

иммунологической реактивности, что является прогностически неблагоприятным фактором ускорения старения и возможности активации процессов связанных с онкогенезом.

Список литературы

1. Zhukov V. I. Detergency – modulatory radiomimeticheskikh effektiv / V. I. Zhukov, V. V. Myasoedov, V. I. Piven [i dr.] // – Belgorod, - 2000. – 376 s.
2. Zhukov V. I. Prostyie i makrotsiklicheskie efiry: Nauchnyie osnovy ohrany vodnyih obyektov / V. I. Zhukov, L. D. Popova, O. V. Zaytseva [i dr.] // – Kharkov, Tornado, - 2000. – 498 s.
3. Zhukov V. I. Ftoridy: biologicheskaya rol i mehanizm deystviya / V. I. Zhukov, O. V. Zaytseva, V. I. Piven [i dr.] // – Belgorod, - 2006. – 220 s.
4. Kratenko R. I. Biologicheskaya aktivnost kraun-efirov v svyazi s problemoy ohrany vodnyih obektov / R. I. Kratenko // – Kharkov, HGMU, - 2001. – 205 s.
5. Scherban N. G. Biohimicheskie mehanizmy radiomimeticheskikh effektiv poverhnostno-aktivnyih veschestv / N. G. Scherban, V. I. Zhukov, V. V. Myasoedov [i dr.] // – Kharkov, „Rarityy Ukrainy”, - 2012. – 126 s.

Реферати

**СТАН ІМУНОБІОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ
ТВАРИН В УМОВАХ ТРИВАЛОГО
СУБТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ЛАПРОКСИДІВ**
Щербань М. Г., Резуєнко Ю. К., Кучерявченко М. О.,
Ніколаєва О. В.

Вивчено вплив субтоксичних доз лапроксидів Л-303 та Л-500 на алергенні властивості і стан клітинного та гуморального імунітету експериментальних тварин. Тестування лапроксидом Л-303 виявило клінічні та шкірні прояви сенсibilізації тварин, а також відсутність таких при тестуванні Л-500. У дозах 1/100 та 1/1000 LD₅₀ Л-303 інгібує клітинний і гуморальний імунітет, синтез ДНК, РНК та білка, стимулює розвиток прозапальних реакцій. Лапроксид Л-500 у дозі 1/100 LD₅₀ інгібує клітинний і гуморальний імунітет, синтез ДНК, РНК та білка на тлі активації пробластомних цитокінів. Встановлено, що Л-500 у 1/100 LD₅₀, а Л-303 у 1/100 і 1/1000 LD₅₀ формують розвиток імунологічної недостатності та дисфункції імунологічної реактивності.

Ключові слова: ксенобіотики, лапроксиди, сенсibilізація, імунологічна недостатність.

Стаття надійшла 19.09.2014 р.

**THE STATE OF IMMUNOBIOLOGICAL REACTIVITY
IN ANIMALS IN RESPONSE TO PROLONGED
SUBTOXIC EXPOSURE TO LAPROXIDES**
Cherban N. G., Rezenenko U. K., Kucheriavchenko M. A.,
Nikolaeva O. V.

The research deals with the study of the effect exerted by subtoxic doses of laproxides L-303 and L-500 on allergenic properties as well as on the state of cellular and humoral immunity in experimental animals. Laproxide L-303 testing determined clinical and skin manifestations of sensibilization in animals and their absence when testing L-500. In the dosage of 1/100 and 1/1000 LD₅₀ L-303 inhibits cellular and humoral immunity, DNA, RNA and protein synthesis, induces pro-inflammatory reactions. Laproxide L-500 in the dosage of 1/100 LD₅₀ inhibits cellular and humoral immunity, suppresses DNA, RNA and protein synthesis with underlying activation of pro-tumor cytokines. L-500 in the dosage of 1/100 LD₅₀, L-303 in the dosage of 1/100 and 1/1000 LD₅₀ have been found to condition the development of immunological deficiency and the dysfunction of immunological reactivity.

Key words: xenobiotics, laproxides, sensibilization, immunological deficiency.

