повреждения клеток использован в настоящей работе - потеря флуоресценции происходила очень быстро.

На основании полученных результатов можно предположить, что ЗФБ конструкции могут быть использованы для определения жизнеспособности клеток. Действительно, в работе [3] было установ-

лено, что гашение флуоресценции клеток аденокарциномы 3230, трансфицированных ЗФБ, после замораживания-оттаивания строго коррелировало с двумя независимыми известными методами определения жизнеспособности - трипановым синим и бромистым этидием (коэффициент корреляции составлял 0,95 и 0,97, соответственно).

В ходе исследования *in vivo* было установлено, что при нанесении меченых клеток на эксцизионные кожные раны, флуоресценция также выявлялась только у живых ЗФБ позитивных МСК и не обнаруживалась при нанесении летально поврежденных клеток.

Флуоресцентный анализ срезов эксцизионных ран выполнялся через 30 минут после нанесения, затем на 1-е, 3-и и 5-е сутки. Через 30 минут после нанесения по всей поверхности раны были обнаружены ярко флуоресцирующие жизнеспособные клетки сферической формы. Распределение клеток внутри геля было равномерным (рис. 2А). Спустя сутки морфология МСК изменялась, клетки распластывались и были сгруппированы по несколько штук. На следующий срок наблюдения (3-и сутки) ЗФБ позитивных клеток было значительно меньше. Располагались они в виде достаточно крупных однородных скоплений, чередуясь с темными участками поверхности раны. К пятому дню эксперимента ярко светящиеся ЗФБ-позитивные клетки практически не обнаруживались.

Таким образом, проведенные исследования показали, что клетки остаются жизнеспособными до 5 суток после нанесения на поверхность раны, что подтверждалось наличием характерного флуоресцирующего свечения.

В многочисленных исследованиях о влиянии МСК на ранозаживление показано, что применение этого клеточного материала ускоряет образование и созревание грануляционной ткани, главным образом за счет активного ангиогенеза, а также существенно увеличивает скорость эпителизации поврежденных участков кожи [6, 12, 15, 18]. Считается, что стимулирующее действие МСК главным образом обусловлено не замещением

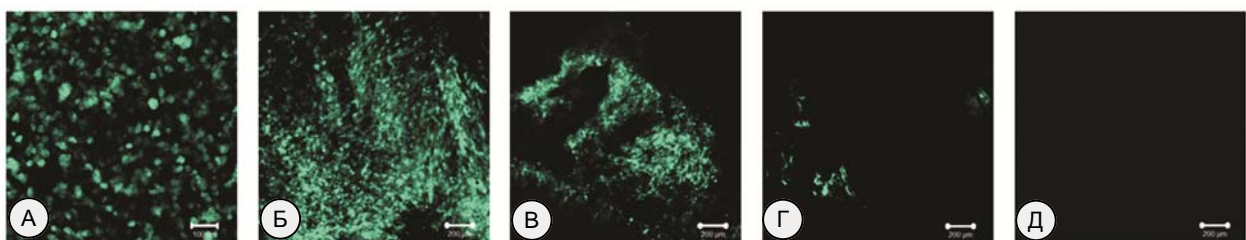


Рис. 2. Флуоресцирующие ЗФБ позитивные клетки на срезах кожных ран:
А – через 0,5 часа после нанесения; Б – через 1 сутки; В – 3- сутки; Г – 5-е сутки;
Д – летально поврежденные клетки

дефекта дифференцирующимися клетками, а паракринным действием экспрессированных ими продуктов. Паракринный эффект МСК стимулирует иммуномодуляцию, ангиогенез, антиапоптоз, антирубцевание, хемоаттракцию и пр. [2, 6, 12, 15].

В ходе нашего эксперимента, планиметрические исследования выявили стимулирующее действие МСК в составе ГП на скорость закрытия эксцизионных ран на 3-и и 7-е сутки после введения клеток (табл.). Вместе с тем, при нанесении летально поврежденных клеток увеличение скорости закрытия ран обнаруживалось только на 3-е сутки, а к 7-м суткам практически не отличалось от контроля (самостоятельного заживления).

