

На правах рукописи

ГРАНИНА
Галина Борисовна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ
ХИРУРГИЧЕСКОЙ РАНЫ ПУТЕМ СНИЖЕНИЯ
АКТИВНОСТИ МИТОГЕН-АКТИВИРУЕМОЙ
ПРОТЕИНКИНАЗЫ ГРУППЫ JNK
(экспериментальное исследование)**

14.01.17 – хирургия
14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Иркутск – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Зеленин Вадим Николаевич

доктор медицинских наук

Шурыгина Ирина Александровна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Апарцин Константин Анатольевич

(заведующий научным отделом клинической хирургии ФГБУ НЦРВХ СО РАМН)

доктор медицинских наук,
профессор

Семинский Игорь Жанович

(заведующий кафедрой патологии с курсами клинической иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России)

Ведущее учреждение:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита состоится « ____ » _____ 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета ДМ 208.032.01 при ГОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития РФ.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Желтовский Юрий Всеволодович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Проблема оптимизации заживления хирургических ран не теряет актуальности в связи с отсутствием способов целенаправленного управления процессами регенерации. Ежегодно во всех странах мира оперируются миллионы больных. Так, по данным ФГУ «ЦНИИОИЗ Минздравсоцразвития РФ» за 2009 г. выполнено операций на брюшной полости – 1 261 205, операций на женских половых органах – 1 531 033, акушерских операций – 1 814 386. Часто послеоперационный период осложняется нарушением регенерации в области хирургической раны. Кроме увеличения сроков заживления это приводит и к развитию ряда осложнений [van Ramshorst G.H. et al., 2009].

Одним из частных осложнений в послеоперационном периоде, связанным с проблемами заживления послеоперационной раны, является расхождение краев раны. По данным М.К. Cigdem et al. (2006), расхождение краев раны составляет от 0,2 до 1,2 % от всех осложнений в раннем послеоперационном периоде. Причины данного осложнения разнообразны. Кроме проблем, связанных с инфицированием раны, либо хирургическими погрешностями (прорезывание швов – 29 %, инфекция – 13 %, сочетание инфекции и прорезывание швов – 5 %, а также такие дефекты хирургической техники, как некачественно наложенные швы – 10 %, слабо завязанный узел – 5 %), в 48 % случаев явную причину расхождения швов установить не удается [van Ramshorst G.H. et al., 2009], что позволяет предположить нарушение эндогенных механизмов заживления раны. Известно, что при таких заболеваниях, как сахарный диабет, атеросклероз, ожирение хирургическая рана может заживать значительно хуже, чем обычно [Mathiue D. et al., 2006; Woo K et al., 2007; Galkowska H. et al., 2006; Wilson J.A., Clark J.J., 2004]. Однако до сих пор точные причины этого остаются неизвестными.

Открытие MAP-киназ (митоген-активируемых протеинкиназ) как универсальных каскадных механизмов, участвующих в реализации всех этапов раневого процесса, позволило выдвинуть гипотезу о возможности влияния на процесс заживления хирургической раны путем изменения активности JNK MAP-киназы – одного из ключевых звеньев в процессах клеточной дифференцировки, воспаления и апоптоза [Oltmanns U. et al., 2003].

Цель исследования

Изучить возможность управления процессом заживления хирургической раны путем снижения активности митоген-активируемой протеинкиназы группы JNK.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. На модели кожно-мышечной раны в условиях эксперимента изучить активность MAPK каскадов в динамике репаративного процесса.
2. Исследовать закономерности процесса заживления хирургической раны при искусственном снижении активности JNK MAPK.
3. Изучить экспрессию маркеров дифференцировки клеток фибробластического ряда при асептических хирургических кожно-мышечных ранах в условиях искусственного снижения активности JNK MAPK.
4. Разработать способ управления динамикой заживления хирургической раны посредством изменения активности JNK MAPK.

Научная новизна

1. Установлена роль JNK MAP-киназного каскада в репаративном процессе при асептических хирургических кожно-мышечных ранах.
2. Доказано, что применение блокатора JNK MAP-киназного каскада в значительной степени модифицирует воспалительный процесс, влияя на различные его фазы.
3. Установлено, что применение блокатора JNK MAP-киназного каскада в ранние сроки раневого процесса существенно влияет на характеристики формирующегося соединительнотканного рубца.
4. Определено, что введение блокатора JNK MAP-киназного каскада приводит к значительному удлинению экспрессии маркеров клеточной активности p38, c-Fos и c-Jun в условиях моделирования кожно-мышечной раны по сравнению с естественным течением раневого процесса, значительно увеличивает привлечение в очаг воспаления прогениторных клеток фибробластического ряда.
5. Доказана принципиальная возможность применение блокатора JNK MAP-киназного каскада для ускорения заживления хирургических ран.

Теоретическая и практическая значимость

Исследовано влияние блокатора JNK MAP-киназ на формирование соединительной ткани при раневом процессе, что позволяет на этой основе разрабатывать новые способы коррекции недостаточности формирования послеоперационных рубцов.

Доказана принципиальная возможность целенаправленного изменения характеристик формирующегося рубца в области хирургической раны.

