



УДК [57.04+616.5].616-003.616-008

Ю. Г. Кот, Е. В. Кот, Е. Э. Перский, А. В. Поликарпова,
Л. В. Алтухова

Торможение развития локального лучевого ожога объемной аутотрансплантацией фибробластов

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины С. А. Костеринным)

Изучена возможность торможения развития локального рентгеновского ожога 3-й степени объемной аутотрансплантацией фибробластов. Показано, что у морских свинок глубокое введение в зону ожога аутофибробластов через 1 ч, а затем каждые 24 ч после облучения в течение 21 сут существенно уменьшает размеры поражения, снижает степень воспалительных процессов, тормозит деструкцию соединительнотканного матрикса и образование лучевой язвы.

Лучевые ожоги — тяжелейшие поражения тканей, для которых характерны отдаленные последствия, заключающиеся в развитии язв, не заживающих самостоятельно, а в некоторых случаях — в развитии рака кожи. Существующие методы лечения лучевых ожогов (фармакологические и хирургические) являются, в сущности, методами “позднего реагирования”, когда поражение имеет клинические проявления или вступает в хроническую стадию [1]. Один из путей решения этой проблемы состоит в торможении развития ожога на ранних этапах его формирования, что позволит более эффективно использовать стандартные методы для дальнейшего лечения.

Целью исследования было изучение возможности торможения развития лучевых ожогов аутотрансплантацией фибробластов в зону поражения сразу же после облучения.

Исследования проведены на морских свинках-самцах массой 350–450 г. Животные были разделены на три группы по семь особей в каждой: I — контрольная; II — облученные без аутотрансплантации фибробластов; III — облученные с аутотрансплантацией фибробластов.

Для получения аутофибробластов из выбритого участка кожи на бедре правой задней лапы каждого животного под эфирным наркозом брали четыре биоптата площадью ($2 \times 2,5$) мм² и толщиной 1 мм. Нарработку клеточной массы проводили по стандартному протоколу [2]. В эксперименте использовали фибробласты 4-го пассажа, которые хранили в жидком азоте в среде с 70% ДМЕМ, 20% фетальной сыворотки и 10% ДМСО.

© Ю. Г. Кот, Е. В. Кот, Е. Э. Перский, А. В. Поликарпова, Л. В. Алтухова, 2013

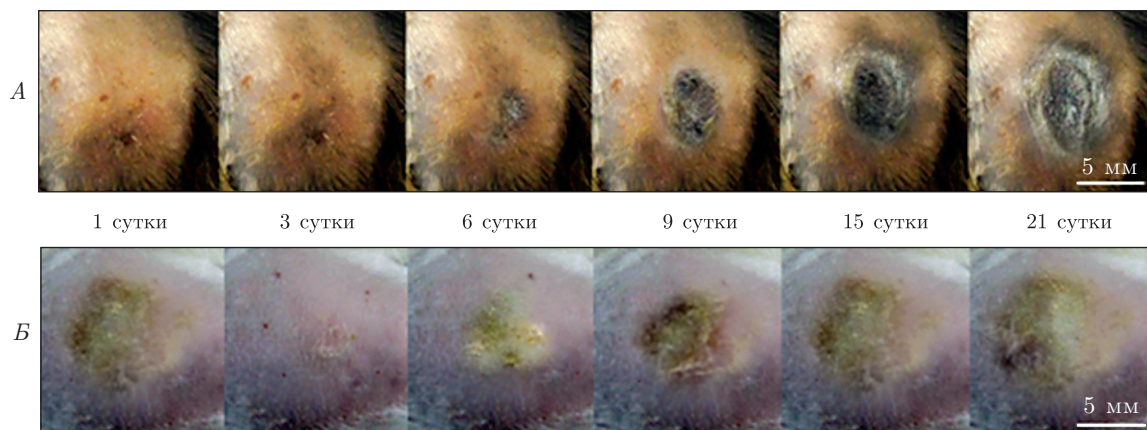


Рис. 1. Влияние аутотрансплантации фибробластами на развитие лучевого ожога и лучевой язвы у морских свинок: А — облучение; В — облучение с аутотрансплантацией

