

С.В. Дмитренко

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова

Показники клітинного циклу клітин шкіри у хворих на іхтіоз

Мета роботи — вивчити особливості показників клітинного циклу клітин шкіри у хворих на іхтіоз в порівнянні з показниками дерматологічно здорових осіб.

Матеріали та методи. Досліджено показники клітинного циклу клітин шкіри у 10 хворих на іхтіоз методом протокової ДНК-цитометрії. Вивчено показники 10 біоптатів шкіри хворих на різні типи іхтіозу. Вік обстежених становив від 19 до 69 років (у середньому 32 роки). Порівняння проводилося з показниками 10 дерматологічно здорових осіб.

Результати та обговорення. Отримані результати засвідчили певні особливості показників клітинного циклу клітин шкіри в дерматологічно здорових осіб, які полягають у наявності суттєвої кількості клітин у стабільній фазі G0G1. Водночас доволі значна група клітин перебуває у фазі G2 + M, що передує фазі S. Відносно невелику кількість клітинних подій зафіксовано в інтервалі SUB-G0G1, що свідчить про неактивний процес апоптозу в клітинах шкіри у здоровій тканині. У пацієнтів з іхтіозом найбільш істотними були відмінності в показниках деградації ДНК — інтервалу SUB-G0G1. Цей показник більше ніж у 2 рази перевищував показник дерматологічно здорових осіб ($p < 0,05$), що свідчить про важливу роль саме активації апоптозу клітин шкіри на тлі іхтіозу.

Висновки. На підставі отриманих даних можна запропонувати модель порушень клітинного циклу на тлі іхтіозу, що полягає в одночасному посиленні апоптозу та проліферативної активності клітин, які призводять до морфологічних ознак порушень кератинізації.

Ключові слова

Іхтіоз, клітинний цикл, проточна цитометрія.

На сьогодні беззаперечним є погляд на патогенез іхтіозу [2, 8], що полягає в порушенні процесу ороговіння як кінцевої ланки гетерогенних генетичних порушень епідермальних білків. Незважаючи на встановлену гетерогенність порушень, в епідермісі формується стереотипна картина ураження з явищами акантозу, гіперкератозу та позаклітинного порушення бар'єрної функції шкіри. Одна група дослідників вважає основним фактором розвитку іхтіозу порушення транскрипції білків кератиноцитів, зокрема профіларгіну — основного білка кератогліанових гранул, що зв'язують кератинові ферменти [7]. Інші дотримуються думки, що істотну роль відіграють такі білки, як інфолюкрин, цитокератин 1 та 10 [10].

Водночас усі науковці погоджуються, що ключовим моментом патогенезу іхтіозу є порушення клітинного циклу, зокрема термінальної диференціації кератиноцитів та ороговіння епідермісу, яке є наслідком зазначених вище гене-

тичних порушень — генів, що кодують різні типи кератину і протеїнів клітинної оболонки та ферментів кератинізації [13].

Суперечливим є і погляд на мітотичну активність кератиноцитів при іхтіозі. Одні дослідники вказують на знижену активність кератиноцитів при іхтіозі [5], інші зафіксували показники, близькі до фізіологічної норми [11]. Тобто питання показників клітинного циклу на сьогодні лишається відкритим. А враховуючи також спрямованість сучасних засобів терапії вульгарного іхтіозу, зокрема і ретиноїдів, на клітинний поділ, надзвичайно актуальним є вивчення показників клітинного циклу шкіри у хворих на вульгарний іхтіоз у порівнянні з показниками дерматологічно здорових осіб.

Мета роботи — дослідити показники клітинного циклу та інтервалу SUB-G0G1 (фрагментації ДНК) у пацієнтів з іхтіозом і в дерматологічно здорових осіб.

Таблиця. Показники клітинного циклу клітин шкіри у хворих на іхтіоз та дерматологічно здорових осіб за даними проточної ДНК-цитометрії (M ± σ)

Група	Показники клітинного циклу					
	G0G1	S	G2 + M	IP	SUB-G0G1	BP
Хворі на іхтіоз (n = 10)	74,70 ± 2,52	3,89 ± 0,96*	12,08 ± 2,78*	25,31 ± 2,52*	18,86 ± 2,06*	0,18 ± 0,03
Дерматологічно здорові особи (n = 12)	85,79 ± 3,27	2,13 ± 0,59	21,41 ± 2,36	14,21 ± 3,27	8,55 ± 2,89	0,18 ± 0,05

Примітка. * Статистично значуща різниця (p < 0,05) за критерієм Манна—Уїтні порівняно з групою дерматологічно здорових осіб.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 10 зрізах дерми дерматологічно здорових осіб віком 30–41 рік (у середньому 34 роки) та 10 хворих на іхтіоз віком 19–69 років (у середньому 32 роки). Проаналізовано 20 ДНК-гістограм.

