

РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ КОЖИ КРЫСЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИНЕЙЧАТОГО СПЕКТРА МАРГАНЦА И МЕДИ, ИЗЛУЧАЕМОГО ЛАМПОЙ ПОЛОГО КАТОДА

В.И. Мельникова, М.С. Извольская, С.Н. Воронова, М.М. Шарипова, Е.М. Рукин, Л.А. Захарова

Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН и
ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений
(Москва)

// Цитология, 2010, т.52, №3, с. 203-210

Исследовано влияние низкоэнергетического линейчатого спектра марганца и меди, излучаемого лампой полого катода (ЛПК) со спектрами Mn и Cu, на скорость посттравматической регенерации тканей кожи крыс. Проведен сравнительный анализ морфологических характеристик и дифференцировочной способности тканей кожи крыс, у которых воспроизводили раневой процесс в межлопаточной области спины, на 15 и 24 сутки после нанесения раны. Крыс облучали ЛПК (Mn-Cu) в области раневого дефекта ежедневно в течение 30 с на протяжении двух недель. Визуально на 15 сутки в группе животных, подвергавшихся облучению, раны были очищены от струпа, рубец полностью эпителизирован и покрыт волосным покровом в отличие от необлученных животных, у которых еще на 24 сутки сохранялся струп. Анализ гистологических данных показал, что под действием ЛПК (Mn-Cu) на 15-е сутки наблюдается увеличение количества волосных луковиц и сальных желез, уменьшение числа кровеносных сосудов, горизонтальная ориентация коллагеновых волокон по сравнению с крысами, которых не подвергали подобному воздействию. При помощи иммуногистохимического окрашивания срезов кожи антителами к маркеру дендритных клеток ОХ-62 наибольшее количество дендритных клеток выявлено в дерме у облученных крыс на 15 сутки, их уровень снижался к 24 суткам. В контрольной группе уровень этих клеток был существенно ниже. Окрашивание срезов антителами к пан-цитокератинам выявило высокий уровень клеток, экспрессирующих различные типы цитокератинов, распределенных в большей части эпидермиса, на 15 сутки у необлученных животных, в то же время в опытной группе их уровень был значительно ниже и сосредоточен ближе к наружной части эпидермиса. Уровень клеток, окрашенных цитокератином 19, на 15-е сутки был выше после воздействия ЛПК (Mn-Cu) по сравнению с контролем, тогда как на 24-е сутки их количество было выше в контрольной группе. Таким образом, спектр марганца и меди, излучаемый ЛПК, стимулирует естественный иммунитет, ускоряет восстановление дермы, эпителиального покрова кожи и ее производных и стимулирует заживление ран.

Одной из задач в лечении кожных ран у человека является создание условий для получения наиболее полноценной их регенерации. Заживление ран - это сложный, процесс, в исходе которого происходит восстановление внеклеточного матрикса и функционально активного эпителиального покрова с формированием или без формирования рубца. В поиске средств, направленно влияющих на полноту регенерации кожи у млекопитающих, использовали различные биологически активные препараты, стимулирующие метаболические процессы: протеолитические ферменты, анаболические гормоны, антиоксиданты, антисептические средства, фитопрепараты, различные масла, адсорбенты [2, 3, 5], воздействие глубокой пролонгированной гипотермии [7] и др. Однако в связи с увеличением числа пациентов, негативно относящихся к традиционной фармакотерапии, не дающей полноценного восстановления, большое значение приобретает применение альтернативных методов лечения. В последнее время пристальное внимание уделяется исследованиям, связанным с избирательным воздействием света различного спектрального состава. Это обусловлено широким внедрением в практику аппаратов с определенным спектром: лазеров, светодиодов, газоразрядных ламп и т.п. [6]. В соответствии с современными тенденциями преимущественного использования факторов малой и сверхмалой интенсивности во Всероссийском научно-исследовательском институте оптико-физических измерений разработаны лампы полого катода (ЛПК), излучающие низкоэнергетические линейчатые спектры различных химических элементов [10]. Результаты предварительных исследований дали основание предполагать, что спектры, излучаемые ЛПК (Mn-Cu), могут модулировать миграцию этих элементов в организме и снимают воспалительные процессы различной этиологии [11].

Целью данной работы явилось исследование влияния ЛПК со спектрами Mn и Cu на скорость посттравматической регенерации тканей кожи крыс.

