

УДК [57.04 + 616.5]. 616-003. 616-008

**ПРОФІЛЬ ІНТЕРЛЕЙКІНІВ У ЗОНІ ПРОМЕНЕВОГО ОПІКУ
ШКІРИ ЗА УМОВ ЛІКУВАННЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ СУМІШШО
АУТОФІБРОБЛАСТІВ З АУТОКЕРАТИНОЦИТАМИ**

Л. Алтухова

*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна
майдан Свободи, 4, Харків 61022, Україна
e-mail: altuhovalv@gmail.com*

Вивчено експресію генів про- і протизапальних інтерлейкінів та вміст цих білків у зоні рентгенівського опіку шкіри 3-го ступеня у морських свинок при щоденній 35-добовій аутоотрансплантації в неї суміші фібробластів з кератиноцитами, що була розпочата відразу після опромінення. Експерименти виконані на морських свинках масою 350-450 г. Променеві опіки 3-го ступеня шкіри лівого стегна викликали у тварин рентгенівським випромінюванням. Експресію генів вимірювали за допомогою гібридизації на ДНК-мікрочипах. Зміст досліджуваних білків у зразках тканин проводили імунохімічним аналізом з використанням ELISA-мікрочіпів. Показано, що в зоні опіку безперервно знижується експресія генів протизапального інтерлейкіну 13, а також інтерлейкіну 6, і вміст цих білків, а експресія генів прозапальних інтерлейкінів ІЛ1 α , ІЛ1 β , ІЛ2 і їх вміст зростають. Введення в зону опіку суміші аутофібробластів з аутокератиноцитами підвищує експресію всіх досліджених генів і вміст у ній інтерлейкінів, причому концентрація протизапальних інтерлейкінів стає більшою, ніж прозапальних. Вища, ніж у контролі, концентрація обох видів інтерлейкінів у зоні опромінення, свідчить про лише часткову нормалізацію клітинного імунітету після закінчення аутоотрансплантації.

Ключові слова: променевий опік, фібробласти, кератиноцити, аутоотрансплантація, інтерлейкіни.

Відомо, що розвиток променевого опіку супроводжується зниженням клітинного імунітету через загибель імунопотентних клітин [6, 11]. У роботах [1, 10] було показано, що тривала щоденна об'ємна трансплантація суміші аутофібробластів з аутокератиноцитами в зону рентгенівського опіку шкіри у морських свинок, розпочата безпосередньо після опромінення, істотно сповільнює розвиток опіку і сприяє загоєнню променевої виразки.

Це свідчить, принаймні, про часткову нормалізацію клітинного імунітету. Для з'ясування цього питання в даній роботі вивчена експресія генів 5 інтерлейкінів, які виробляються як фібробластами і кератиноцитами, так і іншими типами клітин, а також вміст цих білків у зоні опіку в процесі аутоотрансплантації.

Матеріали і методи

Експерименти виконані на морських свинках масою 350-450 г з дотриманням рекомендацій проведення медико-біологічних досліджень зі змінами [2, 3].

Тварини були розділені на три групи: контрольні неопромінені - 4 особини, опромінені неліковані й опромінені ліковані - по 8 особин у кожній групі. Променеві опіки 3-го ступеня шкіри лівого стегна викликали у тварин рентгенівським випромінюванням,

як описано в [5]. Фібробласти і кератиноцити отримували стандартними методами (Rittié, [13] і [14] відповідно, з біоптатів шкіри правого стегна, взятих за 32 доби до опромінення. Для аутотрансплантації використовували обидва типи клітин 3-го пасажу, які зберігали в рідкому азоті [4]. Об'ємну аутотрансплантацію проводили 6 ін'єкціями по контуру зони опромінення під кутом 45° до її центру на глибину 1 мм. Кожна ін'єкція містила суміш $(150-160) \times 10^3$ фібробластів і $(130-140) \times 10^3$ кератиноцитів у 100 мкл фізіологічного розчину.

