

АПОПТОЗ І ПРОЛІФЕРАЦІЯ КЛІТИН ГІПЕРТРОФІЧНИХ І МОЛОДИХ КЕЛОЇДНИХ РУБЦІВ

©Ю.Р. Барановський, В.М. Сегалов, А.У. Косенко

Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського

РЕЗЮМЕ. У 35 пацієнтів хірургічного відділення Кримського регіонального управління клінічної лікарні ім. Н.А. Семашко, що перебували на стаціонарному лікуванні у зв'язку з необхідністю проведення різних повторних оперативних втручань в місці попередньої операції, інтраопераційно сікся післяопераційний келоїдний та гіпертрофічний рубець. Проліферативну активність клітин епідермісу і дерми вивчали за допомогою моноклональних антитіл Ki-67 (MIB-1). Для оцінки процесів програмованої клітинної загибелі в келоїдних рубцях використовували моноклональні антитіла до Fas-рецепторів (CD 95 / Apo 1) і Bcl-2. Протеїн p53 використовувався для визначення числа клітин, що знаходяться у стадії апоптозу. У епідермісі гіпертрофічних рубців процеси апоптозу пригноблювані на тлі посиленої проліферації епідермоцитів, що приводить до його гіпертрофії. Збільшений вміст негативного регулятора апоптозу Bcl-2, що не дозволяє Fas-індукованим кератиноцитам вступити в апоптоз. У епідермісі молодих келоїдних рубців, незважаючи на активні процеси проліферації, кератиноцити активно елімінуються апоптозом, що стримує гіпертрофію епідермісу. У зоні зростання молодих келоїдних рубців спостерігається активна проліферація клітин, апоптоз яких інгібується Bcl-2.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: келоїдний рубець, гіпертрофічний рубець, апоптоз, проліферація.

Вступ. Процеси загоєння ран приводять до рубцевих утворень різного ступеня вираженості: від малопомітних безсимптомних рубців до патологічних, гіпертрофічних або келоїдних, які викликають естетичні і функціональні порушення. До формування подібного роду рубців призводить зміна нормального перебігу процесу загоєння рани [1]. Апоптоз є морфологічним проявом реалізації внутрішньоклітинної програми самознищення клітини і відрізняється від інших відомих форм загибелі клітини високою організацією і чіткістю молекулярного каскаду реакцій [2]. Апоптоз відіграє важливу роль як в патогенезі шкірних хвороб, так і в підтримці гомеостазу здорової шкіри. Деякі автори вважають, що масова загибель фібробластів шляхом апоптозу сприяє дозріванню тканини келоїду [3, 4]. Маловивченими залишаються процеси проліферації та їх взаємовідношення з апоптозом в молодих келоїдних рубцях, що ростуть. У гіпертрофічних рубцях вони не вивчалися взагалі.

Мета дослідження - вивчення індексу проліферації і апоптозу кератиноцитів епідермісу і клітин різних зон дерми молодих келоїдних рубців епідермісу і дерми гіпертрофічних рубців осіб, що мають ці рубці після оперативних втручань.

Матеріал і методи дослідження. Нами вивчено 35 пацієнтів хірургічного відділення Кримського регіонального управління клінічної лікарні ім. Н.А. Семашко. Хворі перебували на стаціонарному лікуванні у зв'язку з необхідністю проведення різних повторних оперативних втручань в місці попередньої операції. Патологічний матеріал брали інтраопераційно. Сікли післяопераційний рубець і з нього вирізували матер-

іал біопсії. Шматочок рубця швидко фіксували 10 % забуферним нейтральним формаліном відразу ж після операції. Матеріал заливали в парафін і з них виготовляли серійні зрізи товщиною 5-6 мкм. Проліферативну активність клітин епідермісу і дерми гіпертрофічних і келоїдних рубців вивчали за допомогою моноклональних антитіл Ki-67 (MIB-1), які ідентифікують ядерний антиген, присутній у більшості проліферативних клітин. Антиген Ki-67, визначений відповідними моноклональними антитілами, короткоживучий протеїн, що руйнується впродовж 1-1,5 години. Завдяки цьому Ki-67 виявляється тільки в клітинах, які діляться, оскільки не встигає накопичуватися і не залишається в спокійних клітинах [5].