На экспериментальной модели продемонстрировано ускорение заживления кожных послеоперационных ран и раннее формирование рубцов с хорошими прочностными характеристиками при отсутствии ухудшения эстетических параметров.

Разработан оригинальный способ местной доставки лекарственного средства при однократном применении.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Применение блокатора JNK MAPK изменяет характеристики формирующегося послеоперационного рубца, повышает его прочность, сокращает сроки заживления раны.

2. Локальное применение блокатора JNK MAPK повышает функциональную активность фибробластов, а также привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону формирования послеоперационного рубца,

3. Разработанный способ локального изменения активности JNK MAPK позволяет оптимизировать процесс заживления операционной раны при однократном применении действующего вещества.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на: 77-й итоговой научно-практической студенческой конференции СНО им. И.И. Мечникова «Вопросы экспериментальной и клинической медицины» (Иркутск, 2010), OzBio2010 Combined Conference (Melbourne, Australia, 2010), 68-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», посвященной 75-летию ВолГМУ (Волгоград, 2010), Международной конференции и Международной школе молодых ученых «Проблемы экологии: Чтения памяти профессора Михаила Михайловича Кожова» (Иркутск, 2010), научно-практической конференции молодых ученых НЦРВХ СО РАМН (Иркутск, 2010), конференции «Генетическая и регенеративная медицина: проблемы и перспективы» (Киев, 2010), 78-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых СНО им. И.И. Мечникова (Иркутск, 2011), Asian Congress on Biotechnology (Shanghai, China, 2011), конференции молодых ученых ВСНЦ СО РАМН (Иркутск, 2011), юбилейной конференции НЦРВХ СО РАМН (Иркутск, 2011).

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 110 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей использованные в работе материалы и методы, главы собственных наблюдений, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список использованных источников включает 195 работ отечественных и зарубежных авторов.

По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 4 – в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований и 3 – в материалах международных конференций.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ГК П803 «Изучение роли молекулярных тар-киназных механизмов в регуляции роста соединительной ткани» в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (директор – член-корр. РАМН проф. Е.Г. Григорьев). Вся работа с экспериментальными животными проводилась на базе отдела экспериментальной хирургии с виварием (зав. отделом – д.б.н. С.А. Лепехова). Виварий имеет ветеринарное удостоверение 238 № 0000023.

1. Моделирование линейной кожно-мышечной раны

Линейную кожно-мышечную рану моделировали с использованием самцов крыс линии Wistar весом 220–250 г в возрасте 9 мес. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986) и требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к Приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755) согласно протоколу, одобренному Комитетом по биомедицинской этике НЦРВХ СО РАМН (протокол № 4 от 07.09.09 г.).

Крыс оперировали в стерильных условиях операционной под кетаминovým наркозом (кетамин 50 мг/кг, дроперидол 2,5 мг/кг и атропин 0,4 мг/кг), вводимым внутривенно. Глубину наркоза контролировали по глубине дыхания, степени расслабленности мышц, диаметру зрачка, роговичному рефлексу. Животных фиксировали. В области грудной клетки паравертебрально выбривали участок шерсти, обрабатывали кожу раствором антисептика, а затем наносили рану кожи и подкожной клетчатки длиной 5 см. Скальпелем вскрывали собственную фасцию на всем протяжении раны и в продольном направлении раздвигали мышечные волокна длиной мышцы спины для формирования вместилища в мышце. После остановки кровотечения в рану вводили перфорированную пластину с нанесенным исследуемым веществом с медленной резорбцией активного ингредиента, изготовленную по разработанной нами методике. Контрольной группе животных вводили пластину без активного вещества. Для зашивания раны на кожу нитью пролен 4/0 (Ethicon) накладывали пять швов с пошаговым интервалом 1 см, без захвата подлежащих тканей. Через 7 суток швы снимали.

Исследование проведено у 2-х групп животных по 30 животных в группе:

1) контрольная (нанесение раны, наблюдение за заживлением раны, изучение активности MAP-киназных каскадов);

2) изучение воздействия блокатора JNK MAP-киназы SP 600125 (Tocris bioscience, кат. № 1496 Bath № 7 A/B 1710) на формирование соединительной ткани (нанесение раны, введение в рану блокатора JNK-MAP-киназного каскада в дозе на 1 животное 10,4 мкг, наблюдение за заживлением раны, изучение активности MAP-киназных каскадов).

3 интактных животных служили в качестве контроля специфичности иммуногистохимических и иммунофлюоресцентных исследований.

Выведение животных из эксперимента проводили в сроки от 2 часов до 30 суток (2 ч, 6 ч, 12 ч, 1, 3, 7, 14 и 30 суток) передозировкой раствора тиопентала натрия внутривенно.

2. Изготовление лекарственной пленки пролонгированного действия

Изготовлена лекарственная пленка следующего состава, масс. части:

30% водный раствор желатина	30
5% водный раствор метилцеллюлозы	30
30% водный раствор агар-агара	5
Глицерин	2,5
Раствор лекарственного средства	2,5
40% этанол	30

При приготовлении лекарственных пленок для животных основной группы добавляли действующее вещество SP 600125. Расчет дозы препарата проводили на основании IC_{50} [Cheng Y., Prusoff W.H. 1973]. Для SP 600125 $IC_{50} = 40-90$ нМ для JNK1, 2 и 3, при этом он незначительно влияет на ERK2, p38 β ($IC_{50} > 10$ мМ) [Bennett B.L. et al., 2001; Bain J. et al., 2003; Wang Y. et al., 2007]. В качестве растворителя действующего вещества использовали 40° этиловый спирт.

