

На правах рукописи

Зеленин Николай Вадимович

Управление процессом заживления хирургической раны путем изменения активности р38 MAPK каскада

14.01.31 – пластическая хирургия

АВТОРЕФЕРАТ
на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Иркутск– 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Иркутский научный центр хирургии и травматологии»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Мантурова Наталья Евгеньевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук,

профессор РАН

Шурыгина Ирина Александровна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор.

Байтингер Владимир Федорович

Президент Автономной некоммерческой организации «Научно-исследовательский институт микрохирургии» г. Томск.

доктор медицинских наук

Зелянин Александр Сергеевич

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии лечебного факультета.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждения высшего образования Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 201__ года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д.208.072.17 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117197, Москва, ул. Островитянова, д. 1; и на сайте <http://rsmu.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Мокрушина Ольга Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Знания о заживлении ран относятся к фундаментальным основам медицины и пластической хирургии, в частности. Чтобы не было целью пластической хирургии, будь то замещение дефектов тканей лоскутами с осевым кровотоком, реплантация конечности или эндопротезирование груди, выполненное по эстетическим показаниям, исход операции зависит от заживления разрезов без осложнений (Janis J.E., Harrison B., 2016).

Проблема образования рубцов имеет особое значение в практике пластического хирурга, где результат операции во многом определяется качеством послеоперационных рубцов (Куприн П.Е., 2003; Логвинов С.В. и др., 2004; Белоусов А.Е., 2005; Шаробаро В.И. и др., 2015).

Внимание к деталям при выполнении операции и зашивании раны является важнейшим условием образования качественного рубца (Фришберг И.А., 1984; Буянов В.М. и др., 1993; Белоусов А.Е., 1998; Тенчурина Т.Г., 2007).

Однако пока остается мечтой создание таких условий для заживления раны, чтобы она заживала совсем без образования рубца или, чтобы такой рубец формировался бы с заданными свойствами. В настоящее время ещё нет продуктов, которые препятствовали бы чрезмерному образованию рубцовой ткани (Шаробаро В.И. и др., 2016; Block L. et al., 2016; Marshall C.D. et al., 2017; Mokos Z.B. et al., 2017; Perez J.L., Rohrich R.J., 2017; Zhang J. et al., 2017).

Становится очевидным, что только совершенствование хирургической техники не приведёт к исчезновению проблемы заметных рубцов, и для качественного скачка нужны новые фундаментальные знания о механизмах воспаления и формирования соединительной ткани (Rohrich R.J., 2016)

Процесс заживления раны требует слаженного взаимодействия между клетками воспаления, биохимическими посредниками и внеклеточным матриксом. Эти реакции регулируются митогенами и хемоаттрактантами, а различные факторы роста обеспечивают клеточные и молекулярные сигналы,

необходимые для нормального заживления раны (Boo S., Dagnino L., 2013; Greaves N.S. et al., 2013; Marshall C.D. et al., 2018; Wang P.H. et al., 2018).

МАР-киназы (mitogen activated protein kinases) – это большая группа протеинкиназ, сформированных в процессе эволюции в мощные сигнальные пути, которые в ответ на внеклеточные стимулы (митогены) участвуют в регуляции клеточной активности (Шурыгина И.А. и др., 2009; Greenblatt M.B. et al., 2015; Dong S., Sun Y., 2017).

После воздействия на рецепторы мембраны клетки начинают развиваться МАРК-каскады реакций фосфорилирования протеинкиназ и других регуляторных белков, в результате чего обеспечивается передача полученного сигнала в ядро клетки. А это, в свою очередь, приводит к активации или подавлению активности определённых генов. В результате запускаются воспалительный ответ, апоптоз, деление клеток. Управление активностью МАР-киназ может привести к появлению новых возможностей для лечения ран и профилактики послеоперационных осложнений.

Целью исследования стало изучение возможности управления процессом формирования послеоперационного рубца путем снижения активности митоген-активируемой протеинкиназы группы p38.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. На модели хирургической кожно-мышечной раны в условиях эксперимента исследовать закономерности процесса заживления раны при искусственном снижении активности p38 МАРК.

2. В условиях асептической кожно-мышечной раны при искусственном снижении активности p38 МАРК изучить экспрессию маркеров дифференцировки клеток фибробластического ряда и синтетическую активность фибробластов.

3. Определить механические свойства образующегося послеоперационного рубца при уменьшении активности p38 МАРК каскада.

4. Разработать способ формирования послеоперационного рубца с заданными характеристиками посредством изменения активности p38 МАРК.

Научная новизна

Впервые установлено, что блокада p38 MAP-киназного каскада в ранние сроки раневого процесса существенно влияет на характеристики формирующегося соединительнотканного рубца, в значительной степени модифицирует сам воспалительный процесс. Установлено, что при применении блокатора p38 MAPK снижается выраженность нейтрофильной инфильтрации, модифицируется ответ клеток фибробластического ряда в зоне асептического повреждения. Доказано снижение синтетической активности фибробластов при локальном применении ингибитора p38 MAPK в ранние сроки раневого процесса. Показано, что блокада p38 MAPK приводит к значительному изменению механических характеристик формирующегося рубца при кожно-мышечной ране. Локальное введение блокатора p38 позволяет к 30-м суткам раневого процесса добиться формирования рубца, при котором механические свойства кожи в области раны (разрушающая нагрузка и точка перехода упругой деформации в пластическую) сильнее приближаются к показателям интактной кожи. При этом достигаются хорошие косметические свойства рубца.

