

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 616.3; 575.5; 57.089-03

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-4-391-401>

Поступила в редакцию 02.06.2021

Received 02.06.2021

А. В. Бутенко¹, З. Б. Квачева¹, И. Б. Василевич¹, А. Ч. Часнойть², И. Д. Волотовский¹

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

ТКАНЕВОЙ ЭКВИВАЛЕНТ КОЖИ – КЛЕТОЧНЫЙ ПРОДУКТ НА ОСНОВЕ КЕРАТИНОЦИТОВ И ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА: СВОЙСТВА КОМПОНЕНТОВ ЭКВИВАЛЕНТА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОДУКТА НА ПРАКТИКЕ

Аннотация. В данной статье рассмотрены природа, способы выделения и культивирования *in vitro* кератиноцитов и фибробластов – основных клеточных компонентов кожи, использованных для изготовления нового биомедицинского клеточного продукта – тканевого эквивалента кожи. Основное внимание уделено оптимизации накопления биомассы клеток кожи. Приведены основные характеристики клеточных культур: их пролиферативная активность, жизнеспособность и фенотип. Изучена генотоксичность фибробластов – ключевого компонента биомедицинского клеточного продукта, а также биосовместимость клеток с органическими матрицами для определения оптимального носителя клеточных элементов в составе тканевого эквивалента кожи. Описаны состав и процесс изготовления тканевого эквивалента кожи, а также перспективы его практического применения.

Ключевые слова: кожа, фибробласты, кератиноциты, тканевой эквивалент кожи, биополимеры, фенотип, генотоксичность

Для цитирования: Тканевой эквивалент кожи – клеточный продукт на основе кератиноцитов и фибробластов: свойства компонентов эквивалента и перспективы использования продукта на практике / А. В. Бутенко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 4. – С. 391–401. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-4-391-401>

Anna V. Butenka¹, Zinaida B. Kvacheva¹, Irina B. Vasilevich¹, Alexej Ch. Chasnoit², Igor D. Volotovskii¹

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

TISSUE DERMAL EQUIVALENT – A CELLULAR PRODUCT BASED ON HUMAN DERMAL KERATINOCYTES AND FIBROBLASTS: THE PROPERTIES OF EQUIVALENT COMPONENTS AND PERSPECTIVES OF PRACTICAL APPLICATION

Abstract. The nature and ways of isolation and cultivation *in vitro* of keratinocytes and fibroblasts, the main cellular components of skin to prepare a new biomedical product, tissue dermal equivalent were considered. The main attention was paid to optimization of upbuilding dermal cell biomass including selection of medium compositions and conditions of cultivation. The information was given on main parameters of cell cultures as proliferation activity, viability and phenotype of the cells. Genotoxicity of fibroblasts and biocompatibility of the cells with organic matrixes to find the optimal carrier for cellular elements of tissue dermal equivalent were studied. The composition, the process of preparation of tissue dermal equivalent and perspectives of its practical application were discussed.

Keywords: skin, fibroblasts, keratinocytes, tissue dermal equivalent, biopolymers, phenotype, genotoxicity

For citation: Butenka A. V., Kvacheva Z. B., Vasilevich I. B., Chasnoit A. Ch., Volotovskii I. D. Tissue dermal equivalent – a cellular product based on human dermal keratinocytes and fibroblasts: the properties of equivalent components and perspectives of practical application. *Vesti Natsyunal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 4, pp. 391–401 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-4-391-401>

Введение. Проблема восстановления дефектов при заболеваниях и повреждениях кожи различной этиологии (трофические язвы, ожоги) постоянно привлекает внимание исследователей, о чем свидетельствует значительное расширение арсенала медикаментозных средств и появление новых, технологически более совершенных методов лечения [1, 2]. Согласно мировым данным, около 6 млн жителей планеты ежегодно обращаются за медицинской помощью по поводу

ожоговых травм. В США число ожоговых пациентов приближается к 1 млн человек в год. В Республике Беларусь число пациентов с термической травмой составляет около 30 тыс. человек в год. По разным данным, инвалидами становятся порядка 6–9 % пациентов от общего числа получивших медицинскую помощь. Следовательно, ввиду высокой распространенности ожогового травматизма проблема лечения ожогов в Республике Беларусь остается актуальной. При обширных повреждениях кожи (ожоги III–IV степени) ее самостоятельное восстановление невозможно без дополнительного медицинского вмешательства, при этом восстановление кожного покрова длится месяцами и сопровождается образованием грубых патологических рубцов с развитием деформаций и контрактур, приводящих к инвалидизации.

Успехи в области клеточной биологии и в разработке клеточных технологий лечения, а также их широкое применение в клинической практике способствовали развитию самостоятельного медицинского направления – регенеративной медицины [3–6]. Среди наиболее перспективных и успешных областей использования клеточных технологий следует особо выделить комбустологию, в рамках которой получило распространение лечение повреждений кожи, включая термические, с использованием дермальных кератиноцитов и фибробластов. Последние благодаря своей прогениторной активности обладают высокой терапевтической эффективностью. Впервые о клеточных технологиях с использованием клеток кожи упоминается в работах Грина с соавт. [7], опубликованных еще в конце 1970-х годов.

