

Влияние интрадермального введения немодифицированного коллагена на пролиферативную активность клеток кожи экспериментальных животных

Б.Н. Сельская¹, Л.А. Мусина², Г.В. Иванова³, Ф.Х. Камилов¹

¹ – ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа

² – ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, Уфа

³ – ООО «Проммедэко», Уфа

Контактная информация: Сельская Бэла Натановна, selskaya-bela@yandex.ru

Иммуногистохимическим методом с использованием мышинных поликлональных антител изучена экспрессия маркеров пролиферации клеток антигена Ki-67 и фактора роста фагоцитов-1 (FGF-1) в коже самок крыс зрелого возраста (12-13 мес.) при внутридермальном введении методом мезотерапии немодифицированного бычьего коллагена типа I, в качестве аналога которого использовался отечественный препарат «Коллост® гель». Установлено, что немодифицированный коллаген стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток кожи и волосяных фолликул, фибробластов, эндотелия сосудов. Наиболее выраженная экспрессия изучаемых цитокинов наблюдается на 7-21-е сутки после инъекции коллагенового препарата.

Ключевые слова: кожа, пролиферация клеток, внутридермальное введение немодифицированного бычьего коллагена, антиген Ki-67, фактор роста фибробластов-1.

Введение

Коллагеновые препараты важны в репаративных и инволюционных процессах как естественный субстрат для адгезии, дифференцировки и роста клеток соединительной ткани. Ранее проведённые исследования показали, что интрадермальное введение препарата нереконструированного бычьего коллагена кожи экспериментальным животным вызывает в зонах инъекций стимуляцию биосинтеза основных биополимеров экстрацеллюлярного матрикса – коллагена, гиалуронана и протеогликанов [2, 3].

Цель исследования – оценить интенсивность пролиферации клеток кожи экспериментальных животных при вну-

тридермальном введении нереконструированного бычьего коллагена типа I методом мезотерапии.

Материалы и методы

Исследования проведены на 25-ти самках белых крыс зрелого (12-13 мес.) возраста массой 280-320 г. Исследования проводили с соблюдением этических норм и рекомендаций по гуманному обращению с животными (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»).

Под рауш-наркозом крысам контрольной группы внутридермально методом мезотерапии вводили стерильный изотонический р-р глюкозы, а животным опытной группы – препарат «Кол-

лост® гель» (ООО «Ниармедик плюс», Россия), содержащий 7% немодифицированный коллаген из кожи крупного рогатого скота в р-ре глюкозы из расчёта 0,06 мл на 100 г массы тела на боковые поверхности туловища (площадь 3х3 см) после предварительного удаления шерстяного покрова. На 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сут после первой инъекции препарата под лёгким эфирным наркозом животных выводили из эксперимента.

Для исследования использовали кожу в зонах введения препарата коллагена и р-ра глюкозы. Методом иммуногистохимии изучали уровни маркёров пролиферации – белок Ki-67 и фактор роста фибробластов-1 (FGF-1). Выявление Ki-67, определяющегося в ядрах пролиферирующих клеток, а FGF-1 – в цитоплазме [1], осуществляли с использованием мышиных поликлональных антител («Santa Cruz Biotechnology», США) и универсальной системы вторичной детекции для визуализации (биотиновая система детекции LECA BOND «Novocastra™», Германия). Окрашивание производили в гистостейнере для иммуногистохимии LECA BOND MAX

(«LECA», Германия). Срезы докрашивали р-ром гематоксилина. Подсчёт клеток осуществляли с помощью микроскопа LECA DM-5000 В. Окрашенные клетки считали в полях зрения при ув. х400 по каждой группе животных.

Статистическую обработку осуществляли, используя пакет программ Statistica 6.0 (Stat Soft) параметрическим методом.

Результаты и их обсуждение

У животных контрольной группы цитокин Ki-67 положительно выявлялся лишь в отдельных клетках базального слоя эпидермиса (рис. 1А). После внутридермального введения крысам препарата коллагена цитокин выявлялся во многих клетках базального слоя эпителия и фибробластических клетках в дермальной пластинке. Наибольшей эффективности пролиферация достигла на 7-е сут эксперимента (рис. 1Б).

На 21-е сут темпы пролиферативных процессов снижались. На 37-е сут после интрадермального введения препарата коллагена цитокин Ki-67 экспрессировали лишь отдельные клетки эпителиального слоя и клетки волосяных луковиц.

