

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭПИТЕЛИЗАЦИИ РАН У КРЫС ПО ИЗМЕНЕНИЮ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В РАНЕВОМ ЭКССУДАТЕ

© М. В. Протасов,¹ Л. В. Смагина,² Н. М. Юдинцева,² О. В. Галибин,¹
Г. П. Пинаев,² И. В. Воронкина²

¹Научно-исследовательский центр Санкт-Петербургского государственного медицинского университета
им. акад. И. П. Павлова

и ²Отдел клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург;
e-mail: protasovm@mail.ru

В экспериментах на крысах изучали приживление кожного лоскута, вносимого в рану в качестве источника эпителизации, в сочетании с пересадкой дермального эквивалента. Течение раневого процесса оценивали по изменению активности матриксных металлопротеиназ (ММП) в раневом экссудате. Показали, что результат пересадки кожного лоскута можно спрогнозировать по уровню активности ММП-2 и ММП-9 раневого экссудата. Установили, что приживление кожного лоскута происходит при средних значениях активности ММП-2 и ММП-9 раневого экссудата, а низкие и высокие значения их активности соответствуют лизису пересаженного кожного лоскута.

Ключевые слова: ММП-2, ММП-9, раневой экссудат, эпителизация, дермальный эквивалент, модель раны.

Принятые сокращения: ДЭ — дермальный эквивалент, ММП — матриксная металлопротеиназа.

Использование биотехнологических методов восстановления кожного покрова с целью лечения ран у человека (Sabolinski et al., 1996; Falanga, Sabolinski, 1999; Muhart et al., 1999; Шумаков и др., 2002; Расулов и др., 2003; Mirastschijski et al., 2004; Marston et al., 2005) требует новых способов мониторинга раневого процесса (Jones, Nelson, 2000). Одним из них может быть оценка активности матриксных металлопротеиназ (ММП) раневого экссудата (Wysocki et al., 1993, 1999; Bullen et al., 1995; Tarlton et al., 1997; Agren, 1999; Mirastschijski et al., 2002; Воронкина и др., 2003; Протасов, 2007). ММП — класс ферментов, ответственных за ремоделирование внеклеточного матрикса в течение раневого процесса.

Цель настоящей работы — изучить возможность использования мониторинга активности ММП-2 и ММП-9 для прогнозирования приживления расщепленного кожного лоскута, вносимого в рану в качестве источника эпителизации. Для этого нами выбрана модель раны, предложенная Горелик (1996), с помощью которой на крысах мы изучали трансплантацию расщепленного кожного лоскута и ее сочетание с пересадкой дермального эквивалента (ДЭ). Кожный лоскут являлся источником эпителизации в ране.

Материал и методика

Эксперимент проводили на 30 самцах белых беспородных крыс массой 200—250 г, разделенных на 3 группы. В 1-й группе ($n = 10$) на 9-е сут после моделирования

неэпителизируемой раны (Горелик, 1996) выполняли трансплантацию кожного лоскута; во 2-й группе ($n = 10$) — трансплантацию кожного лоскута на 9-е сут и ДЭ на 12-е сут после создания модели; в 3-й группе выполняли трансплантацию ДЭ на 6-е сут и кожного лоскута на 9-е сут эксперимента. Срок наблюдения во всех группах составлял 24 сут.

Моделирование неэпителизируемой раны у крыс. В асептических условиях под наркозом в паравертебральной области формировали дефект кожи, подкожной клетчатки, поверхностной и собственной фасций диаметром 13 мм. Края кожи выворачивали и подшивали к краю силиконового кольца. Поверх раны укладывали марлевый шарик и фиксировали завязыванием свободных концов лигатур, фиксирующих силиконовое кольцо (Горелик, 1996) (рис. 1).

Трансплантация кожного лоскута. В 1, 2 и 3-й группах на 9-е сут от момента формирования раны производили трансплантацию свободного кожного лоскута диаметром 2 мм и толщиной 0.3 мм. Донорским местом для взятия кожного лоскута служила кожа спины с противоположной стороны от раны.