Рецензент Бобирьов В. М.

УДК 612.79:612.67.014.3

М. С. Шкумат, Ю. І. Леонів, І. М. Пинель
ДУ “Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України”, м. Київ

ВПЛИВ IGF-1 НА ЗАГОСННЯ РАН ШКІРИ ПРИ СТАРІННІ У МИШЕЙ ЛІНІЇ FVB 3 ТРАНСГЕНОМ K14SIGF1

Одним із основних факторів, які можуть здійснювати вплив на стан та швидкість процесів регенерації шкіри є IGF-1. Проведено морфологічне дослідження ран шкіри мишей лінії FVB дикого типу та трансгенних тварин K14/mIGF-1 різного віку. Показано збільшення площі та товщини регенеруючого епітелію у рані трансгенних тварин порівняно з диким типом.

Ключові слова: шкіра, загоєння ран, старіння, IGF-1.

При пошкодженні шкіри ініціюється серія подій, які спрямовані на регенерацію, принаймні часткову, ушкодженої тканини [1, 7, 11]. Це складний процес, що включає в себе кілька етапів (основні – запалення, проліферації та дозрівання) і вимагає участі клітин багатьох типів (тромбоцитів, нейтрофілів, макрофагів, кератиноцитів, фібробластів, ендотеліальних та нервових клітин, лімфоцитів тощо) [7].

Спосіб, з допомогою якого різні популяції клітин модулюють функції інших клітинних популяцій, а також роль різних гормонів та факторів росту в цьому процесі становлять великий інтерес. Один з гормонів, що впливає на процес регенерації – гормон росту (GH). Він успішно використовується для лікування дефектів росту, в якості чинника стратегії анти-старіння [5]. Багато ефектів GH опосередковується через інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1) [6]. IGF-1 є

мітогеном для кератиноцитів [8], і це стимулює вироблення колагену, глікозаміногліканів і протеогліканів синтезу фібробластів шкіри. Основним джерелом циркулюючого IGF-1 в післяпологовий період життя є печінка, але IGF-1 також може бути вироблений і в багатьох інших тканинах, де він має паракринну активність.

У контексті шкіри, IGF-1 був визначений в якості активного паракринного стимулятора росту, що виділяється фібробластами і макрофагами для кератиноцитів у культурі клітин [2] для стимуляції ненаправленої міграції кератиноцитів [3]. Для IGF-1 також був продемонстрований ефект, як лікувального засобу для прискорення загоєння ран шкіри – шляхом стимуляції впливу фібробластів на синтез колагену на додачу до свого мітогенного впливу на кератиноцити і фібробласти [9, 11]. В кератиноцитах IGF-1 стимулює проліферацію [15] і впливає на морфогенез волосяного фолікула [10, 12, 13]. Миші з виключеним IGF-1 рецептором вмирають незабаром після народження від дихальної недостатності і мають аномально тонкий і напівпрозорий шар епідермісу зі зменшеною кількістю волосяних фолікулів [10].

Досі нез'ясовані функції і механізм впливу IGF-1 на загоєння ран, але було чітко продемонстровано його вплив на цей процес. Так зниження рівня IGF-1, з віком, негативно впливає на процес загоєння ран шкіри [4]. Зокрема на реепітелізації, гемостаз, запалення та ангіогенез. Ці порушення присутні в найрізноманітніших тканинах, в тому числі міокарда, скелетних м'язів, нервах та шкірі [16].

Запальна відповідь є необхідною умовою для початку репарації рани. На молекулярному рівні, підвищення рівня mIGF-1 може значно скоротити активність прозапальних цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин альфа (TNF α) та інтерлейкіну 1 бета (IL-1 β) і коректує вплив СС-хемокіна який приймає участь у привабленні моноцит / макрофагів.

Метою роботи було вивчення особливостей впливу трансгенного mIGF-1 на стан шкіри старих тварин, оцінка вікових особливостей швидкості загоєння ран та вплив на ці процеси трансгенного mIGF-1; аналіз імунологічних та молекулярно-біологічних механізмів дії mIGF-1 на процеси регенерації шкіри у молодих тварин та при старінні.

