

© Группа авторов, 2011

УДК: [611.77:616.718.5/6-001.5-089.227.844]-092.9

Состояние внеклеточного матрикса кожи экспериментальных животных при удлинении голени по Илизарову

Е. Н. Горбач, Е. Л. Матвеева, С. А. Романенко, Н. В. Накоскина, А. А. Еманов

The condition of skin extracellular matrix in experimental animals for leg lengthening according to Ilizarov

E. N. Gorbach, E. L. Matveyeva, S. A. Romanenko, N. V. Nakoskina, A. A. Yemanov

ФГУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова»
Минздравсоцразвития РФ (директор — д. м. н. А. В. Губин)

Проведено комплексное исследование содержания и распределения различных классов гликозаминогликанов в тканях кожного покрова голени, удлиняемой методом Илизарова. Выявлено, что в период дистракции в дерме появляются признаки фибриллогенеза, пик которого приходится на период фиксации. Отмечены вариации содержания гликозаминогликанов в эпидермисе и дериватах кожи, связанные с изменением пролиферативной и биосинтетической активности клеток этих структур в разные периоды эксперимента.

Ключевые слова: кожный покров, чрескостный дистракционный остеосинтез, гликозаминогликаны.

A complex study of the content and distribution of different glycosaminoglycane classes in the skin integument tissues of the leg being lengthened by the Ilizarov method has been performed. It has been revealed that fibrillogenesis signs appear in derma in the period of distraction, and the fibrillogenesis peak takes place in the period of fixation. The content of glycosaminoglycanes in epidermis and skin derivatives varies that is associated with the changes in the proliferative and biosynthetic activity of these structures in different experimental periods.

Keywords: skin integument, transosseous distraction osteosynthesis, glycosaminoglycanes.

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с огромным прикладным значением открытого Г. А. Илизаровым «общебиологического свойства тканей отвечать на возникающие в них напряжения, преимущественно напряжения растяжения, регенерацией и ростом» была создана уникальная модель для фундаментальных исследований общебиологических процессов, лежащих в его основе. В последние годы в РНЦ «ВТО» особое внимание уделяется состоянию мягкотканного компонента, в том числе и кожи. Исследования акустических свойств кожного покрова пациентов с патологией различных сегментов конечностей в разные периоды лечения методом чрескостного дистракционного остеосинтеза выявили повышение коэффициента анизотропии, связанное с возрастанием скорости звука в коже в направлении, совпадающем с вектором ее растяжения [9]. Согласно результатам гистологических исследований дозированно растянутого кожного покрова, существует связь этих изменений со структурной перестройкой фибрillлярного остова дермы [2, 11]. При реконструк-

тивных операциях на кисти в условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза прослежена общая тенденция к активному росту и утолщению пролиферирующих слоев эпидермиса и восстановлению нормального строения дермы [3, 4, 5]. Таким образом, в предыдущих исследованиях кожного покрова в условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза выявлены признаки гистогенеза эпидермиса и дермы, в том числе и процесс фибриллогенеза, обеспечиваемый сложным комплексом взаимодействия коллагена с гликозаминогликанами, их протеогликанами и гликопротеинами [10]. Однако комплексных исследований гисто- и биохимических процессов, объясняющих механизмы гистогенеза кожи в условиях ее растяжения по Илизарову, до настоящего времени не проводилось. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение содержания и распределения в тканях кожного покрова различных классов гликозаминогликанов в разные периоды чрескостного дистракционного остеосинтеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования послужила кожа передней поверхности голени 14 взрослых беспородных собак, которым через 5 суток после флексионной остео-клизии берцовых костей осуществляли удлинение голени с суточным темпом 1 мм за 4 приема в ручном

режиме. Животных выводили из опыта через 28 суток дистракции, 30 суток фиксации, 30 суток после снятия аппарата. Уход, оперативные вмешательства, эвтаназию животных осуществляли в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения РФ к работе

экспериментально-биологических клиник, а также «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей». В качестве контроля исследовали кожный покров 6 интактных собак.

Часть материала фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, обезвоживали и заливали в парафин. Сульфатированные гликозаминогликаны (ГАГ) на гистологические срезах кожи выявляли окрашиванием их альциановым синим с pH 1,0; несульфатированные ГАГ — с pH 2,5. Для подтверждения специфичности выбранных методик параллельно проводили предварительное воздействие на контрольные гистологические срезы тестикулярной гиалуронидазой. Другую часть фрагментов кожи фиксировали в смеси альдегидных фиксаторов, дегидратировали и заливали в аралдит. Поверхность блоков выравнивали стеклянными ножами, напыляли тонким слоем серебра или платины в вакуумном напылителе «JEE-4 X/5 В» и ионном напылителе IB-6 для создания электро- и теплопроводности. При помощи рентгеновского электронно-зондового микроанализатора «INCA Energy 200», смонтированного на сканирующем электронном микроскопе «JSM-840», определяли распределение и концентрацию серы (маркера сульфатированных ГАГ) в дерме кожного покрова в различные периоды чрескостного дистракционного остеосинтеза.

Образец ткани для биохимических исследований высушивали до постоянного веса, измельчали до ку-

сочков около 1 мм³ и хранили до использования в закупоренных стеклянных флаконах при t—(+4–6 °C).

О концентрации гликозаминогликанов и соотношении в них сульфатированных и несульфатированных форм судили по количеству сульфатов¹, уроновых кислот, определяемых по методу Дише в модификации Биттера и Муир [12], используя ХС АС, гепарин или глюкуроновую кислоту в качестве стандартов. Для определения микроколичеств сульфатной серы образец ткани предварительно подвергали влажному озолению [1]. По завершении озления содержимое колб количественно переносили в мерный цилиндр и разбавляли бидистиллированной водой до 10 мл. Принцип метода определения сульфатной серы состоит в том, что реагируя с сульфатом пробы, хлористый барий дает нерастворимое соединение — BaSO₄. При осуществлении реакции в коллоидном растворе образуется устойчивая взвесь, оптическая плотность которой пропорциональна концентрации сульфатов.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методом вариационной статистики, применяемым для малых выборок, с принятием вероятности p, равной 0,05. Для оценки достоверности различий полученных результатов использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, для чего применяли программы: Microsoft Excel, версия 5. 0 и программу AtteStat, разработанную в ИВЦ ФГУ РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова И. П. Гайдышевым. Результаты представлены в таблицах в виде средней арифметической и ошибки средней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что в коже интактных животных при выявлении несульфатированных ГАГ наиболее интенсивное альцианофильное окрашивание отмечалось в области эпидермиса и на границе дермы с подкожно-жировой клетчаткой.

Слабо альцианофильно окрашивались сосочковый и наружные участки сетчатого слоя, стенки сосудов, наружные мембранные фолликулов и базальный слой сальных желез, а также мозговое вещество некоторых волос (рис. 1, а).

При выявлении сульфатированных ГАГ наиболее интенсивно окрашивались соединительнотканые капсулы дериватов, стенки сосудов, фибрillлярный остов на границе сетчатого слоя и подкожно-жировой клетчатки (рис. 1, б). Менее интенсивно — волокнистый остов, базальная мембра, эпидермис. Результаты гистохимических исследований подтверждались данными рентгеновского электронно-зондового микроанализа (рис. 1, в, г).

Полученные результаты показали, что через 28 суток дистракции волокнистый остов сосочкового слоя дермы при pH 2,5 окрашивался более интенсивно, чем у интактных животных.

Усиление альцианофилии отмечалось также на границе сетчатого слоя с подкожно-жировой клетчаткой, в области интимы и средней оболочки артерий и некоторых артериол (рис. 2, а).

Слабое окрашивание отмечалось в наружных мембранных фолликулов и базальном слое новообразованных сальных желез (зачатках). Ослабление окраски по сравнению с контролем наблюдали в эпидермисе и корневых влагалищах волос.

При окрашивании срезов с pH 1,0 интенсивное окрашивание волокон наблюдалось по всей толщине дермы. Менее интенсивно окрашивались эпидермис, соединительнотканые оболочки дериватов и стенки сосудов (рис. 2, б), аналогичное распределение серы наблюдалось и на картах рентгеновского электронно-зондового микроанализа (рис. 2, в, г).

Аналогичные факты опережающего накопления ГАГ (сначала гиалуроновой кислоты, затем преимущественно сульфатированных), а также гликопротеинов были получены при изучении эмбриональных тканей, заживлении ран и фиброзирующих процессов, т. е. в случаях активного фибрillогенеза [10].

Важную роль ГАГ играют в регулировании процессов роста и дифференцировки клеток. Известно, что количественные и качественные особенности ГАГ являются одним из факторов, блокирующих или запускающих механизмы митоза, чем можно объяснить различное распределение и интенсивность окрашивания различных классов ГАГ в коже в этот период эксперимента. В размножении клеток, наблюдаемом к концу периода дистракции [4,5], гиалуроновая

¹ Удостоверение № 43/85 на раб. предложение. Способ определения микроколичеств сульфатной серы в растворе озеленной кости / Десятниченко К. С., Абрамова Г. Д. ; КНИИЭКОТ.

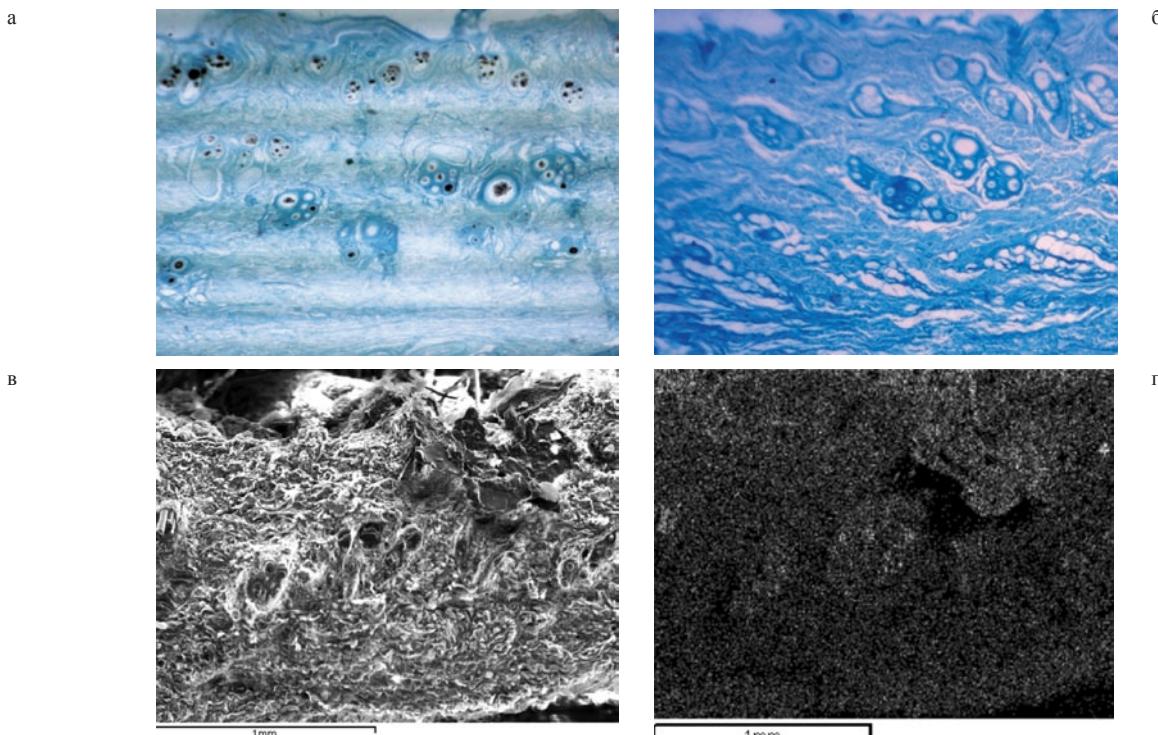


Рис. 1. Распределение ГАГ в коже интактных животных: а — при окрашивании альциановым синим с pH 2,5 (увеличение — 40); б — при окрашивании альциановым синим с pH 1,05 (увеличение — 40); в — электронная сканограмма кожи; г — карта электронно-зондового микроанализа кожи в характеристическом излучении серы (увеличение — 25)

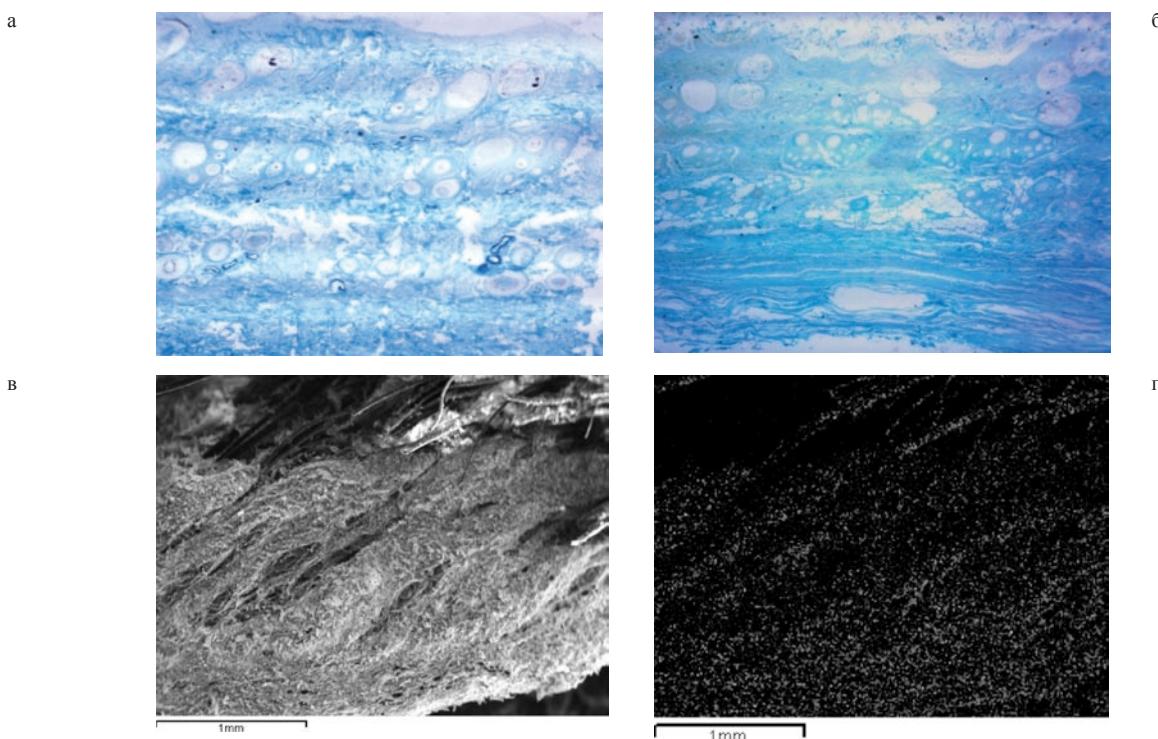


Рис. 2. Распределение ГАГ в коже животных через 28 суток дистракции: а — при окрашивании альциановым синим с pH 2,5 (увеличение — 40); б — при окрашивании альциановым синим с pH 1,05 (увеличение — 40); в — электронная сканограмма кожи; г — карта электронно-зондового микронализма кожи в характеристическом излучении серы (увеличение — 25)

кислота и сульфатированные ГАГ играют противоположную роль [7].

Через 30 суток фиксации у всех животных наблюдали незначительное снижение содержания несульфатированных ГАГ в волокнистом остове кожи опытной конечности. Одновременно с этим отмечали усиление окраски эпидермиса, оболочек дериватов кожи, а так-

же корневых влагалищ волос. Эти процессы мы связываем с высокой скоростью обновления кожи и волос млекопитающих за счёт пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток [17]. В reparативных процессах кожного покрова, наблюдавшихся в периоды дистракции и фиксации чрескостного дистракционного остеосинтеза, участвуют базальные клетки эпи-

дермиса и дериватов, что согласуется и с результатами других исследователей [13].

Альцианофильтная окраска при pH 1,0 по сравнению с периодом дистракции была более насыщена в волокнистом компоненте кожи. Эпидермис, оболочки фолликулов и стенки сосудов окрашивались со средней степенью альцианофильтии, как и в период дистракции. Наибольшая интенсивность окрашивания была характерна для средней и глубокой частей сетчатого слоя дермы, наименьшая — для сосочкового слоя (рис. 3, а).

На картах электронно-зондового микроанализа значительное содержание серы определялось в волокнистых структурах, наибольшее скопление — в корковом веществе волос (рис. 3, в, г).

Результаты, полученные в настоящем исследовании, соотносятся с данными других авторов, наблюдавших аналогичное увеличение степени сульфатирования ГАГ в эмбриональном развитии [14–16].

Известно, что синтез ГАГ и протеогликанов всегда предшествует синтезу коллагена и определяет его тип. При этом микрофибриллы коллагена сначала связываются олигосахарами гликопротеинов, создаются укрупненные фибриллы, которые затем с помощью цепей ГАГ, входящих в состав протеогликанов, объединяются в волокна различной толщины [6, 8].

Через месяц после снятия аппарата окрашивание волокнистого остова кожного покрова при pH 1,0 было незначительно интенсивнее кожи интактных животных, прочих структур — как и при окрашивании с pH 2,5, соответствовало таковому в контроле.

Данные электронно-зондового микроанализа показали достоверное уменьшение сульфатированных ГАГ в дерме кожного покрова к окончанию периода дистракции в 1,5 раза ($p \leq 0,05$).

Через 30 суток фиксации содержание серы в дерме превышало показатели предыдущего периода в

1,75 раза ($p \leq 0,01$) и в 1,2 раза — показатели контроля ($p \leq 0,05$). Через месяц после снятия аппарата анализируемые значения были приближены к показателям интактной нормы ($p \geq 0,05$) (табл. 1).

Исходя из полученных нами данных, представленных в таблице 2, содержание уроновых кислот в опытной и контрлатеральной конечности, ввиду их различного структурного распределения, не отличалось от таких значений в коже интактных собак на всех сроках эксперимента. В коже опытной конечности через 28 суток дистракции достоверно возрастало количество сульфатов и степень сульфатирования гликозаминогликанов, что мы связываем с началом фибрilllogenеза в дерме и активной пролиферативной активностью прогениторных клеток эпидермиса и дериватов, а также неоваскулогенеза, характерных для этого периода и выявленных нами ранее [2, 5, 6]. На дальнейших сроках эксперимента количество сульфатной серы и степень сульфатирования ГАГ оставались ниже, чем в предыдущий период как в опытной, так и в контрлатеральной конечности, возвращаясь к показателям контроля через месяц после снятия аппарата, что мы объясняем накоплением сульфатированных ГАГ в волокнистом компоненте и значительном уменьшении их количества в эпителиальных структурах.

Увеличение отношения сульфатов к уроновым кислотам (УК) почти в 5 раз свидетельствует об активном накоплении в коже сульфатированных гликозаминогликанов, что, по данным литературы, характерно как для новообразования соединительностканых структур, так и для деструктивных процессов в патологически измененной волокнистой соединительной ткани [7, 10].

Проведенные исследования показали увеличение содержания несульфатированных ГАГ в период дистракции в волокнистом компоненте и незначительное

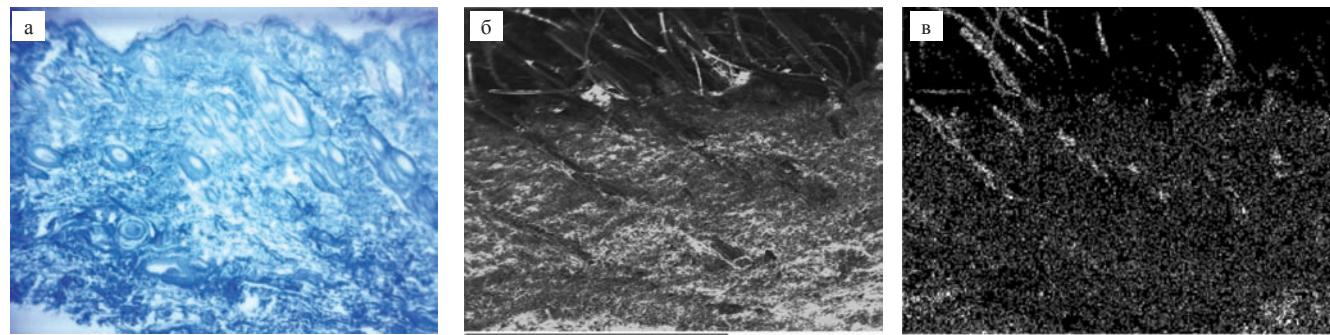


Рис. 3. Распределение ГАГ в коже животных через 30 суток фиксации конечности в аппарате: а — при окрашивании альциановым синим с pH 2,5 (увеличение — 40); б — при окрашивании альциановым синим с pH 1,0 (увеличение — 40); в — электронная сканограмма кожи; г — карта электронно-зондового микроанализа кожи в характеристическом излучении серы (увеличение — 27)

Таблица 1

Динамика содержания серы в дерме кожного покрова в различные периоды чрескостного дистракционного остеосинтеза

Интактные животные (контроль)	Содержание S, вес. % (M±m)		
	Экспериментальные животные		
	дистракция 28 суток	фиксация 30 суток	без аппарата 30 суток
1,1 ± 0,1	0,75 ± 0,28*	1,31 ± 0,27**	1,19 ± 0,32

Примечание: * — при $p \leq 0,05$ (по сравнению с контролем); ** — при $p \leq 0,01$ (по сравнению с предыдущим периодом); полужирный шрифт — при $p \geq 0,05$ (по сравнению с контролем)

Содержание некоторых химических компонентов внеклеточного матрикса кожи собак

Показатель	Интакт. животные	Экспериментальные животные					
		дистракция 28 суток		фиксация 30 суток		без аппарата 30 суток	
		опыт	к-латер.	опыт	к-латер.	опыт	к-латер.
УК мМ/мг	2,39 ± 0,17	2,37 ± 0,26	2,16 ± 0,21	2,47 ± 0,46	1,93 ± 0,16	2,52 ± 0,41	1,83 ± 0,01
S г/100г	0,035 ± 0,008	0,079 ± 0,027*	0,036 ± 0,01	0,007 ± 0,005*	0,025 ± 0,003	0,038 ± 0,001	0,021 ± 0,001
S/УК x10 ²	0,71 ± 0,16	3,4 ± 1,1*	1,7 ± 0,7	0,3 ± 0,2*	1,3 ± 0,04	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,2

Примечание: * — обозначены показатели, достоверно отличающиеся от нормы ($p \leq 0,05$)

его снижение в эпидермисе и дериватах, при этом количество сульфатированных ГАГ было снижено во всех структурах кожного покрова удлиняемой конечности, что подтверждалось данными электронно-зондового микроанализа. В период фиксации содержание всех типов ГАГ увеличивалось, с преобладанием доли сульфатированных. Через месяц после снятия аппарата исследуемые показатели приближались к таковым в контроле.