У 1-шу добу експерименту тварин контрольної групи, а на 20-ту і 35-ту добу по 4 тварини інших груп декапітували під тіопенталовим наркозом у дозі 60 мкг / кг. З периферичних і центральних ділянок зони опіку, а також з аналогічних ділянок лівого стегна у контрольних тварин брали по 2 зразки тканин, фіксували їх формаліном і поміщали в парафінові блоки.

Після депарафінізації зразків тканини, виділення з них загальної РНК (набори «RNeasy FFPE Kit», США) і синтезу кДНК (набори QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, США) з використанням ген-специфічних праймерів і СуЗ-мічених нуклеотидів (виробництво Arrayit і Life Technologies, США, відповідно) проводили ампліфікацію на термоциклері BIO-RAD iCycler.

Експресію генів вимірювали за допомогою гібридизації на ДНК-мікрочипах (виробництво Arrayit, США). Відмивання проводили в камерах для гібридизації SecureSeal.

Депарафінізацію тканини для виділення з неї білків здійснювали наборами Qia-gen's Qproteome FFPE Tissue Kit. Зміст досліджуваних білків в зразках тканин проводили імунохімічним аналізом з використанням ELISA-мікрочипів і наборів Antibody Array Assay Kit (KAS20, Full Moon BioSystems, Inc.)

Обидва типи чипів сканували на конфокальному флуоресцентному сканері Affymetrix 428, використовуючи програмне забезпечення Jaguar. Отримані значення флуоресценції виражали в одиницях флуоресценції (rfu) / мг тканини. Для розрахунку кількості білка в масових одиницях використовували калібрувальний білковий чип Arrayit Protein Microarray і проводили перерахунок отриманих значень (rfu) / мг тканини в нг / мкг тканини.

Усі процедури вимірювань проводили згідно з оригінальними інструкціями фірм-виробників, як описано в роботі [10].

Аналіз і статистичну обробку результатів експериментів провели в пакеті програми Origin 7.5 pro [12]. Результати представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартне відхилення. Достовірними вважали результати з $p \leq 0,05$.

Результати і їхнє обговорення

Результати експериментів наведені в таблиці. Як видно, в зоні опіку у опроміненіх нелікованих тварин, порівняно з контрольними, продукція і вміст медіаторів запалення й імунітету – прозапальних інтерлейкінів – підвищується або на початку (ІЛ1 α), або протягом усього часу експерименту (ІЛ1 β , ІЛ2). У той же час в зоні опіку знижуються рівень експресії гена ІЛ3 і зміст ІЛ3, який має протизапальну дію, пригнічуючи виробництво прозапальних інтерлейкінів макрофагами [9]. Аналогічно змінюються в цій зоні і експресія гена ІЛ6, і вміст інтерлейкіну 6. ІЛ6 відіграє важливу роль у загоєнні травм різного походження, в тому числі й опіків, проявляючи, залежно від характеру ураження, або про-, або протизапальну дію [8]. Ці результати свідчать про те, що у нелікованих опроміненіх тварин інтенсивність запального процесу збільшується з розвитком опіку [7].

Вплив аутотрансплантації сумішню фібробластів і кератиноцитів у зону променевого опіку шкіри морських свинок на рівень експресії генів інтерлейкінів (rfu/мг тканини) $\times 10^4$ та вміст цих білків у ній (нг/ мкг тканини)