Теоретическая и практическая значимость

Установленное значительное влияние блокатора p38 MAPK SB 203580 на механические и косметические характеристики формирующегося рубца при хирургической кожно-мышечной ране позволяет разрабатывать новые способы оптимизации формирования послеоперационных рубцов.

Разработан и протестирован в эксперименте в условиях асептической раны оригинальный способ интраоперационного однократного введения лекарственного средства с медленным высвобождением действующего вещества в зону репарации. Разработанный способ изменения характеристик послеоперационного рубца под действием p38 MAPK перспективен для дальнейшей трансляции к применению в клинической практике.

Проведённое исследование показало, что существуют хорошие перспективы улучшения качества послеоперационного рубца. Они заключаются в использовании достижений молекулярной медицины – создании новых

материалов (лекарственных плёнок, шовного материала), эндопротезов с заданными свойствами – с включением в состав данных материалов блокаторов р38 МАРК. Данные нашего исследования показывают, что блокатор р38 МАРК-киназ SB 203580, который мы помещали внутрь полимерной рассасывающейся пленки, приводит к неосложненному заживлению кожно-мышечной раны с образованием достоверно более тонкого рубца, чем в контрольных опытах. Подобные исследования могут иметь большое практическое значение для профилактики образования послеоперационных контрактур после различных видов эндопротезирования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Локальное введение блокатора р38 МАРК-киназного сигнального каскада на начальном периоде заживления хирургической раны снижает выраженность нейтрофильной инфильтрации, а с 3-х по 30-е сутки наблюдения достоверно уменьшает интенсивность коллагенообразования и повышает фиброкластическую активность в зоне послеоперационного рубца.
2. Разработанный способ локального подавления р38 МАРК приводит к формированию достоверно более узкого послеоперационного рубца при сохранении его механической прочности.

Внедрение полученных результатов исследования в практику.

Результаты исследования внедрены в практику работы отделений ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», и Института пластической хирургии и косметологии (г. Москва).

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, апрель 2010 г.), OzBio2010 Combined Conference (Melbourne, Australia, September 26 – October 1, 2010), 68-й открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», посвящённой 75-летию ВолГМУ

(Волгоград, сентябрь 2010 г.), Международной конференции и Международной школе молодых учёных «Проблемы экологии»: Чтения памяти профессора Михаила Михайловича Кожова (Иркутск, сентябрь 2010 г.), конференции молодых учёных НЦРВХ СО РАМН (Иркутск, октябрь 2010 г.), конференции «Генетическая и регенеративная медицина: проблемы и перспективы» (Киев, октябрь 2010 г.), 78-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых учёных СНО им. И.И. Мечникова (Иркутск, апрель 2011 г.), Asian Congress on Biotechnology (Shanghai, China, 11–15 May 2011), конференции молодых учёных ВСНЦ СО РАМН (Иркутск, сентябрь 2011 г.), юбилейной конференции НЦРВХ СО РАМН (Иркутск, октябрь 2011 г.), XIV Международной молодёжной конференции по люминесценции и лазерной физике (Иркутск, 30 июня – 5 июля 2014 г.), на VII Национальном конгрессе «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» (6–8 декабря 2018 г.)

Апробация диссертационной работы состоялась на совместном заседании научно-лабораторного отдела, научного отдела клинической хирургии и научно-клинического отдела травматологии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (Протокол № 1 от 02.07.2018 г.). Исследование было выполнено при финансовой поддержке гранта ГК П803 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.»

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 109 страницах и состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей использованные в исследовании материалы и методы, главы собственных наблюдений, заключения, выводов. Иллюстрирована 47 рисунками и 4 таблицами. Список использованных источников включает 197 работ отечественных и зарубежных авторов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 21 работ, в том числе 8 в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации, 3 статьи в журналах, входящих в Scopus, 1 статья в журнале, входящем в WoS, и 4 – в материалах международных конференций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Моделирование кожно-мышечной раны

Исследование проведено на 63 самцах крыс линии Wistar весом 220–250 г в возрасте 9 месяцев, у которых изучали влияние блокатора p38 MAP-киназы на заживление кожно-мышечной раны. Исследования выполнены на базе ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (ИНЦХТ) (директор – д.м.н., профессор В.А. Сороковиков) в отделе экспериментальной хирургии и виварии ФГБНУ ИНЦХТ. Все исследования проводились 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). Исследование одобрено Комитетом по этике ФГБНУ ИНЦХТ.

