

••• БІОХІМІЯ ••• BIOCHEMISTRY •••

УДК: 577.12.577.112.577.2

Нормализация содержания соединительнотканых клеток и структурных биополимеров межклеточного матрикса в зоне локального лучевого ожога кожи объёмной трансплантацией аутофибробластов Л.В.Алтухова, М.А.Гриценко, Е.В.Кот, Ю.Г.Кот, Е.Э.Перский

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
altuhovalv@gmail.com*

Изучено состояние соединительной ткани в зоне локального рентгеновского ожога кожи 3-й степени у морских свинок через 3 недели ежедневной объёмной аутоотрансплантации фибробластов в поражённую область. Показано, что этот метод лечения значительно тормозит деструкцию и нормализует биополимерный состав соединительнотканного матрикса в зоне ожога. На 21-е сутки после облучения количество деградированного коллагена в этой области уменьшается, а количество живых клеток, нативного коллагена и гликозаминогликанов повышается.

Ключевые слова: *лучевой ожог, аутофибробласты, трансплантация, межклеточный матрикс.*

Нормалізація вмісту сполучнотканинних клітин та структурних біополімерів міжклітинного матриксу в зоні локального променевого опіку шкіри об'ємною трансплантацією аутофібробластів Л.В.Алтухова, М.А.Гриценко, К.В.Кот, Ю.Г.Кот, Є.Е.Перський

Вивчено стан сполучної тканини в зоні локального рентгенівського опіку шкіри 3-го ступеня у морських свинок через 3 тижні щоденної об'ємної аутоотрансплантації фібробластів в уражену область. Показано, що цей метод лікування значно гальмує деструкцію та нормалізує біополімерний склад сполучнотканинного матриксу в зоні опіку. На 21-у добу після опромінення кількість деградованого колагену в цій області зменшується, а кількість живих клітин, нативного колагену і глікозаминогліканів підвищується.

Ключові слова: *променеви́й опік, аутофібробласти, трансплантація, міжклітинний матрикс.*

Normalization of connective tissue cells and extracellular matrix structural biopolymers in the area of skin local radiation burn by volumetric autofibroblasts transplantation

L.V.Altuhova, M.A.Gritsenko, K.V.Kot, J.G.Kot, Y.A.Persky

The connective tissue state in the local area of 3rd grade X-ray skin burn in guinea pigs at daily volumetric autofibroblasts transplantation within 3 weeks has been investigated. It has been shown that this method of treatment considerably slows down degradation and normalizes biopolymers composition of connective tissue matrix in the area of the burn. On the 21th day after irradiation, amount of degraded collagen in this area is reduced and the number of living cells, native collagen and glycosaminoglycans increases.

Key words: *radiation burn, autofibroblasts, transplantation, extracellular matrix.*

Введение

Лучевые ожоги характеризуются медленными, растянутыми во времени фазами течения раневого процесса, плохо заживают и трудно поддаются стандартному фармакологическому и хирургическому лечению. Показано, что одним из подходов, направленных на решение этой проблемы, является введение живых аутологичных фибробластов в весь объём зоны ожога, начатое

сразу же после облучения. При этом существенно уменьшаются размеры поражения, снижается степень воспалительных процессов и тормозится образование лучевой язвы (Розробка методу Розробка методу ..., 2011). Естественно, что эти эффекты непосредственно связаны с влиянием аутотрансплантации на систему клетки – межклеточный матрикс.

Целью работы было изучение количественных показателей степени нормализации этой системы в зоне ожога при аутотрансплантации фибробластов.

Объекты и методы исследования

Исследования проведены на морских свинках-самцах массой 350–450 г. Животные были разделены на 3 группы – контрольную, облучённых без аутотрансплантации фибробластов и облучённых с аутотрансплантацией фибробластов. В каждой группе было по 7 животных.

В экспериментах соблюдали рекомендации проведения медико-биологических исследований согласно закону Украины «О защите животных от жестокого обращения» (Закон України ..., 2006).

Аутофибробласты для каждого животного получали из биоптатов кожи площадью $2 \times 2,5$ мм и толщиной 1 мм, взятых из бедра правой задней лапы под эфирным наркозом. Целостность кожи после биопсии полностью восстанавливалась на 15 сутки.

Наработку клеточной массы проводили по стандартному протоколу (Keira et al., 2004). В эксперименте использовали фибробласты 4-го пассажа, которые хранили в жидком азоте в среде с 70% ДМЕМ, 20% фетальной сыворотки и 10% ДМСО (Келлер и др., 2000).