Ген	Експресія гена					Інтерлейкін	Вміст інтерлейкіну				
	Контроль, 1 доба	Опромінення, доби					Контроль, 1 доба	Опромінення, доби			
		Без лікування	З лікуванням		Без лікування			З лікуванням			
		20	35	20	35		20	35	20	35	
ІІ1А	44,0±	34,2±	0,1±	41,0±	65,6±	ІІ1α	9,0±	13,3±	1,1±	26,2±	42,5±
	0,88	0,68*	0,002*	0,08*#	1,31*#		0,18	0,27*	0,02*	0,52*#	0,85*#
ІІ1В	61,0±	81,8±	131,2±	60,1±	70,8±	ІІ1β	11,5±	33,3±	96,6±	38,8±	45,9±
	1,22	1,62*	2,62*	1,20*#	1,42*#		0,23	0,67*	1,92*	0,68	0,92*#
ІІ2	41,1±	30,7±	79,1±	47,2±	75,5±	ІІ2	8,4±	11,9±	57,8±	30,3±	49,0±
	0,82	0,31*	1,58*	0,94*#	1,61*#		0,17	0,24*	1,22*	0,61*#	0,78*#
ІІ6	17,0±	0,09±	0,03±	21,2±	33,9±	ІІ6	3,5±	1,0±	1,0±	13,0±	21,4±
	0,35	0,02*	0,006*	0,43*#	0,68*#		0,07	0,02*	0,02*	0,26*#	0,23*#
ІІ13	31,3±	0,17±	0,06±	44,3±	70,8±	ІІ13	6,4±	1,1±	1,0±	28,3±	45,9±
	0,63	0,34*	0,01*	0,09*#	1,42*#		0,13	0,02*	0,02*	0,57*#	0,52*#

Примітки: * - вірогідно щодо контролю, $p \leq 0,05$; # - вірогідно щодо опромінення без лікування на ту ж саму добу, $p \leq 0,05$.

Аутотрансплантація призводить практично до нормалізації експресії всіх досліджених генів вже на 20-ту добу лікування, а на 35-ту добу вона перевищує контрольні значення, в середньому, в 1,5 – 2 рази. Вміст же інтерлейкінів у зоні опіку набагато вищий контролю і на 20-ту, і на 35-ту добу, при цьому прозапальний ІІ1α, ІІ1β і ІІ2 в 4,7 разу, а ІІ6 і ІІ13 - в 6,1 разу, відповідно.

Таким чином, навіть при сповільненні розвитку опіку і після загоєння променевої виразки аутотрансплантацією сумішню фібробластів з кератиноцитами [1, 10] в зоні опромінення деякий час зберігається неповний і трохи змінений клітинний імунітет.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Л. Алтухова, Е. Кот, Ю. Кот и др. Сравнение эффективности тормозящего действия объёмной аутотрансплантиции фибробластов и композиции фибробластов с кератиноцитами на развитие локального лучевого ожога кожи // Вісн. Харків. ун-ту №1153. Сер. біол. 2015. Вип. 24. С. 103–109.
2. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV від 21.02.2006. ВВР.2006. № 27, ст.230.
3. Зміни, внесені до Закону № 3447-IV згідно із Законом № 1759-VI від 15.12.2009. ВВР. 2010. № 9, ст.76.
4. Келлер Г., Себастьян Дж., Лакомбе Ю. и др. Сохранность инъецируемых аутологических человеческих фибробластов // Бюл. Эксп. Биол. Мед. 2000. Т.130 (8). С. 203–206.
5. Кот Ю.Г., Кот Е.В., Перский Е.Э. и др. Торможение развития локального лучевого ожога объёмной аутотрансплантицией фибробластов // Доповіді НАНУ. Математика, природознавство, технічні науки. 2013. № 4. С. 144-147.
6. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги. СПб.: Спецлит, 2000. 488 с.
7. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. 2002. Т. 1, № 1. С. 9-16.
8. Цитокины. Электронный документ. Режим доступа: <http://immuninfo.ru/immunologiya/citokiny/>
9. Нарушения иммунитета при критических состояниях. Особенности диагностики. Электронный документ. Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/41>

10. *Altukhova L. V., Kot K. V., Kot Yu. G.* et all. Biochemical mechanisms of skin radiation burns inhibition and healing by the volumetric autotransplantation of fibroblasts and keratinocytes with fibroblasts composition // *Vіsn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* 2015. 6 (2). P. 125–132.
11. *Antonacci A. C.* Immune dysfunction following burn injury // *The nature, cellular and biochemical basis and management of immunodeficiencies* / Ed. R. A. Good, E. Lindenlaub. Berlin, 1987. P. 341.
12. *Glantz S.A.* Primer of Biostatistics. McGraw-Hill, 2007. P.298.
13. *Rittié L., Fisher G.J.* Isolation and culture of skin fibroblasts // *Methods in Molecular Medicine.* 2005. Vol.117. P. 83–98.
14. *Shaw A.J.* Epithelial cell culture. Reconstruction of human skin epidermis *in vitro*. The practical approach series / Ed. D.Richwood, B.D.Hames. Oxford, England, 1996. P. 179–200.