Животные были разделены на две группы по 30 животных в группе:

1) контрольная – нанесение раны и внесение в рану лекарственной плёнки без активного вещества (Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., 2012)

2) основная – изучение воздействия блокатора p38 MAP-киназы SB 203580 (Tocris bioscience, кат. № 1202 Bath № 4 A/95665) на заживление раны. Препарат вводился в рану в составе лекарственной плёнки пролонгированного действия, содержащая субстанцию лекарственного средства, желатин в виде 30%-ного водного раствора, глицерин, метилцеллюлозу в виде 5%-ного водного раствора, агар-агар в виде 30%-ного водного раствора и 40% этанол, взятые в определенном количестве (Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., 2012) после расчета индивидуальной дозы (4,2 мкг/кг), который проводили на основании IC_{50} (Cheng Y., Prusoff W.H., 1973).

Три интактных животных служили в качестве контроля при проведении оценки механических свойств неизменённой кожи.

Моделирование линейной кожно-мышечной раны (Рисунок 1) в клинических условиях наиболее полно соответствует ране, возникающей при субпекторальном

увеличении молочных желез через субмаммарную борозду, проводили следующим образом: крыс оперировали в условиях операционной вивария под общим наркозом. Перед началом операции в области спины удаляли выбриванием участок шерсти, тщательно обрабатывали кожу раствором антисептика



Рисунок 1 – Модель кожно-мышечной раны

Скальпелем наносили рану по паравerteбральной линии, затрагивающую кожу и подкожную клетчатку, длиной 5 см. Затем проводили вскрытие собственной фасции и раздвигали мышечные волокна длиной мышцы спины в продольном направлении для формирования вместилища под лекарственную плёнку в мышце. В рану помещали лекарственную плёнку с медленной резорбцией, содержащую в своём составе для основной группы – блокатор p38 MAPK SB203580, для контрольной группы – плёнку без активного ингредиента (Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., 2012). Кожу ушивали нитью пролен 4/0 (Ethicon) с пошаговым интервалом 1 см, без захвата подлежащих тканей. Швы снимали через 7 суток.

Выведение животных из эксперимента проводили в следующие сроки: 2 ч, 6 ч, 12 ч, 1, 3 (по 3 животных в группе), 7, 14 и 30 суток (по 5 животных в группе) передозировкой раствора тиопентала натрия, введённого внутривентриально. Для исследования забирали ткани из области раны, фиксировали раствором FineFix (Milestone, Италия) для последующего гистологического и иммуногистологического исследований.

На нефиксированных фрагментах послеоперационного рубца на 7-е, 14-е и 30-е сутки методом тензиометрии проводили определение механических характеристик рубца.

Определение механических характеристик сформированного рубца

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, взятый сразу после выведения животного из эксперимента, исследовали методом тензиометрии на аппарате собственного изготовления.

К образцу ткани, содержащей элемент формируемого рубца, прикладывали силу в направлении перпендикулярном линии раны. Измеряли удлинение в ответ на прилагаемую нагрузку. Вычисляли относительное удлинение – отношение длины при приложении силы к начальной длине образца. Нагрузку повышали дискретно с 50 грамм-сил с шагом 50 гс (от 0.4903 Н, шаг 0.4903 Н). Кроме этого, фиксировали значение приложенной силы, при которой достигался разрыв образца. Вычисляли разрушающую нагрузку – отношение приложенной силы к площади поперечного сечения образца по формуле: Разрушающая нагрузка = F/S ; где: F — сила в Ньютонах, S — площадь поперечного сечения (m^2).

Для каждого образца строили диаграмму растяжения «нагрузка – относительное удлинение». На основании графика определяли точку перехода упругой деформации в пластическую и предел прочности образца. Сравнение показателей проводилось между группами, а также по отношению к поведению интактной кожи. Исследование проведено в сроки 7, 14, 30 суток после операции, а также у интактных животных. От каждого животного исследовали по 3 образца.

Морфологические и морфометрические исследования

Фиксацию иссечённых фрагментов из зоны послеоперационного повреждения проводили в растворе FineFix (Milestone, Италия). Затем осуществляли стандартную гистологическую проводку и заливку (парафиновые блоки), на микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 3 мкм. Препараты окрашивали гематоксилин-эозином, по методу Ван Гизона (на выявление коллагеновых волокон) (Волкова О.В., Елецкий Ю.К., 1982; Bancroft J.D., 2008). Исследование проводили методом световой микроскопии с использованием микроскопа Nikon 80i (Япония).

Проводили морфометрические исследования с использованием программы ImageJ (Национальный институт здоровья, США).

В каждом образце фотографировали при увеличении 400х по 10 зон в области рубца, в зоне, прилегающей к зоне рубца, и в интактной дерме.

Для оценки формирования грубоволокнистой соединительной ткани на микрофотографиях при использовании окраски по методу Ван Гизона определяли соотношение площади, занимаемой окрашенными волокнами коллагена, к общей площади ткани на срезе (Шурыгин М.Г. и др., 2008)

$$S_{отн} = \frac{S_{колл}}{S_{тк}} \times 100\%$$
, где: $S_{отн}$ – относительная площадь коллагена на срезе; $S_{колл}$ – площадь, занимаемая коллагеновыми волокнами; $S_{тк}$ – площадь исследуемой ткани на микропрепарате.