Лучевой ожог животным 2-й и 3-й групп производили на 32 сутки после биопсии под эфирным наркозом, облучая выбранный участок кожи площадью $1,5 \text{ см}^2$ на бедре левой задней лапы рентгеновским излучением дозой 60 Гр на установке УРС-55 (Cu анод, $U = 40 \text{ kV}$, $J_a = 5 \text{ mA}$, мощность излучения $4,25 \text{ Гр/мин}$). В этих условиях облучения радиационное поражение соответствовало третьей степени лучевого ожога (Звягинцева, 1998).

Через 1 час после облучения, а затем каждые 24 часа животным 3-й группы по периметру зоны облучения под углом 45° к её центру делали 6 подкожных инъекций на глубину 1 мм. Каждая инъекция объёмом 100 мкл представляла собой суспензию из $(200-210) \times 10^3$ аутофибробластов с содержанием живых клеток 80–85 %.

На 22 сутки животных всех групп декапитировали под тиопенталом натрия. Оценку содержания соединительнотканых клеток и биополимеров межклеточного матрикса в ожоговых участках облучённых и контрольных участках необлучённых животных проводили на гистологических препаратах кожи этих участков. Для этого с помощью микроскопа Olympus IMT2 и программного обеспечения GSA Image Analyzer 3.2.9 измеряли количество живых клеток на 1 мм^2 раны (Протокол оборобки http://www.histomix.ru/product_17.html) и % площади, занятой в ней нативным и деградированным коллагеном (Протокол оборобки http://www.histomix.ru/product_5.html), коллагеном I типа (FITC-конъюгированные моноклональные антитела Invitrogen) и гликозаминогликанами (Протокол оборобки http://www.histomix.ru/product_4.html; Гістохімічна ідентифікація...). Эти же измерения проводили на препаратах кожи необлучённых животных.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни (Glantz, 2007).

Результаты и обсуждение

Результаты гистологических исследований о влиянии аутотрансплантации на динамику состояния системы клетка-межклеточный матрикс в области лучевого поражения кожи приведены на рис. 1–4.

Наиболее существенным результатом аутотрансплантации является высокое содержание живых фибробластов в зоне поражения на 21 сутки после облучения. По сравнению с контролем оно составляет 67%, в то время как у облучённых животных, которым не вводили аутофибробласты, содержание живых клеток составляет лишь 17% от контроля (рис. 1).

Известно, что в зоне рентгеновского ожога происходит массовая гибель соединительнотканых клеток (Парамонов и др., 2000). Их разрушение приводит к резкому смещению обмена биополимеров соединительнотканного матрикса в сторону деградации.

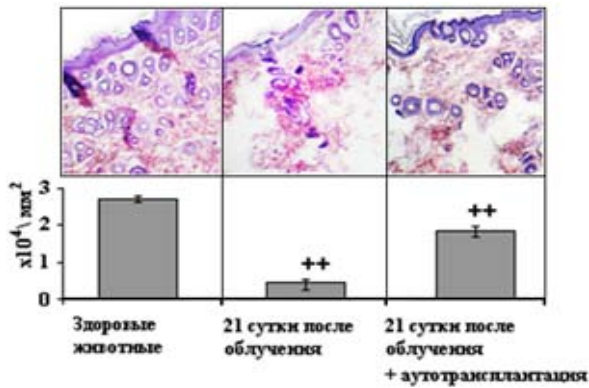


Рис. 1. Влияние аутотрансплантации фибробластов на динамику удельного содержания живых клеток в области лучевого ожога кожи. Окрашивание гематоксилин-эозином

Примечание: ++ – изменения достоверны ($p \leq 0,05$) по сравнению с другими группами.

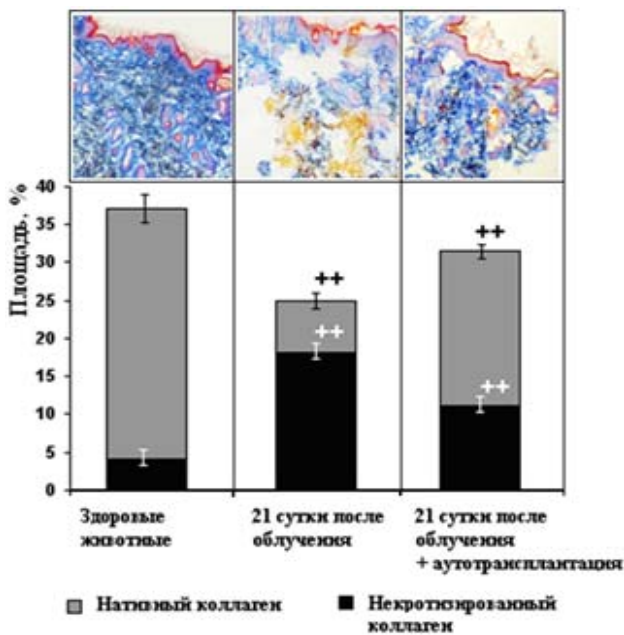


Рис. 2. Влияние аутотрансплантации фибробластов на динамику относительного содержания (площади) общего нативного и деградированного (некротизированного) коллагена в области лучевого ожога кожи. Нативный коллаген окрашен в синий цвет, деградированный – в желтый. Окрашивание по Маллори

Примечание: ++ – изменения достоверны ($p \leq 0,05$) по сравнению с другими группами.