Таким образом, пик накопления в дерме сульфатированных и несульфатированных ГАГ приходился на период фиксации, что свидетельствует об активном процессе фибриллогенеза и начале перестроекных процессов в волокнистом остове кожи. Вариации содержания ГАГ в эпидермисе и дериватах связаны с изменением пролиферативной и биосинтетической активности клеток этих структур в разные периоды эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выделение и биотестирование костных рострегулирующих факторов: метод. рекомендации / ВКНЦ «ВТО»; сост.: К. С. Десятниченко [и др.]. Курган, 1990. 23 с.
2. Горбач Е. Н. Морфологическая характеристика кожного покрова голени в различных условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза // Морфология. 2008. № 3. С. 35.
3. Горбач Е. Н., Шабалин Д. А. Морфологические изменения кожи межпальцевых промежутков кистей с врожденным отсутствием и посттравматическими культурами пальцев в процессе лечения методом чрескостного дистракционного остеосинтеза // Гений ортопедии. 2009. № 2. С. 11–16.
4. Горбач Е. Н. Гистоструктурная характеристика кожного покрова голени в различных условиях чрескостного дистракционного остеосинтеза // Морфология. 2009. № 4. С. 41.
5. Горбач Е. Н. Гистоструктурная характеристика дермы кожного покрова голени собаки при ее удлинении методом чрескостного дистракционного остеосинтеза // Вопросы морфологии XXI века: сб. науч. тр. к 80-летию со дня рождения проф. Алексея Андреевича Клишова / Под ред. Р. К. Данилова, С. В. Костюкевича, И. А. Однцовой. СПб.: Издательство: ДЕАН, 2010. Вып. 2. С. 95–101.
6. Никитин В. Н., Перский Е. Э., Утевская Л. А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур. Киев: Наукова Думка, 1977. 242 с.
7. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань. М.: Медицина, 1981. 312 с.
8. Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л.: Медицина, 1969. 375 с.
9. Шевцов В. И., Гребенюк Л. А. Характеристика реологических и акустических свойств кожного покрова нижней конечности человека при ее удлинении // Физиология человека. 1998. Т. 20, № 1. С. 64–69.
10. Шехтер А. Б. Стимулирующее влияние коллагена и хондроитинсульфатов на образование соединительной ткани (взаимоотношение клеточных и неклеточных компонентов) // Гистофизиология соединительной ткани. Новосибирск, 1972. Т. 1. С. 51–53.
11. Чикорина Н. К., Горбач Е. Н., Баранова С. В. Гистоструктура кожи межпальцевых промежутков кисти, используемая для фалангизации сросшихся пальцев у больных синдактилией // Морфолог. ведомости. 2004. № 1–2. С. 117.
12. Bitter T., Muir H. M. A modified uronic acid carbazole reactions // Anal. Biochem. 1962. Vol. 4, No 4. P. 330–334.
13. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing / M. Morasso [et al.] // Biol Cell. 2005. No 97. P. 173–183.
14. Kondo K., Seno N., Anno K. Mucopolysaccharides from chicken skin of three age groups // Biochem. Biophys. Acta. 1971. Vol. 244, No 3. P. 513–522.
15. Lipson M. J., Cerskus R. A., Silbert J. E. Glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-degrading enzyme of *Rana catesbeiana* back skin during late stages of metamorphosis // Develop. Biol. 1971. Vol. 25, No 2. P. 198–208.
16. Prodi G. Data on dermis mucopolysaccharides and their evolution in growing animals // Biochimie et physiologie du tissu conjonctif. Lyon, 1966. P. 33–39.
17. Transient activation of beta-catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice / D. Van Mater [et al.] // Genes Dev. 2003. No 17. P. 1219–1224.

Рукопись поступила 10. 05. 10.

Сведения об авторах:

1. Горбач Елена Николаевна — ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, лаборатория морфологии, с. н. с., к. б. н.
2. Матвеева Елена Леонидовна — ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, клинико-экспериментальный лабораторный отдел, в. н. с., д. б. н.
3. Романенко Светлана Алексеевна — ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, клинико-экспериментальный лабораторный отдел, м. н. с.
4. Накоскина Наталья Викторовна — ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, клинико-экспериментальный лабораторный отдел, м. н. с.
5. Еманов Андрей Александрович — ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, лаборатория экспериментальной травматологии и ортопедии, н. с., к. в. н.