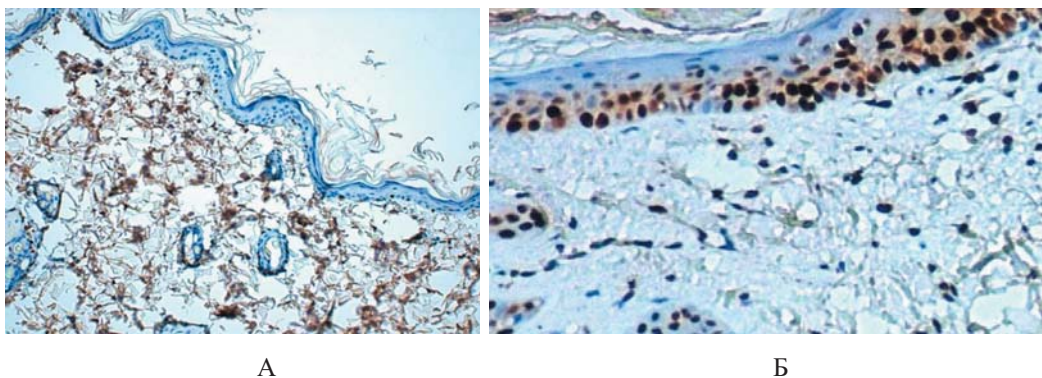


Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 7-е сут: А – после введения р-ра глюкозы, ув. х100; Б – после введения препарата коллагена, ув. х400. Докраска гематоксилином.

FGF, включая несколько путей передачи сигналов, оказывает модулирующее влияние на внутриклеточные события: коммитирование клеток, их пролиферацию, дифференцировку, миграцию, апоптоз [4]. По результатам иммуногистохимической реакции на выявление FGF-1 в коже крыс контрольной группы можно прийти к заключению, что во все сроки эксперимента цитокин экспрессировался слабо в цитоплазме лишь отдельных клеток (рис. 2А). После интрадермального введения препарата коллагена усиление экспрессии FGF-1 наблюдалось начиная с 4-х сут эксперимента. Максимальная экспрессия

цитокина выявлялась на 7-е и 21-е сут. При этом он экспрессировался различными клетками: макрофагами, отдельными фибробластами, эндотелиальными клетками, перицитами. Признаки выраженной экспрессии фактора роста выявлялись и в более глубоких слоях дермальной пластинки кожи, около волосяных луковиц (рис. 2Б).

Подсчёт клеток, экспрессирующих FGF-1, показал, что во все сроки эксперимента, начиная с 4-х сут, их количество статистически значимо выше в коже в зонах введения препарата коллагена по сравнению с контрольной зоной (табл.).

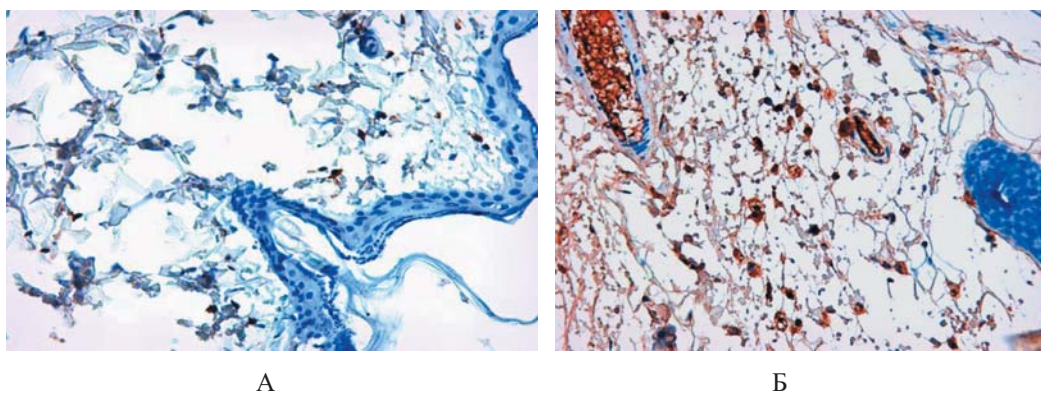


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление FGF-1 (↑) в цитоплазме клеток (коричневое окрашивание): А – на 7-е сут после введения р-ра глюкозы, ув. $\times 100$; Б – на 7-е сут после введения препарата коллагена, макрофаги, экспрессирующие фактор роста (↑). Докраска гематоксилином, ув. $\times 400$.