*Стаття: надійшла до редакції 20.06.16
доопрацьована 31.08.16
прийнята до друку 1.09.16*

THE INTERLEUKINS PROFILE IN RADIATION SKIN BURN ZONE IN TREATMENT WITH MIXTURE OF AUTOFIBROBLASTS AND AUTOKERATINOCYTES

L. Altukhova

*V. N. Karazin Kharkiv National University, Biochemistry Department
4, Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine
e-mail: altuhovalv@gmail.com*

The gene expression of pro- and anti-inflammatory interleukins and the content of these proteins in the area of the 3rd degree X-ray skin burn in guinea pigs at daily 35-day autotransplantation of mixture of fibroblasts and keratinocytes, started immediately after exposure, were studied. Guinea pigs of 350-450 g body weight were used in the experiment. 3rd degree radiation burns of skin on the left thigh were caused by X-ray exposure. Gene expression was measured by hybridization on DNA-microarrays. Content of the investigated proteins in tissue samples was assessed by immunochemical assay using ELISA-microarrays. It was shown that the gene expression of interleukin 13 and interleukin 6, and the content of these proteins in the burn zone are continually decreasing, and the gene expression of pro-inflammatory interleukins IL1 α , IL1 β , IL2 and its content are increasing. Administration of the mixture of autofibroblasts and keratinocytes into the burn zone increases the expression of all the examined genes and interleukin content therein, whereas the concentration of anti-inflammatory interleukins becomes greater than inflammatory ones. Higher than in the control, the concentration of both types of interleukins in the irradiation zone, is indicating only the partial normalization of cellular immunity after autotransplantation.

Keywords: radiation burn, fibroblasts, keratinocytes, autotransplantation, interleukins.

**ПРОФИЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ЗОНЕ ЛУЧЕВОГО ОЖОГА КОЖИ ПРИ
ЛЕЧЕНИИ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ СМЕСЬЮ АУТОФИБРОБЛАСТОВ С
АУТОКЕРАТИНОЦИТАМИ**

Л. Алтухова

*Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина
e-mail: altuhovalv@gmail.com*

Изучена экспрессия генов про- и противовоспалительных интерлейкинов и содержание этих белков в зоне рентгеновского ожога кожи 3-й степени у морских свинок при ежедневной 35-суточной аутотрансплантации в нее смеси фибробластов с кератиноцитами, которая была начата сразу же после облучения. Эксперименты проведены на морских свинках массой 350-450 г. Лучевые ожоги 3-й степени кожи левого бедра у животных были вызваны рентгеновским облучением. Экспрессию генов измеряли при помощи гибридизации на ДНК-микрочипах. Содержание исследуемых белков в образцах тканей проводили иммунохимическим анализом с использованием ELISA-микрочипов. Показано, что в зоне ожога непрерывно снижается экспрессия генов противовоспалительного интерлейкина 13, а также интерлейкина 6, и содержание этих белков, а экспрессия генов провоспалительных интерлейкинов ИЛ1 α , ИЛ1 β , ИЛ2 и их содержание растут. Введение в зону ожога смеси аутофибробластов с аутокератиноцитами повышает экспрессию всех исследованных генов и содержание в ней интерлейкинов, причем концентрация противовоспалительных интерлейкинов становится больше, чем провоспалительных. Более высокая, чем в контроле, концентрация обоих видов интерлейкинов в зоне облучения, свидетельствует о лишь частичной нормализации клеточного иммунитета после окончания аутотрансплантации.

Ключевые слова: лучевой ожог, фибробласты, кератиноциты, аутотрансплантация, интерлейкины.