При приготовлении пленок для животных контрольной группы в состав пленки вместо раствора лекарственного средства вносили эквивалентное количество 40° этилового спирта.

Готовили пленки размером 30×5 мм с отверстиями диаметром 1 мм с шагом перфорации 3 мм.

3. Определение механических характеристик сформированного рубца на модели кожно-мышечной раны

Участок кожно-мышечной раны шириной 1 см, взятый перпендикулярно линии смоделированного повреждения и включающий в себя по 1 см ткани с каждой стороны формирующегося рубца, исследовали методом тензиометрии. Измеряли длину, ширину и толщину образца. К образцу ткани, содержащей элемент формируемого рубца, прикладывали силу в направлении, перпендикулярном линии раны. Измеряли удлинение в ответ на прилагаемую силу. Вычисляли относительное удлинение – отношение увеличения длины при приложении силы к начальной длине образца. Кроме этого фиксировали значение приложенной силы, при которой достигался разрыв образца. Нагрузку повышали дискретно с 50 до 1000 г с шагом 50 г. Определяли относительное удлинение и предел прочности в направлении, перпендикулярном линии раны, точку перехода упругой деформации в пластическую, в зоне упругой

деформации рассчитывали модуль упругости Юнга. Исследование проведено на 7-е, 14-е и 30-е сутки.

4. Морфологические исследования

Фиксацию материала проводили в растворе FineFix (Milestone, Италия). После фиксации осуществляли проводку и заливку в парафиновые блоки, изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм.

Исследование проводили методом световой микроскопии на микроскопе Nikon 80i (Япония) с использованием окрасок гематоксилин-эозином и по методу Ван-Гизона на выявление коллагеновых волокон [Волкова О.В., Елецкий Ю.К., 1982; Bancroft J.D., Gamble M., 2008]. Проводилось фотографирование объектов. Оценивали сроки появления и выраженность воспалительной реакции. Оценку проводили полуколичественным методом. Работа проведена в лаборатории патоморфологии НЦРВХ СО РАМН (зав. лабораторией – к.м.н. О.А. Гольдберг).

5. Морфометрические исследования

Морфометрию проводили с использованием программы ImageJ Национального института здоровья (США) с набором модулей для медицинской морфометрии от Wayne Rasband и Tony Collins. Применяли планиметрический метод в модификации с использованием подсчета элементов на 1 микрофотографии поля зрения при увеличении 600[×].

Для оценки степени развития грубоволокнистой соединительной ткани на микрофотографиях срезов с окраской по методу Ван Гизон измеряли соотношение площади среза, занимаемой волокнами коллагена, к общей площади ткани [Шурыгин М.Г. и др., 2006].

6. Иммуногистохимические исследования

Проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов.

В качестве первичных антител применяли антитела к компонентам MAPK-киназных каскадов p38 и JNK, а также маркеры, позволяющие оценить активность клеток фибробластического ряда:

1) p38 MAPK Rabbit Monoclonal Antibody (Epitomics, Clone 1D : Y 122, Cat. N 1544-1, Lot YE-02-12-11C), рабочее разведение 1:200;

2) c-Jun (N-term) Rabbit Monoclonal Antibody (Epitomics, Clone 1D : E 254, Cat. N 1254-1, Lot YF 042201-r), рабочее разведение 1:200;

3) c-Fos Antibody Rabbit Polyclonal (Abbiotec, Cat. N 250601, Lot 10011801), рабочее разведение 1:300;

4) Actin (Pan) Rabbit Monoclonal Antibody (Epitomics, Cat. N 1844-1, Lot D 091805), рабочее разведение 1:200;

5) антитела к коллагену I типа Col 1A1 (D-13) goat polyclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-25974, Lot # BO310), рабочее разведение 1:300;

6) антитела к CD34 (ICO 115) mouse monoclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-7324, Lot # CO909), рабочее разведение 1:300.

7. Иммунофлюоресцентные исследования

Проводили иммунофлюоресцентное окрашивание срезов. В качестве первых первичных антител использовали:

1) антитела к CD34 (ICO 115) mouse monoclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-7324, Lot # C 0909), рабочее разведение 1:300;

2) антитела к MMP9 rabbit monoclonal antibody IgG (Epitomics, Clone 1D : EP1254, Cat. N 2551-1, Lot YG 113001P), рабочее разведение 1:200.

3) антитела к CD45 (OX 30) mouse monoclonal IgG 2a (Santa Cruz, Cat. N Sc-53047, Lot #B 2409), рабочее разведение 1:300;

4) антитела к Endoglin (M-20) goat polyclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-19793, Lot # I 0908), рабочее разведение 1:300.