Таблица

Количество клеток кожи, экспрессирующих FGF-1, в зонах введения коллагенсодержащего препарата по сравнению с контрольной зоной (в поле зрения при ув. $\times 400$)

Период после введения, сут	Группа крыс		Р
	Контрольная (введение глюкозы)	Опытная (введение коллагена)	
2-е	5,50 $\pm$ 0,50	5,60 $\pm$ 0,60	>0,500
4-е	7,35 $\pm$ 0,74	15,10 $\pm$ 1,59	<0,002
7-е	6,75 $\pm$ 0,45	43,75 $\pm$ 2,38	<0,001
21-е	7,50 $\pm$ 0,64	35,85 $\pm$ 1,63	<0,001
37-е	6,55 $\pm$ 0,63	9,00 $\pm$ 0,75	<0,050

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что интрадермальное введение методом мезотерапии нереконструированного бычьего коллагена стимулирует пролиферацию клеток кожи. Однако механизмы запуска клетками собственного синтеза коллагена, неколлагиновых белков и др. компонентов межклеточного вещества для достижения основной цели – биоревитализации продуктами деградации коллагена – остаются не вполне ясными.

Выводы

Интрадермальное введение методом мезотерапии препарата нативного нереконструированного коллагена животным зрелого возраста в зонах инъекции стимулирует пролиферативные процессы эпителия, фибробластов, эпителиальных клеток волосяных фолликулов и эндотелия сосудов. Экспрессия маркеров пролиферации – белка Ki-67 и фактора роста фибробластов – наблюдается с 4-х суток после введения коллагена и максимально проявляется на 7-21-е сутки.

Список литературы

1. Иммуногистохимические методы: рук-во. Пер. с англ. / Под ред. Г.А. Франка, П.С. Малькова. – М., 2011. – 223 с.
2. **Камилов Ф.Х., Сельская Б.Н., Данилова О.В., Капулер О.М.** Метаболизм коллагена в коже экспериментальных животных при интрадермальной инъекции немодифицированного коллагена типа I // Вестник Удмуртского университета. – 2017. – Т. 27. – Вып. 3. – С. 356-361.
3. **Сельская Б.Н., Капулер О.М., Иванов В.Г., Камилов Ф.Х.** Обмен углеводов в коже в

области внутридермального введения препарата, содержащего немодифицированный коллаген типа I // Вестник Удмуртского университета. – 2017. – Т. 27. – Вып. 3. – С. 292-296.

4. **Chen L., Deny C.X.** Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases // Front. Biosci. – 2005. – No. 10. – Pp. 1961-1974.
5. **Jerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M., et al.** Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential // Lancet Oncol. – 2010. – V. 11. – No. 2. – Pp. 174-183.

References

1. Immunogistokhimicheskie metody: ruk-vo. Per. s angl. [Immunohistochemical methods: guidance. Translation from English]. Ed. by G.A. Frank, P.S. Malkov. Moscow. 2011. 223 p. (In Russian).
2. **Kamilov F.Kh., Selskaya B.N., Danilova O.V., Kapuler O.M.** Metabolizm kollagena v kozhe eksperimentalnykh zhivotnykh pri intradermalnoy in"ektsii nemodifitsirovannogo kollagena tipa I [Metabolism of collagen in the skin of experimental animals with intradermal injection of unmodified type I collagen]. Vestnik Udmurtskogo universiteta [Bulletin of the Udmurt University]. 2017. V. 27. Issue 3. Pp. 356-361. (In Russian).
3. **Selskaya B.N., Kapuler O.M., Ivanov V.G., Kamilov F.Kh.** Obmen uglevodov v kozhe v oblasti vnutridermalnogo vvedeniya preparata, soderzhashchego nemodifitsirovannyj kollagen tipa I [Carbohydrate metabolism in the skin in the area of intradermal administration of a preparation containing unmodified type I collagen]. Vestnik Udmurtskogo universiteta [Bulletin of the Udmurt University]. 2017. V. 27. Issue 3. Pp. 292-296. (In Russian).
4. **Chen L., Deny C.X.** Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases. Front. Biosci. 2005. No. 10. Pp. 1961-1974.
5. **Jerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M., et al.** Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. Lancet Oncol. 2010. V. 11. No. 2. Pp. 174-183.

Influence of intradermal administration of unmodified collagen on proliferative activity of skin cells of experimental animals

B.N. Selskaya, L.A. Musina, G.V. Ivanova, F.Kh. Kamilov

Immunohistochemical method using mouse polyclonal antibodies was used to study the expression of Ki-67 antigen cell proliferation markers and phagocytes-1 growth factor (FGF-1) in mature female rats (12-13 months) with intradermal mesotherapy of unmodified bovine collagen type I, as an analogue of which we used the domestic preparation "Collost® gel". It has been established that unmodified collagen stimulates the proliferation of skin epithelial cells and hair follicles, fibroblasts, and vascular endothelium. The most pronounced expression of the cytokines studied is observed on the 7-21th day after the injection of the collagen preparation.

Key words: skin, cell proliferation, intradermal administration of unmodified bovine collagen, Ki-67 antigen, fibroblast growth factor-1.