Таблица – Закрытие раневой поверхности эксцизионных кожных ран (%) при самостоятельном заживлении (контроль) и при нанесении ЖС-МСК и ЛП-МСК

Дни	Контроль	ЖС-МСК	ЛП-МСК
0	0	0	0
3	16,9±5,6%	29,5±4,9%*	21,1±5,9%*^
7	38,5±5,5%	52,2±5,1%*	40,6±5,7% [^]
14	96,6±3,2%	98,6±3,5%	98,7±1,2%

Примечание: * - $p \leq 0,05$ по отношению к самопроизвольному заживлению на соответствующие сутки наблюдения; ^ - $p \leq 0,05$ по отношению к живым МСК на соответствующие сутки наблюдения.

Как видно из **таблицы**, процент закрытия ран в обеих группах с МСК на 3-и сутки был существенно выше, чем в контрольной группе и составлял 29,5±4,9% для ЖС-МСК и 21,1±5,9% для ЛП-МСК, тогда как в контрольной группе показатель не превышал 16,9±5,6%. К 7-м суткам эксперимента скорость закрытия ран была сопоставима в группах ЛП-МСК и самостоятельного заживления (40,6±5,7% и 38,5±5,5%), тогда как в группе с ЖС-МСК полученные результаты были на 12-14% выше. На 14-е сутки наблюдения у животных отмечалась практически полная эпителизация раневой поверхности, и разницы между экспериментальными группами выявлено не было.

Эти результаты позволяют предположить, что в ранах, обработанных культивированными МСК, клетки оставались живыми в течение более длинного отрезка времени и все это время продолжали функционировать, оказывая паракринный эффект на окружающие клетки и ткани, тем самым положи-

тельно влияя на процесс заживления. В ранах с внесенными поврежденными клетками стимулирующий эффект наблюдался только в первые трое суток, что может служить доказательством ограниченного воздействия паракринных факторов. Данные, полученные в ходе планиметрического измерения и подсчета процента закрытия ран, сочетаются с результатами флуоресцентного анализа, который выявил сохранение жизнеспособности МСК до 4-5 суток. Летально поврежденные клетки, в свою очередь, лишь кратковременно стимулировали ранозаживление.

Полученные нами результаты согласуются с данными работ [4, 19], в которых была показана эффективность сочетанного использования МСК и ГП при лечении ожоговых и хронических незаживающих кожных ран. В настоящей работе показано, что стимулирующее влияние МСК на процессы закрытия ран проявляется на начальных этапах ранозаживления и зависит от жизнеспособности клеток. Более выраженное действие ЖС-МСК очевидно обусловлено тем, что клетки длительное время сохраняют жизнеспособность на поверхности раны, вырабатывая и секретируя биологически активные вещества. В то же время действие поврежденных клеток кратковременно, так как ограничивается лишь внутриклеточным содержанием ростовых факторов, которые высвобождаются на раневую поверхность при нанесении.

Выводы

1. Флуоресценция ЗФБ позитивных МСК выявляется только у жизнеспособных клеток и исчезает при их повреждении.
2. ЗФБ позитивные клетки при нанесении на эксцизионные кожные раны сохраняли жизнеспособность в течение 5 дней.
3. МСК оказывают стимулирующий эффект на ранозаживление эксцизионных кожных ран у мышей.
4. Скорость заживления ран зависит от жизнеспособности МСК и коррелирует со сроком их выживания *in vivo*.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейших исследованиях планируется изучить выживаемость МСК и процесс ранозаживления при внесении клеточных элементов на поверхность эксцизионных кожных ран в составе макропористых крионосителей, полученных из плазмы.

References

1. Couture P, Paradis-Massie J, Oualha-Morin N, Thibault G. Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2009; 315(13): 2192–206. PMID: 19394331. DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.04.013
2. Duscher D, Barrera J, Wong VW, Maan ZN, Whittam AJ, Januszyk M, et al. Stem cells in wound healing: the future of regenerative medicine? A mini-review. *Gerontology.* 2015; 62(2): 216-25. PMID: 26045256. DOI: 10.1159/000381877
3. Elliott G, McGrath J, Crockett-Torabi E. Green fluorescent protein: A novel viability assay for cryobiological applications. *Cryobiology.* 2000 Jun; 40(4): 360-9. PMID: 10924267. DOI: 10.1006/cryo.2000.2258

4. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, et al. Autologous bone marrow–derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Engineering*. 2007; 13(6): 1299-312. PMID: 17518741. DOI: 10.1089/ten.2006.0278
5. Galiano RD, Michaels J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Rep Reg*. 2004; 12(4): 485-92. PMID: 15260814. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x
6. Kanji S, Das H. Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017: 5217967. PMID: 29213192. PMCID: PMC5682068. doi: 10.1155/2017/5217967
7. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Hongjie D, Chu W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS One*. 2014; 9(2): 1–8. PMID: 24586314. PMCID: PMC3930522. DOI: 10.1371/journal.pone.0088348
8. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121(1): 50–8. PMID: 18176205. DOI: 10.1097/01.prs.0000293876.10700.b8
9. Luo G, Cheng W, He W, Wang X, Tan J, Fitzgerald M, et al. Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Wound Rep Regen*. 2010; 18(5): 506–13. PMID: 20840520. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2010.00616.x
10. Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Transpl*. 2011; 20: 205–16. PMID: 20719083. DOI: 10.3727/096368910X520065
11. Obata S, Akeda K, Imanishi T, Masuda K, Bae W, Morimoto R, et al. Effect of autologous platelet–rich plasma–releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study. *Arthritis Research & Therapy*. 2012; 14(6): 1-11. PMID: 23127251. PMCID: PMC3674597. DOI: 10.1186/ar4084
12. Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 23; 16(10): 25476-501. PMID: 26512657. PMCID: PMC4632811. doi: 10.3390/ijms161025476
13. Ojeh NO, Navsaria HA. An in vitro skin model to study the effect of mesenchymal stem cells in wound healing and epidermal regeneration. *J Biomed Mater Res Part A*. 2013; 102: 2785–92. PMID: 24115470. DOI:10.1002/jbm.a.34950
14. Ryu CH, Park SA, Kim SM, Lim JY, Jeong CH, Jun JA, et al. Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 398: 105–10. PMID: 20558135. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.043
15. Shingyochi Y, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2015; 15(9): 1285-92. PMID: 26037027. doi: 10.1517/14712598.2015.1053867
16. Strebel A, Harr T, Bachmann F, Wernli M, Erb P. Green fluorescent protein as a novel tool to measure apoptosis and necrosis. *Cytometry*. 2001 Feb 1; 43(2): 126-33. PMID: 11169577. doi: 10.1002/1097-0320(20010201)43:2<126::AID-CYTO1027>3.0.CO;2-J
17. Tykhvynska OO, Rogulska OY, Volkova NO, Revenko OB, Mazur SP, Volina VV, et al. The effect of human adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in the fibrin gel on the healing of full-thickness skin excision wounds in mice. *Cell Organ Transplantation*. 2017; 5(1): 11-3. doi: 10.22494/cot.v5i1.65
18. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 2007; 25(10): 2648-59. PMID: 17615264. DOI:10.1634/stemcells.2007-0226
19. Yang Y, Zhang W, Li Y, Fang G, Zhang K. Scalded skin of rat treated by using fibrin glue combined with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells. *Annals of Dermatology*. 2014; 26 (3): 289-95. PMID: 24966626. PMCID: PMC4069637. DOI: 10.5021/ad.2014.26.3.289

УДК 611.013.395:577.336:616.5-001.41-092.4

ФЛУОРЕСЦЕНТНА ВІЗУАЛІЗАЦІЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН НА ПОВЕРХНІ ПОВНОШАРОВИХ ЕКСЦИЗІЙНИХ ШКІРНИХ РАН У МИШЕЙ

Тихвинська О. О., Рогульська О. Ю., Васильєв Р. Г., Петренко Ю. О.

Резюме. Мезенхімальні стромальні клітини покращують регенерацію шкіри і сприяють ремодельованню позаклітинного матриксу завдяки імунomodуючій і регуляторній дії.

У роботі візуалізували мічені зеленим флуоресцентним білком мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини на поверхні повношарових ексцизійних шкірних ран у мишей і визначали їх виживаність методом конфокальної флуоресцентної мікроскопії.