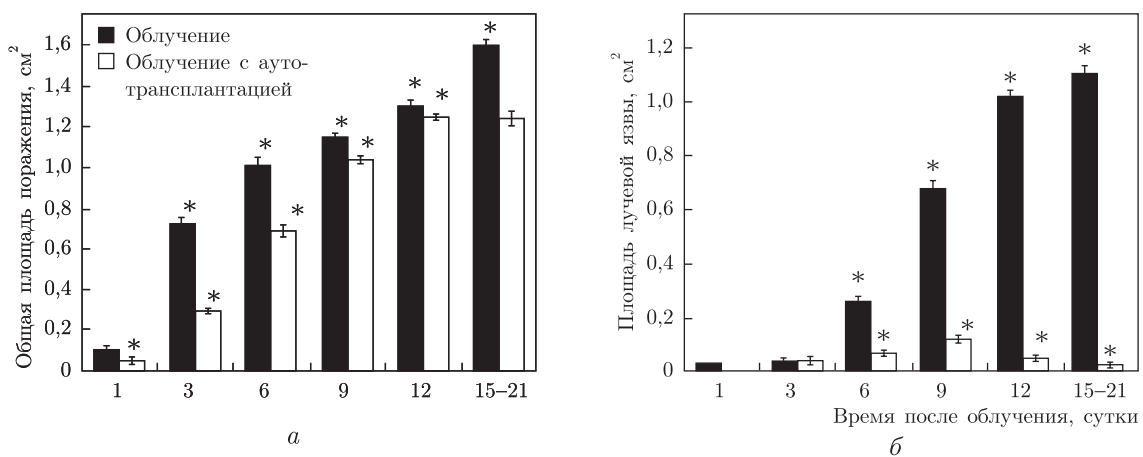


Рис. 2. Влияние аутотрансплантации фибробластами на временные изменения общей площади лучевого ожога и площади лучевой язвы у морских свинок.

* Достоверно ($P < 0,05$) относительно облучения и предыдущего значения площади

Микрораны после биопсии затягивались на 2-е сутки, а на 15-е сутки целостность кожи полностью восстанавливалась.

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

Через 1 ч после облучения, а затем каждые 24 ч животным III группы по периметру зоны облучения под углом 45° к ее центру делали шесть подкожных инъекций на глубину 1 мм. Каждая инъекция объемом 100 мкл представляла собой суспензию из $(200 \div 210) \cdot 10^3$ аутофибробластов с содержанием живых клеток 80–85%.

Перед каждым введением аутофибробластов по фотографиям зоны облучения у животных II и III групп с помощью программы Jimage J 1.45s подсчитывали общую площадь лучевого ожога и площадь лучевой язвы.

На 22-е сутки животных всех групп декапитуировали под тиопенталом натрия и иммуноферментным методом (наборы DRG, Германия) измеряли концентрацию провоспалительных (IL-1, IL-2, TNF- α) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) интерлейкинов в сыворотке крови, а у животных II и III групп также и в гомогенатах ожоговых участков кожи.

Состояние межклеточного матрикса в ожоговых участках оценивали с помощью гистологических методов, определяя площади, занятые нативным и деградированным коллагеном [4], гликозаминогликанами [5, 6], погибшими и живыми клетками [7], коллагеном I типа (FITC-конъюгированные моноклональные антитела Invitrogen). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна–Уитни [8].

У животных II группы к концу 1-х суток после облучения появилась выраженная гиперемия облученного участка кожи, которая развивалась и на 10-е сутки эта область уплотнилась и начала покрываться струпом. На 21-е сутки в зоне облучения развился дефект, представляющий собой покрытый коричневым струпом участок некроза кожи и более глубоко расположенных под ним тканей — так называемую сухую язву. Общая площадь ожога к этому времени значительно увеличилась. Никаких признаков заживления лучевого ожога не наблюдалось. В то же время у животных III группы развитие этих процессов значительно замедлилось. На рис. 1 приведены фотографии, иллюстрирующие этот эффект.

Анализ численных значений обнаруженного эффекта (рис. 2) показывает, что общая площадь ожога при аутотрансплантации все время наблюдения остается меньшей, чем без нее, а с 12-х суток перестает увеличиваться. На 21-е сутки она составляет 75% площади ожога, который развивался без торможения аутотрансплантацией.

Еще эффективнее влияет аутотрансплантация фибробластами на развитие лучевой язвы. При введении аутофибробластов в зону облучения площадь язвы увеличивается только до 9-х суток, после чего начинает уменьшаться. При этом на 9-е сутки она составляет 15%, а на 2-е сутки — только 4% площади язвы, развивающейся без аутотрансплантации фибробластами.

Согласно данным о влиянии аутотрансплантации на динамику изменения гистологических показателей области поражения и интенсивности воспалительного процесса (табл. 1, 2), наблюдаемый эффект торможения определяется меньшим количеством погибших соединительнотканых клеток и, соответственно, меньшей степенью нарушения строения межклеточного матрикса. Гистологические характеристики зоны лучевого ожога при введении в нее аутофибробластов приближаются к норме. К 21-м суткам у животных, которым вво-

Таблица 1. Влияние аутотрансплантации фибробластами на площадь, занимаемую клетками и биополимерами матрикса соединительной ткани морских свинок в зоне лучевого ожога на 21-е сутки после облучения, %

Вариант опыта	Количество живых клеток	Общий нативный коллаген	Коллаген I типа	Деградируемый коллаген	Гликозаминогликаны
Контроль	21,6 ± 1,2	37,2 ± 1,4	34,7 ± 1,3	4,2 ± 0,4	22,8 ± 1,4
Облучение	12,2 ± 0,8*	25,0 ± 1,4*	22,1 ± 1,0*	17,3 ± 0,7*	10,5 ± 0,7*
Облучение с ауто-трансплантацией	15,6 ± 1,2*	31,6 ± 1,2*	29,3 ± 1,1*	11,0 ± 0,7*	27,1 ± 1,0*

* Достоверно ($p < 0,05$) по отношению к предыдущему показателю.