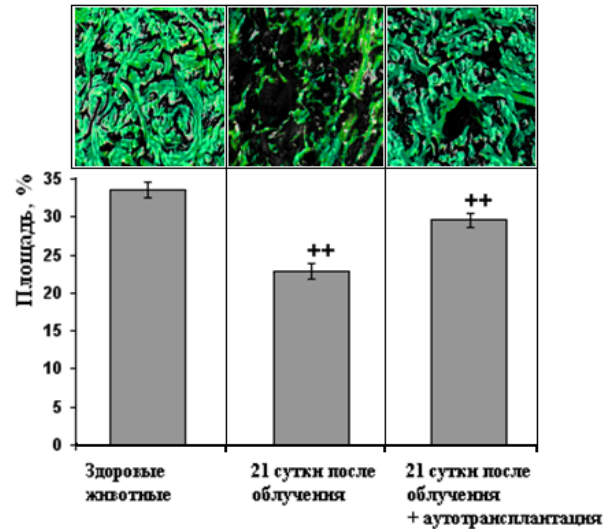


Рис. 3. Влияние аутотрансплантации фибробластов на динамику относительного содержания (площади) коллагена типа I в области лучевого ожога кожи. Окрашивание FITC-антителами на коллаген типа I

Примечание: ++ – изменения достоверны ($p \leq 0,05$) по сравнению с другими группами.

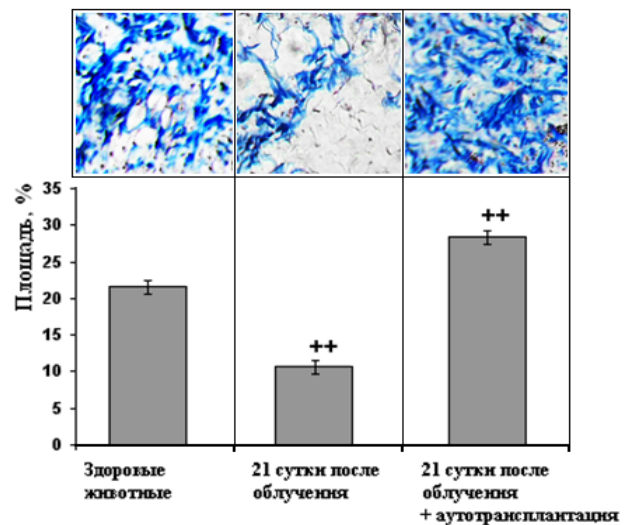


Рис. 4. Влияние аутотрансплантации фибробластов на динамику относительного содержания (площади) гликозаминогликанов в области лучевого ожога кожи. Окрашивание ШИК-алциановым синим

Примечание: ++ – изменения достоверны ($p \leq 0,05$) по сравнению с другими группами.

Это происходит как за счёт снижения их синтеза из-за уменьшения числа живых клеток, так и в результате активации ферментативного расщепления, в частности, кислыми катепсинами, которые выходят в межклеточную среду при разрушении клеток. Поэтому снижение удельного содержания непрерывно гибнущих клеток путём их постоянного добавления в зону поражения сдвигает это смещение обмена в сторону его нормализации.

На 21 сутки, по сравнению с контролем, общее содержание коллагена в зоне ожога у облучённых нелеченых животных составляет, 57%, а у леченых – 74%. При этом в матриксе кожи контрольных животных, в условиях нормального обмена, удельное содержание нативного и деградированного коллагена в его общем количестве равно, соответственно, 77% и 23%. Эти же показатели у облучённых нелеченых животных составляют 27% и 73%, а у облучённых леченых – 65% и 35% (рис. 2).

Таким образом, перманентное введение аутофибробластов в зону ожога приводит к нормализации биополимерного состава соединительнотканного матрикса за счёт повышения синтеза и снижения распада коллагеновых структур.

При этом содержание в них коллагена типа I, который входит в состав наиболее сформированных, «зрелых», надмолекулярных образований матрикса, также выше у облучённых леченых животных по сравнению с нелечеными и равно 88% и 68% соответственно (рис. 3).

Существенно, что по сравнению с контролем общее содержание гликозаминогликанов в зоне ожога у облучённых нелеченых животных составляет 50%, а у леченых – 130% (рис. 4).