В настоящее время в рамках рассматриваемой проблемы ключевое место занимают разработка и производство различных тканевых эквивалентов кожи (ТЭК), которые включают культивированные клетки кожи, например кератиноциты и фибробласты, биологически активные соединения, а также носители (матрицы) – имитаторы внутриклеточного матрикса кожи, состоящие из коллагена, гликозаминогликанов и др. [1, 2, 8–16], используемые в виде гелей, пленок, губок, скаффолдов. Культивированные аутологичные и аллогенные кератиноциты и фибробласты комплексируют с матрицей, приобретая ряд преимуществ по сравнению с изолированными клетками. В составе комплексов клетки достаточно долго находятся в активном функциональном состоянии, близком к их состоянию в ткани. Носители с добавками ростовых факторов и других биологически активных молекул поддерживают условия, при которых сохраняется жизнеспособность и функциональная активность клеток, входящих в состав тканевого эквивалента [1, 2, 10, 13]. Преимущество заменителя (эквивалента) кожи очевидно: из относительно небольшого кусочка кожи можно выделить и нарастить в культуре большое количество клеток необходимого типа, способных покрыть раневую поверхность, в тысячи раз превышающую площадь донорского кусочка кожи [4].

Кератиноциты, основной клеточный компонент эпидермиса [8, 10, 17], содержатся во всех слоях эпидермиса. В базальном слое они соседствуют с мезенхимальными стволовыми клетками, которые и дифференцируются в кератиноциты, благодаря чему обеспечивается регенерация эпидермиса. В составе эпидермиса кератиноциты соединяются между собой с помощью десмосом, образуя друг с другом межклеточные контакты, за счет которых осуществляются передача сигналов и транспорт веществ между клетками. Основные функции кератиноцитов – структурная и барьерная. Так, они формируют барьер, предотвращающий проникновение в организм из внешней среды микроорганизмов, вирусов, участвуют в терморегуляции и защищают организм от обезвоживания. Именно с кератиноцитами соседствуют меланоциты – клетки, содержащие пигмент меланин, который, являясь световым фильтром кожи, защищает организм от ультрафиолетового излучения. При контакте с вирулентными факторами кератиноциты синтезируют хемокины и цитокины и вместе с лейкоцитами обеспечивают иммунологический ответ. Кроме того, кератиноциты синтезируют структурные белки кератин, инволюкрин, кератолин и др., являющиеся основой механической защиты кожи. При повреждении кожи происходит деление кератиноцитов и их миграция в травмированную область, в результате чего запускаются процессы эпителизации раневого дефекта.

Дермальные фибробласты представляют собой основной клеточный компонент соединительнотканной основы кожи, обеспечивающий ее гомеостаз и морфофункциональную организацию [2, 6, 8, 17–19]. Фибробласты дермы (ФД) имеют удлиненную веретенообразную форму с отрос-

ками и плоское овальное ядро. Они активно участвуют в ангиогенезе: продуцируют многие паракринные факторы (VEGFs, FGFs, TGF- β 1, HGF/SF и ангиопоэтин-1), которые индуцируют дифференцировку и миграцию эндотелиальных клеток, способствуют образованию и стабилизации кровеносных сосудов. Они вовлечены также в процессы нейроэндокринной регуляции кожи: синтезируют биологически активные пептиды – гормоны, биогенные амины, нейропептиды и нейротрансмиттеры, идентичные таковым в центральной нервной и эндокринной системах, пролактин, гормон роста, 17- β -эстрадиол; экспрессируют рецепторы андро- и эстрогенов, посредством которых осуществляется влияние этих гормонов на кожу человека.

Скорость роста и характеристики фибробластов в культуре зависят от их количества, возраста донора, источника их выделения (ретикулярная или сосочковая дерма) и анатомической области кожи, из которой получают клетки. На фибробласты *in vitro* оказывают влияние тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста, различные гормоны, витамины, антиоксиданты. В коже в результате дифференцировки фибробласты превращаются в зрелые клетки – фиброциты [18].

Кератиноциты и фибробласты находятся в тесном взаимодействии друг с другом, обеспечивая оптимальный уровень функционирования кожи как барьерного органа [6, 10]. Учитывая изложенное выше, именно кератиноциты и фибробласты стали использовать в качестве клеточного материала при разработке клеточных технологий лечения заболеваний и травм кожи. Хороший клинический эффект, полученный при применении клеточных технологий в комбустиологии за рубежом [3, 5, 8], и отсутствие данного метода лечения в нашей стране определили необходимость разработки нового биомедицинского клеточного продукта (БМКП) – ТЭК, а на его основе – нового метода лечения ожогов и других повреждений кожи.

Целью исследования являлась разработка биомедицинского клеточного продукта – тканевого эквивалента кожи, включающего культивированные аутологичные или аллогенные кератиноциты и фибробласты дермы, иммобилизованные на биodeградируемом носителе, и последующее использование данного клеточного продукта при лечении ожогов и их последствий.

В ходе работы решались следующие задачи:

1. Провести забор биоматериала (кожи) у пациентов, выделить из нее дермальные кератиноциты и фибробласты и накопить их необходимую биомассу в условиях культуры.
2. Охарактеризовать качество полученных кератиноцитов и фибробластов, оценить генотоксичность фибробластов, исследовать клетки на биосовместимость с полимерными носителями.
3. Разработать протокол приготовления БМКП–ТЭК для применения в регенеративной медицине. Подготовить лабораторный технический регламент на производство ТЭК на основе культивированных клеток кожи, иммобилизованных на биodeградируемом носителе.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили клетки кожи (кератиноциты и фибробласты) пациентов с ожоговой травмой. Забор биоптатов кожи у пациентов осуществляли в отделении пластической и эстетической микрохирургии БелМАПО при их информированном согласии. Возраст доноров составлял от 29 до 60 лет. Все они проходили обследования, включая общие анализы крови и мочи, биохимический анализ крови, определение коагулограммы, группы крови, наличие резус-фактора, а также анализы на вирусы гепатита В и С, ВИЧ/СПИД и сифилис. У ожоговых пациентов производилась эксплантация участка кожи размером 2×2 мм на удалении от ожоговых ран, после чего раны ушивали узловыми швами с соблюдением правил асептики и антисептики.

Биоптаты кожи доставляли в лабораторию Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси в стерильных флаконах с питательной средой или физиологическим раствором, помещенных в специальный контейнер при температуре не выше 4 °С. Доставка занимала не более 4 ч от времени забора.

Для выбора наиболее оптимального носителя для кератиноцитов и фибробластов при создании БМКП–ТЭК исследовали следующие полимерные органические соединения:

- 1) кальциевую и натриевую формы окисленной целлюлозы в виде ткани и пленки, фосфат декстран в виде гидрогеля, стерилизованные гамма-излучением (Институт физико-химических проблем, БГУ, Минск);

2) полилактид (Институт порошковой металлургии, Минск), представляющий собой пленку толщиной 0,1–0,2 мм;

3) «Хитомед» (ОАО «Завод горного воска», г. п. Свислочь, Беларусь) – стерильное заживляющее раневое покрытие, изготовленное в форме прямоугольной пластины диаметром от 60 до 200 мм из нетканых материалов на основе полипропилена с нанесенным слоем нановолокон хитозана, плотность которых составляла 1,0–2,0 г/м²;

4) Коллост-гель (ЗАО «БиоФармхолдинг», Россия) – 7 %-ный стерильный биопластический коллагеновый материал нового поколения (получаемый из кожи телят коллаген I типа, который по биохимическому составу и структуре близок к человеческому коллагену) с полностью сохраненной нативной структурой.

Определение пролиферативной активности клеток. Пролиферативную активность клеток оценивали по их накоплению в трех культуральных флаконах в ходе трех пассажей культивирования одного и того же клеточного образца. Подсчитывали количество снятых с пластика клеток на 1 мл среды и делили их на количество посеянных клеток, принимая полученную величину за индекс пролиферации.

Определение жизнеспособности клеток. Для определения жизнеспособности клеток использовали тест на окрашиваемость их красителем (0,5 %-ный раствор трипанового синего), который способен проникать через цитоплазматическую мембрану только погибших клеток и, следовательно, их окрашивать. Количество (процентное содержание) нежизнеспособных (окрашенных) и жизнеспособных (неокрашенных) клеток подсчитывали под микроскопом с использованием камеры Горяева.

Содержание апоптотических и некротических клеток в культуре оценивали методом проточной цитофлуориметрии (FACSCanto II, Becton Dickson, США) с использованием зондов флуоресцеин диацетата (FDA, Sigma) и пропидиум иодида (PI, Sigma). Для этого клетки инкубировали в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре с 0,5 мкг/мл флуоресцеин диацетата (Sigma, США) и 5 мкг/мл пропидиум иодида (Sigma, США), а затем анализировали под флуоресцентным микроскопом Olympus IX71 (Япония), используя для возбуждения «зеленой» флуоресценции (505–560 нм) излучение в области 420–495 нм, а для возбуждения «красной» флуоресценции (620–720 нм) излучение в области 520–580 нм. Изображения регистрировали цифровой камерой DP72 (Япония) и изучали с помощью программного обеспечения Cell F (Olympus, Япония). Жизнеспособные клетки интенсивно флуоресцировали в зеленой области спектра, некротические – в красной. Подсчитывали количество жизнеспособных и некротических клеток в 5 полях зрения микроскопа, среднее значение жизнеспособности выражали в процентах по отношению к количеству всех проанализированных в пробе клеток.

Для идентификации кератиноцитов в культуре использовали антитела, меченные флуорохромами к цитокератину 19 (K19) (Stem Cell Technologies, Канада), рабочее разведение 1:100; нестину (Sigma, США), рабочее разведение 1:50. Для идентификации фибробластов использовали моноклональные антитела, меченные флуорохромами к CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 (Sigma, США), рабочее разведение 1:100; цитокератину 19, рабочее разведение 1:100; нестину (Sigma, США), рабочее разведение 1:50; виментину (Stem Cell Technologies, Канада), рабочее разведение 1:100; фибронектину (Stem Cell Technologies, Канада), рабочее разведение 1:100. Измерения и анализ проводили методом проточной цитофлуориметрии и использованием флуоресцентного микроскопа согласно инструкции фирмы-производителя.

Оценка генотоксичности препаратов. Для определения генотоксических свойств клеточных элементов кожи ФД человека изучали методом ДНК-комет [20], с помощью которого определяли уровень повреждения ДНК лимфоцитов периферической крови (ЛПК) здоровых доноров после их сокультивирования с фибробластами кожи. Сокультивирование ФД и ЛПК проводили в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в течение 24 ч и соотношении ФД/ЛПК, равном 1:1 и 1:5. Сокультивировали четыре культуры ФК с каждой из четырех культур ЛПК в двух соотношениях ФД/ЛПК и в двух повторах с последующим анализом 96 образцов клеток, а также в трех повторах четырех культур ЛПК без ФД с последующим

анализом 12 образцов контрольных клеток и 12 образцов клеток, обработанных мутагеном (100 мкМ H_2O_2).

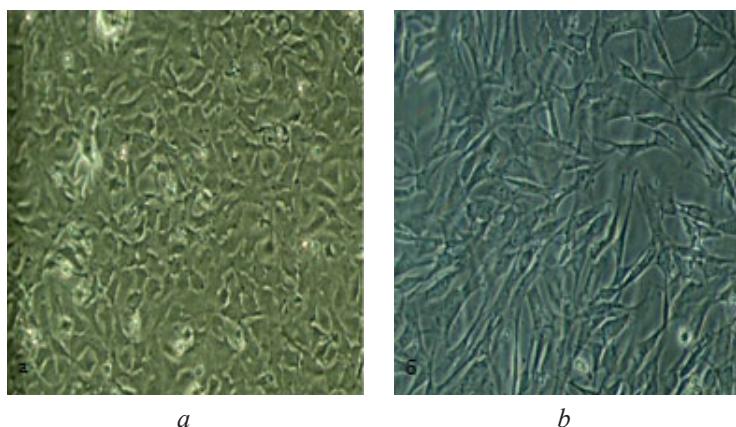
Контроль стерильности. Контроль стерильности осуществляли согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь (ст. 2.6.27 «Микробиологический контроль клеточных продуктов»).

Статистическая обработка результатов. Использовали пакет программ STATISTICA 10.0 (Version10-Index, StatSoft Inc., США). Статистическую значимость различий между показателями групп определяли с помощью рангового анализа вариаций Краскела–Уоллиса (H -критерий). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ (вероятность выше 95 %) и высокодостоверными при $p < 0,001$ (вероятность выше 99,9 %). За нулевую гипотезу принято утверждение, что наблюдаемые различия между одноименными признаками в исследуемых группах находятся в пределах случайных отклонений, т. е. различия недостоверны.

Результаты и их обсуждение. *Приготовление культуры кератиноцитов кожи человека.* Культуру кератиноцитов готовили по разработанной нами методике (патент РБ № 18533). В начале процесса эпидермис отделяли от дермы с помощью пинцета, а ткань эпидермиса обрабатывали 0,1 %-ным раствором коллагеназы в течение 10 мин. Затем суспензию клеток фильтровали и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в питательной среде ДМЕМ/F12, содержащей 10 нг/мл эпидермального фактора роста, 5 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина, 6,7 мкг/мл селенида, 50 мкг/мл форсколина, 50 мкг/мл гентамицина сульфата и 5 % эмбриональной телячьей сыворотки. После этого взвесь клеток высевали на чашки Петри, дно которых было предварительно покрыто коллагеном I типа. Для культивирования кератиноцитов использовали пластиковые культуральные флаконы, в каждый из которых высевали по 500 тыс. клеток/мл. Флаконы помещали в инкубатор с фиксированной температурой (37 °C) и влажной атмосферой, содержащей 5 % CO_2 . Морфологию клеток оценивали под инвертированным микроскопом СКХ 41 (OLYMPUS, Япония) в течение всего срока культивирования. Предлагаемый способ культивирования с использованием ростовой среды и добавок позволил селективно выделить из образца кожи большее количество пролиферативно активных кератиноцитов и при их дальнейшем культивировании за тот же промежуток времени накопить значительно большее количество биомассы клеток.

Кератиноциты в культуре были представлены гетерогенной популяцией. В культуре можно было выделить три группы клеток: голоклоны, параклоны и мероклоны. Голоклоны обладают максимальной способностью к пролиферации (могут претерпевать в культуре до 100 делений); параклоны представляют собой клетки с низким пролиферативным потенциалом (проходят не более 15 делений); группа мероклонов содержит клетки с разным пролиферативным потенциалом, занимая промежуточное место. Предполагается, что голоклоны образованы стволовыми клетками с максимальным пролиферативным потенциалом, параклоны – транзиторными клетками, а мероклоны – прогениторными клетками, обладающими меньшим пролиферативным потенциалом, чем стволовые клетки [21]. Следует отметить, что в культуре одновременно культивируются и фибробласты. Однако по мере нарастания биомассы фибробласты оттесняются на края культурального флакона, а в его центре оказывается наиболее однородная культура кератиноцитов.

Приготовление культуры фибробластов. Культуру фибробластов кожи человека готовили по разработанной нами методике (патент РБ № 18841). Кожный лоскут помещали в 0,2 %-ный раствор диспазы и инкубировали при +40 °C в течение 12 ч, затем пинцетом удаляли эпидермис, дерму измельчали на фрагменты и помещали в стерильную стеклянную чашку Петри. В чашку добавляли ростовую среду, состоящую из ДМЕМ (Lonza, Канада), 20 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma), антибиотика-антимикотика (StemCellTechnologies, Канада), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Lonza, Бельгия). Клетки культивировали при 37 °C в термостате в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 , в течение от 14 до 21 дня до образования вокруг экспланта монослоя фибробластов. Монослой клеток обрабатывали 0,25 %-ным раствором трипсина в 0,02 %-ном растворе ЭДТА. Для накопления большей биомассы клеток в субпассажах фрагменты эксплантов переносили в другие чашки Петри и культивировали в ростовой среде до получения через 5–7 сут монослоя клеток. Полученные клетки в количестве 10–20 тыс. клеток/см² высевали в новые чашки.



Микрофотографии кератиноцитов кожи (а) и фибробластов дермы (б) человека.
 Время культивирования клеток (2-й пассаж) – 7 сут. $\times 20$
 Microphotographs of dermal keratinocytes (a) and fibroblasts (b).
 Time of cell cultivation (second passage) – 7 days. $\times 20$

Таким образом, в ходе нескольких пассажей можно было накопить необходимую клеточную биомассу. После образования клеточного монослоя экспланты переносили в новые чашки с ростовой средой и инкубировали до полной миграции клеток из экспланта. Каждый монослой снимали и субпассировали в ростовой среде из расчета 20 тыс. клеток/см². Используемая в данной работе методика выделения и культивирования фибробластов из папиллярного слоя дермы позволила получить пул митотически активных фибробластов и сократить сроки формирования монослоя.

На рисунке представлены микрофотографии культур кератиноцитов и фибробластов кожи человека.