В качестве вторичных антител применяли:

1) Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-11029, Lot 898236), рабочее разведение 1:300;

2) Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N 11034, Lot 870976), рабочее разведение 1:300;

3) Alexa fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-11031, Lot 822389), рабочее разведение 1:300;

4) Alexa fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-1105 Lot 870969), рабочее разведение 1:300.

Докрашивали ядра Dapi (Biotium, Cat. N 40011, Lot 8D 0605), рабочее разведение 1:50, инкубировали 10 минут. Заклучали в Fluoromount (Diagnostic Biosystems, REF K024, Lot P 939-B).

Визуализацию специфического свечения флюорохромных меток проводили на исследовательском микроскопе Nikon Eclipse 80i с приставкой для эпифлюоресценции DИH-M. В качестве фильтров для выделения требуемых диапазонов флюоресценции использовались Nikon DAPI (возбуждение 325–375 нм, дихроичное зеркало 400 LP, эмиссия 435–485 нм), Nikon B-2A (возбуждение 450–490 нм, дихроичное зеркало 505 LP, эмиссия \geq 515 нм), Nikon TRITC (возбуждение 528–553 нм, дихроичное зеркало 565 LP, эмиссия 590–650 нм). В качестве регистратора использовали камеру Nikon DS-Fi1c, подключенную к контроллеру Nikon DS-U2, с использованием программного обеспечения Nikon Elements. Сведение каналов выполняли в программе ImageJ (NIH, USA) с использованием плагина Stacks – Multi-D.

8. Электронно-микроскопические исследования

Кусочки соединительной ткани, размером 1×1 мм, фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,4) в течение 2 часов, дофиксировали в 1% растворе OsO₄ в течение 1 часа, обезвоживали в

спиртах возрастающей концентрации и заливали в Embed 812 [Миронов А.А., и др., 1994]. Для электронной микроскопии изготавливали ультратонкие срезы на ультратоме «LKB Bromma» (Sweden) и контрастировали их в растворах уранилацетата и цитрата свинца по 20 минут. Срезы исследовали при помощи электронного микроскопа «ТЕМ-410», проводили фотографирование образцов. Работа проведена в лаборатории патоморфологии НЦРВХ СО РАМН (зав. лабораторией – к.м.н. О.А. Гольдберг).

9. Методы статистического анализа

В работе применялись следующие статистические методы – дисперсионный анализ (ANOVA); для оценки значимости различий в попарно сравниваемых группах использовали критерий Манна – Уитни; при оценке механических свойств использовался метод множественных сравнений Шеффе [Гланц С., 1999; Glantz S.A., Slinker B.K., 2000].

При проведении всех видов статистического анализа критический уровень значимости критериев принимался равным 0,05. Анализ данных проводили с использованием статистического пакета г-проект.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Особенности заживления кожно-мышечной раны в условиях локального подавления активности JNK MAP-киназ

Проведено изучение влияния блокатора JNK MAPK SP 600125 на процесс заживления хирургической раны. Выявлено, что у контрольной группы животных процесс формирования соединительнотканного рубца на месте кожно-мышечной раны соответствовал канонам развития воспалительного ответа в условиях асептической раны. Уже через 2 часа после нанесения раны наблюдался выраженный отек дермы и подкожной клетчатки, наблюдалась начальная нейтрофильная инфильтрация в зоне повреждения. К 12 часам выраженность отека и инфильтрации нарастали, достигая максимума за весь период наблюдения. К 1-м суткам после начала эксперимента выраженность отека и нейтрофильной инфильтрации несколько снижались. С 3-х суток закономерно начиналось образование молодой грануляционной ткани. Зона разрастания молодой соединительной ткани и плотность клеточных элементов фибробластического ряда нарастала к 7-м суткам эксперимента. К 14-м суткам наблюдалась полная эпителизация раны, и начиналось созревание вновь образованной соединительной ткани. К 30-м суткам плотность клеточных элементов фибробластического ряда в области раны снижалась. Формировался широкий, хорошо выраженный рубец.

Иная картина отмечена у животных, которым вводился блокатор JNK MAP-киназы SP 600125. Через 2 часа после начала эксперимента отмечено начало

нейтрофильной инфильтрации. К 12 часам выраженность нейтрофильной инфильтрации нарастала, но при этом отек практически отсутствовал. Максимальной выраженности нейтрофильная инфильтрация зоны повреждения достигала к 1-м суткам после нанесения раны. Уже к 3-м суткам эксперимента у данной группы животных наблюдалось выраженное разрастание молодой соединительной ткани в зоне повреждения. К 7-м суткам формировался хорошо выраженный соединительнотканый рубец. В дальнейшем наблюдалось созревание соединительнотканного рубца.

При этом ширина сформированного рубца в конце срока наблюдения (на 30-е сутки) не отличалась от данного показателя в группе контроля (JNK – 573,67 [311,10–1450,84] мкм, контрольная группа – 763,47 [334,1–1285,31] мкм, $Z = 0,166$; $p = 0,869$).

При электронно-микроскопическом исследовании выявлено, что при введении блокатора JNK фибробласты в зоне формирования соединительно-тканного рубца с 3-х по 14-е сутки имели морфологические признаки очень высокой активности, что выражалось в формировании крупного ядра с большим количеством крупных ядрышек, выраженной складчатости ядерной мембраны, а также в хорошо развитой эндоплазматической сети, наличии крупных рибосом, полисом. Высокая функциональная активность фибробластов сопровождалась формированием в их окружении плотно упакованных коллагеновых волокон.

2. Влияние сниженной активности JNK MAPK на синтез коллагена при заживлении кожно-мышечной раны

При исследовании возможности управления процессами образования соединительной ткани важно не только изучение влияния на динамику клеточных популяций в зоне образования соединительной ткани, но и на функциональную активность фибробластов. Поскольку основным продуктом синтетической активности фибробластов является коллаген, определяющий механическую прочность сформированной соединительной ткани, то именно его относительный объем в формирующемся на месте повреждения рубце мы выбрали как индикаторный показатель.

При исследовании выявлено, что в контрольной группе животных концентрация коллагена в зоне формирования рубца повышалась с 3-х суток, закономерно достигая максимума к 30-м суткам наблюдения (медиана 73,54 %, 25–75 % квартили [66,87–78,01] %). Относительный объем коллагеновых волокон в зоне интактной дермы достоверно не изменялся за период наблюдения. В дерме, расположенной вблизи раны, наблюдалось достоверное повышение этого показателя к 14-м суткам наблюдения ($p = 0,029$).

При применении ингибитора JNK MAP-киназы SP 600125 значительно повышалась интенсивность коллагенообразования в области раны. Так, уже на 3-и сутки раневого процесса количество коллагена в 4 раза превышало со-

ответствующий показатель в группе контроля (медиана 44,44 [23,26–70,30] и 11,57 [8,53–27,85] соответственно, $z = 4,00$, $p = 0,00063$).

Сходные различия наблюдались в течение всего периода дальнейшего наблюдения (табл. 1). Различия были достоверны в сроки 3, 7, 14 и 30 суток.

Таблица 1

Количество коллагена в зоне формирующегося рубца при подавлении активности JNK MAP-киназы

Срок	Контрольная группа			Введение SP 600125			z	p
	Me	25 % кв.	75 % кв.	Me	25 % кв.	75 % кв.		
3-и сут.	11,57	8,53	27,85	44,44	23,26	70,30	4,00	0,0006
7-е сут.	25,21	15,61	36,92	46,74	36,34	57,65	3,18	0,0015
14-е сут.	55,41	41,10	74,38	77,01	69,00	81,22	3,31	0,0009
30-е сут.	73,54	66,87	78,01	78,14	72,77	81,14	2,29	0,0219

В то же время применение SP 600125 значимо не влияло на относительный объем коллагена ни в интактной дерме, ни в зоне, расположенной вблизи раны.

Таким образом, локальное подавление активности JNK MAP-киназы избирательным ингибитором SP 600125 существенно влияет на морфологические характеристики формирующегося рубца в области кожно-мышечной раны, приводя к достоверно более раннему и более выраженному синтезу коллагена в зоне формирующегося рубца, что может значительно повышать прочность и сокращать сроки формирования рубца при хирургических ранах.

3. Механическая прочность рубцовой ткани в условиях подавления активности JNK MAP-киназы при заживлении кожно-мышечной раны

Нами изучено вязко-упругое поведение исследуемых образцов. Для каждого образца строили график отношения «нагрузка – относительное удлинение».

Выявлено, что точка перехода упругой деформации в пластическую в ранние сроки раневого процесса (7-е сут.) значительно снижается в обеих исследуемых группах по сравнению с интактной кожей (рис. 1). В дальнейшем наблюдается постепенное повышение этого показателя. В группе с введением блокатора JNK достоверные различия с группой контроля выявлены на 14-е и 30-е сутки – 7714 [7463–8000] кПа в группе JNK и 4201 [3953–4831] кПа в группе контроля на 14-е сутки ($p = 0,006$), соответственно на 30-е сутки – 11531 [10874–12283] и 5709 [5328–5844] кПа ($p = 0,002$). Интересно, что в группе JNK на 30-е сутки модуль упругости значимо не отличался от показателя интактной кожи – 9881 [8454–10753] кПа для интактной кожи и 11531 [10874–12283] кПа для группы JNK ($p = 0,057$).

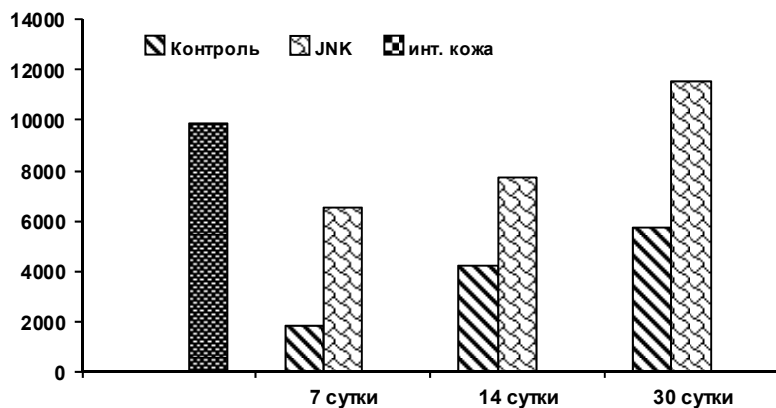


Рис. 1. Точка перехода упругой деформации в пластическую, кПа.

В зоне упругой деформации рассчитывали модуль упругости Юнга – коэффициент, характеризующий сопротивление материала растяжению/сжатию при упругой деформации.

Модуль упругости у исследуемых образцов в ранние сроки раневого процесса был значительно ниже, чем у интактной кожи. В последующие сроки применение блокатора JNK MAP-киназы приводило к более значительному росту этого показателя, чем в группе контроля. При применении блокатора JNK достоверные различия с группой контроля отмечены уже на 14-е сутки (1723 [1619–2348] и 961 [928–965] кПа соответственно ($p = 0,011$)). К 30-м суткам модуль упругости рубцовой ткани в группе JNK еще более возрастал (3056 [2034–3495] по сравнению с контролем – 1177 [935–1210] кПа ($p = 0,003$)), более того – превышал показатель интактной кожи (2380 [2301–3066] кПа) (рис. 2).

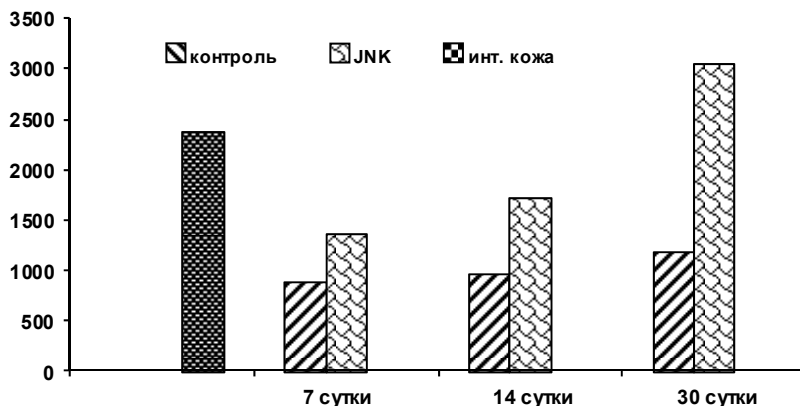


Рис. 2. Модуль упругости образцов, кПа.

Разрушающая нагрузка, измеренная как отношение силы, приведшей к разрушению образца, к площади поперечного сечения образца, для интактной кожи превышала 12000 кПа. Эта величина закономерно была значительно снижена у экспериментальных образцов в ранние сроки раневого процесса и постепенно повышалась по мере созревания формирующегося рубца. Введение блокатора JNK MAPK приводило к повышению этого показателя по сравнению с контролем. После применения блокатора JNK достоверность различий по сравнению с контролем достигнута уже на 14-е сутки – в контроле разрушающая нагрузка составила 4726 [4611–5435] кПа, а при применении блокатора JNK – 8265 [7960–9140] кПа ($p = 0,006$). К 30-м суткам прочность образца в группе JNK не отличалась от показателей интактной кожи – 11531 [10874–11974] в группе JNK и 12096 [11995–12528] кПа для интактной кожи ($p > 0,05$) (рис. 3).

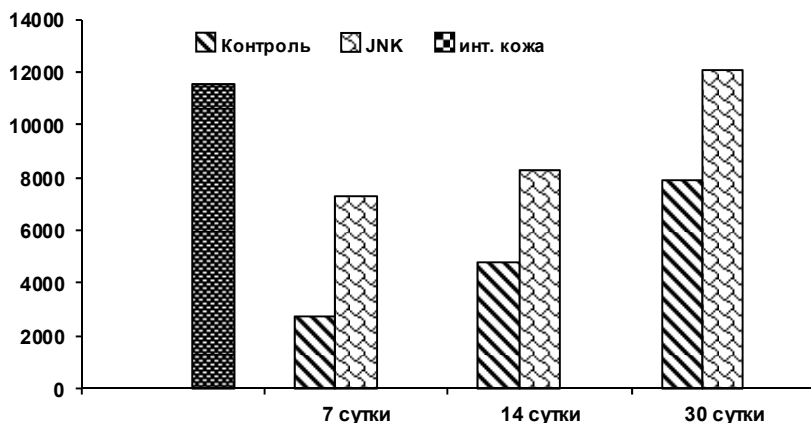


Рис. 3. Предел прочности образцов, кПа.

Таким образом, применение блокатора JNK MAPK приводит к значительному изменению механических характеристик формирующегося рубца при кожно-мышечной ране. Локальное введение блокатора JNK позволяет к 30-м суткам раневого процесса добиться формирования рубца, при котором механические свойства кожи в области раны (модуль упругости, разрушающая нагрузка и точка перехода упругой деформации в пластическую) приближаются к показателям интактной кожи.

Улучшение механических характеристик формирующегося рубца может быть полезно при хирургической ране в плане раннего достижения высоких прочностных характеристик в зоне послеоперационного рубца.

