

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *S. TYPHI* НА ЭПИТЕЛИЗАЦИЮ РАН КОЖИ И СЕКРЕЦИЮ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

Костарной А.В., Логунов Д.Ю., Верховская Л.В.,
Ганчева П.Г., Народицкий Б.С.

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Научно-Исследовательский Институт Эпидемиологии и Микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва

Резюме. Исследовано влияние местного нанесения бактериального липополисахарида, агониста Toll-подобного рецептора 4 на процесс эпителизации на модели резаных ран кожи у мышей. Показано, что местное применение липополисахарида ускоряет эпителизацию раневых дефектов, причем этот процесс ассоциирован с усилением секреции эпидермального фактора роста в области поврежденной кожи.

Ключевые слова: бактериальный липополисахарид, заживление ран, эпителизация, эпидермальный фактор роста.

Kostarnoy A.V., Logunov D.Yu., Verkhovskaya L.V., Gancheva P.G., Naroditsky B.S.

INFLUENCE OF *S. TYPHI* LIPOPOLISACCHARIDE UPON EPITHELIZATION OF SKIN WOUNDS AND EPIDERMAL GROWTH FACTOR SECRETION

Abstract. Influence of topical application of bacterial lipopolysaccharide (LPS), a Toll-like receptor 4 agonist, upon epithelization process was investigated, using a murine incisional skin wound model. It was shown that topical LPS application accelerates wound epithelization, and this process was associated with increased levels of epidermal growth factor secretion in wounded skin area. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 3, pp 223–226)

Keywords: bacterial lipopolysaccharide, wound healing, epithelization, epidermal growth factor.

Введение

Бактериальная контаминация, неизбежная для ран кожи, оказывает существенное влияние на процесс заживления. С одной стороны, раневая инфекция значительно замедляет процесс регенерации поврежденных тканей; с другой стороны, полагают, что умеренная контаминация раны бактериями способствует заживлению, увеличивая уровень инфильтрации иммунокомпетентных клеток в области ранения, способствуя синтезу коллагена и образованию грануляционной ткани [1]. Недавние исследования показали, что изолированные структурные компоненты микро-

организмов (MALP-2 и CpG олигонуклеотид), являющиеся лигандами рецепторов врожденного иммунитета TLR-2 и TLR-9 соответственно, при местном нанесении значительно ускоряют процесс ранозаживления [2, 3]. В исследовании Koff и соавт. [4] была показана способность бактериального липополисахарида, ЛПС (лиганда Toll-подобного рецептора 4, TLR-4), *in vitro* стимулировать миграцию эпителиальных клеток, причем этот процесс был опосредован активацией рецептора эпидермального фактора роста. **Цель настоящего исследования** — оценить *in vivo* влияние местного нанесения ЛПС на процесс эпителизации резаных ран кожи.

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на аутбредных мышах ICR, самцах массой 18–20 г, полученных из питомника «Столбовая» РАМН.

Адрес для переписки:

Костарной Алексей Викторович
Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел./факс: (499) 193-61-83.
E-mail: info@gamaleya.org

Бактериальный липополисахарид (ЛПС) был произведен и очищен в производственном филиале «Медгамал» ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (производитель — *Salmonella typhi*). Для местного нанесения на раневый дефект ЛПС был растворен в глицерогеле следующего состава (вес. %): 4% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Sigma-Aldrich), 10% глицерина (Sigma-Aldrich), вода очищенная, свободная от эндотоксинов, полученная на установке Milli-Q® Advantage A10® (Millipore). Концентрация ЛПС в основе, составляющая 10 мг/г, была выбрана в результате предварительных экспериментов. Плацебо (гель-носитель) было приготовлено аналогично, но без добавления ЛПС.

Животные были анестезированы (45 мг/кг золетила + 7,5 мг/кг ксилазина внутримышечно). После механической депиляции шерсти и обработки операционного поля 70% процентным этанолом была нанесена резаная рана в соответствии со стандартной методикой [5]. Кратко, на спине животных вдоль линии хребта при помощи скальпеля были иссечены эпидермис, дермис и подкожная клетчатка до фасции так, чтобы образовался разрез длиной 4 см. Разрез был зашит двумя швами для формирования трех раневых дефектов одинакового размера. После операции животные были размещены в клетках индивидуально. Животные были разбиты на 2 группы: контрольная группа — местное нанесение плацебо, экспериментальная группа — местное нанесение геля ЛПС. Терапия начата в первый постоперационный день. Терапия заключалась в ежедневном местном нанесении на область раны по 150 мкл соответствующего препарата. По пять животных из каждой группы были выведены из эксперимента на 7-й, 14-й, 21-й день после первого нанесения препаратов. Для эвтаназии использовалась ингаляция диоксидом углерода. Отобранные полоски кожи 1 × 2 см, содержащие раневый дефект, были зафиксированы в 10% формалине, приготовленном на изотоническом фосфатном буфере, рН = 7,2, заключены в парафин и использовались для гистологических исследований. Срезы были окрашены гематоксилином и эозином. Все слайды были проанализированы профессиональным гистологом. Оценивались эпидермальные изменения: толщина эпидермиса, акантоз, эрозия.

Вдополнительной серии экспериментов биоптаты кожи, содержащие раневый дефект, были отобраны в следующие временные точки после первого нанесения препаратов: часы 4-й, 10-й, 24-й, дни 3-й, 7-й, 10-й. В каждую временную точку из эксперимента было выведено по пять животных из каждой группы. Биоптаты были помещены в буфер для экстракции T-PER® (Pierce, США), с добавлением смеси ингибиторов проте-

аз (Roche, Германия). Приблизительно 0,75 мл буфера было использовано на 35 мг ткани. Образцы были гомогенизированы на установке FastPrep 24 (MP Biomedicals, США) и центрифугированы при 12000 об/мин при 4 °C в течение 12 мин. Содержание белка в пробах было измерено по методу Брэдфорд с использованием коммерческого набора (Силекс, Россия). В нормализованных по общему белку пробах было проведено измерение концентрации эпидермального фактора роста (EGF) методом ИФА с использованием набора (R&D Systems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Значимость отличий значений контрольной и экспериментальной групп была оценена с использованием дисперсионного анализа (ANOVA), различия считались значимыми при $p < 0,05$ (Statistica 6.0).

Результаты и обсуждение

В образцах, отобранных через неделю после первого нанесения препаратов, в экспериментальной группе наблюдалась полная эпителизация раневого дефекта акантотически утолщенным эпидермисом, в то время как в группе плацебо присутствовали язвенные дефекты эпидермиса с дном, образованным некротическим детритом, отграниченным от окружающей ткани лейкоцитарным валом. К концу второй недели эксперимента в экспериментальной группе количество слоев эпидермиса составляло 2-3 слоя, тогда как в группе плацебо отмечалось наличие акантотически утолщенного эпидермиса. К концу третьей недели количество слоев эпидермиса во всех группах составляло 2-3 слоя, что соответствовало толщине эпидермиса интактных животных (рис. 1). Таким образом, наличие в области раневого дефекта бактериального липополисахарида способствует раннему завершению эпителизации.

Для того чтобы оценить, коррелирует ли динамика процесса эпителизации с секрецией эпидермального фактора роста, митогена и стимулятора миграции кератиноцитов, была определена концентрация эпидермального фактора роста в гомогенатах биоптатов раневых дефектов. В соответствии с полученными данными, представленными на рисунке 2, местное применение ЛПС способствовало усилению секреции EGF в зоне раневого дефекта. Статистически значимые отличия в концентрации EGF между контрольной и экспериментальной группами обнаружены на 8-й час, 7-й и 10-й дни эксперимента.

Известно, что система врожденного иммунитета играет важную роль в процессах регенерации ран, особенно значимую на воспалительном этапе раневого процесса. Рецепторы врожденного иммунного ответа экспрессируются широким

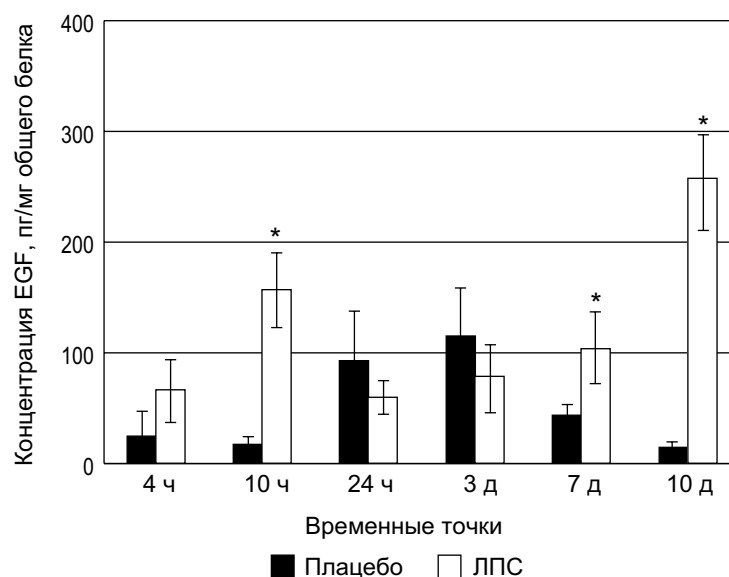


Рисунок 2. Кинетика секреции EGF в области раневого дефекта

Примечание. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * – $p < 0,05$. Временные точки представлены с момента первого нанесения препаратов.

спектром клеток, образующихся или присутствующих в коже, включая иммунокомпетентные клетки. В частности, рецептор TLR-4, лигандом которого является липополисахарид, экспрессируется кератиноцитами, эндотелиальными клетками, макрофагами, фибробластами, адипоцитами и др. [6]. Активация TLR рецепторов инициирует ряд биохимических каскадов, что приводит к увеличению секреции провоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов адгезии, протеолитических ферментов, – факторов, принимающих участие в процессе регенерации.

Так, была показана способность ЛПС индуцировать секрецию активных форм кислорода, активирующих TACE (tumor necrosis factor- α converting enzyme), при этом активная форма TACE обеспечивает шеддинг с поверхности клеток TGF- α , одного из лигандов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [7, 8]. Активация EGFR инициирует ряд каскадов передачи сигнала, в основном MAPK, Akt и JNK пути, что приводит к синтезу ДНК и пролиферации клеток.

Мы предположили, что местное применение ЛПС на раневую поверхность может влиять также и на секрецию эпидермального фактора роста. В соответствии с полученными результатами, местное применение липополисахарида ускоряет эпителизацию раневых дефектов, причем этот процесс ассоциирован с усилением секреции эпидермального фактора роста в области поврежденной кожи. Известно, что EGF является мощным митогеном для кератиноцитов, а также ускоряет миграцию кератиноцитов, способствуя эпителизации [9]. В связи с этим, наблюдаемое ускорение процесса эпителизации может быть

опосредовано увеличенным уровнем секреции EGF.

Вместе с тем, сроки эпителизации раневого дефекта во многом определяются продолжительностью воспалительной фазы, скоростью образования грануляционной ткани и другими показателями процесса ранозаживления, поэтому наблюдаемый эффект ускоренной эпителизации также может быть связан с комплексным влиянием ЛПС на рану в течение различных фаз раневого процесса.

Список литературы

1. Edwards R., Harding K.G. Bacteria and wound healing // *Curr Opin Infect Dis.* – 2004, 17 (2): 91-96.
2. Sato T., Yamamoto M., Shimosato T., Klinman D.M. Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9 // *Wound Repair Regen.* – 2010, 18 (6): 586-593.
3. Deiters U., Barsig J., Tawil B., M hlrad P.F. The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice // *Exp. Dermatol.* – 2004, 13 (12): 731-739.
4. Koff J.L., Shao M.X., Kim S., Ueki I.F., Nadel J.A. Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade // *J. Immunol.* – 2006, 177 (12): 8693-8700.
5. Basu S., Kumar M., Chansuria J.P. Singh T.B., Bhatnagar R., Shukla V.K. Effect of Cytomodulin-10 (TGF-beta1 analogue) on wound healing by primary intention in a murine model // *Int. J. Surg.* – 2009, 7 (5): 460-465.

6. Miller L.S., Modlin R.L. Toll-like receptors in the skin // *Semin. Immunopathol.* – 2007, 29 (1): 15-26.

7. Hsu D., Fukata M., Hernandez Y.G., Sotolongo J.P., Goo T., Maki J., Hayes L.A., Ungaro R.C., Chen A., Breglio K.J., Xu R., Abreu M.T. Toll-like receptor 4 differentially regulates epidermal growth factor-related growth factors in response to intestinal mucosal injury // *Lab. Invest.* – 2010, 90 (9): 1295-1305.

8. Finzi L., Shao M.X., Paye F. Houses' C., Nadel J.A. Lipopolysaccharide initiates a positive

feedback of epidermal growth factor receptor signaling by prostaglandin E2 in human biliary carcinoma cells // *J. Immunol.* – 2009, 182 (4): 2269-2276

9. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing // *Wound Repair Regen.* – 2008, 16 (5): 585-601.

поступила в редакцию 07.02.2012

отправлена на доработку 12.02.2012

принята к печати 17.02.2012

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *S. TYPHI* НА ЭПИТЕЛИЗАЦИЮ РАН КОЖИ И СЕКРЕЦИЮ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА» (АВТОРЫ: КОСТАРНОЙ А.В., ЛОГУНОВ Д.Ю., ВЕРХОВСКАЯ Л.В., ГАНЧЕВА П.Г., НАРОДИЦКИЙ Б.С.) (с. 223-226)

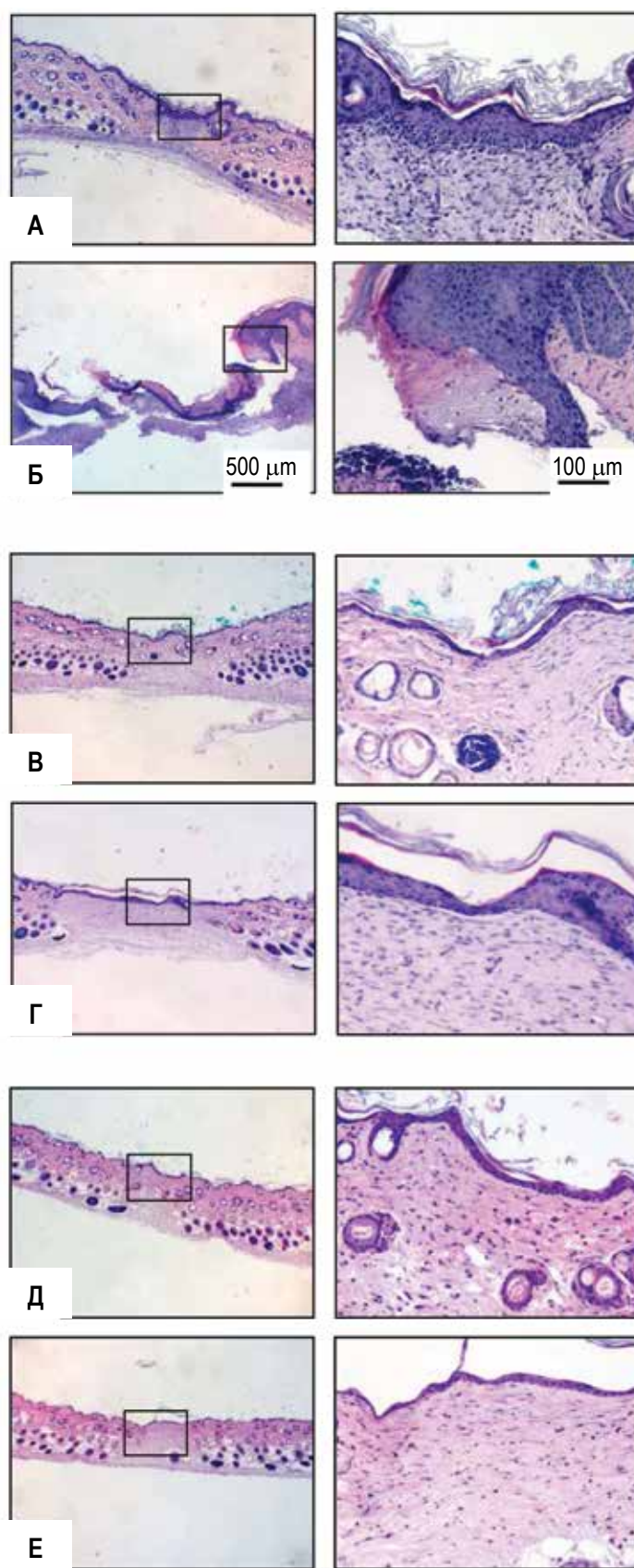


Рисунок 1. Репрезентативные фотографии гистологических срезов: 1-я неделя (А – нанесение ЛПС, Б – нанесение плацебо), 2-я неделя (В – нанесение ЛПС, Г – нанесение плацебо), 3-я неделя (Д – нанесение ЛПС, Е – нанесение плацебо). Увеличение x40 (левая панель), x100 (правая панель)