Материал и методика

Исследования выполнены на крысах Wistar, самцах, массой 150–200 г. (Столбовая, РАН). Крыс содержали в стандартных условиях по 4 особи в клетке с контролируемыми режимами температуры и освещения (24С,

12:12 часов свет-темнота) и со свободным доступом к воде и пище. У крыс воспроизводили раневой процесс методом иссечения полнослойного кожного лоскута с повреждением подлежащей фасции и мышечного слоя в межлопаточной области (площадь раны 25 кв.мм) в проекции шейно-грудного отдела позвоночника. Животных опытной группы подвергали воздействию ЛПК (Mn-Cu) на область раневого дефекта. Сеансы воздействия ЛПК осуществляли ежедневно в течение 30 с на протяжении 2-х недель. На 15-е и 24-е сутки брали биопсийный материал у животных контрольной (4 крысы) и опытной (4 крысы) групп для цитоморфологического и иммуногистохимического исследования состояния эпителизации поверхности раны. Все манипуляции с животными осуществляли под нембуталовым наркозом (50 мг/кг веса). Эффект воздействия ЛПК оценивали по скорости заживления ран, гистологическому анализу, наличию дендритных клеток и дифференцировке эпителиальных клеток кожи у облученных крыс по сравнению с контрольными животными, которых не подвергали никаким воздействиям, в течение 24 суток.

Фиксация, гистохимия, иммуногистохимия

На 15-е и 24-е сутки после нанесения раны у крыс иссекали полнослойный фрагмент кожи в области раны и фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение ночи при комнатной температуре. Далее фрагменты кожи инкубировали 24 часа в 15 %-ном растворе сахарозы в PBS при 4С и замораживали в изопентане при минус 40С. Криостатные срезы кожи толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилин-эозином с последующим анализом изображения с помощью светового микроскопа.

Иммуногистохимическое окрашивание проводили антителами к пан-цитокератину (ЦК - цитокератины 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19) (Sigma, США), ЦК 19 (Chemicon, США) и маркеру дендритных клеток крысы ОХ-62 (Cederlane, Канада). Для иммуногистохимического окрашивания срезы последовательно инкубировали в PBS с 0,1 %-ным раствором тритона X-100 и 3 %-ной нормальной сывороткой телят в течение 30 минут при 20С, затем с первыми антителами (моноклональные антитела мыши к цитокератинам (пан и ЦК19) и ОХ-62 (1:100) в течение 18 часов при 4С, а затем со вторыми антителами к иммуноглобулину (IgG) мыши, мечеными Alexa 488 (1:100), в PBS в течение 2 часов при 20С. Специфичность антител подтверждали с помощью контролей, в которых реакцию проводили в отсутствие первых антител. Отсутствие флуоресцентной метки свидетельствовало о специфичности реакции. Реакцию анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMRXA 2 (Германия), оснащенного соответствующим набором светофильтров и цифровой фотокамерой.

Результаты и обсуждение

Визуальные наблюдения (см. рис. выше) показали, что заживление полнослойной раны было более интенсивным в группе животных, подвергавшихся облучению ЛПК (Mn-Cu). Уже на 8 постоперационные сутки происходило значительное уменьшение раневой поверхности и отечности у опытных животных, по сравнению с контрольной группой, не подвергавшейся никакому воздействию. Как известно, 15-20 сутки соответствуют третьей фазе заживления ран – фазе формирования рубца и его эпителизации [13]. По нашим наблюдениям, на 15 сутки в опытной группе животных раны очищены от струпа, рубец полностью эпителизирован и покрыт волосным покровом в отличие от контроля, где и на 24-е сутки сохраняется струп. При вскрытии у животных опытной группы на 15-е сутки кожа на месте раны была подвижная и не спаяна с подлежащими тканями, тогда как в контрольной группе кожа была плотно спаяна с подлежащими тканями и более обильно снабжена сосудами.

Воздействие ЛПК (Mn-Cu) приводило также к изменению динамики морфологических характеристик процесса регенерации кожных ран. Анализ гистологических данных показал, что на 15-е сутки число волосных луковиц и сальных желез на единицу площади среза у опытных и контрольных животных отличалось и было значительно выше в опытной группе (см. рис. выше).