4. Экспрессия активности MAP-киназ при локальном введении блокатора JNK MAP-киназных путей

Для установления механизмов действия блокатора JNK MAPK нами изучена экспрессия активности MAP-киназных каскадов при заживлении кожно-мышечной раны. Использованы маркеры p38 MAPK, c-Jun (N-term) и c-Fos. Поскольку экспрессия данных маркеров тесно связана с функциональной активностью клеток, логично ожидать изменение экспрессии при изменении функциональной активности фибробластов под действием блокатора MAP-киназных каскадов.

У контрольной группы животных специфическое окрашивание в области формирования соединительной ткани отмечено только на 3-и сутки. При этом отмечено синхронное увеличение экспрессии как p38, так и c-Fos и c-Jun.

После введения блокатора JNK отмечена ранняя активация MAP-киназных каскадов. Так, слабая специфическая окраска при исследовании всех трех маркеров (как p38, так и c-Fos и c-Jun) отмечена уже через 6 часов после начала эксперимента. Через 12 часов зона окраски значительно увеличивалась, выраженность окраски – умеренная, такая же картина отмечалась и через 24 часа после начала эксперимента. Через 3 суток выраженность экспрессии этих белков достигала максимума, отмечена яркая окраска клеток в зоне формирования молодой соединительной ткани при окраске на p38, умеренная – при окраске на c-Fos и относительно более слабая – на c-Jun. На 7-е сутки интенсивность экспрессии изучаемых маркеров снижалась, однако даже в этот срок регистрировалась окраска единичных фибробластов в зоне рубца (табл. 2).

Таблица 2

Сроки выявления экспрессии маркеров клеточной активности в зоне формирования соединительной ткани при кожно-мышечной ране у исследуемых групп

Маркер	Срок	Группа	
		Контроль (n = 30)	Введение блокатора JNK (n = 30)
c-Jun	начало	3-и сутки	6 часов
	окончание	3-и сутки	7 суток
p38	начало	3-и сутки	6 часов
	окончание	3-и сутки	7 суток
c-Fos	начало	3-и сутки	6 часов
	окончание	3-и сутки	7 суток

У интактных животных активация MAP-киназных каскадов не регистрировалась.

Таким образом, введение блокаторов MAP-киназного каскада привело к изменению сроков появления и длительности экспрессии маркеров клеточной активности в условиях моделирования кожно-мышечной раны

При этом применение блокатора JNK MAP-киназных путей приводило к ранней экспрессии маркеров клеточной активности и к значительному удлинению сроков экспрессии p38, c-Fos и c-Jun. Обращает на себя внимание и четкая параллельность экспрессии c-Fos и c-Jun, что объясняется участием данных веществ в одном MAP-кинажном каскаде. Дисбаланс между относительно более слабой экспрессией c-Fos и c-Jun в сравнении с наблюдаемой для p38 может объяснить повышенную активность фибробластов в зоне хирургической раны за счет активации альтернативного p38 MAPK каскада у основной группы животных.

5. Экспрессия маркеров дифференцировки фибробластов при локальном введении блокатора JNK-MAP-киназных путей

Для оценки влияния ингибиторов JNK MAP-киназ на дифференцировку клеток фибробластического ряда в области кожно-мышечной раны нами изучена экспрессия маркеров клеток костномозгового происхождения (CD45), маркеров лейкоцитарных клеток (CD34), проколлагена I типа (ColIAI), актина.

Выявлено, что у контрольной группы животных фибробласты в области формирования рубца интенсивно экспрессировали CD34 на 3-и сутки раневого процесса, на 7-е сутки отмечено слабое окрашивание небольшого числа клеток в области раны. В другие сроки специфическое окрашивание не регистрировалось. Коэкспрессия CD34+CD45+, отражающая наличие в очаге прогениторных клеток фибробластического ряда, в контрольной группе зарегистрирована только на 7-е сутки на единичных клетках.

В то же время применение блокатора JNK резко увеличивало количество CD34+ клеток в области раны. CD34+ клетки отмечены в ране с 12 часов до 7-х суток раневого процесса. На 3-и сутки после моделирования кожно-мышечной раны у животных этой группы регистрировалось появление множества прогениторных клеток в зоне регенерации, однако на более поздних сроках наблюдения прогениторные клетки в зоне регенерации не выявлялись.

Для оценки наличия миофибробластов в зоне формирования соединительной ткани применялось окрашивание на актин, позволяющее дифференцировать данную популяцию фибробластов на препарате [Powell D.W., 2000]. Обнаружено, что у контрольной группы животных окрашивалось небольшое число клеток на 3-и и 7-е сутки раневого процесса. При введении блокатора JNK наблюдалось окрашивание гладкомышечного актина в единичных фибробластах с 12 часов раневого процесса, в дальнейшем их количество в сроки 1–3 суток быстро нарастало, причем на 3-и и 7-е сутки актин-позитивные клетки

становились преобладающей популяцией. Это свидетельствует о присутствии в области раны высокого числа миофибробластов, обладающих высокой потенциальной способностью к синтезу коллагена. Отсутствие миофибробластов в ране в более поздние сроки раневого процесса отражает завершение стадии активной пролиферации и отсутствие потенциала для формирования келлоидных рубцов [Wynn T.A., 2007; Hinz B., 2010].