На поверхню експериментальних шкірних ран наносили 200-250 тис. життєздатних або летально пошкоджених клітин, які були мічені зеленим флуоресцентним білком в гелі із плазми крові людини. Летальне пошкодження досягали шляхом швидкого заморожування до температури рідкого азоту і швидкого

відігріву в середовищі без додавання кріопротекторів. Пошкодження клітинної мембрани підтверджували методом забарвлення трипановим синім. Флуоресцентний аналіз зрізів ексцизійних ран проводили через 30 хвилин після нанесення, потім на 1-у, 3-ю і 5-ту добу спостереження. Репаративну активність мезенхімальних стромальних клітин оцінювали планіметричним методом на 3-й, 7-й і 14-й день експерименту. Встановлено, що трансфіковані мічені зеленим флуоресцентним білком позитивні клітини, нанесені на рану, виживали і зберігали флуоресценцію протягом 5 днів. Гибель клітин призводила до повного зникнення флуоресценції. Застосування мезенхімальні стромальні клітини з високою життєздатністю прискорювало закриття ран у мишей на 12-14% у порівнянні зі спонтанним загоєнням (контрольна група) на 3-й день дослідження. Позитивний репаративний ефект зберігався протягом 7-ми днів спостереження, тоді як летально пошкоджені клітини мали лише короточасну стимулюючу дію. Таким чином, результати, отримані в ході планіметричних вимірювань і підрахунку відсотка закриття ран, підтверджують дані флуоресцентного аналізу. Отримані результати вказують на те, що швидкість загоєння ран залежить від життєздатності мезенхімальних стромальних клітин і корелює із строками їх виживання *in vivo*.

Ключові слова: флуоресценція, зелений флуоресцентний білок, мезенхімальні стромальні клітини, ексцизійні рани.

UDC 611.013.395: 577.336: 616.5-001.41-092.4

Fluorescent Visualization of Mesenchymal Stromal Cells on the Surface of Full-Layer Excisional Skin Wounds in Mice

Tykhvynska O., Rogulska O., Vasilyev R., Petrenko Yu.

Abstract. Application of mesenchymal stromal cells improves skin regeneration due to immunomodulatory action and facilitation of extracellular matrix remodeling. However, there is a need to deepen our knowledge about the main mechanisms involved in healing stimulation via cell therapeutics.

The purpose of the work was to assess the survival of mesenchymal stromal cells on the surface of full-thickness skin wounds in mice.

Material and methods. Adult male Balb / C mice (n = 27) at the age of 5-6 months were used for modeling the skin wounds. To mimic the healing process in humans and prevent contraction, the edges of the wounds were fixed with a polymer medical plaster and glue. Viable or lethally damaged green fluorescent protein labeled cells within blood plasma-based gel in concentration $200-250 \times 10^3$ were applied on the wound surface. Plasma-based gel was prepared by direct mixture of human platelet poor plasma with calcium chloride and serum. Lethal cell damage was achieved by rapid immersion of suspension into liquid nitrogen with following rapid thawing without addition of any cryoprotectants. Cell membrane disruption was tested by Trypan blue staining. The reparative activity of mesenchymal stromal cells was evaluated at day 3, 7, and 14 after wounding using a planimetric method. Cell fluorescence *in vivo* and *in vitro* was confirmed by confocal microscopy. Photographs were then analyzed using the ImageJ 1.50b software.

Results and discussion. The obtained results showed that rapid freezing with following rapid thawing led to disruption of plasma membrane in 98-99% of cells in suspension. Cell damage was accompanied by complete loss of fluorescence. When applied on the wound surface without any additional manipulations, transfected green fluorescent protein labeled positive cells remained viable and maintained fluorescence up to 5 days. Plasma-based gel ensured optimal conditions for cell survival in wounding site acting as a supportive extracellular matrix. The application of mesenchymal stromal cells suspension with high viability accelerated the wound closure in mice by 12-14% compared to spontaneous healing (control group) at day 3 of examination. Positive healing effect persisted for at least 1 week, while lethally damaged cells had a short-term stimulating effect. Planimetric assay of wound closure fully confirmed our data achieved using a confocal microscopy.

Conclusions. Reparative effect of mesenchymal stromal cells observed at the early stages of wound healing could be driven by the release of growth factors improving vascularization and proliferation of cells in surrounding tissues. Obtained results indicate that the rate of wound healing depends on mesenchymal stromal cells viability and correlates with terms of their survival *in vivo*.

Keywords: fluorescence, green fluorescence protein, mesenchymal stromal cells, excision wounds.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 30.03.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування