

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВВЕДЕНИЯ В КОЖУ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 И ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЕРЕД НАНЕСЕНИЕМ ХИМИЧЕСКОГО ОЖОГА

EFFECT OF INJECTION OF PEROXIREDOXIN 6 AND PARACRIN FACTORS OF MESENCHYMAL STEM CELLS BEFORE CHEMICAL BURN

A. Potapova

Summary. The efficacy of introducing peroxiredoxin 6 and the culture medium of the paracrine factors of mesenchymal stem cells into the skin before the application of a chemical burn with trichloroacetic acid was evaluated. The evaluation was performed by visual and histological methods on rats of the Wistar line. The use of peroxiredoxin 6 and paracrine factors of mesenchymal stem cells had a beneficial effect on the regeneration of the epithelium after chemical burns.

Keywords: chemical burn, trichloroacetic acid, peroxiredoxin 6, paracrine factors of mesenchymal stem cells.

Потапова Ангелина Владимировна

Аспирант, Тульский Государственный Университет;
Институт биофизики клетки РАН (Пушино)
angelina_bio@mail.ru

Аннотация. В данной работе оценивалась эффективность введения в кожу пероксиредоксина 6 и культуральной среды паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток перед нанесением химического ожога трихлоруксусной кислотой. Оценка производилась визуальным и гистологическим методами на крысах линии Wistar. Применение пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток благотворно повлияло на регенерацию эпителия после химического ожога.

Ключевые слова: химический ожог, трихлоруксусная кислота, пероксиредоксин 6, паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток.

Введение

Химоксфолиация (химический пилинг) имеет практическое применение не только в области косметологии, но и перспективен в терапии новообразований кожи[1,2]. Данный метод отвечает современным тенденциям индустрии красоты, которые проявляются в стремлении к снижению инвазивности процедуры.

Химический пилинг — это химический ожог определенных слоев эпидермиса и/или дермы, интенсивность которого зависит от природы кислоты, ее абсорбционной способности и электрохимических характеристик раствора[3]. В эпидермисе развивается воспалительная реакция, а также стимулируются защитные и восстановительные реакции. На первом этапе происходит деструкция, затем начинается процесс заживления и регенерации тканей[4,5].

В современной косметологии наиболее часто для срединного и глубокого пилинга трихлоруксусная кислота[6–8]. Трихлоруксусная кислота (ТХУ) относится

к карбоксикислотам. Ее химическая структура аналогична структуре молекулы ацетиловой кислоты, в которой 3 атома водорода (не принадлежащие функциональной карбоксильной группе) замещены тремя атомами хлора. Именно эти атомы хлора обеспечивают легкое высвобождение протона (сильные кислотные свойства) и глубокую пенетрацию кислоты через липидные и протеиновые структуры кожи[9].

В косметологии остро стоит проблема уменьшения срока регенерации эпителия после химического пилинга. Для этого прибегают к различным процедурам, которые проводят как после нанесения ожога, так и до него. Одной из такой процедур являются инъекции препаратов для регенерации в кожу, инъекции делаются перед процедурой химического пилинга.

Поскольку химический ожог сопровождается мощным окислительным стрессом, развитием воспалительного процесса, интенсивным некрозом и апоптозом клеток кожи. Чтобы уменьшить масштаб всех этих процессов необходимо активировать защитную систему организма. В коже антиоксидантная система представлена

набором ферментов-антиоксидантов, основным из которых является пероксиредоксин 6 (Prx6). Ранее была показана высокая эффективность применения Prx6 при лечении ряда патологий (ожоги трахеи, резаные раны, ишемически/реперфузионные поражения почки и кишечника, повреждения кожи после УФ-облучения) [10–13]. Паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток (МСК) обладают прогенераторным, противовоспалительным и антиапоптотическим действием [14,15]. Таким образом, оптимальными условиями восстановления эпидермиса кожи после химического ожога являются: нейтрализация окислительного стресса и интенсификация процессов регенерации в эпидермисе.

В данной работе оценивалась эффективность введения в кожу Prx6 и культуральной среды паракринных факторов МСК перед нанесением химического ожога ТХУ.

Материалы и методы

Исследование заключалось в изучении процессов репарации на модельной ожоговой ране животных. Химический ожог моделировали на самцах популяции Wistar массой 200–250 г, возрастом 6–10 недель, полученных из вивария ИБК РАН г. Пущино. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей» и законодательством Российской Федерации.