Для оцінки процесів програмованої клітинної загибелі в келоїдних рубцях використовували моноклональні антитіла до Fas-рецепторів (CD95/Apo1) і Bcl-2. Головну роль в розвитку апоптозу відіграє так званий "дикий" ("wild") тип гена - онкосупресора wt p53 і кодований ним протеїн p53 [6]. У дослідженнях він використовується для визначення кількості клітин, що знаходяться у стадії апоптозу.

Імуногістохімічні реакції проводили в парафінових зрізах патологічних рубців з використанням відповідних первинних антитіл Ki-67, CD 95/Apo 1, Bcl-2 і p53 (DAKO) і системи візуалізації LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin). Ядра дофарбовували гематоксиліном. Теплове демаскування антигенів проводили в мікрохвильовій печі Samsung M1915 NR при фіксованій потужності 800 Вт протягом 2 хвилин. Індекс проліферації і апоптозу вивчали на 40 випадково вибраних полях зору мікроскопа гістологічних зрізів при збільшенні x1350 після підрахунку 1000

ядер або клітин, відповідно, з подальшим обчисленням показника у відсотках в середньому за наслідками всіх вивчених біоптатів.

Результати й обговорення. У гіпертрофованому епідермісі гіпертрофічного рубця спостерігається активна проліферація клітин паросткового шару. За допомогою моноклонального антитіла Ki 67(MIB-1), яке ідентифікує ядерний антиген, котрий присутній у більшості проліферативних клітин, визначали індекс проліферації. На 100 епітеліоцитів базального шару доводиться $81 \pm 0,02$ ($81\% \pm 0,02$) клітин з міткою Ki-67 в ядрі. На 100 епітеліоцитів шипуватого шару доводиться $24 \pm 0,001$ ($24\% \pm 0,001$) клітин з міткою Ki-67 в ядрі. У дермі мітка відсутня.

У ядрі клітини існують спеціальні молекулярні сенсори, які реагують на пошкодження ДНК і запускають каскад реакцій, що зрештою служить причиною зупинки клітинного циклу і активації апоптозної загибелі [2]. Активуються репресори клітинної загибелі, головним чинником яких, що реагують на пошкодження ДНК, є білок p53. Активований p53 активує експресію білка Bax і пригніблює експресію Bcl-2 [7]. У здоровій шкірі p53 не виявляється [8]. Білок p53 зустрічається в епідермісі гіпертрофічних рубців в $46 \pm 0,01$ ($46\% \pm 0,01$) клітинах на 100 кліток базального шару і в $9 \pm 0,0001$ ($9\% \pm 0,0001$) клітинах на 100 клітин шипуватого шару. У дермі мітка відсутня. Вважається, що в епідермісі саме апоптоз клітин є тим механізмом, який на тлі активної проліферації регулює товщину епідермісу [9]. У гіпертрофічних рубцях процес апоптозу явно не достатній, що призводить до потовщення епідермісу.

Готовність клітин до апоптозу визначається експресією Fas (CD 95 / Apo 1) - рецепторів. Білок Fas (CD 95 / Apo 1) є мембранним рецептором, що за структурою належить до рецепторів сімейства чинника некрозу пухлин [2]. Приблизно 80 амінокислотних залишків утворюють домен смерті (DD), який залучається до білок-білкової взаємодії з білками цитоплазми, генеруючи сигнал смерті. Ген Fas у людини локалізований в довгому плечі 10-ї хромосоми і складається з 9 екзонів. Взаємодія Fas з FAS-L (ліганд) або з моноклональними антитілами призводить до апоптозу клітини [10]. Встановлено, що на 100 кліток базального шару епідермісу гіпертрофічних рубців мітка є на мембранах і в ядрах $42 \pm 0,02$ ($42\% \pm 0,02$) кліток, а на 100 кліток шипуватого шару - в $11 \pm 0,001$ ($11\% \pm 0,001$) клітинах. У дермі мітка відсутня.