Трансплантация дермального эквивалента. С целью стимуляции раневого процесса во 2-й и 3-й группах трансплантацию кожного лоскута дополняли трансплантацией ДЭ, представляющего собой культуру дермальных фибробластов, заключенных в гель из коллагена I типа. Во 2-й группе пересадку ДЭ выполняли на 12-е, в 3-й — на 6-е сут эксперимента.

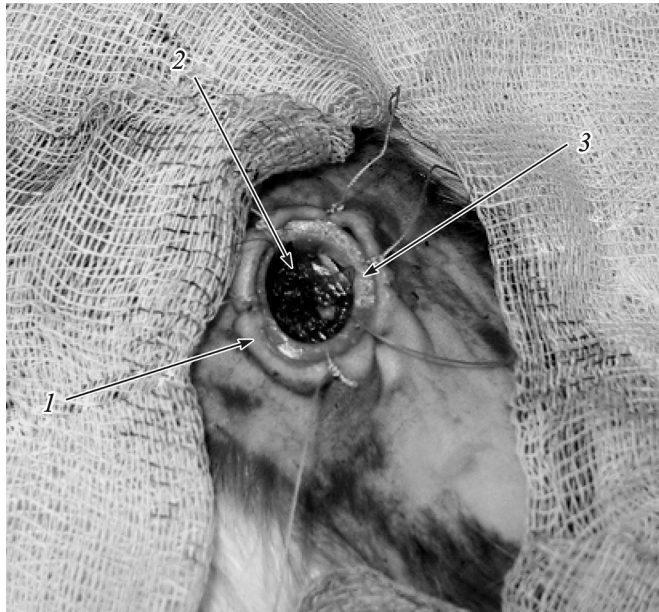


Рис. 1. Неэпителизируемая рана у крысы.

1 — край раны, 2 — дно раны, 3 — кольцо из силикона.

Перевязки животных, сбор раневого экссудата и выведение их из опыта. Во всех группах в асептических условиях под наркозом каждые 3 сут (на 3, 6, 9, 12, 15, 18 и 21-е сут эксперимента) осуществляли перевязки. Сбор раневого экссудата с целью последующего его анализа на активность ММП осуществляли при каждой перевязке, перед трансплантацией кожного лоскута, ДЭ и перед выведением животных из опыта. Для этого круг из стерильной бумаги диаметром 13 мм, предварительно смоченный в 0.9%-ном растворе NaCl, помещали на поверхность раны на 5 мин, после чего собранный на него раневой экссудат переносили в пробирку с 0.9%-ным раствором NaCl.

На 24-е сут после моделирования раны животных всех групп выводили из опыта летальными дозами CO₂. Ткани из дна раны фиксировали в 10%-ном растворе формалина для последующего морфологического изучения.

Морфологические исследования. Из тканей раны по стандартной методике готовили микропрепараты с окраской гематоксилином и эозином. С помощью световой микроскопии оценивали приживление кожного лоскута.

Оценка протеолитической активности раневого экссудата крыс. ММП в пробах раневого экссудата обнаруживали с помощью зимографии. Пробы готовили, смешивая образцы с буфером по Лэммли (Laemmli, 1970). Гель для проведения электрофореза (10%-ный акриламид) полимеризовали вместе с раствором желатина (1 мг/мл). Пробы наносили на гель в количестве, соответствующем 20 мкг белка на дорожку. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым. Присутствие ММП-2 и ММП-9 определяли по наличию неокрашенных полос на геле (Oliver et al., 1999). Для проведения количественного анализа содержания ММП-2 и ММП-9 высушенные гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программ QuantiScan. Количество белка в пробе определяли по Брэдфорд (Bradford, 1976).