Жизнеспособность клеточных культур. При получении кератиноцитов кожи человека по описанной выше методике количество клеток в 1,0 см³ составило 3,5 млн, а жизнеспособность – $92,3 \pm 3,0$ %. При этом среди нежизнеспособных клеток на долю апоптотических и некротических клеток приходилось $2,8 \pm 0,3$ и $4,3 \pm 1,5$ % соответственно.

Оценка жизнеспособности фибробластов показала, что культуры ФД, судя по окрашиваемости клеток трипановым синим, характеризовались высокой жизнеспособностью: количество жизнеспособных клеток в пассажах составило $(95-96,2) \pm 1,5$ %, а нежизнеспособных – не более 4 %, в том числе апоптотических – 0,8–1,8 %, некротических – 2,9–3,9 %.

Фенотип фибробластов и кератиноцитов кожи в культуре. В настоящее время установлен ряд маркерных белков, находящихся на поверхности и внутри клеток. Они экспрессируются на определенной стадии дифференцировки кератиноцитов и фибробластов. Анализ данных проточной цитофлуориметрии показал, что фибробласты в культуре содержат маркерные белки, характерные для мезенхимальных стволовых и прогениторных клеток (CD29, CD73, CD90, CD105), и не содержат в своей структуре маркерные белки, присущие гемопоэтическим стволовым клеткам (CD34 и CD45). Кроме того, выявлен высокий показатель содержания клеток, экспрессирующих виментин (97,8 %) – белок промежуточных филаментов соединительной ткани, и фибронектин (от 28,2 % и более) – белок, выполняющий интегрирующие функции в межклеточном пространстве и обладающий высокой адгезирующей способностью. Отмечено небольшое процентное содержание клеток (5–7 %), экспрессирующих белки промежуточных филаментов эпителиальных стволовых и прогениторных клеток – цитокератин 19, нестин.

Анализ культуры кератиноцитов выявил высокое содержание клеток, экспрессирующих цитокератин 19 и нестин, и небольшое содержание клеток (3–5 %), имеющих маркеры мезенхимальных прогениторных клеток.

Исследование генотоксичности фибробластов кожи. В отсутствие фибробластов кератиноциты хотя и оказывают стимулирующее действие на собственные клетки реципиента, но практически не приживаются при трансплантации на гранулирующие ожоговые раны. В то же время

трансплантация культивированных фибробластов при лечении ожогов значительно ускоряет эпителизацию ран и обеспечивает заживление пограничных ожогов уже через 6–8 сут после трансплантации [1]. Кроме того, аллогенные и аутологичные ФД стимулируют пролиферацию и дифференцировку периваскулоцитов реципиента, которые, трансформируясь в фибробласты, способствуют пролиферации и миграции кератиноцитов. По литературным данным [1, 4, 5], применение аллогенных фибробластов в различных ожоговых центрах показало высокую эффективность метода и хорошую приживаемость клеточного трансплантата (в среднем 97 %).

Известно, что нормальные фибробласты в культуре сохраняют диплоидный кариотип, способны расти только при прикреплении к поверхности культурального флакона, обладают феноменом контактного торможения и имеют ограниченную продолжительность жизни [2]. Кроме того, они не онкогенны и характеризуются низкой экспрессией антигенов гистосовместимости. Эти показатели были внесены в аналитический паспорт, и им должны соответствовать все культуры, используемые для получения БМКП–ТЭК. Тем не менее, следовало проверить, обладают ли фибробласты генотоксичностью.

При изучении биобезопасности (генотоксичности) фибробластов методом ДНК-комет [22] были получены следующие результаты:

1. Уровень повреждения ДНК лимфоцитов периферической крови, культивированных в течение 24 ч в ростовой среде, составил 5,5–8,1 у. е., что соответствует фоновому уровню поврежденный ДНК лимфоцитов здоровых доноров.

2. ЛПК проявлял высокую чувствительность к мутагенному действию перекиси водорода (100 мкМ, 1 мин), под ее влиянием уровень повреждения ДНК клеток возрастал до 89–108 у. е.

3. После сокультивирования ЛПК в присутствии ФД (аллогенные культуры, 24 ч) уровень повреждения ДНК лимфоцитов составил 4,8–8,0 у. е. при соотношении ФД/ЛПК, равном 1:1, и 4,9–7,8 у. е. при соотношении клеток, равном 1:5.

На основании результатов проведенных экспериментов можно заключить, что фибробласты, изолированные из кожи и культивированные в искусственной среде, не обладают генотоксическим действием, т. е. безвредны и поэтому могут использоваться при разработке клеточных продуктов для их последующего применения в клинической практике.

Биологическая совместимость клеток кожи с биodeградируемыми носителями. Сначала исследовались клетки на биосовместимость с кальциевой и натриевой формами окисленной целлюлозы в виде ткани и с пленки и с фосфат декстраном в виде гидрогеля.

Клетки кожи засевали в пластиковые чашки Петри (Sarstedt, Германия) с носителями в виде ткани или пленки в количестве $5 \cdot 10^4$ клеток на 1 см^2 в 2 мл питательной среды. Инкубировали 2, 4 и 6 ч. При исследовании биосовместимости фибробластов и кератиноцитов с носителями в виде геля $5 \cdot 10^4$ клеток смешивали с 2 мл носителя, предварительно нагретого до 37°C , аккуратно перемешивали, заливали в чашки Петри и инкубировали в термостате при 37°C в течение 2, 4 и 6 ч.

Ткань и пленки кальциевой и натриевой формы окисленной целлюлозы обладали низкой биосовместимостью с клетками: после совместной инкубации в течение 2 ч этих препаратов с клетками было зарегистрировано появление значительного количества клеток (30–40 %), проницаемых для пропидиум иодида, что свидетельствовало о некротической гибели части клеток в культуре. Пленка из натриевой формы целлюлозы через 2 ч распадалась на фрагменты различных размеров, наблюдался сдвиг рН среды с 7,2 до 5,5, что отражалось на жизнеспособности клеток. После 6 ч инкубации количество некротических клеток составляло 75–100 %.