Иммуногистохимические и иммунофлюоресцентные исследования

Для проведения иммуноморфологических исследований срезы толщиной 5 мкм монтировали на предметные стёкла с адгезивным покрытием (поли-L-лизин) (Thermo Scientific-Menzel, Германия).

Для иммуногистохимического исследования в качестве первичных антител применяли: 1) Actin monoclonal antibody (Rabbit) (Epitomics, Cat. N 1844-1, Lot D 091805), 1:200; 2) CD34 (ICO 115) monoclonal IgG (Mouse) (Santa Cruz, Cat. N Sc-7324, Lot CO909), 1:300.

Для иммунофлюоресцентного исследования в качестве первичных антител применяли: 1) CD34 (ICO 115) monoclonal IgG (Mouse) (Santa Cruz, Cat. N Sc-7324, Lot C 0909), 1:300; 2) MMP9 monoclonal antibody IgG (Rabbit) (Epitomics, Cat. N 2551-1, Lot YG 113001P), 1:200; 3) CD45 (OX 30) monoclonal IgG (Mouse) (Santa Cruz, Cat. N Sc-53047, Lot B 2409), 1:300; 4) Endoglin (M-20) goat polyclonal IgG (Santa Cruz, Cat. N Sc-19793, Lot # I 0908), 1:300.

В качестве вторичных антител использовали:

1) Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-11029, Lot 898236), 1:300; 2) Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N

11034, Lot 870976), 1:300; 3) Alexa fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-11031, Lot 822389), 1:300; 4) Alexa fluor 488 donkey anti-goat IgG (H+L) (Invitrogen, Cat. N A-1105 Lot 870969), 1:300. Проводили процедуры как одинарного, так и двойного мечения.

Ядра докрашивали Dapi (Biotium, Cat. N 40011, Lot 8D 0605).

Для визуализации специфической окраски и фотографирования образцов использовали микроскоп Nikon Eclipse 80i с камерой Nikon DS-Fi1c с приставкой для эпифлюоресценции (Япония) и фильтрами Nikon DAPI, Nikon B-2A, Nikon TRITC.

Электронно-микроскопические исследования

Образцы ткани из области послеоперационного рубца, взятые на 3, 7 сутки, фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4), дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия. Заливали в Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, США) [Миронов А.А. и др, 1994]. На ультратоме «LKB» (LKB, BROMMA, Швеция) изготавливали ультратонкие срезы, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Образцы исследовали на электронном микроскопе «ТЕМ-410» (Голландия).

Морфологические, иммуноморфологические исследования проведены на базе лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины ФГБНУ ИНЦХТ (зав. лабораторией – д.м.н., профессор РАН И.А. Шурыгина).

Методы статистического анализа

Нормальность распределения количественных показателей определялась по критерию Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's test) W. Дисперсионный анализ (ANOVA) проводился с проверкой гипотезы о равенстве дисперсий совокупности выборок при помощи модификации Levene's test. Для оценки значимости различий в попарно сравниваемых группах использовали критерий Манна – Уитни; при оценке механических свойств использовался метод множественных сравнений Шеффе (Гланц С., 1999). При проведении всех видов статистического анализа критический уровень значимости критериев принимался равным 0.05. Данные представлены в виде Среднее +/- Ошибка среднего (M+-SE) при нормальном

распределении и Медиана [25% квартиль - 75% квартиль] (Me [Q25-Q75]) при несоответствии распределения критериям нормальности.

Результаты исследований

Особенности формирования послеоперационного рубца в условиях локального подавления активности p38 MAP-киназы

При исследовании процесса заживления раны у контрольной группы (введение лекарственной плёнки без активного действующего вещества) установлено, что репаративный процесс соответствовал канонам формирования послеоперационного рубца в условиях асептической раны.

У животных, которым вводился блокатор p38, в отличие от животных контрольной группы, через 2 часа после нанесения травмы, наблюдался умеренный отёк подкожной клетчатки в области раны без нейтрофильной инфильтрации. Через 6 часов была отмечена умеренная нейтрофильная инфильтрация и отёк области раны. К 1-м суткам эксперимента выраженность нейтрофильной инфильтрации достигала максимума, однако она была значительно менее выраженной как по площади зоны инфильтрации, так и по плотности клеточных элементов. К 3-м суткам наступала фибробластическая фаза воспаления с началом формирования молодой грануляционной ткани. Однако и на 7-е сутки развитие соединительной ткани в области раны отставало от уровня группы контроля, зона формирования соединительной ткани была очень узкой, с низкой плотностью клеточных элементов. К 14-м суткам формировался узкий аккуратный рубец в области раны, наблюдалась полная эпителизация раны. К 30-м суткам на месте раны наблюдался зрелый узкий соединительнотканый рубец, малозаметный на коже.

У животных основной группы на 30-е сутки ширина сформированного рубца составляла 157,8 [120,11–206,45] мкм, в то время как у животных контрольной группы – 763,47 [334,1–1285,31] мкм. Различия достоверны – по критерию Манна – Уитни, $Z = 6,073$, $p = 0,00001$ (Рисунок 2).