Вміст ДНК в ядрах клітин шкіри людини визначено методом проточної ДНК-цитометрії. Суспензії ядер з клітин шкіри людини отримували за допомогою спеціального набору для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA Step 2 (Partec, Німеччина) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Цей набір дає змогу виконувати екстракцію ядер та маркувати ядерну ДНК діамідинофенілндолом (ДАФІ). У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувалися спеціальні одноразові фільтри Cell-Trics 50 мкм (Partec, Німеччина).

Проточний аналіз проведено за допомогою багатфункціонального науково-дослідного проточного цитометра PartecPAS (Partec, Німеччина). Для збудження флуоресценції DAPI застосовано УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії реєструвалося 10 тис. подій. Аналізу підлягали події (ядра клітин шкіри) з вмістом ДНК ≤ 4 с (гейт RN1).

Циклічний аналіз клітин проведено з використанням засобів програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) у повній цифровій відповідності з математичною моделлю, де визначали:

- G0G1 – відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2 с);
- S – процентне співвідношення фази синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2 с та < 4 с);
- G2 + M – процентне співвідношення фази G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4 с);
- IP – індекс проліферації, який визначали за сумою показників S + G2 + M;
- BP – блок проліферації, який оцінювали за співвідношенням S/(G2 + M) (збільшення

кількості клітин у фазі G2 + M при низьких значеннях S-фази свідчить про затримку проліферації в стадії G2 + M).

Фрагментацію ДНК (апоптоз) визначено шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах – RN2 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2 с.

Статистичну обробку результатів проведено в пакеті STATISTICA 6.1 (належить НДЦ ВНМУ імені М.І. Пирогова, ліцензійний № ВХХR901 E246022FA) із застосуванням непараметричних методів оцінки результатів. Оцінювали правильність розподілу ознак за кожним з отриманих варіаційних рядів, середні значення кожної досліджуваної ознаки та стандартне квадратичне відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою U-критерія Манна—Уїтні [1].

Результати та обговорення

Результати дослідження засвідчили існування певних особливостей показників клітинного циклу клітин шкіри у дерматологічно здорових осіб, які полягають в наявності суттєвої кількості клітин у стабільній фазі G0G1 (таблиця).

Водночас доволі значна група клітин перебуває у фазі G2 + M, що передує фазі S. Відносно невелика кількість клітинних подій фіксується в інтервалі SUB-G0G1 (рис. 1), що свідчить про неактивний процес апоптозу в клітинах шкіри у здоровій тканині.

Порівняння отриманих даних з даними інших досліджень, присвячених вивченню показників клітинного циклу клітин шкіри, виявлено їх подібність. Однак варто зауважити, що ці дані отримано 20–30 років тому на культуральному матеріалі. Жодної публікації стосовно показників клітинного циклу клітин шкіри *in vivo* не виявлено [4]. А щодо вивчення деградації ДНК в клітинах шкіри лише останніми роками з'явилися поодинокі публікації, які свідчать про складність цього механізму в клітинах шкіри і важливість його порушень при деяких дерматологічних захворюваннях [9, 12].