Пленки из полилактида толщиной 0,1–0,2 мм стерилизовались УФ-облучением в ламинарном боксе в течение 18–24 ч с последующим микробиологическим контролем стерильности. Жизнеспособность сохранялась на уровне 80 %. Однако ввиду того, что полилактидная пленка непрозрачна, наблюдать за ростом клеток под инвертированным микроскопом не представлялось возможным. Жизнеспособность клеток сохранялась на уровне 80 %.

При использовании геля из фосфата декстрана сдвига рН, как в случае с другими носителями, не наблюдалось, не было выраженной цитотоксичности носителя при инкубации с клетками. Клетки были не только жизнеспособны в субстрате, но и пролиферировали в данной среде.

В растворе с 1 %-ным Коллост-гелем токсического его влияния на клетки не выявлено. Жизнеспособность в течение всего времени инкубации сохранялась на уровне 92 %.

Из перечисленных выше носителей для приготовления тканевого эквивалента кожи был выбран коллагеновый гель как наиболее близкий по своим структурно-функциональным свойствам к элементам кожи.

При лечении повреждений кожных покровов применяется раневое покрытие «Хитомед». «Хитомед-ранозаживляющее стерильное» представляет собой препарат, предназначенный в качестве ранозаживляющего средства для восстановления кожных дефектов и трофических язв различного генеза при полном и частичном сохранении кожных дериватов, для ускоренной подготовки полнослойных кожных фрагментов к аутодермопластике, полноценного восстановления структуры донорских участков, быстрее заживления послеоперационных ран. Хитомед – это подложка из нетканых материалов на основе полипропилена в виде прямоугольных пластин диаметром от 60 до 200 мм с нанесенным лечебным слоем нановолокон хитозана. Поверхностная плотность нанесения нановолокон хитозана составляет 1,0–2,0 г/м². Лечебный слой защищен антиадгезионной бумагой, необходимой для беспрепятственного извлечения раневого покрытия из индивидуальной упаковки и отделения от лечебного слоя перед непосредственным наложением на рану. Оно обладает ранозаживляющим, антибактериальным, кровоостанавливающим свойствами, хорошей воздухопроницаемостью и, следовательно, обеспечивает адекватный газо- и влагообмен на уровне раневой поверхности длительное время, сохраняя высокую жизнеспособность клеток (см. таблицу).

Жизнеспособность клеток кожи, инкубированных с различными носителями, %

Viability of skin cells incubated with different matrixes, %

Носитель	Время инкубации					
	2 ч		4 ч		6 ч	
	ФД	Кератиноциты	ФД	Кератиноциты	ФД	Кератиноциты
Ткань из целлюлозы Са	70 ± 5,0	60 ± 2,0	56 ± 4,0	40 ± 3,0	35 ± 2,0	20 ± 1,2
Пленка из целлюлозы На	60 ± 3,8	50 ± 2,3	25 ± 1,0	17 ± 2,4	8 ± 3,2	3 ± 2,0
Пленка из полилактида	90 ± 2,5	87 ± 1,8	86 ± 3,0	85 ± 2,0	80 ± 2,4	75 ± 1,0
Гель из фосфата декстрана	97 ± 1,0	96 ± 2,2	95 ± 2,1	92 ± 1,6	93 ± 1,0	89 ± 3,0
Коллост-гель 1 %	98 ± 2,0	95 ± 1,5	97 ± 1,3	92 ± 1,2	95 ± 0,8	90,5 ± 1,0
Раневое покрытие «Хитомед»	95 ± 0,5	93 ± 0,7	92 ± 1,1	90 ± 3,0	90 ± 3,5	87 ± 2,0

Приготовление тканевого эквивалента кожи. Приготовление тканевого эквивалента кожи проводили в асептических условиях в ламинарном боксе. Для приготовления ТЭЖ использовали клетки 2–3-го пассажа. Иммунизацию кератиноцитов и фибробластов в соотношении 1:4 осуществляли в 1 %-ный коллагеновый Коллост-гель, который наносился послойно на раневое покрытие из хитозана. Терапевтическая доза клеток зависела от площади повреждения кожи и составляла порядка 50 тыс. клеток на 1 см² площади повреждения.

По результатам проведенной работы подготовлен лабораторный регламент и технические условия на производство ТЭЖ на основе культивированных клеток кожи, иммобилизованных на биодеградируемом носителе.

Полученный клеточный продукт удовлетворял следующим параметрам: стерильная опалесцирующая взвесь клеток без видимых на глаз включений, содержание клеток не менее 5·10³ клеток/мл, содержание жизнеспособных клеток не менее 85 %. Согласно фенотипированию, содержание маркеров фибробластов в клеточном продукте составляет: виментина – не менее 95 %, фибронектина – не менее 25 %. В случае кератиноцитов в продукте регистрируется содержание не менее 50 % маркера цитокератина 19 и не менее 25 % нестина.

БМКП не подлежит длительному хранению. Срок годности при температуре от +5 до +10 °С составляет не более 4 ч, при температуре от +20 до +33 °С – не более 12 ч от момента изготовления. Поэтому сразу же после изготовления препарат пересылался в клинику.