Результаты и обсуждение

Для изучения результатов совместной пересадки кожного лоскута и ДЭ и активности ММП при их применении нами выбрана модель неэпителизируемой раны (Горелик, 1996). Предварительное изучение гистологических изменений тканей раны (Протасов, 2007) показало, что гистологическая картина раны через 3 сут соответствовала переходу фазы воспаления в фазу пролиферации, на что указывало появление в ране элементов грануляционной ткани. Более поздние сроки, на которых изучали гистологические изменения тканей раны (6, 9 и 24-е сут), соответствуют описанной ранее фазе пролиферации (Серов, Шехтер, 1981; Кузин, Костюченко, 1990). Грануляционная ткань, имеющая полнослойную структуру, формировалась к 9-м сут. На более позднем сроке (24-е сут) строение грануляционной ткани дна раны характеризовалось преобладанием фиброзного слоя. Это придает ей сходство с патоморфологической картиной длительно незаживающих ран и трофических язв у человека (Кузин, Костюченко, 1990; Васютков, Проценко, 1993).

В наших экспериментах пересадка кожного лоскута осуществлялась во всех группах на зрелую грануляционную ткань на 9-е сут после моделирования раны. Выбранные нами малые размеры пересаженного кожного лоскута (диаметр 2 мм) создавали неблагоприятные условия для его приживления, что и обуславливало наблюдавшиеся у части животных случаи лизиса пересаженного кожного лоскута.

В 1-й группе, в которой выполнили пересадку только кожного лоскута на 9-е сут, лизис его наблюдался в 4 случаях из 10. Во 2-й группе, в которой пересадка ДЭ на 12-е сут следовала за пересадкой кожного лоскута на 9-е сут, случаев лизиса не наблюдали. Это свидетельствует о способности ДЭ, пересаженного после внесения в рану источника эпителизации, улучшать результаты последней. В то же время в 3-й группе, где пересадка ДЭ на 6-е сут предшествовала пересадке кожного лоскута на 9-е сут, лизис лоскута наблюдали чаще, чем в 1-й группе (6 случаев из 10). Таким образом, эти наблюдения позволяют предположить, что при подобном варианте внесения источника эпителизации в рану ее заживление будет происходить лучше в случае пересадки ДЭ после кожного лоскута. Полученные данные имеют прикладное значение для медицины, так как происходящие в моделированной нами ране процессы имитируют процессы, происходящие в ране при сочетании пересадки ДЭ и свободного кожного лоскута.

В литературе можно найти данные о динамике ММП в раневом экссудате в процессе заживления ран разного происхождения (Wysocki et al., 1993, 1999; Bullen et al., 1995; Tarlton et al., 1997; Agren, 1999; Mirastschijski et al., 2002; Воронкина и др., 2003), но нет сведений о возможности прогнозирования результатов лечения ран исходя из уровня активности ММП в раневом экссудате.

Активность ММП-2 в раневом экссудате на протяжении эксперимента снижается (рис. 2, а), что, на наш взгляд, обусловлено замедлением процессов миграции клеток в ране по мере завершения процесса формирования и перестройки грануляционной ткани. Активность ММП-9 сохраняется практически на одном и том же уровне (рис. 2, б). Это, на наш взгляд, обусловлено тем, что вне зависимости от результатов пересадки кожного лоскута полного заживления раны к концу эксперимента не происходило, в результате чего поддерживался и вос-