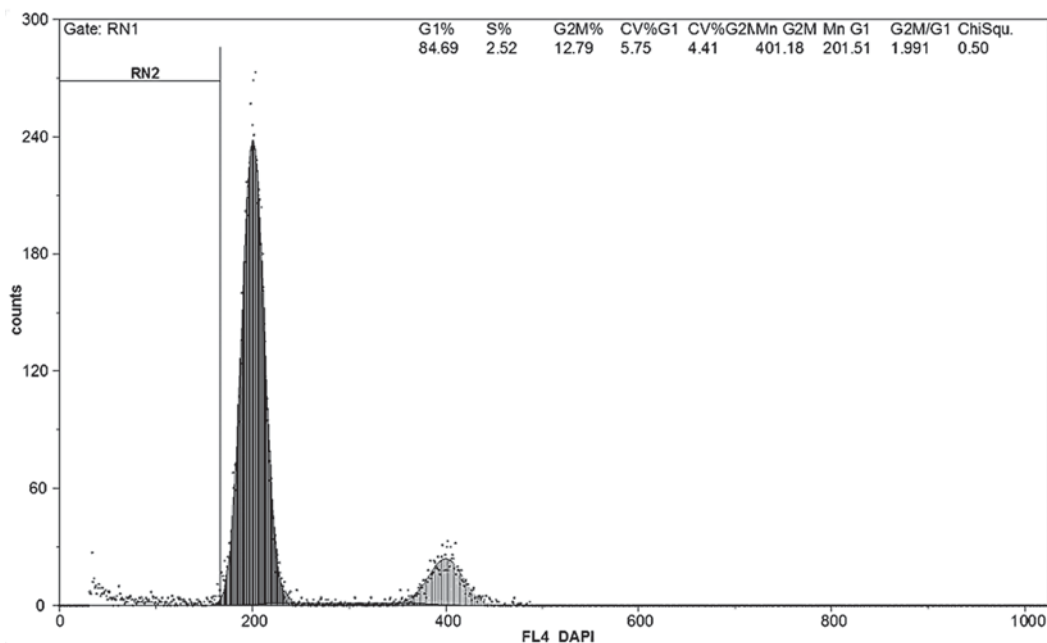


Рис. 1. ДНК-гістограма ядерної суспензії клітин шкіри дерматологічно здорової людини
Фрагментація ДНК, SUB-G0G1 — 6,55 %.

Вважається, що апоптоз кератиноцитів відіграє важливу роль у регуляції розвитку епідермісу та стримуванні канцерогенезу. Апоптоз регулює активну проліферацію, щоб підтримувати товщину епідермісу, сприяє утворенню рогового шару і може усувати злякано змінені клітини. На думку багатьох дослідників, апоптоз є критичним механізмом саморегуляції клітин шкіри, що дає змогу контролювати активну проліферацію клітин, і порушення цього механізму є основною патогенетичною ланкою багатьох патологічних процесів у шкірі — пухлин і захворювань, пов'язаних з порушенням кератинізації, зокрема іхтіозу [3].

У дослідженні не виявлено розбіжностей показників блоку проліферації у дерматологічно здорових та хворих на іхтіоз, який визначається за співвідношенням клітин, що перебувають у S-фазах та G2 + M, найбільш істотними були відмінності показників деградації ДНК — інтервалу SUB-G0G1. Більше ніж у 2 рази цей показник при іхтіозі перевищував показник дерматологічно здорових осіб ($p < 0,05$), що свідчить про важливу роль саме активації апоптозу клітин шкіри на тлі іхтіозу (рис. 2).

На сьогодні загальноприйнятою є думка, що бар'єрна функція епідермісу реалізується при термінальному диференціюванні кератиноцитів. Проблеми запрограмованої загибелі клітин — апоптозу кератиноцитів — гіпотетично пов'язують з бар'єрними пошкодженнями на тлі іхтіозу [5, 10]. Досліджень щодо апоптозу клітин

шкіри у хворих на іхтіоз не виявлено, хоча поодинокі роботи, присвячені вивченню клітин фібробластів у культурі, вказують на посилення апоптозу [8, 10].

Індекс проліферації клітин шкіри теж виявився значно вищим у групі хворих на іхтіоз ($p < 0,05$) — на 85 % перевищував аналогічний показник дерматологічно здорових осіб. Стандартно індекс проліферації [6] визначається як сумарна кількість клітин, що перебувають у фазах S- і G2 + M клітинного циклу. Цей показник істотно збільшується в багатьох тканинах, зокрема і в кератиноцитах, при патологічних станах, стресових ситуаціях, що прискорює як відновлення клітин, так і їх посилену загибель [12]. Такі зміни показників клітинного циклу клітин шкіри відбуваються у хворих на іхтіоз, що може свідчити про подібний механізм.

Також привертає увагу істотне збільшення у хворих на іхтіоз показників фази S ($p < 0,05$) порівняно з аналогічним показником дерматологічно здорових осіб. Це також свідчить про дисбаланс показників клітинного циклу на тлі іхтіозу як реалізацію глибинних порушень генотипу генів кератинізації, коли посилений синтез ДНК співіснує з підвищеним рівнем апоптозу і призводить до морфологічних виявів захворювання.