Транспортирование ТЭК в медицинское учреждение осуществлялось в стерильном контейнере, замораживание исключалось. На заключительных этапах проекта была принято решение готовить клеточный продукт с использованием клеточных ингредиентов и носителей прямо в операционной и сразу же наносить его на ожоговую поверхность пациента. В УП Центр экспертиз МЗ РБ было получено регистрационное удостоверение № БМКП-7.108662 «Эквивалент тканевой кожи человека» (ТУ ВУ100217351.011-2020, регистрационный номер БК-7.8-1910, разрешен к производству, реализации и медицинскому применению на территории Республики Беларусь в соответствии с инструкцией по применению). Совместно с кафедрой комбустиологии БелМАПО были проведены исследования эффективности применения БМКП на ожоговых пациентах, разработана инструкция по применению № 173-1219 «Метод лечения ожогов кожи с применением аутологичных фибробластов и кератиноцитов», которая была утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Заключение. Разработан биомедицинский клеточный продукт – тканевой эквивалент кожи, состоящий из культивированных фибробластов и кератиноцитов в коллагеновом геле, послойно наносимых на биодеградируемое раневое покрытие «Хитомед», с жизнеспособностью клеток не менее 85 %. Определены критерии качества культивируемых клеток. Подготовлен лабораторный технологический регламент на производство БМКП. БМКП внедрен в ожоговом отделении Минской больницы скорой помощи. Клеточная терапия с применением БМКП–ТЭК может применяться врачами комбустиологами-хирургами и специалистами, оказывающими хирургическую помощь пациентам с ожогами и их последствиями, и в других ожоговых отделениях учреждений здравоохранения республиканского и областного уровней.

Список использованных источников

1. Использование клеточных технологий для восстановления клеток кожи при ожоговой травме / Д. А. Алейник [и др.] // *Соврем. проблемы науки и образования*. – 2015. – № 4. – Ст. 331.
2. Волков, А. В. Краткий обзор коммерчески доступных клеточных продуктов для восстановления кожных покровов / А. В. Волков // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2006. – Т. 1, № 4. – С. 62–65.
3. Клеточные технологии для регенеративной медицины : сб. / под ред. Г. П. Пинаева, М. С. Богдановой, А. М. Кольцовой. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2011. – 332 с.
4. Новые подходы к лечению тяжелых ожогов: трансплантация выращенных в культуре кератиноцитов / С. Ф. Малахов [и др.] // *Воен.-мед. журн.* – 1997. – Т. 318, № 9. – С. 16–19.
5. Туманов, В. П. С. 30-летний опыт разработки и применения клеточных технологий в клинической практике / В. П. Туманов, Д. А. Жакота, Н. С. Корчагина // *Пласт. хирургия и косметология*. – 2012. – № 3. – С. 433–449.
6. Терских, В. В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных. Проблемы культивирования и трансплантации / В. В. Терских, А. В. Васильев. – М. : Наука, 1995. – 102 с.
7. Rheinwatd, J. G. Serial cultivation of stains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells / J. G. Rheinwatd, H. Green // *Cells*. – 1975. – Vol. 6, N 3. – P. 331–343. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(75\)80001-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(75)80001-8)
8. Волоатовский, И. Д. Морфофункциональные основы создания искусственной кожи (дермальных эквивалентов) / И. Д. Волоатовский, З. Б. Квачева // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 3. – С. 96–103.
9. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications / L. Cen [et al.] // *Pediatr. Res.* – 2008. – Vol. 63, N 5. – P. 492–496. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e31816c5bc3>
10. Gallo, R. L. Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes / R. L. Gallo // *J. Invest. Dermatol.* – 2017. – Vol. 137, N 6. – P. 1213–1214. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.045>
11. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects / T. Dai [et al.] // *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* – 2011. – Vol. 9, N 7. – P. 857–879. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>
12. Croisier, F. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering / F. Croisier, C. Jérôme // *Eur. Polym. J.* – 2013. – Vol. 49, N 4. – P. 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
13. Dong, C. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives / C. Dong, Y. Lv // *Polymers*. – 2016. – Vol. 8, N 2. – Art. 42. <https://doi.org/10.3390/polym8020042>
14. Alginate dressings for healing diabetic foot ulcers / J. C. Dumville [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2012. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd009110.pub2>
15. New method for coupling collagen on biodegradable polyurethane for biomedical application / X. He [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2012. – Vol. 126, N S1. – P. E354–E361. <https://doi.org/10.1002/app.36742>
16. Применение дермальных фибробластов в комплексном лечении больших трофических язвами венозной этиологии / А. Ж. Мельцова [и др.] // *Вестн. хирургии им. Грекова*. – 2007. – Т. 166, № 1. – С. 72–77.
17. Проллиферативный потенциал, морфологические и фенотипические характеристики эпидермальных кератиноцитов, культивируемых в субпассажах / А. В. Бутенко [и др.] // *Новости мед.-биол. наук*. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 91–96.

18. Бозо, И. Я. «Фибробласт» – специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? / И. Я. Бозо, Р. В. Деев, Г. П. Пинаев // Цитология. – 2010. – Т. 2, № 52. – С. 99–109.
19. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи / В. Л. Зорин [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4, № 4. – С. 26–40.
20. Russo, B. Chizzolini. Interplay between keratinocytes and fibroblasts: a systematic review providing a new angle for understanding skin fibrotic disorders / B. Russo, N. C. Brembilla, C. Chizzolini // Front. Immunol. – 2020. – Vol. 11. – Art. 648. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00648>
21. Isolation and clonal analysis of epidermal keratinocytes stem cells in long-term culture / S. Papini [et al.] // Stem Cells. – 2003. – Vol. 21, N 4. – P. 481–494. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-4-481>
22. Методические рекомендации МР 4.2.0014–10.4.2. Методы контроля. Биологические факторы. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. – 2010. – 15 с.