Протокол эксперимента включал введение животного в длительный наркоз смесью растворов 0,5 мл 3,5% Золетила® 100 (Zoletil® 100, «Virbac Sante Animale», Франция) и 0,1 мл Рометара (Rometar, «Bioveta», Чехия), доведенных до 2 мл изотоническим раствором натрия хлорида 0,9%, наркоз вводился внутривенно. В зависимости от цели проведения исследования: достижение косметического эффекта или медицинского, препараты вводились животным за 2 часа до нанесения ожога. После депиляции паравертебральной области спины, создавали контактный ожог пропитанной в 40% трихлоруксусной кислоте фильтровальной бумагой площадью 10×10 мм². Время экспозиции пропитанной бумаги составило 3 минуты, после чего место нанесения ожога промывалось проточной водой 15 секунд. Перед нанесением ожога за 2 часа в депилированную паравертебральную область спины были сделаны инъекции препаратов (300 мкл, 10 введений по 30 мкл), площадь обкалывания 15×15 мм².

В зависимости от вводимого препарата животные были разделены на 4 группы:

1 группа (контрольная) — физиологический раствор;

2 группа — пероксиредоксин-6 (2 мг/мл);

3 группа — кондиционированная среда МСК (раствор, 10 мг/мл);

4 группа — пероксиредоксин-6 (4 мг/мл, 150 мкл) + кондиционированная среда МСК (10 мг/мл, 150 мкл)

Оценку результатов проводили на основе динамического визуального и гистологического анализов состояния раневой поверхности. Контрольные точки анализа репарации: 1, 3, 7 суток с момента ожога.

Гистологический анализ

Срезы окрашивали гематоксилин-эозином (Hematoxylin-Eosin according to Ehrlich, «Fluka», USA), просветляли и заключали в смолу Histofluid («Marienfeld Laboratory Glassware», Germany), затем накрывали покровными стеклами («Menzel-Glaser», Germany).

Микроскопический анализ проводили на микроскопе Leica DM 6000, фотографии получали с помощью цифровой камеры для микроскопии Leica DFC490.

Статистический анализ

Статистику измеряли с помощью программы «Image Tool v. 3.0» («UTHSCSA», США). Вычислили среднюю арифметическую величину (M) и стандартное отклонение средней арифметической (m). Проверка достоверности различий была осуществлена по критерию Стьюдента (t). Математическая обработка морфометрических данных гистологических срезов проводили с использованием метода непараметрической статистики (Манна-Уитни тест).

Результаты и их обсуждение

Визуальная оценка состояния химического ожога у животного показала, что в 1-е и 3-е сутки воздействие препаратов на заживление ожоговой раны минимизировано. В первые сутки наблюдается отделение пораженного слоя эпидермиса, визуально ожог в течение 24 часов практически не изменяется. Так как ожог был сделан трихлоруксусной кислотой, которая на месте контакта с тканями вызывает денатурацию белков с развитием коагуляционного некроза и обезвоживания тканей, в третьи сутки, на месте ожога сформировался плотный, темный, поверхностный струп, при котором некроз не распространяется вглубь. Степень оволосения зависит от возраста экспериментальных животных. Так, у более молодых особей рост волос происходит намного быстрее, чем у более взрослых. К седьмым суткам в контрольной группе наблюдается частичное отшелушивание струпа, однако процесс регенерации протека-

Таблица 1. Морфометрическое исследование площади поражения ($M \pm m$, мм²)

Сутки после нанесения ожога	Контроль (физический раствор)	Prx 6	факторы МСК	Prx 6 + факторы МСК
3	93,4±4,0	94,2±3,9	96,8±4,1	95,1±2,5
4	91,6±4,7	88,2±3,2	89,3±2,8	90,7±3,7
5	74,8±6,5	56,2±5,2	53,4±3,6	54,6±5,8
6	62,0±8,9	35,8±5,9	33,5±5,1	32,1±6,7
7	48,8±10,6	12,6±7,1	13,8±5,9	11,3±7,5

* — достоверно по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

— достоверно по сравнению с группой 1, $p < 0,05$.

x — достоверно по сравнению с группой 3, $p < 0,05$.

‡ — достоверно по сравнению с группой 2; $p < 0,05$.

ет достаточно медленно. В группах с предварительных введением исследуемых препаратов наблюдается положительный результат. Так, по сравнению с контрольной группой в группах, где были сделаны инъекции Prx 6 и паракринных факторов МСК наблюдается полное очищение ожоговой раны от струпа.

Гистологическая оценка ожоговой раны в первые сутки показала, что во всех группах отмечается наличие некротизированных клеток эпителия, утративших свою жизнеспособность. Область локализации волосяных фолликулов сильнее, чем другие участки была подвержена воздействию ТХУ.