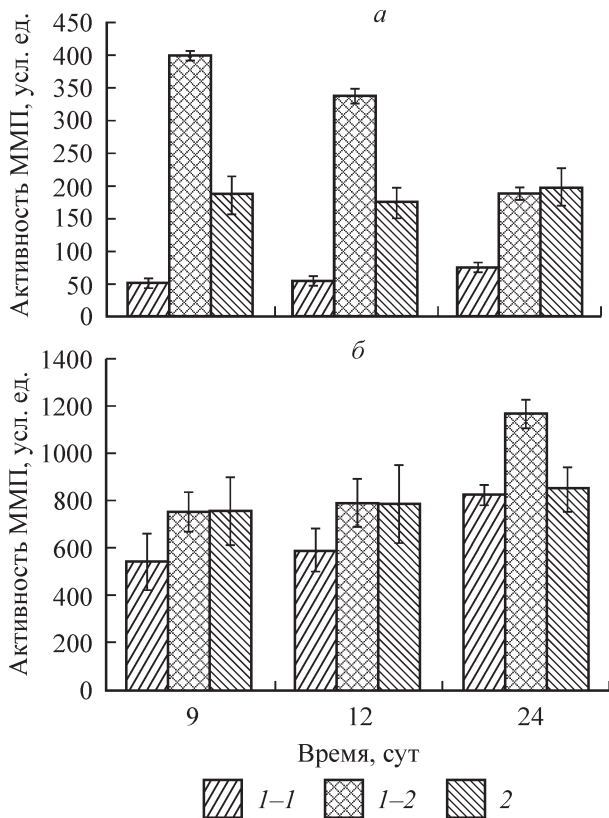


Рис. 2. Изменение активности ММП-2 (а) и ММП-9 (б) на 9—24-е сут после моделирования раны у крыс.

1-1 и 1-2 — кожный лоскут лизировался, 2 — кожный лоскут прижился.

палительный процесс (как составная часть раневого), что и обуславливало сохранение активности ММП-9 раневого экссудата.

Нами впервые сопоставлены результаты мониторинга активности ММП-2 и ММП-9 с результатами пересадки кожного лоскута. Приведенные нами значения активности ММП выражены в условных единицах, зависящих от методики. Однако наличие достоверных различий ($p < 0.05$) активности ММП при различном течении эпителизации ран позволяет предположить наличие закономерностей.

Мы обнаружили взаимосвязь уровня активности ММП-2 в раневом экссудате с результатами пересадки кожного лоскута (рис. 2, а). Оказалось, что при уровне активности ММП-2 в раневом экссудате, равном 186.7 ± 91.2 в момент пересадки кожного лоскута и 174.7 ± 72.6 через 3 сут после его пересадки, лизиса не происходит. А при повышенных значениях активности ММП-2 (399.2 ± 25.5) в момент пересадки кожного лоскута и через 3 сут после пересадки (337.3 ± 34.6) наблюдается его лизис. Лизис кожного лоскута также возникает у крыс в случаях более низких значений ММП-2 по сравнению с крысами, у которых кожный лоскут прижился. У этой части животных активность ММП-2 в раневом экссудате составляла 50.8 ± 25.1 в момент пересадки кожного лоскута и 54.8 ± 24.1 через 3 сут. Промежуточные значения активности ММП-2 соответствовали случаям, когда пересаженный кожный лоскут приживался, но его размеры к концу эксперимента (24-е сут) были меньше исходного.

Сведения о роли ММП-2 в процессах приживления кожного лоскута отсутствуют, но можно предположить,

что эта протеиназа, как и другие ММП, необходима для перестройки внеклеточного матрикса в зоне интеграции пересаженного кожного лоскута и дна раны. При этом избыточная активность ММП-2 не позволяет прижиться пересаженному кожному лоскуту и способствует его лизису, в то время как низкая активность может свидетельствовать о недостаточной миграции клеток, что препятствует связи пересаженного кожного лоскута с тканями дна раны.

Активность ММП-9 непосредственно перед пересадкой кожного лоскута и после нее также может служить для прогнозирования его приживления (рис. 2, б). Уровень активности ММП-9 в раневом экссудате крыс с прижившимся кожным лоскутом был выше, чем у крыс, у которых произошел лизис пересаженного кожного лоскута. Так, на 9-е сут эксперимента перед пересадкой кожного лоскута активность ММП-9 у крыс, у которых он потом прижился, составляла 750.9 ± 290.7 , на 12-е сут эксперимента — 786.4 ± 302.5 . У крыс, у которых кожный лоскут впоследствии лизировался, активность ММП-9 на 9-е сут составляла 542.3 ± 374.1 , на 12-е сут — 585.0 ± 259.4 , различие было статистически достоверным ($p = 0.021$ и $p = 0.000004$ соответственно) и сохранялось до конца срока наблюдения (24-е сут). Промежуточные значения активности ММП-9 соответствовали случаям, когда пересаженный кожный лоскут приживался, но его размеры к концу эксперимента были меньше исходного.