Негативним регулятором апоптозу, що руйнується каспазами, є Bcl-2 [6]. Шляхом зміни транскрипції промітотичних генів Bcl-2 підтримує клітинний ріст і утруднює входження клітин в

клітинний цикл [8, 11]. Він позитивно впливає на транскрипцію генів антиапоптичних білків і одночасно інгібує експресію білків типу Bax і Bcl-2 [12]. Bcl-2 подовжує життя клітин, блокуючи апоптоз навіть в умовах стимуляції препаратами хіміотерапії, гіпертермією, чинниками некрозу пухлин і трансфекцією генів p53 або C-myc. Зменшення кількості Bcl-2 індукує розвиток апоптозу [13]. Цей білок є перспективною мішенню для різних маніпуляцій з метою дії на бажану долю клітин. Встановлено, що на 100 клітин базального шару епідермісу гіпертрофічних рубців $27 \pm 0,02$ ($27\% \pm 0,02$) клітин містять активований даний ген. Отже, 27 клітин із ста не вступають в апоптоз. У клітинах шипуватого шару і дерми мітка відсутня. Саме інгібітор Bcl-2, який зв'яже його і дозволить Fas-індукованим клітинам вступити в апоптоз, буде патогенетичним лікарським засобом для лікування гіпертрофії епідермісу гіпертрофічних рубців.

В епідермісі молодих келоїдних рубців виявляються активні процеси проліферації. Мітка локалізується в ядрах клітинах базального шару - на 100 клітин доводиться $85 \pm 0,01$ ($85\% \pm 0,01$) проліферувальних клітин. У шипуватому шарі бензидинова мітка зустрічається на 100 клітин в $26 \pm 0,002$ клітинах. У дермі мітка присутня в округлих клітинах, схожих на клітини крові. Вони є в судинах і між колагеновими волокнами зони зростання. Можливо, це проліферувальні клітини судин, які поповнюють популяцію фібробластів [14].

Встановлено, що в епідермісі молодих келоїдних рубців білок p53 експресується в епідермоцитах паросткового шару. На 100 епітеліоцитів базального шару доводиться $95 \pm 0,02$ ($95\% \pm 0,02$) клітин з міткою в ядрі. На 100 епітеліоцитів шипуватого шару виявлено $14 \pm 0,001$ ($14\% \pm 0,001$) клітин з міткою. Це свідчить, що, незважаючи на активні процеси проліферації, кератиноцити також активно елімінуються за рахунок процесів апоптозу, який, за нашими даними, відбувається активніше, ніж проліферація. Можливо, через це в келоїдному рубці немає значної гіпертрофії епідермісу.

Експресія білка Fas, що свідчить про те, що епітеліоцити готові до апоптозу, була виявлена в клітинах базального і шипуватого шару (рис. 1). На 100 клітин базального шару мітка локалізується на мембранах і в ядрах $86 \pm 0,02$ кліток ($86\% \pm 0,02$). На 100 клітин шипуватого шару доводиться $34 \pm 0,002$ ($34\% \pm 0,002$) клітин з мітками в цитоплазмі або в ядрі. У дермі мітки немає.

Bcl-2 негативний регулятор апоптозу, який гальмує вступ клітин до апоптозу [8]. За нашими даними, інгібітор апоптозу Bcl-2 присутній в

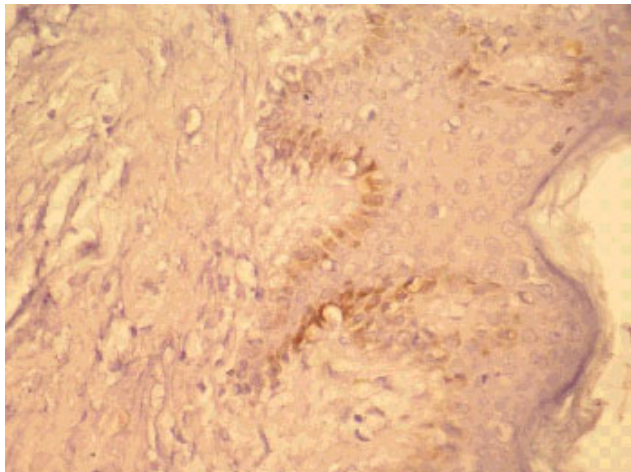


Рис. 1. Fas рецептори на епідермоцитах паросткового шару молодого келоїдного рубця. Забарвлення CD 95 з дофарбуванням ядер гематоксином. Візуалізація в системі LSAB. Збільшення: об. 40, ок. 10.