Для фазы рубцевания характерно уменьшение числа кровеносных сосудов и фибробластов [8]. По нашим данным, на 15-е сутки в контрольной группе животных грануляционная ткань в раневом канале была богата фибробластами и обильно пронизана вертикально направленными кровеносными сосудами по сравнению с опытной группой, где их количество было значительно меньше. К 15-м суткам у опытных животных выявлена также фиброзная трансформация созревающей грануляционной ткани. Отмечается горизонтальная ориентация коллагеновых волокон, т.е. параллельно поверхности раны в соответствие механической нагрузки, тогда как в контрольной группе они располагались вертикально по ходу сосудов. Все эти данные указывают на ускорение процессов созревания и заживления ран под действием ЛПК (Mn-Cu) .

Важную роль в процессе заживления ран играет местная иммунная система кожи. В эпидермисе и дерме локализуются дендритные клетки, обеспечивающие нейтрализацию и элиминацию проникающих в рану патогенов. Их относят к наиболее мощным антигенпредставляющим клеткам [9, 19]. Дендритные клетки секретируют целый ряд веществ, необходимых для жизнедеятельности кожи, а в случае ее поражения и инфицирования продуцируют цитокины воспаления: интерлейкин-1 (ИЛ-1), ИЛ-6, гамма-интерферон [4, 16, 20]. Эпидермальные дендритные клетки активно мигрируют в дерму и регионарные лимфатические узлы. В дерме локализуются также собственно дермальные клетки, которые относятся, вероятно, к незрелым миелоидным дендритным клеткам [9]. В наших экспериментах при помощи иммуногистохимического окрашивания срезов кожи антителами к маркеру дендритных клеток крысы ОХ-62 в дерме выявлены дендритные клетки как в опытной, так и контрольной группах животных. Однако их уровень в наибольшем количестве определялся в опытной группе животных на 15-е сутки. На 24-е сутки число этих клеток уменьшалось по сравнению с 15-ми сутками. У контрольных животных на 15-е сутки уровень дендритных клеток был ниже чем у опытных, а на 24-е сутки выявлялись единичные клетки. В эпидермисе в эти сроки дендритные клетки не выявлялись. Это связано, по-видимому, с тем, что на 15-е сутки в дерме еще идет процесс заживления раны. Различные субпопуляции дендритных клеток, экспрессирующие ОХ-62 маркер, вероятно, участвуют в этом процессе [15].

В заживление ран кожи включается не только процесс регенерации соединительнотканной основы кожи, но и регенерация нарастающего на нее эпителия [2]. Для оценки полноты эпителизации раны, помимо общего сравнительного анализа гистоструктуры кожи животных разных групп, нами проводилось иммуногистохимическое окрашивание срезов кожи антителами к пан-ЦК и ЦК 19. Кератины представляют собой класс белков промежуточных филаментов эпителия, которые создают механическую стабильность и целостность эпителиальных клеток и тканей. Кроме того, некоторые кератины, в том числе и ЦК 19, включаются в регуляцию внутриклеточных сигнальных путей, защищая клетки и ткани от стресса при заживлении ран, апоптозе [18]. При повреждении тканей происходит переключение синтеза цитокератинов с одного типа на другой, в частности, наряду с парой цитокератинов ЦК 8/ЦК 18 на клетках дополнительно экспрессируются ЦК 7 и ЦК 19, а иногда и ЦК 17. Увеличение экспрессии цитокератинов сопровождается сниженной дифференцировкой клеток [17]. В наших исследованиях распределение цитокератин-позитивных клеток на 15-е и 24-е сутки в опытной и контрольной группах животных было неодинаковым. На 15-е сутки клетки, окрашенные пан-ЦК, содержащего различные типы цитокератинов, в наибольшем количестве выявлялись в контрольной группе животных и были распределены в большей части эпидермиса. В опытной группе животных они были сосредоточены ближе к наружной части эпидермиса. Эти данные свидетельствуют об усилении дифференцировки эпителиальных клеток под воздействием ЛПК (Mn-Cu). На 24-е сутки их уровень был практически одинаковым как у опытных, так и контрольных животных, при этом толщина эпидермиса у контрольных животных была значительно больше. Уровень клеток, окрашенных ЦК 19, выполняющих защитную функцию при заживлении ран, на 15-е сутки был выше после обработки животных ЛПК (Mn-Cu) по сравнению с контролем, тогда как на 24-е сутки их количество превышало в контрольной группе. Толщина эпидермиса в опытной и контрольной группах была практически одинаковой. **Полученные данные свидетельствуют, что спектр марганца и меди, излучаемый ЛПК, стимулирует естественный иммунитет, ускоряет восстановление дермы, эпителиального покрова кожи и ее производных и стимулирует заживление ран.** Механизмы действия этого спектра пока не ясны. Существуют данные, что на течение раневого процесса, особенно на начальных этапах, оказывают влияние матриксные металлопротеиназы. Основными ферментами, способствующими заживлению ран, являются металлопротеиназы раневого экссудата, представляющие собой семейство цинкосодержащих эндопептидаз [1]. Вполне вероятно, что ЛПК (Mn-Cu) модулирует миграцию и накопление ионов марганца и меди в организме, которые могут образовывать комплексы с металлопротеиназами, что и будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Список литературы