ММП-9 продуцируется нейтрофилами и кератиноцитами в процессе их миграции (Schaffer, Nanney, 1996). Ранее нами была показана связь между активностью ММП-9 и количеством нейтрофилов в тканях раны (Протасов, 2007; Протасов и др., 2008). Более высокая активность ММП-9 на 9-е сут у крыс с прижившимся кожным лоскутом свидетельствует об активной санации дна раны нейтрофилами до его пересадки. После пересадки кожного лоскута более высокая активность ММП-9 может быть обусловлена гибелью и резорбцией нейтрофилами небольшой части кожного лоскута, вследствие того что он до приживления к грануляционной ткани лишен кровоснабжения, а также появлением в ране кератиноцитов, продуцирующих ММП-9 в процессе миграции. Дальнейшая повышенная активность ММП-9 у крыс с прижившимся кожным лоскутом может быть обусловлена процессами перестройки тканей кожного лоскута и дна раны в месте их интеграции, так как в этом процессе принимают участие нейтрофилы, а также продукция ММП-9 кератиноцитами пересаженного кожного лоскута в процессе их миграции.

Таким образом, на основании представленных данных можно заключить, что пересадка ДЭ способна улучшать результаты приживления внесенного в рану источника эпителизации. Мониторинг активности ММП-2 и ММП-9 раневого экссудата позволяет прогнозировать результат заживления длительно существующей раны при внесении в нее источника эпителизации.

Список литературы

- Васютков В. Я., Проценко Н. В. 1993. Трофические язвы стопы и голени. М.: Медицина. 159 с.
- Воронкина И. В. 2003. Модуляция функциональной активности клеток и белков внеклеточного матрикса в процессе регенерации тканей под действием матриксных металлопротеиназ: Автореф. канд. дис. СПб. 28 с.
- Воронкина И. В., Кокорин К. В., Чуликов О. В., Парамонов Б. А., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2003. Матриксные метал-

лопротеиназы ММП-2 и ММП-9 раневых и ожоговых экссудатов и их действие на белки внеклеточного матрикса. Цитология. 45 (1) : 43—50.

Горелик Ю. В. 1996. Влияние элементов внеклеточного матрикса на функциональную активность эпидермальных кератиноцитов в культуре и при заживлении кожных ран: Автореф. канд. дис. СПб. 26 с.

Кузин М. И., Костюченко Б. М. (ред.). 1990. Раны и раневая инфекция: Руководство для врачей. М.: Медицина. 591 с.

Протасов М. В. 2007. Экспериментальное обоснование применения дермального эквивалента в лечении ран: Автореф. канд. дис. СПб. 20 с.

Протасов М. В., Смагина Л. В., Галибин О. В., Пинаев Г. П., Воронкина И. В. 2008. Зависимость активности ММП в раневом экссудате крыс от состояния тканей раны на начальных этапах раневого процесса. Цитология. 50 (10) : 884—888.

Расулов М. Ф., Онищенко Н. А., Крашенинников М. Е., Зайденов В. А., Зорин В. Л., Богатырев С. Л. 2003. Фибробластоподобные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга подобно эмбриональным фибробластам стимулируют заживление поверхностных ожоговых ран. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 3 : 46—49.

Серов В. В., Шехтер А. Б. 1981. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина. 312 с.

Шумаков В. И., Расулов М. Ф., Крашенинников М. Е., Зайденов В. А., Онищенко Н. А. 2002. Сравнительная оценка эффективности применения аллогенных эмбриональных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для терапии глубоких ожоговых ран. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 4 : 7—11.

