

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ხელნაწერის უფლებით

მარიამ კაკაბაძე

ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მკურნალობა წამლის ლოკალური მიწოდების
სისტემის გამოყენებით ცხოველებში

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარდგენილი დისერტაციის
ავტორეფერატი

თბილისი

20222

პრობლემის აქტუალობა

ავთვისებიანი სიმსივნე წარმოადგენს ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან სამედიცინო და სოციალურ პრობლემას, როგორც საქართველოში, ასევე მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში. ყოველწლიურად პირის ღრუს ავთვისებიანი სიმსივნეების 300,000-ზე მეტი ახალი შემთხვევა ვლინდება, ხოლო ამ დაავადებით გამოწვეული სიკვდილიანობის მაჩვენებელი 145,400-ს აღწევს.

პირის ღრუს ავთვისებიან სიმსივნეებს შორის, ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომა ვლინდება შემთხვევათა 80-90%-ში. დღეისათვის პირის ღრუს ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის სამკურნალოდ გამოიყენება როგორც ქირურგიული მეთოდები, ასევე ქიმიოთერაპია, სხივური თერაპია, იმუნოთერაპია და მათი კომბინაცია. თითოეულ შემთხვევებზე მეთოდს თავისი დანიშნულება და როლი აქვს სიმსივნის მკურნალობის პროცესში. უნდა აღინიშნოს, რომ პირის ღრუს ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მკურნალობაში უპირატესობას ანიჭებენ ქირურგიულ მეთოდს. თუმცა კარცინომის რადიკალური ამოკვეთის შემდგომ, ხშირია „ნარჩენი“ სიმსივნური უჯრედების არსებობა, რაც რეციდივის ჩამოყალიბების მიზეზი ხდება. ტრადიციული სისტემური ქიმიოთერაპია ხასიათდება ტოქსიკურობით, ის ზიანს აყენებს არა მარტო სიმსივნურ უჯრედებს, არამედ ჯანმრთელ უჯრედებსა და ქსოვილებს, რაც იწვევს საკმაოდ მძიმე გვერდითი მოვლენების განვითარებას და იმუნური სისტემის სუპრესიას. შემოთქმულიდან გამომდინარე, ბოლო წლებში კლინიკურ ონკოლოგიაში დიდ ინტერესს იწვევს წამლის ლოკალური მიწოდების სისტემები. მათ შეუძლიათ სიმსივნის საწინააღმდეგო წამლის აკუმულირება უშუალოდ სიმსივნეში, ისინი უზრუნველყოფენ წამლის პროლონგირებულ შემოქმედებას სიმსივნურ უჯრედებზე და ამავდროულად ამ წამლებით გამოწვეული გვერდითი მოვლენების განვითარების პრევენციას. ასეთი წამალთფორმებისა და სისტემების შექმნის დროს ძალზე მნიშვნელოვანია სიმსივნის საწინააღმდეგო წამლის მაღალი სიზუსტით მიწოდებისა და გადამზიდზე ინკაფსულირებული სამკურნალო ნივთიერების საჭირო

რაოდენობის გამოთავისუფლების უზრუნველყოფა, უშალოდ სიმსივნურ უბანში. თანამედროვე ბიოტექნოლოგიაში ქიმიოთერაპიული პრეპარატების გადამზიდად იყენებენ ორგანული და არაორგანული მასალისაგან დამზადებულ ნანონაწილაკებს, ბიოდეგრადირებად და ბიოთავსებად პოლიმერებს და გელებს. სიმსივნის საწინააღმდეგო წამლით დატვირთული ბიოდეგრადირებადი და ბიოთავსებადი ჰიდროგელები იწვევენ მოქმედი პრეპარატის საჭირო კონცენტრაციის შენარჩუნებას და პროლონგირებულ ზემოქმედებას ლოკალურად, უშალოდ სამიზნე ორგანოში ან მის უბანში. გარდა ამისა, ასეთი სამკურნალწამლო ფორმის გამოყენება მრავალჯერადი ინექციის თავიდან აცილების შესაძლებლობას იძლევა.

ჩვენ ვივარაუდებთ, რომ ჰიდროგელის საფუძველზე დამზადებული წამლის ლოკალური მიწოდების სისტემა შეიძლება გახდეს ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის ამოკვეთის შემდგომ, სიმსივნის სარეცელში არსებული „ნარჩენი“ სიმსივნური უჯრედების განადგურების საშუალება, რაც თავის მხრივ ხელს შეუწყობს რეციდივის განვითარების პრევენციას და თავიდან აგვაცილებს მრავალჯერად ინექციას.

კვლევის მიზანი და ამოცანები

სადისერტაციო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენს კონტროლირებადი წამლის ლოკალური მიწოდების სისტემის შექმნა და მისი ეფექტურობის განსაზღვრა ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მკურნალობაში ცხოველებზე.

ამ მიზნის განსახორციელებლად დავისახეთ შემდეგი ამოცანები:

- ფიბრინოგენ-თრომბინის საფუძველზე ბიოდეგრადირებადი, ორშრიანი, მრავალკომპონენტური ჰიდროგელის შექმნა და მისი გამოყენება როგორც კონტროლირებადი წამლის ლოკალური მიწოდების სისტემა;

- სიმსივნის საწინამდღეო წამლით (ცისპლატინით) გადამზიდის (CultiSpher) დატვირთვა და მისი მოთავსება ფიბრინ-თრომბინის ჰიდროგელში (ქვედა შრე);
- ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედების იზოლაცია და მათი ლიოფილიზაციის მეთოდის შემუშავება;
- გადამზიდზე ლიოფილიზირებული ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედების მოთავსება და ფიბრინ-თრომბინის ჰიდროგელის ზედა შრის შექმნა;
- ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მოდელირება ცხოველებზე;
- ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის ამოკვეთა და სიმსივნის სარეცელის დაფარვა ჩვენს მიერ შემუშავებული ჰიდროგელით;
- ჰიდროგელის ეფექტურობის შეფასება ცხოველებზე დაკვირვების, ლაბორატორიული, ჰისტოლოგიური, იმუნოჰისტოქიმიური, რადიოლოგიური და მასკანირებადი ელექტრონული მიკროსკოპიის მეთოდების გამოყენებით.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

პირველად მსოფლიოში ჩვენს მიერ შემუშავდა ბიოშეთავსებადი, ბიოდეგრადირებადი, ჰიდროგელზე დაფუძნებული ორშრიანი წამლის ლოკალური მიწოდების სისტემა. ჰიდროგელის ქვედა შრეს, რომელიც შეიცავს ცისპლატინით დატვირთულ გადამზიდებს (CultiSpher) შეუძლია სიმსივნის ამოკვეთის შემდგომ გაანადგუროს ჭრილობაში არსებული „ნარჩენი“ სიმსივნური უჯრედები. ჰიდროგელის ზედა შრე კი, რომელიც წარმოდგენილია გადამზიდით (CultiSpher) და მასზე მოთავსებული ლიოფილიზირებული ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედებით ხელს უწყობს ჭრილობის სწრაფ რეპიტელიზაციას. ჰიდროგელი ჩვენს მიერ პირველად იქნა გამოყენებული ცხოველებზე, ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის ამოკვეთის შემდეგ ნარჩენი სიმსივნური უჯრედების გასანადგურებლად. ასევე, ჰიდროგელის საშუალებით შესაძლებელი გახდა ენის ბრტყელუჯრედოვანი

კარცინომის ამოკვეთის შემდეგ სიმსივნის სარეცელში ცისპლატინის პროლონგირებული გამოთავისუფლება და ცისპლატინით გამოწვეული გვერდითი მოვლენების შემცირება.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება

ჩვენს მიერ შემუშავებული ბიოდეგრადირებადი ჰიდროგელი შეიძლება გამოყენებულ იქნას სიმსივნის ამოკვეთის შემდეგ, სიმსივნური სარეცელის დაფარვის მიზნით, რაც ხელს შეუწყობს „ნარჩენი“ სიმსივნური უჯრედების განადგურებას და ლოკო/რეგიონალური მეტასტაზების პრევენციას. გარდა ამისა, ასეთი სამკურნალწამლო ფორმის გამოყენება მრავალჯერადი ინტრავენური ინექციის თავიდან აცილების და წამლით გამოწვეული გვერდითი მოვლენების პრევენციის საშუალებას იძლევა. მიღებული კვლევის შედეგი მნიშვნელოვნად გაზრდის ონკოლოგიური ავადმყოფების მკურნალობის ეფექტურობას. ჰიდროგელი შეიძლება გამოყენებულ იქნას სიმსივნის სამკურნალო სხვა მეთოდებთან ერთად კომბინაციაში.

დასაცავად გამოტანილი ძირითადი დებულებები

- მსოფლიოს სამედიცინო ბაზარზე არსებული ჰიდროგელებისაგან განსხვავებით, ჩვენს მიერ შემუშავებულ ჰიდროგელს გააჩნია მრავალკომპონენტური, ორშრიანი სტრუქტურა, რომელიც წარმოდგენილია ფიბრინოგენით, ცისპლატინით და ლიოფილიზირებული ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედებით დატვირთული კოლაგენის გადამზიდებით (CultiSpher);
- ჰიდროგელის გამოყენებით შესაძლებელია ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის ამოკვეთის შემდეგ, ცისპლატინის მაღალი სიზუსტით მიწოდება სიმსივნის სარეცელში და გადამზიდზე მოთავსებული სიმსივნის საწინააღმდეგო წამლის პროლონგირებული გამოთავისუფლება სიმსივნის ნარჩენი უჯრედების გასანადგურებლად;

- სიმსივნის საწინააღმდეგო წამლის ლოკალური მიწოდების სისტემა სიმსივნის სარეცელში საგრძნობლად ზრდის მკურნალობის ეფექტურობას, ახდენს ლოკო/რეგიონალური რეციდივების პრევენციას და ამცირებს ცისპლატინით გამოწვეულ გვერდით მოვლენებს;
- ლიოფილიზირებული ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედების გამოყენებამ ჰიდროგელს შესძინა ანთების საწინააღმდეგო და ანტიმიკრობული თვისებები, რაც ხელს უწყობს ჭრილობის სწრაფ რეპიტელიზაციას;
- ჰიდროგელი არის ბიოლოგიურად უსაფრთხო, ბიოდეგრადირებადი, პირის ღრუს ქსოვილებთან ბიოთავსებადი და აკმაყოფილებს წამლის ლოკალური მიწოდების სისტემებისთვის წაყენებულ ყველა მოთხოვნას.

შრომის აპრობაცია

კვლევის თითოეულ ეტაპზე მიღებული შედეგები მოხსენებული იყო სხვადასხვა საერთაშორისო და ადგილობრივ კონფერენციებზე: მე-5 საერთაშორისო კონფერენცია „სტომატოლოგიური მეცნიერება და განათლება“ (ნიუ-იორკი, აშშ 2019); აკად.ნინო ჯავახიშვილის ხსოვნისადმი მიძღვნილ სიმპოზიუმზე (“საუბრები მორფოლოგიაზე“ (თბილისი 2021); I საერთაშორისო კონფერენციაზე „ტრანსლაციური და კლინიკური მედიცინა“ თბილისი 2022;

მასალა და მეთოდები

კვლევის პირველი ნაწილი დაეთმო წამლის კონტროლირებადი ლოკალური მიწოდების სისტემის (ჰიდროგელის) შექმნას ფიბრინოგენ-თრომბინის საფუძველზე. ჩვენს მიერ შემუშავებული ჰიდროგელი შედგება ორი შრისაგან. ჰიდროგელის ქვედა შრე იქმნებოდა პეგ-ფიბრინის გელისა და ცისპლატინით დატვირთული კოლაგენის გადამზიდის (CultiSpher) გამოყენებით. ჰიდროგელის ზედა შრის შესაქმნელად კი, გამოყენებული იყო პეგ-ფიბრინის გელი, რომელშიც მოთავსდა კოლაგენის გადამზიდი (CultiSpher) და ლიოფილიზირებული ძვლის ტვინის დეროვანი უჯრედები.