На підставі отриманих даних можна запропонувати модель порушень клітинного циклу на тлі іхтіозу, що полягає в одночасному посиленні апоптозу та проліферативної активності клітин,

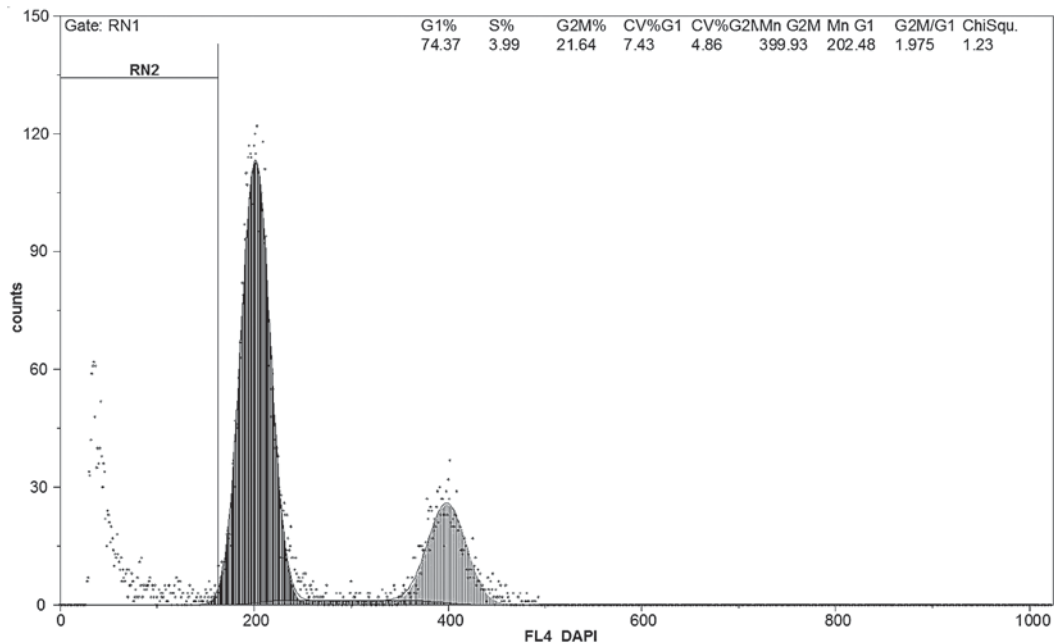


Рис. 2. ДНК-гістограма ядерної суспензії клітин шкіри хворого на іхітоз
Фрагментація ДНК, SUB-G0G1 — 19,54 %.

які призводять до морфологічних ознак порушень кератинізації.

Висновки

Клітинний цикл клітин шкіри дерматологічно здорових осіб характеризується істотною кількістю клітин у стабільній фазі G0G1. Значна група клітин перебуває у фазі G2 + M, що передує фазі S. Відносно невелику кількість клітинних подій зафіксовано в інтервалі SUB-G0G1.

На тлі іхітіозу суттєво підвищеними виявилися показники індексу проліферації, інтервалу SUB-G0G1, фази S та значно знижені показники фази G2 + M.

Запропоновано модель порушень клітинного циклу на тлі іхітіозу, яка полягає в одночасному посиленні апоптозу та проліферативної активності клітин шкіри, що призводить до морфологічних ознак порушень кератинізації.

Список літератури

1. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA.—М.: МедиаСфера, 2002.— 312 с.
2. Akiyama M. Updated molecular genetics and pathogenesis of ichthyoses // Nagoya J. Med. Sci.— 2011.— Vol. 73 (3–4).— P. 79–90.
3. Chamcheu J.C. et al. Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages // Arch. Biochem. Biophys.— 2011.— Vol. 15, N 508 (2).— P. 123–137.
4. Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry // Cytometry.— 1992.— Vol. 13 (8).— P. 795–808.
5. Denecker G. et al. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification // Cell. Death. Differ.— 2005.— Vol. 12 (suppl. 2).— P. 1497–1508.
6. Franssen M.E. et al. A multiparameter flow cytometric analysis of the effect of bexarotene on the epidermis of the psoriatic lesion // Br. J. Dermatol.— 2003.— Vol. 149 (3).— P. 506–512.
7. Gruber R. et al. Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function // Am. J. Pathol.— 2011.— Vol. 178 (5).— P. 2252–2263.
8. Milstone L.M. et al. Meeting report from Frontiers in Ichthyosis // Research. J. Invest. Dermatol.— 2011.— Vol. 131 (2).— P. 279–282.
9. Ohnuki H. et al. Zoledronic acid induces S-phase arrest via a DNA damage response in normal human oral keratinocytes // Arch. Oral. Biol.— 2012.— Vol. 57 (7).— P. 906–917.
10. Sandilands A. et al. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease // J. Cell. Sci.— 2009.— Vol. 1, N 122 (Pt 9).— P. 1285–1294.
11. Schmuth M. et al. Inherited ichthyoses/generalized Mendelian disorders of cornification // Eur. J. Hum. Genet.— 2013.— Vol. 21 (2).— P. 123–133.
12. Taviani D. et al. Fibroblast apoptosis in a patient affected by lamellar ichthyosis // J. Cutan. Pathol.— 2009.— Vol. 36 (4).— P. 417–424.
13. Winge M.C. et al. Filaggrin genotype determines functional and molecular alterations in skin of patients with atopic dermatitis and ichthyosis vulgaris // PLoS One.— 2011.— Vol. 6 (12).— P. 282–204.