Таким образом, локальная блокада p38 MAP-киназного каскада в ранние сроки раневого процесса в значительной степени модифицирует воспалительный

процесс, влияя на различные его фазы. При этом снижается выраженность нейтрофильной инфильтрации, подавляется выраженность фибробластической фазы воспаления, что в итоге приводит к формированию достоверно более узкого послеоперационного рубца по сравнению с группой контроля.

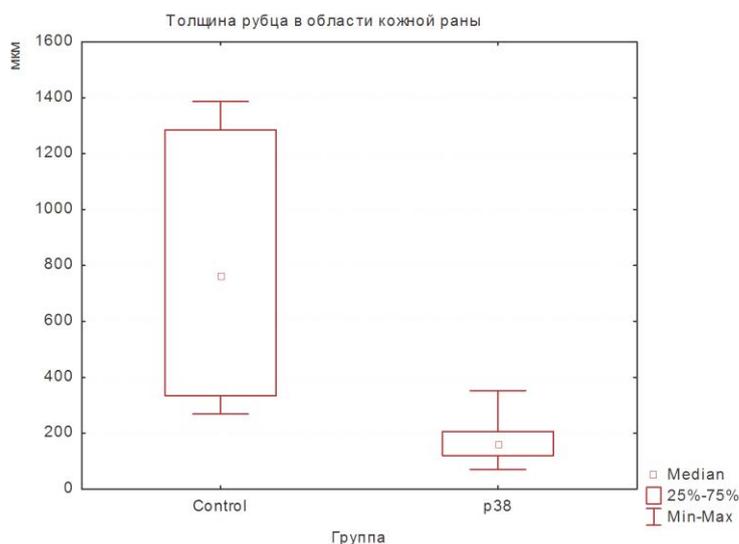


Рисунок 2 – Ширина рубца в области кожной раны на 30-е сутки у животных контрольной группы и животных, получавших блокатор p38.

Механические свойства послеоперационного рубца

При низких нагрузках поведение образцов соответствовало закону Гука. То есть образцы демонстрировали поведение, соответствующее поведению упругого тела. При больших нагрузках наблюдался переход упругой деформации в пластическую. Выявлено, что точка перехода упругой деформации в пластическую в срок 7 суток после моделирования раны у экспериментальных животных значительно снижалась по сравнению с интактной кожей. В дальнейшем наблюдалось постепенное повышение этого показателя. При этом на 30-е сутки в группе животных, которым в рану вводили блокатор p38, данный показатель был достоверно выше, чем в группе контроля – 8417 ± 503 и 5623 ± 164 кПа соответственно ($p = 0,0016$). Разрушающая нагрузка, измеренная как отношение силы, приведшей к разрушению образца, к площади поперечного сечения образца, для интактной кожи превышала 12 МПа. Эта величина была значительно ниже у животных экспериментальных групп в ранние сроки раневого

процесса и постепенно повышалась по мере созревания формирующегося рубца. Введение блокатора р38 МАРК приводило к повышению этого показателя по сравнению с контролем. Так, после введения в рану блокатора р38 данный показатель был выше во все сроки наблюдения по сравнению с контролем, различия становились достоверными к 30-м суткам – 9130 ± 341 и 7872 ± 237 кПа ($p < 0,05$) (Рисунок 3).

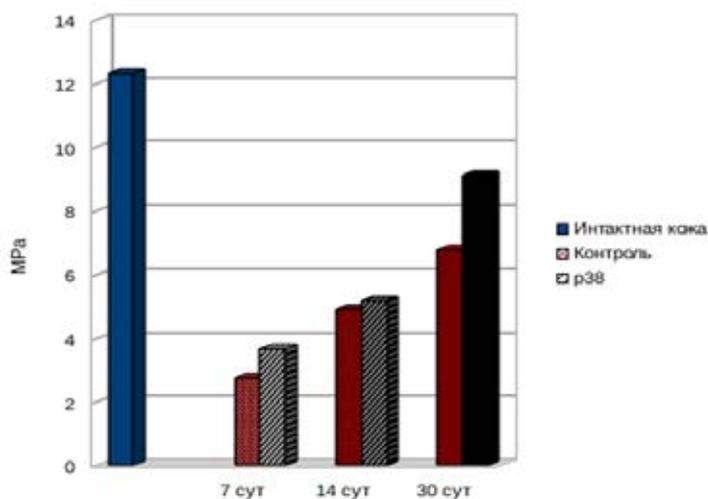


Рисунок 3 – Предел прочности образцов, кПа

Таким образом, нашими исследованиями показано, что блокада р38 МАРК приводит к значительному изменению механических характеристик формирующегося рубца при кожно-мышечной ране. Локальное введение блокатора р38 позволяет к 30-м суткам раневого процесса добиться формирования рубца, при котором механические свойства кожи в области раны (разрушающая нагрузка и точка перехода упругой деформации в пластическую) сильнее приближаются к показателям интактной кожи.

Оценка синтеза коллагена при формировании послеоперационного рубца

Оценка синтетической активности фибробластов проводилась по продукции ими специфического белка – коллагена. Исследования проводились на гистологических препаратах, окрашенных по Ван Гизону, при этом оценивалась относительная площадь, занимаемая коллагеновыми волокнами (Шурыгин М.Г. и др., 2008).

У животных контрольной группы относительная площадь, занятая волокнами коллагена в зоне послеоперационной раны закономерно возрастала от 3-х до 30-х

суток, достигала максимальных значений к 30-м суткам – 73,54 % [66,87–78,01]. При этом в интактной дерме изменений не наблюдалось. А в дерме рядом с травматическим повреждением плотность коллагена достоверно повышалась на 14-е сутки ($p = 0,029$).

Применение блокатора р38 SB 203580 приводило к значительному снижению интенсивности коллагенообразования в зоне формирующегося рубца. В течение всего срока наблюдения отмечалось достоверное снижение коллагенообразования в сравнении с группой контроля (Таблица 1).

Таблица 1 – Количество коллагена в зоне формирующегося рубца при подавлении активности р38 MAP-киназы

Срок	Контрольная группа			Введение SB 203580			Z	p
	Me	25% кв.	75% кв.	Me	25% кв.	75% кв.		
3-и сутки	11,57	8,53	27,85	4,53	0,89	9,81	2,49	0,011000
7-е сутки	25,21	15,61	36,92	1,78	1,09	2,80	5,20	0,000001
14-е сутки	55,41	41,10	74,38	31,54	23,15	40,24	4,49	0,000007
30-е сутки	73,54	66,87	78,01	43,60	41,05	60,15	3,14	0,001700

Таким образом, локальное подавление активности р38 MAP-киназы снижает синтетическую активность фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца.

Влияние блокатора р38 MAPK на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца

Для изучения влияния локального введения ингибитора р38 MAPK на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца оценивалась экспрессия в зоне повреждения CD45 как маркера клеток костномозгового происхождения, CD34 как маркера лейкоцитарных клеток, MMP9 – матриксной металлопротеазы 9, актина и эндоглина.

У животных контрольной группы установлено, что уже с начала фибробластической фазы воспаления фибробласты (на 3-и сутки) интенсивно экспрессировали CD34+, к 7-м суткам только небольшое число клеток имели слабое специфическое окрашивание. Позднее специфическое окрашивание

зарегистрировать не удалось. Аналогичный процесс зарегистрирован при локальном введении ингибитора p38 MAPK.

Наличие в зоне формирования послеоперационного рубца прогениторных клеток фибробластического ряда, имеющих фенотип CD34+CD45+ у животных контрольной группы зарегистрировано только в срок 7 суток. В группе с введением блокатора p38 такое сочетание маркеров не зарегистрировано в течение всего срока наблюдения.

Выявление в зоне формирования рубца миофибробластов определялось по наличию положительной окраски на актин. Установлено, что как у животных контрольной группы, так и при введении блокатора p38 MAPK окрашивалось только небольшое число клеток на 3-и и 7-е сутки раневого процесса.

Наличие в зоне формирования рубца фиброкластов детектировали по специфическому окрашиванию на MMP9 клеток фибробластического ряда. У животных контрольной группы такие клетки в зоне рубца обнаружены только на 7-е сутки. В группе с применением блокатора p38 клетки с такими маркерами фиксировались на 3-и и 7-е сутки после моделирования послеоперационного рубца и характеризовались высокой интенсивностью специфического свечения.

Применение блокатора p38 MAPK изменяло экспрессию эндоглина. Так, у животных контрольной группы клетки фибробластического ряда в течение всего срока наблюдения не экспрессировали эндоглин. При применении блокатора p38 отмечалась экспрессия фибробластами эндоглина с 7-х по 30-е сутки. Таким образом, локальное введение блокатора p38 MAPK снижает привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону формирования рубца, повышает фиброкластическую активность, приводит к экспрессии эндоглина на поверхности фибробластов, что косвенно свидетельствует об активной перестройке внеклеточного матрикса.

***Изучение ультраструктуры клеток фибробластического ряда при
подавлении активности p38 MAPK***

Изучение влияния блокатора p38 MAPK на состояние фибробластов в очаге образования соединительной ткани показало, что у животных при применении

блокатора p38 резко снижается количество фибробластов в зоне формирующегося послеоперационного рубца. При этом фибробласты не имеют морфологических признаков активации — ядрышки не выражены, слабо развита эндоплазматическая сеть. Причем данная картина наблюдается весь период фибробластической фазы воспаления, начиная с 3 суток. Отражением низкой плотности клеток в очаге образования соединительной ткани и их невысокой функциональной активности является низкая плотность формирующегося коллагена. При этом коллагеновые волокна рыхлые, неплотно упакованные, в отличие от контрольной группы не образуют больших полей. На 3 и 7 сутки после моделирования раневого процесса при искусственном подавлении активности p38 MAPK каскада нами отмечена деструкция митохондрий, их отек, набухание крист. При этом у животных контрольной группы митохондрии были сохранены. По-видимому, блокада каскада запускает апоптоз клеток-фибробластов, реализующийся через нарушение энергетического обмена внутри клетки. Таким образом, изучение ультраструктуры фибробластов показало значительное влияние ингибитора p38 MAPK на функциональную активность клеток фибробластического ряда, что выразилось в снижении активности фибробластов и запуске митохондриального апоптоза клеток фибробластического ряда. Наше исследование подтвердило мнение, что при естественном течении репаративного процесса, а также при подавлении активности p38 MAPK основным источником фибробластов являются малодифференцированные фибробласты, пролиферирующие после повреждающего воздействия. Прогениторные клетки фибробластического ряда также вносят свой вклад в репарацию при естественном течении и появление данных клеток в зоне повреждения ограничено сроком 7 суток. В то же время локальное подавление активности p38 MAPK снижает хоуминг данных клеток в зону повреждения.

Важную роль в формировании и созревании соединительной ткани играет перестройка рубцовой ткани, в частности под действием ферментов — металлопротеаз. Зарегистрированная нами активизация фиброкластической активности при локальном подавлении p38 MAPK, несомненно, вносит

существенный вклад в ремоделирование формирующейся соединительной ткани. В итоге достигается изменение характеристик рубца в сторону формирования узкого малозаметного рубца.

Достигнутые результаты позволяют оценить блокаду p38 MAP-киназного пути как перспективный способ для управления процессом заживления хирургической раны.

ВЫВОДЫ:

1. Блокада p38 MAP-киназного сигнального каскада в начальном периоде заживления хирургической раны в значительной степени изменяет процесс воспаления и регенерации – снижает выраженность нейтрофильной инфильтрации, подавляется интенсивность фибробластической фазы воспаления.

2. Местное использование блокатора p38 MAPK SB 203580 уменьшает привлечение прогениторных клеток фибробластического ряда в зону хирургической раны, повышает фиброкластическую активность и статистически значимо снижает интенсивность коллагенообразования в зоне послеоперационного рубца с 3-х по 30-е сутки наблюдения.

3. Введение в рану блокатора p38 повышает прочностные характеристики формирующегося рубца – на 30-е сутки предел прочности статистически значимо превышает показатели контрольной группы – 9130 ± 341 против 7872 ± 237 кПа ($p < 0,05$).

4. Разработанный способ локального подавления p38 MAPK приводит к формированию статистически значимо более узкого послеоперационного рубца по сравнению с группой контроля $157,8 [120,11–206,45]$ мкм против $763,47 [334,1–1285,31]$ мкм ($p = 0,00001$) при сохранении прочностных характеристик рубца.

Рекомендации к практическому применению.

1. Создание новых материалов (лекарственных плёнок, шовного материала), эндопротезов с включением в их состав блокаторов p38 MAPK может способствовать улучшению косметического результата в пластической

и реконструктивной хирургии за счёт контроля над процессом воспаления и влияния на качественный состав образующегося послеоперационного рубца.

2. Полимерная рассасывающаяся плёнка, имеющая в своём составе блокатор p38 MAP-киназ SB 203580, может быть использована в качестве покрытия силиконовых имплантатов для эндопротезирования груди, ягодиц и голеней, что будет способствовать неосложнённому заживлению кожно-мышечной раны с образованием достоверно более тонкого рубца.

3. Использование блокаторов p38 MAPK в перспективе может иметь очень большое практическое значение для профилактики образования послеоперационных контрактур после различных видов эндопротезирования.

4. Разработанная методика хирургической кожно-мышечной раны может быть использована для изучения влияния различных местных факторов для получения более качественного результата в пластической хирургии при выполнении контурной пластики тела и аугментации груди при помощи имплантатов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Зеленин, Н.В. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста / И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, Н.В. Зеленин, Г.Б. Гранина // **Сибирский медицинский журнал** (Иркутск). – 2009. – №6. – С. 36-40.
2. Зеленин, Н.В. Подавление активности JNK MAPK в регуляции синтеза коллагена при раневом процессе / Г.Б. Гранина, Н.В. Зеленин, И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, С.А. Лепехова, В.Н. Зеленин // **Бюллетень ВСНЦ СО РАМН**. – 2010. – Т. 75. – N. 5 – С. 172-174.
3. Зеленин, Н. В. Заживление хирургической раны в условиях подавления активности p38 MAP-киназного каскада / Н. В. Зеленин, Г. Б. Гранина, Д. М. Шурыгин // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Мат. 68-ой открытой научно-практической конференция молодых учёных и студентов с международным участием, посвященной 75-летию ВолГМУ, сентябрь 2010. – Волгоград. – 2010. – С. 105-106.