клітинах паросткового шару епідермісу молодих келоїдних рубців. Мітка локалізується в ядрах клітин базального шару. На 100 епітеліоцитів доводиться $96 \pm 0,03$ ($965 \pm 0,03$) клітин з Bcl-2. На 100 епітеліоцитів шипуватого шару доводиться $11 \pm 0,002$ ($11\% \pm 0,002$) клітин з міткою.

У глибокій зоні і зоні росту дерми зустрічаються округлі клітини з міткою. Такі клітини лежать в капілярах і між колагеновими волокнами поза капілярами. Значить, такі клітини проліферують (у них є Ki 67 позитивні рецептори) і не

ЛІТЕРАТУРА

1. Peled Z.M., Chin O.S., Liu W., Galliano R., Longaker M.T. Response to tissue injury // Clin Plast Surg. – 2000. – Vol. 27, № 4. – P. 489-500.
2. Цымбалюк В. И., Медведев В. В. Нейрогенные стволовые клетки. – К.: "Коваль", 2005. – 596 с.
3. Kischer C.W. The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: a review. // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. – Vol. 24, № 2, 1992. – 281-296 p.
4. Brown N.J., Willoughby D.A. Apoptosis, necrosis, and proliferation: possible implications in the etiology of keloids // Am. J. pathology. – Vol. 149, № 5, 1996. – 1441-1447 p.
5. Cell proliferation in the growing human heart: MIB-1 immunostaining in preterm and term infants at autopsy // V. Huttenbach, M. L. Ostrowski, D. Thaller, H. S. Kim // Cardiovasc. Pathol. – 2001. – Vol. 10, N 3. – P. 119-123.
6. Fesus L. P., Davis J. A., Piacentini M. Apoptosis; Molecular mechanisms in programmed cell death // Europ. J. Cell Biol. – 1991. – Vol. 747. – P. 195-204.
7. Sionov R. V., Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death // Ontogene. – 1999. – V. 18. – P. 6145-6157.
8. Снарская Е. С., Молочков В. А. Иммуитет и особенности клеточной иммуногистохимии при базально- и плоскоклеточном раке кожи (Обзор литературы) // Российский журнал кожных и венерических болезней // 2002. – № 5. – С. 4-9.
9. Казанцева И. А. Апоптоз и его роль в патологии кожи // Российский журнал кожных и венерических болезней – 2000. – № 4. – С. 17-22.
10. Роль системы Fas / Fas-L в индукции апоптоза гепатоцитов при хронических вирусных гепатитах / Е.В. Дмитриева, Е.Ю. Москалева, Е.А. Коган, А.О. Буеверов, Н.Н. Белушкина, В.Т. Ивашкин, У.С. Северин, М.А. Пальцев // Арх. пат. – 2003. – № 6. – С. 13-17.
11. Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival // Science. – 1998. – V. 281. – P. 1322-1326.
12. Rich T., Allen R. L., Wylie A. H. Defying death after DNA damage // Nature. – 2000. – V. 407. – P. 777-783.
13. Белушкина Н. Н., Северин С. Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // Арх. пат. – 2001. – № 1. – С. 51-59.
14. Келоидные рубцы / В.В. Шафранов, Е.Н. Борхунова, А.В. Таганов, Н.Г. Короткий, В.А. Виссарионов, А.Г. Стенько. М., 2003. – 192 с.
15. Ярилин А. Апоптоз // Эстетическая медицина. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 111-123.
16. Chang S. E., Kim K. J., Ro K. H. Sphingosine may have cytotoxic effects via apoptosis on the growth of keloid fibroblasts // J. Dermatol. – 2004. – Vol. 31. – P. 1-5.