Матеріал та методи дослідження. Експерименти були проведені на молодих (3-4 міс) і старих (23-25 міс) мишах-самцях лінії FVB з трансгеном K14sIGF1 (tg) та без нього (wt). Миші були надані Європейською молекулярно біологічною лабораторією (ЕМБЛ) [14] і утримувалися на базі віварію Інституту геронтології.

Модель пошкоджень шкіри. Всі маніпуляції з тваринами проводилися під кетаміновим наркозом (10 мг/кг). На спинній ділянці хутро видаляли голінням, шкіру промивали 70% етанолом, і наносили чотири рани на всю товщину шкіри (5 мм в діаметрі). На період загоєння тварини були розміщені індивідуально. На 5 та 8 день після травми, під кетаміновим наркозом, у дослідних тварин вирізали рану та 3 мм оточуючої шкіри. Рани розрізалися навпіл, у напрямку росту хутра. Одна половина зразку була взята та оброблена для морфологічного дослідження. Інша половина зразку була заморожена і зберігалася при -80°C до виділення РНК. Зовнішня частина рани та гранульозна тканина зберігалися і оброблялися окремо.

Зразки шкіри/рани були переведені в парафін та отримані зрізи товщиною 7 мкм. Потім за допомогою ксилолу, регідратовані в етанол. Зрізи були проаналізовані після фарбування по Масону, трикольорове фарбування (Sigma-Aldrich). Вивчення зрізів проводили з допомогою світлового мікроскопа (Leica DC500).

Зображення були отримані і оброблені за допомогою програмного забезпечення Adobe Photoshop. Для кількісного морфометричного аналізу площі, товщини регенеруючого епітелію (потовщеної ділянки шкіри); довжини регенеруючого епітелію; довжини відкритої рани; загальної довжини рани (суми довжини регенеруючого епітелію і відкритої рани) було використано програмне забезпечення "Image J".

Статистичну обробку даних проводили методом Фішера (при $p < 0,05$ різницю вважали достовірною). Для порівняння між групами використовували програмне забезпечення ANOVA для декількох груп або непарний t-тест на дві групи. Статистичну різницю вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. З літературних джерел відомо, що при старінні спостерігається зменшення товщини епідермісу, послаблення зв'язків між рогуотворюючими клітинами, зменшення кількості меланоцитів та клітин Лангерганса. Відзначається ущільнення межі епідермісу і дерми. Дерма поступово атрофується за рахунок зниження вмісту колагену, еластину та основної речовини, що пов'язано зі зменшенням кількості фібробластів. Також зменшується кількість тучних клітин та кровоносних судин в дермі. А це, в

свою чергу, призводить до погіршення васкуляризації, зменшення числа волосяних фолікулів та кількості потових залоз.

Нами було проведено морфологічне дослідження шкіри тварин дикої та трансгенної лінії різного віку. Попередні результати досліджень свідчать, що у молодих трансгенних тварин не виявлено істотної різниці у таких показниках структури шкіри, як товщина та архітектура епітелію, та товщина сполучної тканини – вони відповідали аналогічним показникам лінії мишей дикої типу.

Різниця була виявлена в структурі волосяного покриву – густина шерсті підвищувалась, та у товщині прошарку жирової тканини, що, у свою чергу, призвело до збільшення загальної товщини зрізу. У старих тварин під впливом IGF-1 було виявлено лише збільшення товщини сполучної тканини в порівнянні з аналогічним показником у тварин дикої лінії (табл.).