4. Зеленин, Н.В. Механическая прочность рубцовой ткани в условиях подавления активности p38 MAP-киназы / Н.В. Зеленин, Г.Б. Гранина, И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин// **Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.** – 2010. – Т. 75. – N. 5. –С. 175-176.
5. Зеленин, Н.В. Течение раневого процесса в условиях подавления активности p38 MAP-киназы / Н.В. Зеленин, Г.Б. Гранина, Д.М. Шурыгин// Вопросы экспериментальной и клинической медицины.- Мат. 77 итоговой научно-практической студенческой конференции СНО им. И.И. Мечникова. - Иркутск. –2010. – С. 27.
6. Зеленин, Н. В. MAP-киназы как регуляторы роста соединительной ткани / И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, Н.В. Зеленин, Г.Б. Гранина, С.А. Лепехова // Международная конференция и Международная школа молодых ученых «Проблемы экологии» Чтения памяти профессора Михаила Михайловича Кожова. – Иркутск. – 2010. – С. 348.
7. Зеленин, Н. В. Влияние блокаторов p38 и JNK MAP киназ на репаративный процесс и экспрессию гладкомышечного α актина в поперечно-полосатой мускулатуре при повреждении / М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Г.Б. Гранина, Н.В. Зеленин// **Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.** – 2011. – Т. 80, –№ 4. – Ч. 1. – С. 295-297.
8. Зеленин, Н. В. Оптимизация заживления хирургической раны при модификации активности митогенактивируемой протеинкиназы группы jnk / Г.Б. Гранина, И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, Н.В. Зеленин // Инновационные технологии в медицине XXI века Материалы конференции. Научный Центр сердечно-сосудистой хирургии РАМН им. А.Н.Бакулева. – 2012. –С. 192-193.
9. Зеленин, Н. В. Оценка активности map-киназных систем при репаративном процессе с использованием лазерной конфокальной микроскопии / М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Г.Б. Гранина, Н.В. Зеленин, Н.И. Аюшинова // XIV международная молодежная конференция по люминисценции и лазерной физике Тезисы лекций и докладов. –2014. –С. 156-157.

10. Зеленин, Н. В. Использование блокатора p38 митогенактивируемой протеинкиназы для формирования послеоперационного рубца / И.А. Шурыгина, Н.Е. Мантурова, Н.В. Зеленин, Г.Б. Гранина, М.Г. Шурыгин// **Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.** – 2014. –№ 3. –С. 41-45.
11. Зеленин, Н. В. Активность MAP-киназных систем при репаративном процессе: оценка с использованием лазерной конфокальной микроскопии / М.Г. Шурыгин, И.А. Шурыгина, Г.Б. Гранина, Н.В. Зеленин, Н.И. Аюшинова // **Известия Российской академии наук. Серия физическая.** – 2016. – Т. 80, № 1. – С. 19-22.
12. Зеленин, Н. В. Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани / И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, Н.В. Зеленин, Н.И. Аюшинова // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2017. – № 16 (4). – С. 75-86.
13. Зеленин, Н. В. MAP-киназы в управлении репаративным процессом / И.А. Шурыгина, Н.И. Аюшинова, Е.Е. Чепурных, Н.В. Зеленин, Г.Б. Гранина, М.Г. Шурыгин// **Гены и клетки.** – 2017. – № 3. – С. 273-274.
14. N.V. Zelenin Influence of p38 mapk inhibitor on inflammation after surgical wound / I.A. Shurygina, M.G. Shurygin, N.V. Zelenin, G.B. Granina, S.A. Lepekhova// **OzBio2010 Combined Conference s Melbourne.** –September 26 - October 1. – 2010. – P. 230.
15. N.V. Zelenin Control on connective tissue formation by blocks of MAP-kinase mechanisms / I.A. Shurygina, M.G. Shurygin, N.V. Zelenin, G.B. Granina // **Asian Congress on Biotechnology: Shanghai, 11-15 May 2011.** – 2011. – P. 237.
16. N.V. Zelenin Mechanisms of connective tissue formation and blocks of mitogen activated protein kinase / I.A. Shurygina, M.G. Shurygin, N.I. Ayushinova, G.B. Granina, N.V. Zelenin // **Frontiers of Chemical Science and Engineering.** –2012. –Т. 6. –№ 2. –С. 232-237.
17. N.V. Zelenin Application of Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor SP 600125 for Wound Healing Control / I.A. Shurygina, M.G. Shurygin, G.B.

- Granina, N.V. Zelenin // *Journal of Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. - 2013. – Vol. 2. –Article: 9. – DOI: <http://dx.doi.org/10.7243/2050-1218-2-9>
18. N.V. Zelenin Using laser confocal microscopy to assess the activity of map kinase systems in the reparative process / M.G. Shurygin, I.A. Shurygina, G.B. Granina, N.V. Zelenin, N.I. Ayushinova // **Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics**. –2016. –Т. 80. – № 1. –С. 14-16.
 19. Зеленин, Н. В. Влияние блокатора p38 MAPK на дифференцировку фибробластов в зоне формирования послеоперационного рубца/ И.А. Шурыгина, Н.В. Зеленин, Г.Б. Гранина, М.Г. Шурыгин// **Патогенез**. – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 43-47.
 20. Зеленин, Н. В. Ингибирование сигнального каскада митогенактивированных протеинкиназ группы p38 как новая перспектива для улучшения качества послеоперационных рубцов / Н.В. Зеленин, Н.Е. Мантурова, М.Г. Шурыгин, Г.Б. Гранина, В.А. Уманец, И.А. Шурыгина// **Вопросы реконструктивной и пластической хирургии**. – 2018. –Т.21. – № 4 (67). – С. 13-19.
 21. Зеленин, Н.В. Перспективы получения более качественных послеоперационных рубцов/ Н.В. Зеленин, Н.Е. Мантурова, И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин, Г.Б. Гранина// VII Национальный конгресс «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология» –2018. – С. 104-105.