ორშრიანი ჰიდროგელის ქვედა შრის შექმნის მეთოდი

ჰიდროგელის ქვედა შრის შესაქმნელად გამოყენებული იყო Zhang-ის (G. Zhang et al. 2006) მიერ მოწოდებული პეგ-ფიბრინის გელის მიღების პროტოკოლი ჩვენს მიერ შეტანილი მცირე ცვლილებებით. ამისათვის, კომერციულად შეძენილ 500 მკლ. ფიბრინოგენს (Sigma-Aldrich) ვამატებდით 40 მგ/მლ თრის-ის ბუფერულ ხსნარს Tris Buffered Saline (TBS), pH-ით 7.8 და 250 მკლ. პოლიეთილენ გლიკოლს (PEG). მიღებული ნაერთი თავსდებოდა 24 ფოსფორიანი პლანშეტის ექვს ფოსოში. პლანშეტს ვათავსებდით CO₂ ინკუბატორში 37°C-ზე 20 წუთის განმავლობაში. ამ მეთოდით მიღებულ ნაერთს ეწოდა პეგილირებული ფიბრინოგენი. ინკუბაციის შემდეგ პეგილირებულ ფიბრინოგენში ვათავსებდით გადამზიდებს (CultiSpher), რომლის ზედაპირზე მოთავსებული იყო სიმსივნის საწინააღმდეგო პრეპარატი ცისპლატინი. საბოლოო პროდუქტის მისაღებად პეგილირებული ფიბრინოგენის ჭრილობაში მოთავსების შემდეგ ვამატებდით გამოხდილ წყალში განზავებულ თრომბინს (Sigma-Aldrich). ორივე კომპონენტის შერწყმის დროს იქმნებოდა წებოვანი მასა, რომელიც მკვრივდებოდა 5-6 წამში და წარმოადგენდა გამჭირვალე რბილ ჰიდროგელს. აქვე უნდა ავღნიშნოთ, რომ ჩვენს კვლევაში პეგილირებული ფიბრინოგენიდან

პეგილირებულ ფიბრინის ჰიდროგელში გადასაყვანად, 52U/მლ თრომბინს ვამატებდით უშუალოდ ჭრილობის დამუშავების დროს.

გადამზიდის (CultiSpher-ის) ზედაპირის ცისპლატინით დატვირთვა

კომერციულად შეძენილი გამშრალი სამგანზომილებიანი კოლაგენ-ჟელატინის გადამზიდი (CultiSpher)100 მიკრონის ზომით, ჰიდრატაციის მიზნით მოთავსდა ერთი საათის განმავლობაში ფოსფატ-ბუფერულ ხსნარში, Phosphate-buffered saline (PBS). ჰიდრატაციის შემდეგ აფუებული კოლაგენის მიკროგადამზიდები (CultiSpher), 7.0 მლ სიმსივნის საწინააღმდეგო წამლის ხსნარი Cisplatin Solution (50mg/100 ml), (KOSAK FARMA, Turkey), რომლის ძირითად კომპონენტს წარმოადგენს ორვალენტური პლატინა და 3.0 მლ 1% ნატრიუმის ციტრატი მოთავსდა უჯრედულ მღვებავში Spinner Flasks (Sigma-Aldrich). ნაზად ურევდით 4 საათის განმავლობაში (40 ბრუნვა/წუთში). ამის შემდეგ აღნიშნულ ხსნარს ვამატებდით 15.0 მლ ცისპლატინის ხსნარს და ვაწარმოებდით ცენტრიფუგირებას 10.000 x ბრუნვით. სუპერნატანტის მოცილების შემდეგ გადამზიდების ნაწილი გაგზავნილი იყო მორფოლოგიური კვლევისათვის, მეორე ნაწილი კი ლიოფილიზაციის და სტერილიზაციის შემდეგ შენახული იქნა მის შემდგომ გამოყენებამდე.

ჰიდროგელის ზედა შრის შექმნის მეთოდი

ჰიდროგელის ზედა შრის შესაქმნელად ასევე გამოყენებული იყო პეგ-ფიბრინის გელი, რომელშიც მოთავსდა გადამზიდი (CultiSpher) და ლიოფილიზირებული ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედები.

ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედების მიღება და მათი მოთავსება გადამზიდის (CultiSpher) ზედაპირზე

ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედების მისაღებად გამოყენებულ იქნა ორივე სქესის 20 Lewis-ის ხაზის თეთრი ლაბორატორული ვირთაგვა, მასით 200-250გ. ლეტალური ინექციის შემდეგ 200 მგ/კგ (0,5% ნატრიუმის თიოპენტალის ხსნარი) მოხდა ცხოველების ევთანაზია და ორივე ქვედა კიდურის ამპუტაცია, ბარდაყის ძვლის კუნთოვანი ქსოვილისგან იზოლაცია და ძვლის რეზექცია ეპიფიზისა და დიაფიზის არეში. ძვლის ტვინის ასპირაციის შემდეგ ხდებოდა მისი დისოციაცია ნატრიუმ ციტრატის, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) და დულბეკო-ს (Dulbecco) ხსნარის გამოყენებით. ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედების მონონუკლეარული ფრაქცია გამოიყო გრადიენტული მეთოდით Ficoll Paque Plus-ის გამოყენებით. იზოლირებული მონონუკლეარული უჯრედების მცირე ნაწილი მოთავსდა ნეუბაუერის კამერაში. უჯრედული გამოსავლისა და მათი სიცოცხლისუნარიანობის განსზღვრას ვაწარმოებდით მიკროსკოპში ტრიპან ლურჯის გამოყენებით. უჯრედების მეორე ნაწილი ($3,0 \times 10^6$) და კოლაგენის მიკროგადამზიდები(CultiSpher) მოთავსდა 24-ფოსოიანი პლანშეტის 12 ფოსოში. პლანშეტი მოთავსდა CO₂ ინკუბატორში ტემპერატურით 37°C-ზე, 1 საათის განმავლობაში. უჯრედების საკვებ გარემოს წარმოადგენდა Dulbecco's მოდიფიცირებული Eagle's (DMEM) ხსნარი, 10%-ანი ხბოს ფეტალური შრავტი, 50 U/ml პენიცილინი და 0,05მგ/მლ სტრეპტომიცინი. ამის შემდეგ, ინკუბატორში შევიტანეთ ორბიტალური შეიკერი (110 ბრ/წთ) რომელზედაც მოვათავსეთ პლანშეტი. უჯრედების კო-კულტივაციას გადამზიდთან ერთად ვახორციელებდით 7 დღის განმავლობაში. საკვებ ნიადაგს ვუცვლიდით სამდღიანი ინტერვალით. კო-კულტივაციის დასრულების შემდეგ, გადამზიდები და მასზე დასმული ღეროვანი უჯრედები მოვათავსეთ ლიოფილიზაციის აპარატში "Power Dry PL 6000 Freeze Dryers" (Heto Labware). ლიოფილიზაციის შემდეგ, გადამზიდები და მასზე დასმული ღეროვანი უჯრედები ინახებოდა ოთახის ტემპერატურაზე მის შემდგომ გამოყენებამდე. პეგილირებული ფიბრინოგენიდან

ჰიდროგელში გადასაყვანად, ისევე როგორც პირველი შრის შექმნის დროს, თრომბინს ვამატებდით უშუალოდ ჭრილობის დამუშავებისას.

ვირთაგვის ენის ანატომიური თავისებურებების შესწავლა

ვირთაგვებში ბრტყელუჯრედოვანი სიმსივნის მოდელის შექმნამდე მოხდა მათი პირის ღრუსა და ენის ანატომიური თავისებურებების შესწავლა. ამისათვის გამოყენებული იყო პირის ღრუს რბილი ქსოვილების შრეობრივი ანატომიური დისექცია. ენის სისხლძარღვების შესწავლა ხდებოდა სისხლძარღვებში ფერადი და რენტგენოკონტრასტული საღებავების ინექციით. ენის კაპილარული ქსელის განსაზღვრისათვის გამოყენებული იყო ტრანსილუმინაციის მეთოდი. ასევე მოხდა ვირთაგვის ენის ქსოვილების მორფომეტრული შესწავლა. სისხლძარღვებში ფერადი და რენტგენოკონტრასტული საღებავების ინექციისათვის ზოგადი გაუტკივარების პირობებში ცხოველებს უტარდებოდათ ლაპარატომია. აორტასა და ქვემო ღრუ ვენის გამოყოფის შემდეგ, აორტაში შეგვყავდა რენტგენოკონტრასტული ხსნარი (კარდიოტრასტი) წითელი ფერის ლატექსთან (NAIRIT-L3) ერთად. ქვემო ღრუ ვენაში კი, შეგვყავდა ლურჯი ფერის ლატექსი. სისხლძარღვების ვიზუალიზაცია ხდებოდა ტრანსილუმინაციური სტერეოსკოპული მიკროსკოპის MBS-9 LOMO (რუსეთი), ჰალოგენური სინათლის წყაროს OS-100 (რუსეთი) ოპტიკურ ბოჭკოვანი განათების გამოყენებით და რენტგენოლოგიური გამოკვლევით, რომლისთვისაც გამოყენებულ იქნა DVS -100 ვიზიოგრაფი, Diox (DigiMed)-ის რენტგენის აპარატი და კომპიუტერული ტომოგრაფი Orthophos SL 3D.

ენის ბრტყელუჯრედოვანი სიმსივნის მოდელირება

მიღებული ანატომიური კვლევის შედეგების საფუძველზე, ვირთაგვის ენის ბრტყელუჯრედოვანი სიმსივნის მოდელირებისათვის შერჩეულ იქნა ორივე სქესის Lewis-ის ხაზის 60 თეთრი ლაბორატორიული ვირთაგვა, 8-10 კვირის ასაკის და 250-300გრ მასით. ცხოველები მიღებული იყო თსუ ალექსანდრე ნათიშვილის

მორფოლოგიის ინსტიტუტის ვივარიუმიდან. ყველა კვლევა ჩატარდა მოქმედი საერთაშორისო სტანდარტების შესაბამისად (გზამკვლევია ლაბორატორიული ცხოველების მოვლისა და გამოყენებისათვის, IACUC გაიდლაინის მიხედვით).

ვირთაგვის ენის პრტყელუჯრედოვანი სიმსივნის მოდელირებისათვის ვირთაგვებში გამოვიყენეთ 4 ნიტროქუინოლინ 1 ოქსიდი - 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO), რომელიც წარმოადგენს წყალში ხსნად ქინოლინის ჯგუფის სინთეზურ კანცეროგენს. კვირაში ერთხელ ვამზადებდით ხსნარს (1მგ/5ლ) და ვანზავებდით ონკანის წყლით, რათა მიგვეღო ხსნარი 0,001% კონცენტრაციით. ხსნარს ვათავსებდით ბოთლებში და ვაძლევდით ვირთაგვებს 8 კვირის განმავლობაში. ცხოველების 95%-ს 50-55 დღის შემდეგ ენის ზედაპირზე აღენიშნებოდათ კარგად გამოხატული სიმსივნე (კარცინომა in situ), რომელიც დადასტურდა ჰისტოლოგიური და იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდების გამოყენებით.

ენის ბრტყელუჯრედოვანი სიმსივნის მკურნალობის მეთოდები

ყველა ქირურგიული პროცედურა ცხოველებზე ჩატარდა ზოგადი გაუტკივარების პირობებში, ინტრაპერიტონეალურად, ეთამინალ-ნატრიუმის (30მგ/კგ) გამოყენებით, ცხოველები დაიყო 3 ჯგუფად.