Таблиця

Морфологічні показники стану шкіри мишей дикої та трансгенної лінії різного віку

Вікові групи	Лінії тварин											
	wt					tg+/+						
	Товщина, мм				Густина хутра, шт/мм ²	Густина хутра, шт/мм	Товщина, мм				Густина хутра, шт/мм ²	Густина хутра, шт/мм
	епітелію	СТ	зрізу	жирової тканини			епітелію	СТ	зрізу	жирової тканини		
Старі	0,030±0,003	0,169±0,016	0,607±0,066	0,287**±0,044	21,176±1,678	9,570±0,998	0,025*±0,003	0,238##±0,010	0,530**±0,057	0,167*±0,023	20,403**±2,207	8,444**±0,960
Молоді	0,027±0,002	0,181±0,006	0,546±0,053	0,133±0,011	29,716±3,925	11,070±1,685	0,038±0,006	0,255±0,037	0,786#±0,028	0,355##±0,066	47,960±7,839	31,183#±8,602

Примітки: 1. * – P(U) < 0,05 відносно молодих тварин відповідної лінії. 2. ** – P(U) < 0,01 відносно молодих тварин відповідної лінії. 3. # – P(U) < 0,05 відносно тварин дикої лінії відповідного віку. 4. ## – P(U) < 0,01 відносно тварин дикої лінії відповідного віку.

З літературних джерел відомо, що гістологічними ознаками старіння шкіри є зменшення товщини епідермісу та сили зчеплення клітин, кількості волосяних одиниць, кількість і розміри клітин дерми, щільність міжклітинної речовини, кількість колагенових і еластичних волокон, сіткі капілярів і сплюснення сосочків дерми.

В епідермісі постійно відбуваються оновлення і специфічне диференціювання клітин – кератинізація. З віком швидкість ділення клітин базального шару знижується, що призводить до уповільнення відновлення епідермісу та накопичення дефектних клітин.

В наших дослідженнях у тварин дикої лінії не було виявлено виражених вікових змін. Ми спостерігали тенденцію до зниження густоти хутряного покриву та товщини сполучної тканини. Вірогідно у старих тварин дикої лінії збільшувався прошарок жирової тканини (табл.).

В той же час слід зазначити, що вікові зміни в показниках стану шкіри тварин трансгенної лінії були більш виражені. Ми спостерігали істотне зменшення товщини епітелію, жирової тканини та зрізу шкіри у старих тварин лінії tg+/+ у порівнянні з молодими тваринами. У них відбувалось також істотне зменшення густоти хутряного покриву (табл.).

Результати дослідження свідчать, що шкіра старих tg+/+ трансгенних тварин має більш виражені вікові зміни у порівнянні з молодими тваринами відповідної лінії. В той же час ми не виявили статистично доведених відмінностей між показниками, що вивчалися, у старих тварин дикої та трансгенної лінії.

Навпаки, у старих трансгенних тварин у порівнянні з дикою лінією такого ж віку спостерігалась більша товщина епітелію, що може свідчити про позитивний вплив трансгенного tg+/+ на стан шкіри старих тварин. Але остаточні висновки можна буде зробити лише після

аналізу рівня продукції IGF-1 у тканині шкіри при старінні, яке передбачається провести наступного року.

Висновки

1. Результати дослідження свідчать, що показники стану шкіри старих IGF1^{+/+} трансгенних тварин виявляють більш виражені вікові зміни у порівнянні з молодими тваринами відповідної лінії.
2. У старих трансгенних тварин у порівнянні з дикою лінією такого ж віку спостерігалась більша товщина епітелію, що може свідчити про наявність позитивного впливу трансгенного IGF1^{+/+} на стан шкіри старих тварин. Але остаточні висновки можна буде зробити лише після аналізу рівня продукції IGF1 у тканині шкіри при старінні.