1. Воронкина И. В., Кокорин К. В., Чуликов О. В., Парамонов Б. А., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2003. Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 раневых и ожоговых экссудатов и их действие на белки внеклеточного матрикса. Цитология. 45 (1) : 43–50.
2. Ершова Т. В., Иванищук П. П., Диндяев С. В. 1992. Влияние обработки кожных ран у крыс гидролитическими ферментами на синтетическую активность эпидермоцитов. Цитология. 34 (8) : 70 – 74.
3. Ефимов Е. А. 1999. Факторы, влияющие на полноту регенерации кожи у млекопитающих. Изв. РАН. Сер. биол. №4 : 488 – 492.

4. Зими́на И. В., Лопухин Ю. М., Арион В. Я. 1994. Кожа как иммунный орган: клеточные элементы и цитокины. Иммунология. № 1 : 8 – 13.
5. Крутова Т. В., Ефимов Е. А., Корман Д. Б. 1984. Влияние линимента дибунуола на посттравматическую регенерацию кожи у мышей. Бюл. эксперим. биол. мед. №10 : 471 – 473.
6. Мигунов С. А. 2006. Низкоинтенсивная спектральная аппаратура в фототерапии. Рефлексотерапия. 1 (15) : 8 – 12.
7. Мяделец О. Д., Пчельникова Е. Ф., Суханов А.Ф. 1999. Динамика популяций нейтрофильных лейкоцитов при заживлении кожной раны, нанесенной в разных условиях температурного гомеостаза. Бюл. эксперим.биол. мед. № 4 : 440 – 443.
8. Николаев А. Б., Шахтмейстер Л. Я., Шахтер А. Б. 1977. Экспериментально-клинические аспекты репаративных процессов и методы их стимулирования. М.: 1 ММИ им. Сеченова. 161 – 167.
9. Пащенко М. В., Пинегин Б. В. 2001. Основные свойства дендритных клеток. Иммунология. № 4. : 7 – 16.
10. Рукин Е. М. 2004. Спектральная фотопунктура. Рефлексотерапия. 2 (9) : 35 – 37.
11. Рукин Е. М., Садагов Ю. М., Мигунов С. А., Сидоров Е. П., Творогова А. В. 2006. Атомно-абсорбционная спектрометрия - ценное дополнение к спектральной фототерапии. Рефлексотерапия. 1 (5) : 25 – 27.
12. Рукин Е. М. 2008. Патент на изобретение № 2322988 "Способ Рукина снятия воспалительных процессов и введения в организм лекарственных препаратов". Бюл. № 12.
13. Серов В. В., Шехтер А. Б. 1981. Соединительная ткань. М.: Медицина. 312 с.
14. Agren M. S. 1999. Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds. Arch. Dermatol. Res. 291 : 583 – 590.
15. Brenan M., Puklavec M. 1992. The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin. J. Exp. Med. 175 (6) : 1457 – 1465.
16. Kishimoto T. 2005. Interleukin-6: from basic science to medicine – 40 years in immunology. Annu. Rev. Immunol. 23 : 1 – 21.
17. Moll R., Hage C., Thoenes W. 1991. Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. Lab. Invest. 65 (1) : 74 – 86.
18. Moll R., Divo M., Langbein L. 2008. The human keratins: biology and pathology. Histochem. Cell Biol. 129 (6) : 705 – 733.
19. Shimada S., Katz S.I. 1988. The skin as an immunologic organ. Arch. Pathol. Lab. Med. 112 (3) : 231 – 234.
20. Wollenberg A., Wagner M., Gunther S., Towarowski A., Tuma E., Moderer M., Rothenfusser S., Wetzel S., Endres S., Hartmann G. 2002 . Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. J . Invest . Dermatol . 119 (5) : 1096 – 1102.

КОНТРОЛЬ

ЛПК Cu-Mn

1 сут.



4 сут.



8 сут.



11 сут.



15 сут.



24 сут.