Известно, что на начальных стадиях развития соединительной ткани в зоне формирования межклеточного матрикса синтез гликозаминогликанов начинается раньше синтеза конструктивных белков. Соответственно, и содержание гликозаминогликанов на этом этапе превышает содержание белков, в том числе и коллагена (Waller, Maibach, 2006).

Представленные на рис. 4 результаты указывают на то, что в зоне ожога у облучённых нелеченых животных одной из причин подавления регенерации соединительной ткани является низкое содержание гликозаминогликанов из-за малого числа клеток, которые их синтезируют.

В то же время постоянное введение в зону поражения аутофибробластов приводит к резкому усилению формирования матрикса, степень которого выше, чем в аналогичной области кожи у контрольных необлучённых животных.

Выводы

Ежедневная 3-недельная объёмная аутоаутопересадка фибробластов в область локального рентгеновского ожога кожи 3-й степени у морских свинок, начатая через 1 час после облучения, значительно тормозит деструкцию соединительной ткани, увеличивает количество живых клеток и нормализует биополимерный состав соединительнотканного матрикса в зоне ожога.

Список литературы

- Гістохімічна ідентифікація вуглеводів. Протокол ШИК-реакції. Електронний ресурс. (http://www.histopathology.narod.ru/documents/gistohimija_uglevodov.html) /Gistokhimichna identifikatsiya vuglevodiv. Protokol SHIK-reaktsii. Elektronnyy resurs./
- Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження. Електронний ресурс // Верховна Рада України. – Закон №3447-IV від 21.02.2006. – Киев, 2006. (<http://www.uapravo.net/data/base12/ukr12108.htm>) /Zakon Ukrainy «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennya. Elektronnyy resurs // Verkhovna Rada Ukrainy. – Zakon №3447-IV vid 21.02.2006. – Kiev, 2006./
- Звягінцева Т.В. Моделювання місцевих променевих пошкоджень шкіри // Фізіологічний журнал. – 1998. – Т.44. – С. 106–112. /Zvyagintseva T.V. Modelyuvannya mistsevykh promenevykh poshkodzen' shkiry // Fiziologichnyy zhurnal. – 1998. – T.44. – S. 106–112./
- Келлер Г., Себастиан Дж., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъекцируемых аутологичных человеческих фибробластов // Бюл. эксп. биол. мед. – 2000. – Т.130 (8). – С. 203–206. /Keller G., Sebastian Dzh., Lakombe Yu. i dr. Sokhrannost' inyetsiruyemykh autologichnykh chelovecheskikh fibroblastov // Byul. eksp. biol. med. – 2000. – T.130 (8). – S. 203–206./

Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги. Руководство для врачей. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2000. – С.488. /Paramonov B.A., Porembskiy Ya.O., Yablonskiy V.G. Ozhogi. Rukovodstvo dlya vrachey. – Sankt-Peterburg: SpetsLit, 2000. – S.488./

Протокол обробки сполучної тканини в парафінових зрізах гематоксиліном і еозином. Електронний ресурс. (http://www.histomix.ru/product_17.html) /Protokol obrobky spoluchnoi tkanyny v parafinovykh zrizakh gematoksilinom i eozinom. Elektronnyy resurs./

Протокол обробки сполучної тканини в парафінових зрізах для фарбування за Ван-Гізоном. Електронний ресурс. (http://www.histomix.ru/product_5.html) /Protokol obrobky spoluchnoi tkanyny v parafinovykh zrizakh dlya farbuвання za Van-Gizonom. Elektronnyy resurs./

Протокол обробки сполучної тканини в парафінових зрізах для фарбування кислих глікозаміногліканів алціановим синім. Електронний ресурс. (http://www.histomix.ru/product_4.html) /Protokol obrobky spoluchnoi tkanyny v parafinovykh zrizakh dlya farbuвання kyslykh glikozaminoglikaniv altsianovym synim. Elektronnyy resurs./

Розробка методу культивування клітин сполучної тканини на біополімерних матрицях для лікування опіків // Звіт з НДР. Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна. Шифр 27–11. – 2011. – С.21. /Rozrobka metodu kul'tyvuvannya klityn spoluchnoi tkanyny na biopolimernykh matrytsyakh dlya likuvannya opikiv // Zvit z NDR. Kharkivs'kyu natsional'nyy universytet im. V.N.Karazina. Shyfr 27–11. – 2011. – S.21./

Glantz S.A. Primer of Biostatistics. McGraw-Hill, 2007. – P.298.

Keira S.M., Ferreira L.M., Gragnani A. et al. Experimental model for fibroblast culture // Acta Cir. Bras. [serial online]. – 2004. – Vol.19. Special Edition. (<http://www.scielo.br/acb>)

Waller J.M., Maibach H.I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water and lipid content and structure // Skin Research Technology. – 2006. – Vol.12, №3. – P. 145–154.

Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: O.P.Bilozorov

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 24.10.2013