Agren M. S. 1999. MMP are required for re-epithelisation of cutaneous wounds. Arch. Derm. Res. 291 : 583—590.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.

Bullen E. C., Longaker M. T., Updike D. L., Benton R., Ladin D., Hou Z., Howard E. W. 1995. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. J. Invest. Dermatol. 104 : 236—240.

Falanga V., Sabolinski M. 1999. A bilayered living skin construct (APLIGRAF) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers. Wound Rep. Regen. 7 : 201—207.

Jones J. E., Nelson E. A. 2000. Skin grafting for venous leg ulcers. Cochrane Database Syst. Rev. 2 : CD001737.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—683.

Marston W. A., Usala A., Hill R. S., Mendes R., Minsley M.-A. 2005. Initial report of the use of an injectable porcine collagen-derived matrix to stimulate healing of diabetic foot wounds in humans. Wound Rep. Regen. 13 : 243—247.

Mirastschijski U., Impola U., Jahkola T., Karlsmark T., Agren M. S., Saarialho-Kere U. 2002. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. Human Pathol. 33 : 355—364.

Mirastschijski U., Konrad D., Lundberg E., Lyngstadaas S. P., Jorgensen L. N., Agren M. S. 2004. Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound healing. Wound Rep. Regen. 12 : 100—108.

Muhart M., McFalls S., Kirsner R. S., Elgart G. W., Kerdel F., Sabolinski M. L., Hardin-Young J., Eaglstein W. H. 1999. Behavior of tissue-engineered skin: a comparison of a living skin equivalent, autograft, and occlusive dressing in human donor sites. Arch. Dermatol. 135 : 913—918.

Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. 1999. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. In: Handbook of proteolytic enzymes. San Diego: Acad. Press. 61—76.

Sabolinski M. L., Alvarez O., Auletta M., Mulder G., Parenteau N. L. 1996. Cultured skin as a «smart material» for healing wounds: experience in venous ulcers. Biomaterials. 17 : 311—320.

Schaffer C. J., Nanney L. B. 1996. Cell biology of wound healing. Int. Rev. Cytol. 169 : 151—181.

Tarlton J. F., Vickery C. J., Leafert D. J., Bailey A. J. 1997. Postsurgical wound progression monitored by temporal changes in the expression of matrix metalloproteinase-9. Br. J. Dermatol. 157 : 506—516.

Wysocki A. B., Kusakabe A. O., Chang S., Tuan T. L. 1999. Temporal expression of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and gelatinase-B in chronic wound fluid switches from a chronic to acute wound profile with progression to healing. Wound Rep. Regen. 7 : 154—165.

Wysocki A. B., Staiano-Coico L., Grinnell F. 1993. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. J. Invest. Dermatol. 101 : 64—68.

Поступила 29 X 2008

POSSIBILITY OF PREDICTION OF RAT WOUND EPITHELIZATION BY CHANGES OF MATRIX METALLOPROTEINASES LEVELS IN WOUND FLUID

M. V. Protasov,¹ L. V. Smagina,² K. M. Yudinseva,² O. V. Galibin,¹ G. P. Pinaev,² I. V. Voronkina²

¹Scientific Research Center, I. P. Pavlov St. Petersburg State Medical University and ²Institute of Cytology RAS, St. Petersburg

The engraftment of a skin sheet together with transplantation of dermal equivalent was studied on rats. The skin sheet was taken as a source of epithelization material in unhealing wound. The process of wound healing was evaluated by changes of matrix metalloproteinases (MMP) activity levels in wound fluid. It was shown that results of skin sheet transplantation could be predicted by monitoring of wound fluid MMP-2 and MMP-9 activity levels. It was determined that skin sheet engraftment appeared at medium values of wound fluid MMP-2 and MMP-9, and transplanted skin sheet was lysed at high and low values.