პირველი ჯგუფის ცხოველები ($n = 20$), სიმსივნის მოდელირების შემდეგ წარმოადგენდნენ საკონტროლო ჯგუფს და იმყოფებოდნენ დაკვირვების ქვეშ მკურნალობის გარეშე.

მეორე ჯგუფის ცხოველებში ($n=20$) განხორციელდა ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მასის 85% ამოკვეთა ელექტროკოაგულატორის გამოყენებით. კარცინომის ამოკვეთის შემდეგ, ენაზე წარმოქმნილი 0.5 სმ დიამეტრის ჭრილობა იხურებოდა კვანძოვანი ატრავმული ნაკერებით (5.0 Ethicon).

მესამე ჯგუფის ცხოველებში ($n=20$), ისევე როგორც მეორე ჯგუფში, ვახორციელებდით ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის 85% მასის ამოკვეთას, რის შემდეგაც ენაზე წარმოქმნილი 0.5 სმ დიამეტრის ჭრილობა იფარებოდა ჩვენს მიერ

შემუშავებული ჰიდროგელის გამოყენებით. ცხრილი 1-ში ნაჩვენებია ოპერაციული ჩარევის სახეები, საცდელი ცხოველების ჯგუფები და რაოდენობა.

ცხრილი 1. ოპერაციული ჩარევის სახეები, საცდელი ცხოველების ჯგუფები და რაოდენობა.

საცდელი ცხოველების ჯგუფები	საცდელი ცხოველების რაოდენობა	ქირურგიული ჩარევის სახეები
I	20	ვირთაგვის ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მოდელირება მკურნალობის გარეშე
II	20	ვირთაგვის ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მოდელირება, სიმსივნის ამოკვეთა და ჭრილობის დახურვა კვანძოვანი ნაკერებით
III	20	ვირთაგვის ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მოდელირება, სიმსივნის ამოკვეთა და ჭრილობის დაფარვა ბიოდეგრადირებადი, ორშირიანი ჰიდროგელის გამოყენებით

ოპერაციის შემდეგ ყველა ცხოველი მოთავსდა ვივარიუმის სტანდარტულ პირობებში და ცდიდან გამოგვყავდა 1, 3, 5, 7, 14, 18, 25, 30 , 60, 90, 120 დღის შემდეგ.

ჰისტოლოგიური და იმუნოჰისტოქიმიური კვლევის მეთოდები

ჰისტოლოგიური კვლევისათვის ოპერაციის შემდგომ სხვადასხვა ვადებში აღებული ვირთაგვის ენის ქსოვილის მასალა ფიქსირდებოდა 10%-ან ნეიტრალურ ფორმალინის ხსნარში, ყალიბდებოდა პარაფინში და იჭრებოდა 5 მიკრონი სისქის ნაჭრებად. დეპარაფინიზაციისა და რეჰიდრატაციის შემდეგ ქსოვილი შეიღება ჰემატოქსილინ-ეოზინით და მასონ ტრიქრომით.

იმუნოჰისტოქიმიური შედეგისათვის გამოყენებული იყო პარაფინში დაფიქსირებული 3 მიკრონი სისქის ქსოვილი. დეპარაფინიზაციის და რეჰიდრატაციის შემდგომ ქსოვილების შეღებვა ხდებოდა ჰემატოქსილინ ეოზინით (Leica Biosystems Newcastle Ltd.) და მასონ ტრიქრომით (Bio-Optica Ltd.)ოთახის ტემპერატურაზე მწარმოებლის მიერ მოწოდებული პროტოკოლის მიხედვით. იმუნოშეღებვა ხდებოდა anti-p63 (ინკუბაციის დრო 20 წთ, კლონი -7 JUL; განზავებით 1:25; (Leica Biosystems Newcastle Ltd. GB), anti-Ki67 (ინკუბაციის დრო 20 წთ, კლონი-MM1, განზავებით 1:200; (Leica Biosystems Newcastle Ltd. GB), anti-cyclin-D1 (ინკუბაციის პერიოდი 20 წთ, კლონი -EP12, განზავებით 1:50, PA0046; Leica Biosystems Newcastle Ltd.) და anti-E-cadherin (ინკუბაციის პერიოდი, 20 წთ; კლონი 36B5; განზავებით 1:25; cat. no. PA0387; Leica Biosystems Newcastle Ltd.) ანტისხეულების განსაზღვრა მოხდა მანუალური შეღებვის მეთოდით Novolink DAB Polymer Detection სისტემის გამოყენებით (ინკუბაციის დრო 20 წთ; cat no. RE7260-CE; Leica Biosystems Newcastle Ltd. GB), რომელიც განხორციელდა მწარმოებლის რეკომენდაციის გათვალისწინებით. ენდოგენური პეროქსიდაზას აქტივობა განეიტრალდა Peroxidase Block რეაგენტის [3-4% (v/v) წყალბადის ზეჟანგის გამოყენებით; Novolink DAB Polymer Detection სისტემა; კატალოგის N. RE7260- CE; Leica Biosystems Newcastle Ltd]. პირველადი ანტისხეულის არასპეციფიკური შებოჭვის შესამცირებლად გამოყენებული იქნა Novocastra Protein Block რეაგენტი (0.4% კაზეინის ცილა ფოსფატის ბუფერულ ფიზიოლოგიურ ხსნარში, სტაბილიზატორებით, სურფაქტანტით და 0.2% Bronidox L, როგორც კონსერვანტი; Novolink DAB Polymer Detection system). როგორც მეორადი ანტისხეული, გამოყენებული იყო კურდლის ანტი-თაგვის IgG (≤ 10 მკგ/მლ) 10% (v/v) ცხოველის შრატში Tris-ბუფერულ ფიზიოლოგიურ ხსნარში/0.1% ProClin™ 950 (Novolink DAB Polymer Detection system). ყველა იმუნოჰისტოქიმიური რეაქცია ჩატარდა ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ პრეპარატები დათვალიერდა სინათლის მიკროსკოპის ქვეშ. გამოსახულების გადასაღებად გამოყენებული იქნა LAS V4.0 (Leica Microsystems Ltd.) პროგრამული

უზრუნველყოფა. სურათები, რომლებიც გაანალიზებულია ImageJ v1.51 (ჯანმრთელობის ეროვნული ინსტიტუტი, აშშ) გამოყენებით. დადებითი ბირთვების პროცენტული რაოდენობა დათვლილია ImageJ მაკროსის მოდულის - ImmunoRatio-ს გამოყენებით. ციტოპლაზმური შეღებვის ინტენსივობა შეფასდა 4-დონიანი ვიზუალური შეფასების შკალით (0, შეღებვის გარეშე; 1+, სუსტი; 2+, საშუალო და 3+, ძლიერი).

სკანირებადი ელექტრონული მიკროსკოპიული კვლევა

მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპიისათვის ვირთაგვის ენის ქსოვილების ამოკვეთის შემდეგ აღებული მასალა მოთავსდა ლიოფილიზატორში. გამოშრობის დასრულების შემდეგ, ენის ქსოვილი დაიფარა ოქროთი ვაკუუმ ტექნოლოგიის გამოყენებით და მათი გამოსახვა მოხდა JEOL JSM-65 10 LW მასკანირებელი ელექტრონული მიკროსკოპის მეშვეობით (JEOL Ltd, ტოკიო, იაპონია). ელექტრონული მიკროფოტოსურათების გადაღება წარმოებდა სხვადასხვა გადიდებებზე, მიკრორენტგენოსპექტრალური ანალიზი ტარდებოდა ნიმუშის როგორც წერტოლოვანი არედან, ასევე მისი ზედაპირის გარკვეული ფართიდან.

კვლევის შედეგები

ვირთაგვის ენის ანატომიური თავისებურებების შესწავლის შედეგები

ჩატარებულმა ანატომიურმა კვლევებმა გვიჩვენა, რომ თეთრი ლაბორატორიული ვირთაგვის ენას, ისევე როგორც ადამიანის ენას, გააჩნია წვეტი, სხეული და ძირი. ენას აქვს ზედა, ქვედა და გვერდითი ზედაპირები. ენის ზედა, დორსალური ზედაპირი დაფარულია კერატინიზირებული მრავალშრიანი ეპითელიუმით, რომელიც შეიცავს დიდი რაოდენობით სხვადასხვა დვრილებს: 1) ძაფისებრ დვრილებს; 2) სოკოსებრ დვრილებს; 3) ფოთლისებრ დვრილებს და 4) კონუსისებრ დვრილებს.

ენის ეპითელიური შრის ქვეშ მდებარეობს საკუთარი ფირფიტა, რომელიც ძირითადად წარმოდგენილია შემაერთებული ქსოვილით. აღნიშნულნი ერთმანეთისგან გამოყოფილია ბაზალური მემბრანით. ენის სისქეში მდებარე ენის საკუთრივ კუნთები წარმოდგენილია გასწვრივი, განივი და ვერტიკალური კუნთების სახით.

ვირთაგვის ენის ანატომიური კვლევის დროს ჩვენი ყურადღება მიიპყრო ვირთაგვის თავისა და კისრის სისხლძარღვების თავისებურებამ. ანატომიურმა კვლევამ გვიჩვენა, რომ ვირთაგვის მარცხენა საერთო საძილე არტერია გამოეყოფა აორტის რკალს, მარჯვენა კი-მხარ-თავის ღეროს. კისრის მიდამოში ორივე საერთო საძილე არტერიები განლაგებული არიან ტრაქეის პარალელურად და მიემართებიან კრანიალურად. ფარისებრი ჯირკვლის დონეზე საერთო საძილე არტერიები გარეთა და შიგნითა საძილე არტერიებად იყოფა. გარეთა საძილე არტერია შიგნითა საძილე არტერიის მედიალურად და შედარებით ზედაპირულად მდებარეობს.

ნაშრომის მიზნიდან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის ინტერესს წარმოადგენდა ვირთაგვის ენის სისხლძარღვების ტოპოგრაფიული ანატომია. ვირთაგვის ენას სისხლით ამარაგებს გარეთა საძილე არტერიის ტოტი-ენის არტერია, რომელიც თავის მხრივ ენის დორსალურ და ღრმა არტერიებად იყოფა. ენის არტერიას ასევე გამოეყოფა ენისქვეშა არტერია. ენის არტერიის ტოტებს მიჰყვება თანამოსახელე ვენები.

ჩატარებულმა ანატომიურმა კვლევებმა გვიჩვენა რომ ვირთაგვის თავისა და კისრის ვენური სისტემა განსხვავდება ადამიანის თავისა და კისრის ვენური სისტემებისაგან. გარეთა საულლე ვენა შეიძლება წარმოვიდგინოდ როგორც ვირთაგვის კისრის ძირითადი ვენა. ის წარმოიქმნება დინგის კრანიალური და დინგის კაუდალური ვენების შეერთებით. დინგის კრანიალური ვენის ტოტები წარმოდგენილია ზედა ტუჩის და ქვედა ტუჩის ვენებით, ნიკაპქვეშა, ხორხის და ენისქვეშა ვენებით. დინგის კაუდალური ვენების ტოტები კი წარმოდგენილია საფეთქლის ზედაპირული და ზედა ყბის ვენებით. ასევე, დინგის კაუდალური

ვენების ტოტებს მიეკუთნება თვალის ვენა, რომელიც ერთვის საფეთქლის ზედაპირულ ვენას, დინგის განივი ვენა და ლოყის ვენები. გარეთა საულლე ვენა მიემართება კაუდალურად და ერთვის ლავიწქვეშა ვენას. შიგნითა საულლე ვენა წარმოიქმნება ზედა და ქვედა ყბის ვენების შეერთებით. ასევე, შიგნითა საულლე ვენის ტოტებს მიეკუთნება კეფის, ხახის, ფარისებრი ჯირკვლის და საყლაპავის კისრის ნაწილის ვენები. შიგნითა საულლე ვენა ერთვის ზემო ღრუ ვენას.

ენის კუნთების ინერვაცია ხორციელდება ენისქვეშა ნერვით (n. hypoglossus), ხოლო ლორწოვანი გარსის წინა ზედაპირის 2/3-ის მგრძნობიარე ინერვაცია ხორციელდება ენისა და შუამდებარე ნერვებით (n. Lingualis et n. Intermedius), უკანა ზედაპირის კი -ენა-ხახის ნერვით (n. glossopharyngeus).

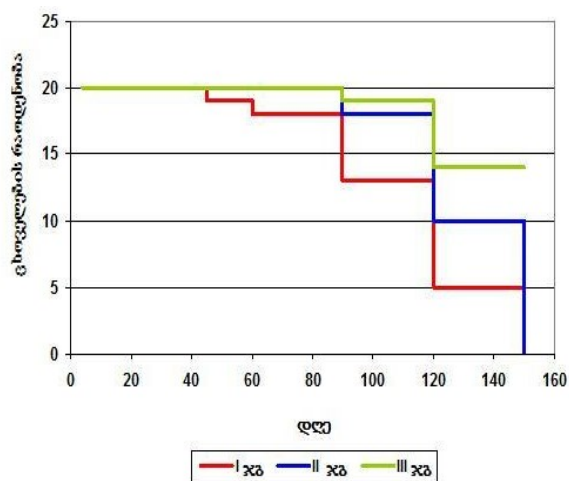
კვლევებით ასევე დადგინდა, რომ ადამიანის და ვირთაგვის ენის ანატომიური და ჰისტოლოგიური აგებულება ძალიან მსგავსია, თუმცა არსებობს რამოდენიმე განსხვავება. მაგალითად, ადამიანის ლორწოვანი წარმოდგენილია არაგარქოვანებული მრავალშრიანი ეპითელიუმით, ხოლო ვირთაგვაში იგი გარქოვანებული ეპითელიუმისაგან შედგება. განსხვავებულია ასევე შრეების სისქე და რაოდენობა, რაც საკვების თავისებურებასთანაა დაკავშირებული. განსხვავებულია ადამიანის და ვირთაგვის ენის ფორმა და ზომაც, რაც ასევე საკვებს უკავშირდება. ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, შეიძლება დავასკვნათ, რომ თეთრი ლაბორატორიული ვირთაგვა შეიძლება გამოყენებულ იქნას პირის ღრუს სხვადასხვა პათოლოგიის მოდელირებისათვის, კერძოდ ენის ბრტყელუჯრედოვანი სიმსივნის მოდელირებისათვის.

ვირთაგვის ენის ბრტყელუჯრედოვანი სიმსივნის მკურნალობის შედეგები

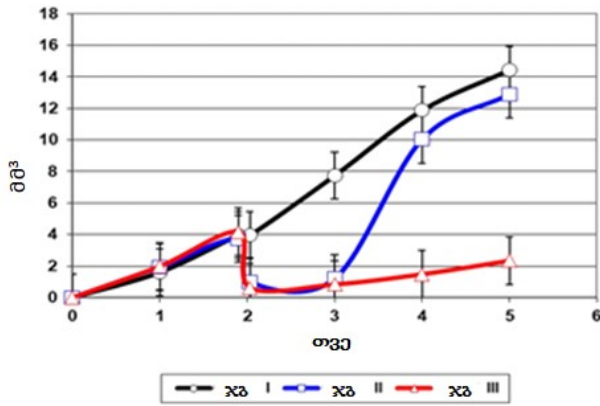
ჩატარებულმა კვლევებმა გვიჩვენა, რომ ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მოდელირებიდან 60 დღის შემდეგ, ცხოველების 95%-ში ვითარდება კარცინომა in situ. ჰისტოლოგიური კვლევის მეთოდებმა გამოავლინეს ეპითელიური უჯრედების პოლარობის დაკარგვა, ბირთვული პლეომორფიზმი და

ჰიპერქრომატიზმი. მიკროსლაიდებზე ნათლად ჩანს ცალკეული უჯრედების პათოლოგიური კერატინიზაცია (დისკერატოზი), ციტოლოგიური დეზორგანიზაცია და პათოლოგიური მიტოზები ლორწქვეშა გარსის ინვაზიის გარეშე. შემაერთებელ ქსოვილში აღენიშნებოდა ანთებითი უჯრედები.

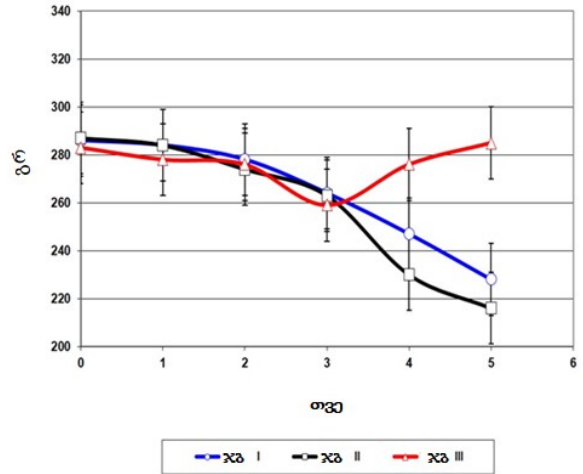
პირველი ჯგუფის ყველა ცხოველი დაიღუპა სხვადასხვა ვადებში მოდელირებიდან ხუთი თვის განმავლობაში. დაღუპვის ძირითადი მიზეზი იყო, ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის პროგრესირება და ინვაზია მიმდებარე ქსოვილებში. მეორე ჯგუფში, სიმსივნის ამოკვეთიდან სამი თვის განმავლობაში დაიღუპა ყველა ცხოველი. დაღუპვის ძირითადი მიზეზი იყო ნარჩენი სიმსივნური უჯრედებიდან განვითარებული კარცინომა, ინვაზიით ენის მიმდებარე ქსოვილებში. მესამე ჯგუფში, კარცინომის ამოკვეთიდან სამი თვის განმავლობაში დაიღუპა 6 (30%) ცხოველი. ცხოველების დაღუპვის მიზეზი იყო ნარჩენი სიმსივნური უჯრედებიდან განვითარებული კარცინომა ინვაზიით ენის მიმდებარე ქსოვილებში. დანარჩენი 14(70%) ცხოველი იმყოფებოდა დაკვირვების ქვეშ. ცხოველებზე დაკვირვების მაქსიმალური ვადა შეადგენდა 150 დღეს. პირველ გრაფიკში მოცემულია ცხოველების სიცოცხლისუნარიანობა მოდელირების და მკურნალობის შემდეგ. მეორე და მესამე გრაფიკში მოცემულია სიმსივნის ზრდის მაჩვენებელი და ცხოველების სხეულის მასის ცვლილება დინამიკაში.



გრაფიკი 1. ცხოველების სიცოცხლისუნარიანობა მოდელირების და მკურნალობის შემდეგ.



გრაფიკი 2. სიმსივნის ზრდის
მაჩვენებელი დინამიკაში



გრაფიკი 3. ცხოველების სხეულის მასის
ცვლილება დინამიკაში

ცხრილებიდან ნათლად ჩანს, რომ მესამე ჯგუფის ცხოველებთან შედარებით, პირველი და მეორე ჯგუფის ცხოველებში დაფიქსირდა სხეულის მასის მკვეთრი შემცირება. იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდებით გამოვლინდა cyclin-D1-ის მაღალი და E-cadherin-ის დაბალი ექსპრესია.

აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ პირველი ჯგუფის ცხოველებში მოდელირებიდან 60 დღის შემდეგ (ორი თვე), განვითარდა კარგად დიფერენცირებული ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომა, კერატინის ფორმირების ნიშნებით. კარცინომის უჯრედებს ახასიათებდა პლეომორფული ჰიპერქრომატული ბირთვი და შეცვლილი ბირთვ/ციტოპლაზმის თანაფარდობა. ბაზალური მემბრანა იყო წყვეტილი. სიმსივნის ინვაზია ნელნელა ხდებოდა ენის კუნთოვან ბოჭკოებში. ჰისტოლოგიურ სურათზე კარგად იყო გამოხატული მარგალიტის ფერის მარცვლები.

პირველ ჯგუფთან შედარებით, მეორე ჯგუფის ცხოველებში, ოპერაციის შემდეგ სიმსივნის ზრდის მაჩვენებელი დათრგუნული იყო 24 დღის განმავლობაში. თუმცა, 30-35 დღის შემდეგ სიმსივნემ სწრაფად დაიწყო პროგრესირება. ოპერაციიდან 5-7 დღის შემდეგ, ყველა ცხოველს განუვითარდა ჭრილობის ნაკერების უკმარისობა.

ქრილობის კიდები იყო შეშუპებული, ნეკროზული, ქრილობის სიღრმეში კი აღინიშნებოდა ჩირქოვანი ექსუდატი. ქრილობის ზედაპირი დაფარული იყო ფიბრინის ბოჭკოებით, ნეკროზული ქსოვილით და უხვი პოლინუკლეარული ნეიტროფილებით. ამ ჯგუფის ცხოველებში ოპერაციიდან სამი თვის განმავლობაში ქრილობის სრული რეპითელიზაცია არ გამოვლენილა. ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, შეიძლება დავასკვნათ, რომ ოპერაციიდან სამი თვის განმავლობაში გამოვლინდა ენის მაღალდიფერენცირებული ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის 14 (70%) შემთხვევა. ამ ჯგუფის სხვა ცხოველებში სხვადასხვა დროს დაფიქსირდა ეპითელური დისპლაზია ატიპიის სხვადასხვა ხარისხით. იმუნოჰისტოქიმიურმა კვლევებმა გვიჩვენა cyclin-D1-ის მაღალი ექსპრესია და E-cadherin-ის დაბალი ექსპრესია, ასევე აღინიშნებოდა Ki-67 და p-63 მაღალი ექსპრესია.

მესამე ჯგუფის ყველა გადარჩენილ ცხოველს ქრილობა შეუხორცდა სიმსივნის ამოკვეთიდან და ჰიდროგელის გამოყენებიდან 20-25 დღეში. აქვე უნდა აღინიშნოს რომ, 150 დღის განმავლობაში სიმსივნის ლოკო/რეგიონალური რეციდივი არ გამოვლენილა. ასევე არ აღინიშნებოდა მეტასტაზები ღვიძლში, ფილტვებსა და თირკმლებში. ქრილობის დაფარვიდან სამი დღის შემდეგ ჰიდროგელმა შეიცვალა ნახევრად გამჭვირვალე ფერი და გახდა მუქი ყავისფერი. ჰიდროგელის ქვეშ აღინიშნებოდა ნეკროზული ქსოვილი, რომელიც გარშემორტყმული იყო ანთებითი უჯრედებით ნეიტროფილებით და ფიბრობლასტებით. 4-6 დღის შემდეგ ქრილობაში განლაგებულ CultiSpher-ს შორის აღინიშნებოდა შემაერთებული ქსოვილის ჭარბი რაოდენობა. მე-8 დღეს, ქრილობაში ანთებით უჯრედებთან ერთად აღინიშნებოდა გრანულაციური ქსოვილის კუნძულები და ფიბრობლასტები. მე-9-10 დღეს ქრილობა შევსებული იყო ფიბრობლასტებით და შემაერთებული ქსოვილით. გადამზიდები ჩაფლულები იყვნენ ახლად წარმოქმნილ შემაერთებულ ქსოვილში. გადამზიდების გარშემო აღინიშნებოდა მრავალი სისხლძარღვი. მე-12 დღეს აღინიშნა რეპითელიზაციის დაწყების პროცესი, ქრილობის კედლების მიახლოება, რომელიც გამოიხატა ორგანიზებული კოლაგენის ჩამოყალიბებაში, ფიბრობლასტების

გაზრდილ რაოდენობასა და ვასკულარიზაციაში. გადამზიდები განლაგებულნი იყვნენ ჰიდროგელში, როგორც ჭრილობის ზედაპირზე, ასევე ჭრილობაში. 14 დღის შემდეგ ანთებითი პროცესი ნაკლებად იყო გამოხატული. ჭრილობის ნახევარზე მეტი დაფარული იყო ეპითელიუმით, ხოლო ნაწილში ვარდისფერი გრანულაციური ქსოვილი აღინიშნებოდა. გადამზიდები განიცდიდნენ რეზორბციას. იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდებით გამოვლინდა cyclin-D1-ის დაბალი და E-cadherin-ის საშუალო ექსპრესია.

ენერგოდისპერსიულმა მიკრორენტგენოსპექტრალურმა ანალიზმა გვიჩვენა, რომ პეგ-ფიბრინის გელში მოთავსებული კოლაგენის მიკროგადამზიდები(CultiSpher) დიფუზურად იყო გადანაწილებული, როგორც გელის ზედაპირზე, ასევე გელის სისქეში, დაზიანების გარეშე. მათზე მოთავსებულ პლატინის ნანონაწილაკებს ზომით 10.7 – 11.2 ნმ, ჰქონდათ ცილინდრული ფორმა. ენერგოდისპერსიულმა მიკრორენტგენოსპექტრალურმა ანალიზმა გვიჩვენა, რომ პეგ-ფიბრინის გელი შეიცავს 29.1 მგ. პლატინის ნანონაწილაკებს. რაც შეეხება ძვლის ტვინის ღეროვან უჯრედებსა და მათ როლს ჭრილობის სწრაფ შეხორცების პროცესში, გვინდა ავღნიშნოთ თსსუ-ს ექსპერიმენტულ ანატომიის დეპარტამენტში ადრე ჩატარებულ კვლევების საფუძველზე დადასტურდა, რომ ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედები შეიცავს ისეთ ზრდის ფაქტორებსა და ციტოკინებს, როგორცაა სისხლძარღვთა ენდოთელიალური ზრდის ფაქტორი (VEGF), თრომბოციტებიდან წარმოებული ზრდის ფაქტორები (PDGF), მატრანსფორმირებელი ზრდის ფაქტორი- β 1 (TGF- β 1), TGF- β 3, TGF ალფა, ფიბრობლასტების ზრდის ფაქტორი და სხვა, რომლებიც ჭრილობაში მოთავსების შემდეგ ხელს უწყობენ უჯრედების პროლიფერაციას, მიგრაციას, დიფერენცირებას და როგორც შედეგი, ჭრილობის სწრაფ რეგენერაციას.

კვლევის შედეგების ანალიზი

მრავალი წელია, რაც ქირურგიულ პრაქტიკაში, ჭრილობის სწრაფი რეეპითელიზაციისთვის ფართოდ გამოიყენება ბიოლოგიურად აქტიური საფენი

ფიბრინ/თრომბინის გელი, რომელმაც უკანასკნელ პერიოდში არსებითი გამოყენება ჰპოვა ქსოვილოვან ინჟინერიაში და ონკოლოგიაში. ლიტერატურაში გვხვდება ურთიერთსაწინააღმდეგო მონაცემები ფიბრინის გამოყენებასთან დაკავშირებით. კერძოდ, როგორც ცნობილია, ფიბრინოგენი გავლენას ახდენს სიმსივნის ზრდასა და მეტასტაზების განვითარებაზე *in vivo*. ასევე სამგანზომილებიანი ფიბრინის გელი ხელს უწყობს სიმსივნური უჯრედების სელექციასა და პროლიფერაციას, თუმცა არსებობს მონაცემები, რომ *in situ* სიმსივნის საწინააღმდეგო პრეპარატის კონდენსაცია ფიბრინის გელში ახდენს სიმსივნური უჯრედების ზრდის ინჰიბიციას. მაგალითად, ფიბრინოგენ-თრომბინის საფენი ეფექტურად იყო გამოყენებული კლინიკურ პრაქტიკაში, კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის ზედა ნაწილის კიბოს ქირურგიული მკურნალობისას. ამჟამად, ფიბრინოგენიდან დამზადებული მიკრო- და ნანოსტრუქტურული ბიორეზორბირებადი პოლიმერული გადამზიდები ეფექტურად გამოყენება წამლის ლოკალური მიწოდების სისტემის შესაქმნელად. ასევე უნდა აღინიშნოს, რომ ფიბრინოგენი წარმატებულად იქნა გამოყენებული, როგორც სიმსივნის საწინააღმდეგო პრეპარატის 5-ფლუოროურაცილის გადამზიდი. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ფიბრინის გელი აძლიერებს წამლის სიმსივნის საწინააღმდეგო თვისებებს თავების კანქვეშა კოლორექტალური სიმსივნის აბდომინალური მეტასტაზის მოდელებში.

ჩვენი კვლევის მიზნებიდან გამომდინარე საჭირო იყო ისეთი გელის შექმნა, რომელიც შესაძლებელს გახდიდა სიმსივნის საწინააღმდეგო წამლის გამოთავისუფლებას ლოკალურად, პროლონგირებული მოქმედებით, რაც თავის მხრივ გამოიწვევდა სიმსივნის ამოკვეთის შემდგომ ნარჩენი სიმსივნური უჯრედების განადგურებას და ჭრილობის შეხორცების პროცესის დაჩქარებას.

ვირთავებში ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის მოდელის მკურნალობის მიზნით ჩვენს მიერ შემუშავებულმა ჰიდროგელის გამოყენებამ დაადასტურა ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის ამოკვეთის შემდეგ ნარჩენი სიმსივნური უჯრედების განადგურების ეფექტურობა. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ჩვენი

მეთოდით ნამკურნალები ცხოველების 80%-ში აღინიშნებოდა სიმსივნის ზრდის კარგად გამოხატული სუპრესია და სიმსივნის რეციდივი არ გამოვლენილა 150 დღის განმავლობაში (დაკვირვების სრული პერიოდი). დამატებით უნდა ითქვას, რომ ცხოველების უმეტესობაში სიმსივნის ამოკვეთიდან და ჰიდროგელის ჭრილობაში შეყვანიდან 20-25 დღის შემდეგ მოხდა ჭრილობის სრული რეეპითელიზაცია. მასკანირებადი ელექტრონული მიკროსკოპული ანალიზით დაფიქსირდა პლატინის არსებობა ჰიდროგელში, რომელიც თანაბრად იყო გადანაწილებული გელის ზედაპირსა და სიღრმეში. 10.7-11.2 ნმ-ის ზომის პლატინის ნანონაწილაკებს ჰქონდათ ცილინდრული და ოვალური ფორმა. უნდა აღინიშნოს, რომ გელის ჭრილობაში მოთავსების შემდეგ პლატინის შემცველობის მაჩვენებელი არ შეცვლილა 5 თვის განმავლობაში და შესაბამისად გამოვლინდა ნარჩენ სიმსივნურ უჯრედებზე მათი პროლონგირებული მოქმედების დადებითი ეფექტი.

ჩვენ დავადასტურეთ, რომ სიმსივნის ამოკვეთისა და ჭრილობის ჰიდროგელით დაფარვის შემდეგ, ჰიდროგელში არსებული გადამზიდები Cultispher-S შეიძლება გახდეს *in vivo* ხაფანგი ნარჩენი სიმსივნური უჯრედებისათვის. გადამზიდის ფოროვანი სტრუქტურა განაპირობებს სიმსივნის უჯრედების მიმაგრებას და მიგრაციას, როგორც გადამზიდის ზედაპირზე, ასევე მის შიგნით, ხოლო ცისპლატინით დატვირთული Cultispher-ი ანადგურებს სიმსივნის უჯრედებს.

ჩვენ ასევე დავადასტურეთ, რომ ჰიდროგელის შიდა ფენას, რომელიც უშუალოდ შედის კონტაქტში ჭრილობის ზედაპირთან, შეუძლია ცისპლატინის ადგილობრივად გამოყოფა პროლონგირებულად გარკვეული პერიოდის განმავლობაში და ნებისმიერი ნარჩენი სიმსივნური უჯრედის განადგურება. ჰიდროგელის ზედა ფენა შედგებოდა გადამზიდი Cultispher-სა და ლიოფილიზირებული ძვლის ტვინის ღეროვანი უჯრედებისაგან (BMSC). Cultispher-ებმა თავისი სამგანზომილებიანი სტრუქტურების საშუალებით ამოავსო ჭრილობის ღრუ, ხოლო ლიოფილიზირებულმა BMSC-ების პარაკრინულმა ფაქტორებმა გააძლიერა ჭრილობის რეეპითელიზაციის პროცესი. ლიოფილიზირებული BMSC-

ების გამოყენება შეუხორცებელი ჭრილობის სამკურნალოდ განხილული იყო წინა კვლევებში. კერძოდ, ლიოფილიზირებული ღეროვანი უჯრედები ეფექტურად იქნა გამოყენებული რადიაციული თერაპიის შედეგად განვითარებული შეუხორცებელი ჭრილობის სამკურნალოდ. აღნიშნულმა კვლევამ დაადასტურა, რომ ლიოფილიზირებული BMSC-ები ინარჩუნებენ თავის უნიკალურ პარაკრინულ ფაქტორებს და აღნიშნულით ხელს უწყობენ შეუხორცებელი ჭრილობის რეპიტელიზაციას. ქრონიკული შეუხორცებელი ჭრილობის ღეროვანი უჯრედებით თერაპიულმა მკურნალობამ აჩვენა დიდი პოტენციალი მთელ რიგ პრეკლინიკურ და კლინიკურ კვლევებში. როგორც ავლნიშნეთ, ლიტერატურულ მიმოხილვაში, მეზენქიმური ღეროვანი უჯრედები შეიცავს კერატინოციტების ზრდის ფაქტორს, ეპიდერმულ ზრდის ფაქტორს, ენდოთელიალურ ზრდის ფაქტორს და სხვ; თუმცა დღემდე არ არსებობს მტკიცებითი პასუხი იმ ზუსტ მექანიზმთან დაკავშირებით, რომლითაც BMSC-ების პარაკრინული ფაქტორები დადებით ეფექტს ახდენენ ჭრილობის შეხორცებაზე. ასევე ბოლომდე არ არის ახსნილი მექანიზმი, რომლითაც ჰიდროგელი თრგუნავს სიმსივნური უჯრედების ზრდას. ეს კი მოითხოვს დამატებით კვლევებს ჰიდროგელის მიერ სიმსივნის ზრდის სუპრესიის მექანიზმის გასარკვევად.

დასკვნები

- ჩვენს მიერ შემუშავებული ჰიდროგელი შეიძლება გამოყენებულ იქნას ეფექტურად ენის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომის ამოკვეთის შემდგომ ლოკო/რეგიონალური მეტასტაზის განვითარების პრევენციასათვის.
- ჰიდროგელი ინარჩუნებს ცისპლატინის საჭირო კონცენტრაციას სიმსივნის სარეცელში კარცინომის ამოკვეთის შემდეგ და პროლონგირებულად ზემოქმედებს უშალოდ "ნარჩენ" სიმსივნურ უჯრედებზე;
- ბიოდეგრადირებადი ჰიდროგელიდან წამლის გამოთავისუფლების რეგულირება (რამოდენიმე დღიდან რამოდენიმე თვემდე) შესაძლებელია გელის ქიმიური და

ფიზიკური თვისებების მოდიფიკაციით, რაც გამოიხატება ჰიდროგელის ნანობოჭკოების სიმკვრივის შეცვლაში;

- ჰიდროგელი ამცირებს ცისპლატინით გამოწვეულ გვერდით მოვლენებს დააძლიერებს მის ანტისიმსივნურ აქტივობას;
- ჰიდროგელი შეიძლება გამოიყენებულ იქნას სიმსივნის მკურნალობის სხვა მეთოდებთან ერთად კომბინაციაში;
- ჰიდროგელის ერთჯერადი შეყვანა უშუალოდ სიმსივნეში ან სიმსივნის სარეცელში მისი ამოკვეთის შემდეგ, სიმსივნის საწინააღმდეგო წამლების მრავალჯერადი ინტრავენური ინექციის თავიდან აცილების საშუალებას გვაძლევს.

პრაქტიკული რეკომენდაციები

კვლევის პრაქტიკულ ღირებულებას წარმოადგენს ის, რომ ჰიდროგელის ადგილობრივი შეყვანა ჭრილობაში სიმსივნის ამოკვეთის შემდეგ გამოიწვევს ცისპლატინის საჭირო კონცენტრაციის შენარჩუნებას და პროლონგირებულ ზემოქმედებას უშუალოდ ნარჩენ სიმსივნურ უჯრედებზე. ასეთი სამკურნალო ფორმის გამოყენება მრავალჯერადი ინტრავენური ინექციის თავიდან აცილების საშუალებას მოგვცემს. ჰიდროგელი შეიძლება გამოიყენებულ იქნას მკურნალობის სხვა მეთოდებთან ერთად კომბინაციაში. მიღებული კვლევის შედეგი მნიშვნელოვნად გაზრდის ონკოლოგიური ავადმყოფების მკურნალობის ეფექტურობას.

გამოქვეყნებულ ნაშრომების სია

Kakabadze MZ, Paresishvili T, Karalashvili L, Chakhunashvili D, Kakabadze Z. Oral microbiota and oral cancer: Review. *Oncol Rev.* 2020 Jul 6;14(2):476. doi: 10.4081/oncol.2020.476. PMID: 32676172; PMCID: PMC7358985.

Kakabadze MZ, Paresishvili T, Kordzaia D, Karalashvili L, Chakhunashvili D, Kakabadze Z. RELATIONSHIP BETWEEN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND IMPLANTS (REVIEW). Georgian Med News. 2020 Sep;(306):147-151. PMID: 33130663.

Kakabadze MZ, Paresishvili T, Mardaleishvili K, Vadachkoria Z, Kipshidze N, Jangavadze M, Karalashvili L, Ghambashidze K, Chakhunashvili D, Kakabadze Z. Local drug delivery system for the treatment of tongue squamous cell carcinoma in rats. Oncol Lett. 2022 Jan;23(1):13. doi: 10.3892/ol.2021.13131. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34820012; PMCID: PMC8607325

Ivane Javakhsishvili Tbilisi State University

With the right of handwriting

Mariam Kakabadze

A presented dissertation to obtain an academic
degree of doctor of medicine

Self-report

Tbilisi

2022

Introduction

Relevance of the problem

Malignant tumor is one of the most important medical and social problems both in Georgia and in many countries of the world. More than 300,000 new cases of oral cancer are diagnosed every year, and about 145,400 cases with lethal outcome are registered.

Among malignant tumors of the oral cavity, squamous cell carcinoma occurs in 80-90% of cases. Currently, surgical methods, as well as chemotherapy, radiation therapy, immunotherapy and their combinations are used for the treatment of oral squamous cell carcinoma. Every above-mentioned method has its purpose and role in the cancer treatment process. It should be noted that the surgical method is preferred in the treatment of oral squamous cell carcinoma. However, after the radical excision of the carcinoma, the presence of "residual" tumor cells is frequent, which becomes the reason for the recurrence. Since the traditional systemic chemotherapy is characterized by toxicity, which damages not only tumor cells, but also healthy cells and tissues that leads to the development of rather severe side effects and suppression of the immune system, throughout the recent years, local drug delivery systems have attracted great interest in clinical oncology. They can provide the accumulation of pro-tumor drugs directly in the tumor, exert a prolonged effect of the drug on tumor cells, and at the same time prevent the development of side effects caused by these drugs. While working on developing such forms of treatment and systems, it is very important to deliver the antitumor drug with high precision and to release the required amount of the treatment substance encapsulated on the carrier in the desired tumor area. In modern biotechnology, nanoparticles that are created with organic and inorganic materials, biodegradable and biocompatible polymers and gels are used as carriers of chemotherapeutic drugs. Biodegradable and biocompatible hydrogels loaded with antitumor drug allow the maintenance of the required concentration of the active drug and provides a prolonged effect locally, directly in the target organ or in its surrounding area. In addition, the use of such a pharmaceutical form makes it possible to avoid multiple injections.

We hypothesized that a local drug delivery system created on the basis of hydrogel can become a solution for destroying "residual" tumor cells in the tumor bed after the resection of squamous cell carcinoma of the tongue, which in turn will help prevent the recurrence and multiple injections.

The purpose and objectives of the research

The aim of the dissertation is to create a controlled local drug delivery system and determine its effectiveness in the treatment of squamous cell carcinoma of the tongue in animals.

To achieve this goal, we have outlined the following tasks:

- To create a biodegradable, two-layer, multi-component hydrogel based on fibrinogen-thrombin and its use as a controlled local drug delivery system;
- To load the carrier (CultiSpher) with an antitumor drug (cisplatin) and to place it in the fibrin-thrombin hydrogel (bottom layer);
- To isolate bone marrow stem cells and develop lyophilization method;
- To place the lyophilized bone marrow stem cells on the carrier and to create the upper layer of fibrin thrombin hydrogel;
- To model squamous cell carcinoma of the tongue in animals;
- To remove squamous cell carcinoma of the tongue and to cover the tumor cell with hydrogel developed by us;
- To evaluate the efficiency of hydrogel through animal observation, laboratory, histological, immunohistochemical, radiological and scanning electron microscopy methods.

Scientific Novelty

For the first time in the world, we have developed a biocompatible, biodegradable, hydrogel-based two-layer local drug delivery system. The bottom layer of the hydrogel that contains cisplatin-loaded carriers (CultiSpher) can destroy the "residual" tumor cells in the wound after the tumor removal. The upper layer of the hydrogel is represented by the carrier (CultiSpher) and the lyophilized bone marrow stem cells that are placed on it, and it contributes to the rapid re-epithelialization of the wound. For the destruction of residual tumor cells after the removal of squamous cell carcinoma of the tongue, the hydrogel was used by us for the first time. Also, with the help of hydrogel, it was possible to prolong the release of cisplatin in the tumor bed after excision of squamous cell carcinoma of the tongue and reduce the side effects caused by cisplatin.

Practical Value

Biodegradable hydrogel that we developed can be used for covering tumor bed after the removal of the tumor, which destroys "residual" mast cells and prevents loco/regional metastases. In addition, the use of such form of drug allows to avoid multiple intravenous injections and prevents side effects caused by the drug. The obtained result of the study will significantly increase the effectiveness of the treatment of oncological patients. Hydrogel can be used in combination with other cancer treatment methods.

Basic theses for dissertation defense

- Unlike the hydrogels available in the medical market of the world, the hydrogel that we developed has a multi-component, two-layer structure represented by collagen carriers loaded with fibrinogen, cisplatin and lyophilized bone marrow stem cells (CultiSpher);

- With the hydrogel, after the removal of squamous cell carcinoma of the tongue, it is possible to deliver cisplatin to the tumor bed with high-precision and to provide a prolonged release of the pre-tumor drug placed on the carrier for the destruction of residual tumor cells;
- Local delivery system of pre-tumor drug in the tumor bed significantly increases the effectiveness of treatment, prevents loco/regional recurrences and reduces side effects caused by cisplatin;
- The use of lyophilized bone marrow stem cells added anti-inflammatory and antimicrobial properties to the hydrogel, which promotes rapid re-epithelialization of the wound;
- Hydrogel is biologically safe, biodegradable, biocompatible with oral tissues and meets all requirements for local drug delivery systems.

Approbation of the study

At each stage of the study, the obtained results were reported at the following congresses and conferences: the 5th International Conference on Dental Science and Education & Surgery, and the 5th International Surgery and Surgeons Meet (New York, USA 2019). At the symposium dedicated to the memory of Academician Nino Javakhishvili ("Conversations on Morphology" (Tbilisi 2021); I International Conference "Translational and Clinical Medicine" Tbilisi 2022;

Materials and methods

The first part of the research was to develop the method of creating a multi-component hydrogel. The hydrogel developed by us consists of two layers: the internal layer of the hydrogel was formed using PEG-fibrin gel and cisplatin-loaded collagen carrier

(CultiSpher). Peg-fibrin gel was used to form the external layer of the hydrogel, in which a collagen carrier (CultiSpher) and lyophilized BMSCs were placed.

Creating an internal layer of the hydrogel

An internal layer of the gel was created by slightly modifying a previously published protocol for creating polyethylene glycol (PEG)-fibrin gel, which was developed by Zhang *et al.* TBS (40 mg/ml; pH 7.8) and 250 μ l PEG were added to 500 μ l commercially purchased fibrinogen (Sigma-Aldrich). The acquired compound was then placed in a Falcon® 24-well Companion Plate (Falcon; Corning Life Sciences) and incubated at 37°C for 20 min. The compound that was generated through this method was called pegylated fibrinogen (PGF). After incubation, carriers (CultiSpher) were placed in PGF, on the surface of which the antitumor drug cisplatin was placed. To obtain the final product, after placing the PGF in the wound, 52 U/ml thrombin diluted in saline solution (Sigma-Aldrich) was added. While merging of these two components, a glutinous mass was formed and it became thick within 5–6 seconds, which presented itself as a transparent soft hydrogel. It should be noted that, in our study, in order to convert PGF into pegylated fibrin hydrogel, we were adding 52 U/ml of thrombin during the wound treatment.

Preparation of cisplatin-loaded CultiSpher microcarrier

A commercially purchased dried three-dimensional collagen-gelatin carrier (CultiSpher) with a size of 100 microns was placed in phosphate-buffered saline (PBS) for one hour for hydration. After hydration, foamed collagen microcarriers (CultiSpher), 7.0 ml of anti-tumor drug solution Cisplatin Solution (50mg/100 ml), (KOSAK FARMA, Turkey), the main components of which are divalent platinum and 3.0 ml of 1% sodium citrate, were placed in the cell shaker spinner flask (Sigma-Aldrich) and stirred gently for 4 h (at 40 rpm). Subsequently, the solution was transferred to a 50-ml Falcon test tube (Falcon; Corning Life Sciences), where 15 ml cisplatin solution was added, and subsequently centrifuged at a

10,000 × g . After removing the supernatant part of the carriers was sent for morphological studies, and the other part, after lyophilization and sterilization was stored until further use.

Creating an external layer of the hydrogel

Peg-fibrin gel was also used to create the external layer of the hydrogel, in which the carrier (CultiSpher) and lyophilized bone marrow stem cells (BMSCs) were placed.