На третьи сутки в контрольной группе наблюдается наличие массивного струпа с лейкоцитарной инфильтрацией, чётко видна граница химического ожога и интактного эпидермиса. В верхнем слое дермы присутствует большое количество форменных элементов крови, а так же некроз тканей под струпом.

В группе с препаратом Prx 6 струп образован некротизированными клеточными элементами эпидермиса, отделение струпа от интактного эпидермиса неявное. Отмечается отсутствие лейкоцитарного вала.

В группе с применением паракринных факторов МСК наблюдается отделение струпа от интактного эпидермиса. На границе струпа и эпидермиса отмечается наличие лейкоцитов.

В группе с Prx 6 и паракринными факторами МСК наблюдается четкая граница между струпом и интактным эпидермисом. Клетки струпа некротизированны. Наблюдается образование новых клеток на поверхности эпидермиса.

На 7-е сутки во всех группах происходит регенерация эпидермиса. В контрольной группе эпидермис деформирован. Клетки базальной мембраны неравномерно распределены. При использовании Prx 6, паракринных факторов МСК и комплекса антиоксидант-паракринные факторы МСК струп отсутствует, деформации эпидермиса не наблюдается. Происходит процесс регенерации.

Заключение

Оценка эффективности введения пероксида водорода и паракринных факторов МСК перед нанесением химического ожога трихлоруксусной кислотой на процесс регенерации кожи показала, что в контрольной группе регенерация кожи происходит дольше, чем в группах с лечением. В группах с применением Prx 6 и паракринных факторов МСК благотворно повлияло на регенерацию эпителия по сравнению с контрольной группой.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда содействия инновациям (программа УМНИК, договор № 9843ГУ/2015)

ЛИТЕРАТУРА

1. Monheit GD. The Jessner's-trichloroacetic acid peel. An enhanced medium-depth chemical peel. *Dermatol Clin.* 1995;13:277–83.
2. Al-Waiz MM, Al-Sharqi AI. Medium-depth chemical peels in the treatment of acne scars in dark-skinned individuals. *Dermatol Surg.* 2002;28:383–7.
3. Monheit GD. The Jessner's-trichloroacetic acid peel. An enhanced medium-depth chemical peel. *Dermatol Clin.* 1995;13:277–83.
4. Baumann L, Saghari S. Chemical Peels. In: Baumann L, editor. *Cosmetic Dermatology*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002. pp. 148–60.
5. Rubin MG. 1st ed. Philadelphia, PA: JB. Lippincott Company; 1995. *Manual of Chemical Peels. Superficial and Medium Depth*; p. 111.
6. Monheit GD, Chastain MA. Chemical peels. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2001;9:239–55. VIII.

7. Landau M. Chemical peels. *Clin Dermatol*. 2008;26:200–8.
8. Bhardwaj D, Khunger N. An assessment of the efficacy and safety of CROSS Technique with 100% TCA in the management of ice pick acne scars. *J Cutan Aesthet Surg*. 2010;3:93–6.
9. Monheit GD. Medium-depth chemical peels. *Dermatol Clin*. 2001;19:413–25. VII.
10. Волкова А. Г., Шарапов М. Г., Равин В. К., Гордеева А. Е., Карадулева Е. А., Мубаракшина Э. К., Темнов А. А., Фесенко Е. Е., Новоселов В. И. Эффект различных ферментов-антиоксидантов на регенеративные процессы в эпителии трахеи после химического ожога. *Пульмонология*, 2014, 12 (2), с. 84–90
11. Гордеева А. Е., Шарапов М. Г., Новоселов В. И., Фесенко Е. Е., Темнов А. А., Хубутия М. Ш. Влияние пероксиредоксина VI на сохранение тонкой кишки при ишемии/реперфузии. 2014. *Трансплантология*, 8, № 4, с. 21–27
12. Kümin A, Huber C, Rüllicke T, Wolf E, Werner S. Peroxiredoxin 6 Is a Potent Cytoprotective Enzyme in the Epidermis. *The American Journal of Pathology*. 2006;169(4):1194–1205. doi:10.2353/ajpath.2006.060119.
13. Rolfs F, Schäfer M, Werner S. Peroxiredoxin 6 in skin carcinogenesis. *Oncoscience*. 2014;1(6):392–393.
14. Khubutiya T. S. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury / T. S. Khubutiya, A. V. Vagabov, A. A. Temnov // *Cytotherapy*. — 2014. — Vol. 5, № 16. — P. 579–585
15. Хубутия М. Ш., Вагабов В. А., Темнов А. А., Склифас А. Н. Паракринные механизмы противовоспалительного и органопротективного действия при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. 2012. *Трансплантология*, № 1–2, с. 20–32

© Потапова Ангелина Владимировна (angelina_bio@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Тульский Государственный Университет