С.В. Дмитренко

Вінницький національний медичний університет імені Н.І. Пирогова

Показатели клеточного цикла клеток кожи у больных ихтиозом

Цель — изучить особенности показателей клеточного цикла кожи у больных ихтиозом в сравнении с показателями дерматологически здоровых людей.

Материалы и методы. Проведено исследование показателей клеточного цикла клеток кожи у 10 больных ихтиозом методом проточной ДНК-цитометрии. Изучены показатели 10 биоптатов кожи больных разными типами ихтиоза. Возраст обследованных больных составил от 19 до 69 лет (в среднем 32 года). Сравнение проводилось с показателями 10 дерматологически здоровых лиц.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты свидетельствовали об определенных особенностях показателей клеточного цикла клеток кожи у дерматологически здоровых лиц, которые заключаются в наличии существенного количества клеток в стабильной фазе G0G1. Наряду с этим достаточно значительная группа клеток находится в фазе G2 + M, которая предшествует фазе S. Относительно небольшое количество клеточных событий зафиксировано в интервале SUB-G0G1, что указывает на весьма неактивный процесс апоптоза в клетках кожи в здоровой ткани. У пациентов с ихтиозом наиболее существенными оказались различия показателей деградации ДНК — интервала SUB-G0G1. Этот показатель более чем в 2 раза превышал показатель дерматологически здоровых лиц ($p < 0,05$), что свидетельствует о важной роли именно активации апоптоза клеток кожи на фоне ихтиоза.

Выводы. На основании полученных данных можно предложить модель нарушений клеточного цикла на фоне ихтиоза, заключающуюся в одновременном усилении апоптоза и пролиферативной активности клеток, которые приводят к морфологическим признакам нарушений кератинизации.

Ключевые слова: ихтиоз, клеточный цикл, проточная цитометрия.

S.V. Dmitrenko

National Pyrogov Memorial Medical University, Vinnytsia

Indicators of cell cycle of skin cells in patients with ichthyosis

Objective — to examine the performance features of the cell cycle in the skin of patients with ichthyosis, compared with the same indicators of dermatologically healthy persons.

Materials and methods. We studied the parameters of the cell cycle of skin cells in 10 patients with ichthyosis by ductal DNA cytometry. Indicators of 10 skin biopsies of patients with different ichthyosis types were explored. Age of the patients ranged from 19 to 69 years (mean age — 32 years). The comparison was conducted with the same indicators of 10 dermatologically healthy individuals.

Results and discussion. The results showed that there are certain specific parameters of the cell cycle of skin cells in dermatologically healthy individuals which are characterized by a substantial number of cells in a stable phase of G0G1. At the same time, a rather large group of cells is in phase G2 + M, which precedes phase S. A relatively small number of cellular events were recorded in the range of SUB-G0G1, indicating a rather inactive process of apoptosis in the skin cells of healthy tissue. In patients with ichthyosis, the most significant differences appeared in performance degradation of DNA — interval SUB-G0G1. This rate is more than 2 times higher than in dermatologically healthy persons ($p < 0.05$), indicating the important role of apoptosis activation of skin cells on the background of ichthyosis.

Conclusions. Based on our data we can offer a model of violations of the cell cycle against the background of ichthyosis consisting in strengthening of apoptosis and proliferative activity of cells, leading to morphological signs of keratinization disorders.

Key words: ichthyosis, cell cycle, flow cytometry.

Дані про автора:

Дмитренко Світлана Володимирівна, к. мед. н., доц. кафедри шкірних та венеричних хвороб Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова
21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56
E-mail: Svetlana7783@yandex.ru