Таблица 2. Влияние аутотрансплантации фибробластами на концентрацию про- и противовоспалительных интерлейкинов в крови (пкг/мл) и коже (пкг/г белка) морских свинок в зоне лучевого ожога на 21-е сутки после облучения

Вариант опыта	IL-1 β	IL-2	TNF- α	IL-4	IL-10
Кровь					
Контроль	7,45 ± 0,34	14,08 ± 1,22	1,16 ± 0,09	20,37 ± 1,28	2,64 ± 0,11
Облучение	12,05 ± 0,19*	32,30 ± 0,31*	4,60 ± 0,12*	19,02 ± 1,31	3,09 ± 0,49
Облучение с ауто-трансплантацией	5,05 ± 0,36**	7,03 ± 0,24**	1,63 ± 0,21**	30,42 ± 1,48**	22,09 ± 0,09**
Кожа					
Контроль	0,00	0,00	0,27 ± 0,09	6,38 ± 0,47	1,38 ± 0,07
Облучение	66,30 ± 3,99*	20,48 ± 1,37*	120,00 ± 3,50*	14,02 ± 0,31*	10,68 ± 0,05*
Облучение с ауто-трансплантацией	15,41 ± 1,71**	8,22 ± 1,04**	4,53 ± 0,21**	11,08 ± 0,11**	12,27 ± 0,14**

* Достоверно ($p \leq 0,01$) по сравнению с контрольной группой.

** Достоверно ($p \leq 0,01$) по сравнению с контрольной группой и группой животных, облученных без ауто-трансплантации.

дили аутофибробласты, практически нормализуются и воспалительные процессы, о чем свидетельствует приближение концентраций про- и противовоспалительных интерлейкинов к значениям, характерным для необлученных животных I группы (см. табл. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о реальной возможности на ранних этапах тормозить развитие лучевых ожогов кожи объемной аутотрансплантацией фибробластов.

1. Tenenhaus M., Rennekampff H. O. Burn surgery. Clinics in Plastic // Surgery. – 2007. – **34**, Is. 4. – P. 697–715.
2. Keira S. M. Experimental model for fibroblast culture. [Электронный ресурс]. Режим доступа до протоколу: www.scielo.br/pdf/acb/v19s1/v19s1a03.pdf.
3. Звягинцева Т. В. Моделивання місцевих променевих пошкоджень шкіри // Фізіол. журн. – 1998. – **44**. – С. 106–112.
4. Протокол обробки сполучної тканини в парафінових зрізах для фарбування за Ван-Гізоном. [Електронний ресурс]. Режим доступу до протоколу: http://www.histomix.ru/product_5.html.
5. Протокол обробки сполучної тканини в парафінових зрізах для фарбування кислих глікозаміногліканів алціановим синім. [Електронний ресурс]. Режим доступу до протоколу: http://www.histomix.ru/product_4.html.
6. Гістохімічна ідентифікація вуглеводів. Протокол ШИК-реакції. [Електронний ресурс]. Режим доступу до протоколу: http://www.histopathology.narod.ru/documents/gistohimija_uglevodov.html.

7. *Протокол* обробки сполучної тканини в парафінових зрізах гематоксиліном і еозином. [Електронний ресурс]. Режим доступу до протоколу: http://www.histomix.ru/product_17.html.
8. *Glantz S. A.* Primer of Biostatistics. – 4th ed. – New York: McGraw-Hill, 2007. – P. 298.

Харьковский национальный университет
им. В. Н. Каразина

Поступило в редакцию 27.06.2012

Ю. Г. Кот, К. В. Кот, Є. Е. Перський, Г. В. Полікарпова, Л. В. Алтухова

Гальмування розвитку локального променевого опіку об'ємною аутотрансплантацією фібробластів

Вивчено можливість гальмування розвитку локального рентгенівського опіку 3-го ступеня об'ємною аутотрансплантацією фібробластів. Показано, що у морських свинок глибоке введення в зону опіку аутофібробластів через 1 год, а потім кожні 24 год після опромінення протягом 21 доби істотно зменшує розміри ушкодження, знижує ступінь запальних процесів, гальмує деструкцію сполучнотканинного матриксу і утворення променевої виразки.

Yu. G. Kot, K. V. Kot, Ye. E. Persky, A. V. Polikarpova, L. V. Altuhova

Inhibition of local radiation burn development by volume fibroblast autotransplantation

The possibility of the local third degree X-ray burn inhibition by volume autotransplantation of fibroblasts is studied. It is shown that, in guinea pigs, a deep injection of autofibroblasts into a zone of burn in 1 hour and then every 24 hours after the irradiation during 21 days significantly decreases the size of damage, reduces inflammatory processes, and inhibits the destruction of a connective tissue matrix and the formation of radiation ulcers.