При окраске на Col IAI, позволяющий выявить проколлаген I типа в фибробластах, зафиксированы лишь единичные положительно окрашенные клетки в области формирования рубца на 3-и и 7-е сутки в контрольной группе, в то время как при применении блокатора JNK окраска на проколлаген зафиксирована с 3-х по 14-е сутки, что подтверждает повышенную синтетическую активность фибробластов у этой группы животных.

Благодаря проведенному исследованию показано, что применение блокатора JNK MAPK значительно изменяет процесс заживления хирургической раны, стимулирует раннее образование, повышает интенсивность формирования и ускоряет созревание соединительной ткани в месте повреждения.

Достигнутые результаты позволяют оценить блокатор JNK MAP-киназного каскада SP 600125 как перспективное средство для управления процессом заживления хирургической раны.

Например, применение блокатора JNK в составе хирургических нитей может открыть совершенно новые перспективы для создания шовного материала и различного вида сеток нового поколения. Также очевидно, что усиление прочности рубца может обеспечить более быстрое выздоровление пациентов и сокращение сроков госпитализации и нетрудоспособности.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при блокаде JNK MAP-киназных путей в операционной ране наблюдается ранняя и длительная экспрессия маркеров клеточной активности (с 6 часов до 7 суток) и дисбаланс в экспрессии конечных элементов MAP-киназных каскадов – выраженная экспрессия для p38 при умеренной – c-Fos и c-Jun, в то время как без введения блокатора JNK наблюдается синхронная экспрессия p38, c-Fos и c-Jun, причем высокая активность отмечается только на 3-и сутки.

2. Доказано, что применение блокатора JNK MAP-киназных каскадов в ранние сроки раневого процесса существенно влияет на характеристики формирующегося соединительнотканного рубца, повышает количество коллагена в рубце (различия достоверны по сравнению с контролем с 3-х по 30-е сутки наблюдения), а также достоверно позволяет достичь высоких показателей механической прочности в области послеоперационного рубца.

3. Установлено, что применение блокатора JNK MAPK приводит к раннему заживлению операционной раны и формированию рубца с высокими механиче-

скими характеристиками за счет привлечение в очаг воспаления прогениторных клеток фибробластического ряда, повышения активности миофибробластов в ране и удлинения сроков экспрессии проколлагена 1A1.

4. Разработан оригинальный способ локального применения в операционной ране блокатора JNK MAP-киназы SP 600125, позволяющий при однократном применении ускорить формирование высокопрочного послеоперационного рубца.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный оригинальный способ локального применения в операционной ране блокатора JNK MAP-киназы SP 600125, позволяющий при однократном применении модифицировать процесс заживления хирургической раны, рекомендован для проведения доклинических и клинических испытаний для дальнейшего широкого клинического применения.

2. Перспективно применение блокатора JNK MAP-киназы SP 600125 для нанесения на шовный материал, дренажи и другие имплантируемые медицинские изделия.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста // Сиб. мед. журн. – 2009. – № 6. – С. 36–40.

2. Зеленин Н.В., Гранина Г.Б., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Механическая прочность рубцовой ткани в условиях подавления активности p38 MAP-киназы // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 5 (75). – С. 175–176.

3. Гранина Г.Б., Зеленин Н.В., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. и др. Подавление активности JNK MAPK в регуляции синтеза коллагена при раневом процессе // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 5 (75). – С. 172–174.

4. Зеленин В.Н., Гранина Г.Б., Шурыгин Д.М. Течение раневого процесса в условиях подавления активности p38 MAP-киназы // Вопросы экспериментальной и клинической медицины: мат. 77-й итоговой науч.-практ. студенч. конф. СНО им. И.И. Мечникова. – Иркутск, 2010. – С. 27.

5. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Granina G.B. et al. Influence of p38 MAPK inhibitor on inflammation after surgical wound // OzBio2010 Combined Conference. – Melbourne, 2010. – P. 230.

6. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б. и др. MAP-киназы как регуляторы роста соединительной ткани // Матер. междуна. конф. и междуна. школы молодых ученых «Проблемы экологии» Чтения памяти профессора М.М. Кожова. – Иркутск, 2010. – С. 348.

7. Зеленин Н.В., Гранина Г.Б., Шурыгин Д.М. Заживление хирургической раны в условиях подавления активности p38 MAP-киназного каскада // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: мат. 68-й открытой науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов с междуна. участием, посвящ. 75-летию ВолГМУ. – Волгоград, 2010. – С. 105–106.

8. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Гранина Г.Б., Зеленин Н.В. Влияние блокаторов p38 и JNK MAP киназ на репаративный процесс и экспрессию гладкомышечного α актина в поперечно-полосатой мускулатуре при повреждении // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 4 (80). – Ч. 1. – С. 295–297.

9. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Granina G.B. Control on connective tissue formation by blocks of MAP-kinase mechanisms // Asian Congress on Biotechnology. – Shanghai, 2011. – P. 237.

Подписано в печать 13.02.2012. Бумага офсетная. Формат 60x84¹/₁₆.

Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 1,0

Тираж 100 экз. Заказ № 020-12.

РИО НЦРВХ СО РАМН

(Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел 29–03–37. E-mail: arleon58@gmail.com)