Obtaining BMSCs and placing them on the surface of a carrier (CultiSpher)

For obtaining BMSCs, 20 Lewis inbred laboratory rats of both sexes weighing 200–250 g were used. Animals were euthanized with thiopental sodium (MilliporeSigma) with an intraperitoneal dose of 200 mg/kg. The lower extremities were amputated after being treated with 70% ethanol solution. Femurs, which were cleared of muscle tissues, were resected in the epiphysis and diaphysis areas. After the aspiration of bone marrow, it was dissociated with sodium citrate, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and Dullbeco's solution. The mononuclear fraction was isolated by density gradient method using Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). A small fraction of isolated mononuclear cells were placed in a Neubauer chamber. Cell yield and their viability were determined under the microscope using trypan blue. The second part of the cells (3.0×10^6), together with microcarriers CultiSpher-S, were placed in 12 wells of a Falcon 24-well Companion Plate (Falcon; Corning Life Sciences) and incubated for 1 h. DMEM, 10% FBS (MilliporeSigma), 50 U/ml penicillin and 0.05 mg/ml streptomycin was used as the cell culture medium. An orbital shaker (110 rpm), onto which a plate was placed, was then introduced into the incubator. The cells were co-cultured with CultiSpher-S for 7 days. The culture medium was changed every 3 days. Upon culture, CultiSpher-S and BMSCs were placed in a freeze-drier for lyophilization “Power Dry PL 6000 Freeze Dryers” (Heto Labware) and then stored under sterile conditions at a room temperature until further use. To convert the pegylated fibrinogen into the

hydrogel as well as during the formation of the first layer, thrombin was added directly during the wound treatment.

Study of the anatomical features of the rat's oral cavity

Before creating a squamous cell carcinoma model, the anatomical features of the oral cavity and tongue of the rats were studied. For this purpose, the anatomical research methods such as soft tissue layered dissection, injection of colored and X-ray contrasting dyes into blood vessels, transillumination blood vessels to determine the capillary network of the tongue were used. A morphometric study of the tissues of the tongue was also performed. Under general anesthesia, the animals underwent laparotomy. After separating the aorta and inferior vena cava, X-ray contrast solution (cardiotrast) with the red latex (NAIRIT-L3) was inserted in the aorta, and blue one in the inferior vena cava. Blood vessels were visualized with transillumination stereoscopic microscope MBS-9 LOMO (Russia) using halogen light source OS-100 (Russia) optical fiber lighting, and for radiological examination with (DVS-100) visiograph, Diox (DigiMed) x-ray machine, and orthophos (SL 3D) computed tomography.

Rat model of squamous cell carcinoma of the tongue

Based on the results of the anatomical study, 60 Lewis line white laboratory rats of both sexes (age, 8 weeks; weight, ~250 g) were selected for modeling the squamous cell carcinoma of the tongue. The animals were acquired from the vivarium of Aleksandre Natishvili Institute of Morphology, Tbilisi State University. All studies were conducted in accordance with international standards (Directive 2010-63-EU on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes, 2010; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed., 2011) according to IACUC guideline.

For establishing a model of squamous cell carcinoma of the tongue in rats, 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) (MilliporeSigma) has been used, which is a water soluble

tumorigenic quinoline compound. Once a week, the solution (1 mg/5 l) was prepared that was dissolved with the drinking water to acquire the solution with the concentration of 0.001%. The solution was placed in the bottles and given to the rats for 8 weeks. After 50-55 days from the creation of a model of squamous cell carcinoma, 95% of rats have developed a well-defined carcinoma in situ on the surface of the tongue the presence of which was confirmed by histopathological and immunohistochemical methods.

Methods of treatment of squamous cell carcinoma of the tongue in rats

All surgical procedures on animals were performed under the general anesthesia, intraperitoneally with ethaminal-sodium (30mg/kg). The animals were divided into 3 equivalent groups.

After tumor modeling, the animals of the first group (n = 20) served as the controls and were observed without treatment.

At 2 months after the initiation of the animal model, 85% of squamous cell carcinoma was removed in the animals of the second group, and the 0.5 cm diameter wound was closed with knotted atraumatic sutures (5.0 Ethicon, Inc.; Johnson & Johnson).

In the animals of the third group, at 2 months from the beginning of modeling, 85% of squamous cell carcinoma tumor was also removed, and our hydrogel was introduced into the 0.5 cm diameter wound. Table 1 shows the types of surgical interventions, groups and the numbers of experimental animals.

Table 1. Types of operative intervention, groups and number of experimental animals.

Experimental animal groups	Number of experimental animals	Types of surgical interventions
I	20	Modeling squamous cell carcinoma on the tongue of the rat without treatment
II	20	Modeling squamous cell carcinoma on the tongue of the rat. Tumor excision. Wound closed with knotted sutures
III	20	Modeling squamous cell carcinoma on the tongue of the rat. Tumor excision. Wound covered with a biodegradable, two-layer hydrogel

After the surgery, all animals were placed in standard vivarium conditions and euthanized at the following time points: 1, 3, 5, 7, 14, 18, 25, 30, 60, 90, and 120 days.

Methods of the histological and immunohistochemical research

For histological study, the tissue material of the rat tongue taken at different time points after the surgery were obtained for histological examination that was fixed in 10% neutral formalin and then embedded in paraffin, and was cut into 5 micron thick slices. After paraffinization and rehydration, the tissue was stained with hematoxylin-eosin and Mason's Trichrome (Bio-Optica, Italy).

For the histopathological studies, the tongue tumor and its surrounding tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h at room temperature, embedded in paraffin and cut into 5- μ m thick slices. After deparaffinization and rehydration, the tissues were stained with hematoxylin and eosin (Leica Biosystems Newcastle Ltd.), and Masson's

trichrome (Bio-Optica Ltd.) at a room temperature for 35 min in accordance with the manufacturers' protocols. Immunostaining was performed with anti-p63 (incubation time, 20 min; clone 7JUL; dilution 1:25; cat. no. PA0103; Leica Biosystems Newcastle Ltd.), anti-Ki67 (incubation time, 20 min; clone MM1; dilution 1:200; cat. no. PA0118; Leica Biosystems Newcastle Ltd.), anti-cyclin D1 (incubation time, 20 min; clone EP12; dilution 1:50; cat. no. PA0046; Leica Biosystems Newcastle Ltd.), and anti-E cadherin (incubation time, 20 min; clone 36B5; dilution 1:25; cat. no. PA0387; Leica Biosystems Newcastle Ltd.). Antibody identification was performed with the manual staining method using the Novolink DAB Polymer Detection system (incubation time, 20 min; cat no. RE7260-CE; Leica Biosystems Newcastle Ltd.) in accordance with the manufacturer's recommendations. Endogenous peroxidase activity was neutralized using the Peroxidase Block reagent [3–4% (v/v) hydrogen peroxide; Novolink DAB Polymer Detection system; cat. no. RE7260-CE; Leica Biosystems Newcastle Ltd.]. To reduce non-specific binding of primary antibody Novocastra Protein Block reagent was used (0.4% casein in phosphate-buffered saline, with stabilizers, surfactant and 0.2% Bronidox L as a preservative; Novolink DAB Polymer Detection system). As the secondary antibody, rabbit anti-mouse IgG (<10 µg/ml) in 10% (v/v) animal serum in Tris-buffered saline/0.1% ProClin™ 950 was used (Novolink DAB Polymer Detection system). All reactions for immunohistochemistry were performed at room temperature. The samples were next observed under a light microscope. For image capture, the LAS V4.0 (Leica Microsystems Ltd.) software was used. Images than was analyzed using ImageJ v1.51 (National Institutes of Health). Percentage of positive nuclei were counted using the ImmunoRatio macros plugin for ImageJ. Intensity of cytoplasmic staining was evaluated by a 4-tier visual scoring method (0, no staining; 1+, weak; 2+, moderate; and 3+, strong).

Scanning electron microscopy

For the scanning electron microscopy, after the removal, the tongue tissues of the rat were placed in the freeze-drier. After the freeze-drying, the surface of the tongue was coated

with gold using the vacuum technology, and it was visualized with JEOL JSM-65 10 LW scanning electron microscope (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan). The electron microscopy images were taken at various magnifications, and micro-X-ray spectral analysis was carried out both from the point area of the sample, as well as from a certain area of its surface.

Research Results

Results of anatomical research

Anatomical studies have shown that, just like the human tongue, the tongue of the white lab rat has a tip, a body, and a base. The tongue has the dorsal, ventral, and lateral surfaces. The dorsal surface of the tongue is covered by partially keratinized stratified squamous epithelium which contains a large number of different papillae: filiform, fungiform, conical and circumvallate papillae.

The lamina propria is located under the epithelial layer, and is separated from it by the basal membrane. The muscles of the tongue of the rat are represented as longitudinal, transverse and vertical muscles.

In the anatomical study of the head and neck of the rat, our main attention was focused on the characteristics of blood vessels. Anatomical study has shown that the right common carotid artery (a. Carotis communis dextra) is an extension of the truncus brachiocephalicus, while the left one protrudes directly from the aortic arch. Both arteries run cranially and are located in parallel to the trachea at the level of the lower edge of the thyroid gland. At this level, they are divided into internal and external carotid arteries. The external carotid artery lies medial and superficially to the internal carotid artery.

Based on the aim of the work, the topographical anatomy of the blood vessels of the tongue of the rat was of major interest to our research. The tongue of the rat was supplied

with blood by a branch of the external carotid artery - the tongue artery, which in turn was divided into the dorsal and deep arteries of the tongue. The sublingual artery was also singled out from the tongue artery. Branches of the tongue artery were followed by veins of the same name. Anatomical studies have shown that the head and neck venous system of the rat was different from the head and neck venous system of a human. The external jugular vein can be considered as the major neck vein of the rat. It was formed by the junction of the cranial veins of snout and the caudal veins of snout. The branches of the cranial vein of the snout were presented by veins of the upper lip and lower lip, submental, laryngeal and sublingual veins. The branches of the caudal veins of snout were represented by the superficial temporal and maxillary veins. Also, the branches of the caudal veins of snout were the ophthalmic vein, which joined the superficial temporal vein, the transverse vein of snout, and the cheek veins. The external jugular vein was directed caudally and joined the subclavian vein. The internal jugular vein was formed by the junction of the maxillary and mandibular veins. Also, the branches of the internal jugular vein were the veins of the occipital, throat, thyroid gland and the neck part of the veins of the esophagus. The internal jugular vein joined the superior vena cava.

The muscles of the tongue were innervated by the sublingual nerve (n. hypoglossus), while the sensitive innervation of the front 2/3 of the mucous membrane was carried out by the tongue and intermediate nerves (n. Lingualis et n. Intermedius), and the back surface by the glossopharyngeal nerve (n. glossopharyngeus).

Studies have also shown that the anatomical and histological structure of the human and rat tongue was very similar, but there were some differences. For example, the human mucosa was represented by a non-keratinized multi-layered epithelium, while in the rat it consisted of a keratinized epithelium. The thickness and number of layers were also different, which was related to the characteristics of the food. The shape and size of human and rat tongues were also different, which was also related to food. Based on the above, it can

be concluded that the white laboratory rat can be used to model various pathologies of the oral cavity, in particular, to model squamous cell tumors of the tongue.

Treatment of the squamous cell carcinoma of the rat

The studies have demonstrated that after 60 days from the modeling of squamous cell carcinoma of the tongue, carcinoma in situ is developing in 95% of the rats. Histological study results have revealed the loss of polarity of epithelial cells, nuclear pleomorphism and hyperchromatism. Also, abnormal keratinization of individual cells (dyskeratosis), cytological disorganization and abnormal mitoses without the invasion of submucosa were noted. There were inflammatory cells in the connective tissue.

Throughout first five months after the modeling, all animals of the first group have died at various time points. The main cause of death was the progression of squamous cell carcinoma and its invasion into the surrounding tissues.

All animals of the second group have died after three months from the removal of the carcinoma. The main cause of death was carcinoma that developed from residual tumor cells invading the surrounding tissues of the tongue.

In the third group of animals, 6 (30%) animals have died after three months from the removal of carcinoma. The cause of death was the carcinoma, which developed from residual tumor cells invading the surrounding tissues of the tongue. The other 14 (70%) animals have remained under observation. The maximal observation period of these animals was 150 days. The table 1 shows the viability of animals after modeling and treatment. Tables 2 and 3 show the rate of tumor growth and the change in body weight of animals.