References

1. Aleinik D. Ya., Zorin V. L., Eremin I. I., Korsakov I. N., Charykova I. N. The use of cellular technologies for the restoration of skin cells in burn injury. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2015, no. 4, art. 331 (in Russian).
2. Volkov A. V. A brief overview of commercially available cellular products for skin restoration. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya* [Cell transplantology and tissue engineering], 2006, vol. 1, no. 4, pp. 62–65 (in Russian).
3. Pinaev G. P., Bogdanova M. S., Kol'tsova A. M. (eds.). *Cellular technologies for regenerative medicine*. St. Petersburg, Publishing house of the Polytechnic University, 2011. 332 p. (in Russian).
4. Malakhov S., Paramonov B., Emel'yanov A., Vasil'ev A., Terskikh V. New approaches to the treatment of severe burns: transplantation of cultured keratinocytes. *Voenno-meditsinskii zhurnal* [Military medical journal], 1997, vol. 318, no. 9, pp. 16–19 (in Russian).
5. Tumanov V. P., Zhakota D. A., Korchagina N. S. 30 years of experience in the development and application of cell technologies in clinical practice. *Plasticheskaya khirurgiya i kosmetologiya* [Plastic surgery and cosmetology], 2012, no. 3, pp. 433–449 (in Russian).
6. Terskikh V. V., Vasil'ev A. V. *Epidermal keratinocytes of humans and animals. Problems of cultivation and transplantation*. Moscow, Nauka Publ., 1995. 102 p. (in Russian).
7. Rheinwatd J. G., Green H. Serial cultivation of stains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cells*, 1975, vol. 6, no. 3, pp. 331–343. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(75\)80001-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(75)80001-8)
8. Volotovskii I. D., Kvacheva Z. B. Morphofunctional bases for creating artificial skin (dermal equivalents). *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 3, pp. 96–103 (in Russian).
9. Cen L., Liu W., Cui L., Zhang W., Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatric Research*, 2008, vol. 63, no. 5, pp. 492–496. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e31816c5bc3>
10. Gallo R. L. Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes. *Journal of Investigative Dermatology*, 2017, vol. 137, no. 6, pp. 1213–1214. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.045>
11. Dai T., Tanaka M., Huang Y. Y., Hamblin M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2011, vol. 9, no. 7, pp. 857–879. <https://doi.org/10.1586/eri.11.59>
12. Croisier F., Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 2013, vol. 49, no. 4, pp. 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
13. Dong C., Lv Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. *Polymers*, 2016, vol. 8, no. 2, art. 42. <https://doi.org/10.3390/polym8020042>
14. Dumville J. C., O'Meara S., Deshpande S., Speak K. Alginate dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd009110.pub2>
15. He X., Zhai Z., Wang Y., Wu G., Zheng Z., Wang Q., Liu Y. New method for coupling collagen on biodegradable polyurethane for biomedical application. *Journal of Applied Polymer Science*, 2012, vol. 126, no. S1, pp. E354–E361. <https://doi.org/10.1002/app.36742>
16. Mel'tsova A. Zh., Gritsenko V. V., Orlovskii P. I., Tomson V. V., Sabel'nikov V. V., Shulepova E. K., Prokopets A. I., Pinaev G. P., Blinova M. I., Yuditseva N. M. The use of dermal fibroblasts in the complex treatment of patients with trophic ulcers of venous etiology. *Vestnik khirurgii imeni I. I. Grekova* [Bulletin of surgery named after I. I. Grekov], 2007, vol. 166, no. 1, pp. 72–77 (in Russian).
17. Butenka A. V., Kvacheva Z. B., Gurmanchuk E. I., Petrakova O. V., Mezen N. I., Goncharov A. E., Kabanova Yu. A., Romanyuk E. N. Proliferative potential, morphological and phenotypic characteristics of epidermal keratinocytes cultured in subpassages. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of biomedical sciences], 2010, vol. 2, no. 3, pp. 91–96 (in Russian).
18. Bozo I. Ya., Deev R. V., Pinaev G. P. Is “fibroblast” a specialized cell or a functional condition of mesenchymal cells derivatives? *Tsitologiya* [Cytology], 2010, vol. 2, no. 52, pp. 99–109 (in Russian).
19. Zorin V. L., Zorina A. I., Petrakova O. S., Cherkasov V. R. Dermal fibroblasts for the treatment of skin defects. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya* [Cell transplantology and tissue engineering], 2009, vol. 4, no. 4, pp. 26–40 (in Russian).

20. Russo B., Brembilla N. C., Chizzolini C. Interplay between keratinocytes and fibroblasts: a systematic review providing a new angle for understanding skin fibrotic disorders. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 11, art. 648. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00648>

21. Papini S., Cecchetti D., Campani D., Fitzgerald W., Grivel J. Ch., Chen S., Margolis L., Revoltella R. P. Isolation and clonal analysis of epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. *Stem Cells*, 2003, vol. 21, no. 4, pp. 481–494. <https://doi.org/10.1634/stemcells.21-4-481>

22. *Methodical recommendations MP 4.2.0014–10.4.2. Control methods. Biological factors. Evaluation of genotoxic properties by the in vitro DNA comet method.* 2010. 15 p. (in Russian).

Информация об авторах

Бутенко Анна Викторовна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: annabutenka@tut.by

Квачева Зинаида Болеславовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kvachzb@tut.by

Василевич Ирина Борисовна – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina-vasilevich@yandex.by

Часнойть Алексей Чеславович – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dr.chasnoits@gmail.com

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com

Information about the authors

Anna V. Butenka – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: annabutenka@tut.by

Zinaida B. Kvacheva – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kvachzb@tut.by

Irina B. Vasilevich – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina-vasilevich@yandex.by

Alexej Ch. Chasnoit – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dr.chasnoits@gmail.com

Igor D. Volotovski – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com