Список літератури

1. Auf dem Keller U. Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds / U. Auf dem Keller, A. Kümin, S. Braun // Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.– 2006.– Vol.11.– P. 106–111.
2. Barreca A. In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors / A. Barreca, M. De Luca, P. Del Monte [et al.] // J. Cell Physiol.– 1992.– Vol.151, No. 1.– P. 262–268.
3. Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own risk / J. Blenis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1993.– Vol. 90, No. 13.– P. 5889–5892.
4. Blakytny R. Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers / R. Blakytny, E. B. Jude, J. Martin-Gibson [et al.] // J. Pathol.– 2000.– P. 589–594.
5. Cummings D. Growth Hormone Therapy in Adults / D. Cummings, G. Merriam // Annual Review of Medicine.– 2003.– Vol. 54, No. 1.– P. 513–533.
6. Green H. A dual effector theory of growth-hormone action / H., M. Green, Morikawa, T. A. Nixon // Differentiation.– 1985.– Vol. 29, No. 3.– P. 195–198.
7. Grazul-Bilska A. Wound healing: The role of growth factors / A. Grazul-Bilska, M. Johnson, J. Bilski [et al.] // Drugs Today.– 2003.– Vol.39, No. 10.– P. 787–795.
8. Eming S. Targeted expression of insulin-like growth factor to human keratinocytes: modification of the autocrine control of keratinocyte proliferation / S. Eming, R. Snow, M. Yarmush [et al.] // J. Invest. Dermatology.– 1996.– Vol.107, No. 1.– P. 113–120.
9. Guler H. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats / H. Guler J. Zapf, E. Scheiwiller [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1988.– Vol.85, No. 13.– P. 4889–4893.
10. Johansson O. γ -melanocyte stimulating hormone (γ -MSH)- like immunoreactivity is present in certain normal human keratinocytes / O. Johansson, O. Peng Yue Liu // Exp. Dermatology.– 1993.– Vol.2, No. 5.– P. 204–208.
11. Martin P. Wound Healing - Aiming for Perfect Skin Regeneration / P. Martin // Science.– 1997.Vol. 276, No. 5309.P. 75-81.
12. Philpott M. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro / M. Philpott, D. Sanders, T. Kealey // J. Invest. Dermatology.– 1994.– Vol.102, No. 6.– P. 857–861.
13. Rudman S. The Role of IGF-I in Human Skin and its Appendages: Morphogen as Well as Mitogen? / S. Rudman, M. Philpott, G.Thomas [et al.] // J. Invest. Dermatology.– 1997.– Vol.109, No. 6.– P. 770–777.
14. Semenova E. Overexpression of mIGF-1 in keratinocytes improves wound healing and accelerates hair follicle formation and cycling in mice / E. Semenova, H. Koegel, S. Hasse [et al.] // The American J. Pathology.– 2008.– V.173, No. 5.– P. 1295–1310.
15. Tavakkol A. Expression of Growth Hormone Receptor, Insulin- Like Growth Factor 1 (IGF-1) and IGF-1 Receptor mRNA and Proteins in Human Skin / A. Tavakkol, J. Elder, C. Griffiths [et al.] // J. Invest. Dermatology.– 1992.– Vol.99, No. 3.– P. 343–349.
16. Wetzler C. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair / C. Wetzler. H. Kampfer, B. Stallmeyer [et al.] // J. Invest. Dermatol.– 2000.– Vol.115, No. 1.– P. 245–253.

Реферати

ВЛИЯНИЕ IGF-1 НА ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН КОЖИ ПРИ СТАРЕНИИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ FVB C ТРАНСГЕНОМ K14/mIGF-1

Шкумат М.С., Леонов Ю.И., Пишель И.М.

Одним из основных факторов, которые могут осуществлять влияние на состояние и скорость процессов регенерации кожи является IGF-1. Проведено морфологическое исследование ран кожи мышей линии FVB дикого типа и трансгенных животных K14/mIGF-1 разного возраста. Показано увеличение площади и толщины регенерирующего эпителия в ране у трансгенных животных в сравнении с диким типом.

Ключевые слова: кожа, заживление ран, старение, IGF-1.

EFFECT OF IGF-1 ON WOUND HEALING IN AGED FVB MICE WITH K14SIGF1 TRANSGENES

Shkumat M., Leonov Y., Pishel I.

One of the main factors that can exert influence on the state and the rate of skin regeneration is IGF-1. A morphological studies of wound healing rate was performed in wild-type and transgenic FVB-K14/mIGF-1 mice of different ages to determine the effect of IGF-1 on wound healing in aging. It has been shown that an increase in area and thickness of the regenerating epithelium in the wound of transgenic animals compared with wild-type.

Key words: skin, wound healing, aging, IGF-1.

Стаття надійшла 5.10.2014 р.

Рецензент Запорожець Т.М.