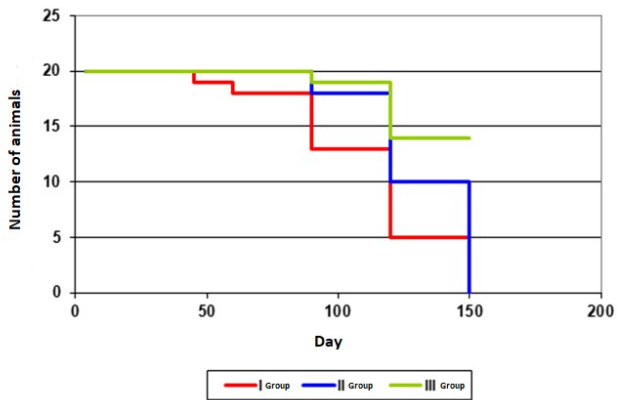


Table 1. The viability of animals after modeling and treatment

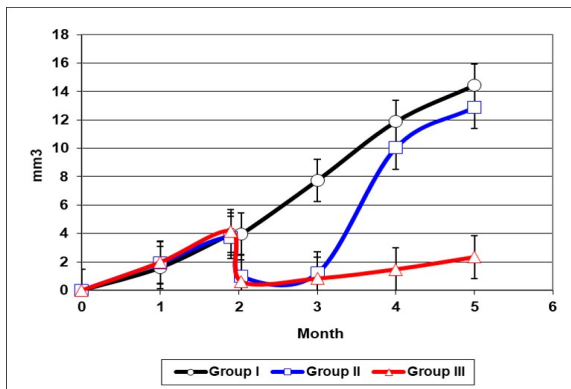


Table 2. The dynamics of development of carcinoma in the animals of the group 1, 2 and 3.

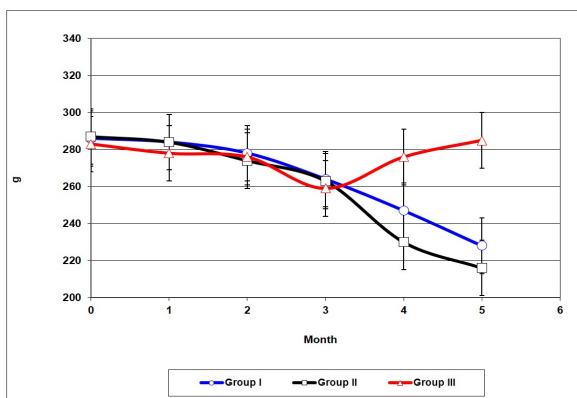


Table 3. The change in body weight of animals.

It should be noted that in animals of the first group, 60 days (two months) after modeling, a well-differentiated squamous cell carcinoma with signs of keratin formation has developed. Carcinoma cells were characterized by pleomorphic hyperchromatic nuclei and an altered nucleus/cytoplasm ratio. The base membrane was discontinuous. Tumor invasion was slow in the muscle fibers of the tongue. On the histological image, pearl-colored granules were clearly visible.

Compared to the animals of the first group, in the animals of the second group, the rate of tumor growth was slightly inhibited through 24 days after the surgery. However, after 30-35 days, the tumor began to progress rapidly. Wound suture failure has developed in all animals from 5 to 7 days after the surgery. The wound surface was covered with fibrin fibers, necrotic tissue and abundant polynuclear neutrophils. In animals of this group, complete re-epithelialization of the wound was not detected after three months from the surgery. Considering the abovementioned, it can be concluded that 14 (70%) cases of highly differentiated squamous cell carcinoma of the tongue were detected within three months after the surgery. In other animals of this group, epithelial dysplasia with varying degrees of atypia was observed at different time points. The immunohistochemical studies have shown high expression of cyclin d1 and low expression of e-cadherin. Additionally, high expression of Ki-67 and p-63 was also evident.

The wounds have healed in all surviving animals of the third group after 20-25 days from the removal of tumor and the application of hydrogel. No local/regional recurrence of the tumor was detected throughout 150 days. There were no metastases in the liver, lungs and kidneys. Three days after the wound was covered with the hydrogel, it changed from translucent to dark brown. Necrotic tissue surrounded by inflammatory cells, neutrophils and fibroblasts was observed under the hydrogel. After 4-6 days, there was an excess of connective tissue between the CultiSpher that was placed in the wound. On the day 8,

together with inflammatory cells, the granulation tissue fragments and fibroblasts were observed in the wound. On days 9-10, the wound was filled with fibroblasts and connective tissue. The carriers were trapped in the newly formed connective tissue. Many blood vessels were observed around the carriers. On the 12th day, the process of epithelization initiation was noted, which included the approximation of the wound margins, which was manifested in the formation of organized collagen, increased number of fibroblasts and vascularization. The carriers were located in the hydrogel both on the surface of the wound and in the depth of the wound. After 14 days, the inflammatory process was less pronounced. More than half of the wound was covered with epithelium, and in part, pink granulation tissue was observed. The carriers were going through resorption. In the animals of the third group, complete epithelization of the wound developed on 20-25 days after the beginning of treatment. Immunohistochemical methods have revealed low expression of cyclin d1 and medium expression of e-cadherin.

Energy dispersive X-ray microspectral analysis has shown that the collagen microcarriers (CultiSpher) that were placed in the peg-fibrin gel were diffusely distributed both on the surface of the gel and in the thickness of the gel without any damage. The platinum nanoparticles placed on them were 10.7-11.2 nm in size and had a cylindrical shape. Energy dispersive X-ray microspectral analysis showed that peg-fibrin gel contained 29.1 µg of platinum nanoparticles. As for bone marrow stem cells and their role in the process of rapid wound healing, we would like to mention that based on earlier studies conducted at the Department of Experimental Anatomy of the TSMU , it was confirmed that BMSCs contain growth factors and cytokines such as vascular endothelial Growth factor (VEGF), platelet-derived growth factors (PDGF), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), TGF-β3, TGF alpha, fibroblast growth factor and others, which promote cell proliferation, migration, differentiation after placement in the wound, and as a result, the rapid regeneration of the wound.

Analysis of the study results

For many years, fibrin/thrombin gel has been widely used in surgical practice as a biologically active dressing for rapid wound re-epithelialization. Recently, fibrinogen/thrombin gels have found significant applications in tissue engineering and oncology. However, it has been reported that fibrinogen affects tumor growth and metastasis in vivo. Additionally, three-dimensional fibrin gel promotes the selection and growth of tumorigenic cells. According to the data of other authors, the in situ condensation of an anticancer drug into fibrin gel enables effective inhibition of tumor cell growth. For example, the fibrinogen-thrombin pad has been effectively used in clinical practice in the surgical treatment of cancer of the upper part of the gastrointestinal tract. Currently, the bioresorbable polymer carriers of fibrinogen-based micro- and nanostructures are effectively used for creating targeted drug delivery systems. It should also be noted that fibrinogen has successfully been used as a 5-fluorouracil carrier for cancer drug delivery applications. It has also been reported that fibrin glue enhances antitumor performance in models of subcutaneous and abdominal metastasis of murine colorectal cancer.

Based on the goals of our study, it was necessary to develop a gel that, over a period of time, could release anticancer drugs locally which in turn would lead to the destruction of residual tumor cells after the tumor removal and the acceleration of the wound healing process.

The hydrogel that was developed has demonstrated the effectiveness of destroying residual tumor cells after resection of the squamous cell carcinoma of the tongue. Importantly, in 80% of the animals that were treated with our method, the suppression of tumor growth was notable for 150 days without tumor recurrence. Additionally, in the majority of animals, at 20-25 days from tumor removal and introduction of MCPFTG into the wound, complete epithelialization of the wound was observed. Scanning electron microscopy demonstrated that CPTCS was placed in the MCPFTG without being damaged,

and was evenly distributed both on the surface and within the gel. The platinum cisplatin nanoparticles with a size of 10.7-11.2 nm had a cylindrical and oval shape. It should be noted that after it was placed in the wound, the quantity of platinum nanoparticles did not change for 5 months, and consequently they exhibited a long-term effect on residual tumor cells.

We confirmed that CultiSpher-S microcarrier can become an *in vivo* trap for residual tumor cells after it has been removed. The porous structure of the microcarrier allows the attachment and migration of tumor cells both on the surface and the inner structure of the microcarrier, and the cisplatin-loaded microcarrier is expected to destroy tumor cells.

We also confirmed that the internal layer of hydrogel that directly contacted the surface of the wound could release cisplatin locally over a certain period of time, and destroy any residual tumor cells. The external layer of the hydrogel consisted of CultiSpher microcarrier and freeze-dried BMSCs. CultiSpher-S filled the wound cavity by creating a three-dimensional structure, and the paracrine factors of dried BMSCs enhanced the wound re-epithelialization process. The possibility of using freeze-dried BMSCs for the treatment of non-healing wounds has been discussed in detail in our previous publications. For example, freeze-dried stem cells have been used effectively in the treatment of radiation-induced non-healing wounds. This study confirmed that freeze-dried BMSCs retained their unique paracrine factors and improved clinical healing and re-epithelialization of non-healing wounds. Stem cell therapy for the treatment of non-healing chronic wounds has demonstrated positive therapeutic potential in a number of preclinical and clinical studies. As mentioned in the literature review, mesenchymal stem cells contain keratinocyte growth factor, epidermal growth factor, endothelial growth factor and others. However, it should be noted that until now there is no conclusive answer regarding the exact mechanism by which BMSCs paracrine factors have a positive effect on wound healing. The mechanism by which hydrogel inhibits the growth of tumor cells is not fully explained, and it requires additional studies to understand the mechanism of tumor growth suppression by hydrogel.

Conclusion

- The developed hydrogel can be effectively used to prevent the development of loco/regional metastasis after tumor removal;
- After tumor removal, the hydrogel maintains required concentration of cisplatin in the tumor bed and enables the prolonged effect locally, directly on the residual tumor cells;
- Regulation of the release of the drug from the biodegradable hydrogel (from several days to several months) is possible by modifying the chemical and physical properties of the gel by changing the density of hydrogel nanofibers;
- Hydrogel can be used in combination with other methods of treatment of squamous cell carcinoma of the tongue;
- Hydrogel reduces side effects caused by cisplatin and enhances its antitumor activity;
- Administration of the hydrogel directly into the tumor or into the tumor bed after its removal can prevent multiple injections;

Practical recommendations

The practical value of the study was that the local, targeted introduction of the hydrogel into the wound after the removal of the tumor would cause the maintenance of the necessary concentration of cisplatin and prolonged effect on the residual tumor cells. The use of such form of drug would enable the prevention of multiple intravenous injections. The hydrogel can be used in combination with other treatment methods. The acquired results of the study will significantly increase the efficacy of the treatment of oncological patients.

List of published papers

Kakabadze MZ, Paresishvili T, Karalashvili L, Chakhunashvili D, Kakabadze Z. Oral microbiota and oral cancer: Review. *Oncol Rev.* 2020 Jul 6;14(2):476. doi: 10.4081/oncol.2020.476. PMID: 32676172; PMCID: PMC7358985.

Kakabadze MZ, Paresishvili T, Kordzaia D, Karalashvili L, Chakhunashvili D, Kakabadze Z. RELATIONSHIP BETWEEN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND IMPLANTS (REVIEW). *Georgian Med News.* 2020 Sep;(306):147-151. PMID: 33130663.

Kakabadze MZ, Paresishvili T, Mardaleishvili K, Vadachkoria Z, Kipshidze N, Jangavadze M, Karalashvili L, Ghambashidze K, Chakhunashvili D, Kakabadze Z. Local drug delivery system for the treatment of tongue squamous cell carcinoma in rats. *Oncol Lett.* 2022 Jan;23(1):13. doi: 10.3892/ol.2021.13131. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34820012; PMCID: PMC8607325