

УДК 577.112

Е.В.Рыбалко (6 курс, каф. ФХОМ), О.С.Москалёва (асп. ЛЗМК ИнЦ РАН),  
М.И.Блинова к.б.н., в.н.с. (ИнЦРАН)

## ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ СТРЕСС-ФАКТОРОВ НА КОЛОНИЕОБРАЗОВАНИЕ КЕРАТИНОЦИТОВ IN VITRO

Существование любого живого организма, включая человека, тесно связано с воздействием внешней среды, которая является главным фактором, определяющим создание в нем защитных систем. К ним в первую очередь принадлежит наружная оболочка, непосредственно отделяющая организм от окружающей среды и, прежде всего, испытывающая на себе его влияние. Кожу можно рассматривать как трехкомпонентную систему, образованную эпидермисом, дермой и подкожной жировой клетчаткой, которые находятся в морфофункциональном единстве [1].

Известно четыре типа клеток эпидермиса. Большая часть клеток имеет эктодермальное происхождение и называется кератиноцитами. Эпидермис кожи состоит из гетерогенных популяций, включая кератиноциты, которые находятся на разных стадиях дифференцировки, клеток Лангерганса (иммунные клетки), меланоцитов (пигментные клетки) и рецепторных клеток Маркеля [2].

Культивирование и трансплантация выращенных вне организма кератиноцитов с целью восстановления нарушенного кожного покрова в результате различных ран представляет интерес для фундаментальных исследований и практического применения [3].

Живая клетка, как и целый организм, способна эффективно защищаться от перегрева, гипоксии и других факторов путем включения разнообразных молекулярных систем. Одно из направлений биологии адаптации связано с белками теплового шока (БТШ) или белками стресса. БТШ обладают выраженным защитным эффектом и способны защищать клетку от разнообразных токсических воздействий. Белки теплового шока были обнаружены практически во всех живых организмах, причем их экспрессия может увеличиваться при действии разнообразных стимулов, приводящих к денатурации белков или повреждению их структуры (тепловой шок, окислительный стресс и др.) [4].

Целью данного исследования было определение влияния температурных стресс-факторов на колониеобразование и жизнеспособность кератиноцитов *in vitro*. Представлялось интересным выяснить, существует ли прямая зависимость между нагревом и уровнем колониеобразования кератиноцитов.

В экспериментах использовали кератиноциты, выделенные из кожи лица, век и ушей, взятой в результате проведения пластических операций. При работе соблюдались правила асептики. Выделение и культивирование эпидермальных кератиноцитов человека проводили по методу Рейнвальда и Грина [5], в модификации Юдинцевой [6]. Температурное воздействие выполнялось на термостатирующей бане ТБ-110 в течение 1 часа при температурах 39, 40, 41, 42, 43<sup>0</sup>С. О воздействии температуры на клетки судили по следующим критериям:

- 1) по способности образовывать колонии в контрольных и клетках, подвергшихся воздействию температуры. Колониеобразование оценивали путем подсчета количества колоний после окраски генциан виолетом, в концентрации 0.1 %, на четвертые сутки после выделения.

- 2) по изменению уровня экспрессии БТШ70 (наиболее консервативный белок, с массой 70кДа) через 3, 6, 20, 24, 48, 72 часов после нагрева.
- 3) по изменению жизнеспособности прогретых клеток через 3, 6, 20, 24, 48, 72 часов после нагрева. Жизнеспособность оценивали в камере Горяева путем подсчета количества окрашенных клеток по сравнению с неокрашенными после окраски трипановым синим, в концентрации 0.2%.

Проводилась статистическая обработка результатов по методу Стьюдента с доверительной вероятностью 0.05%. В ходе выполнения работы было поставлено две серии экспериментов.

Первая серия: нагревали суспензию только что выделенных клеток при различных температурных режимах (39, 40, 41, 42<sup>0</sup>С) в течение 1 часа. Исследовали содержание БТШ70 в контрольной пробе и прогретых клетках через 3, 6, 20, 24, 48, 72 часа (два опыта). В эти же сроки определяли жизнеспособность клеток (два опыта). В итоге выяснили, что уровень содержания БТШ70 в контрольной пробе и клетках, подвергнутых температурному стрессу (при всех указанных температурах) со временем (3, 6, 20, 24, 48, 72 часов) не различается. Жизнеспособность клеток, определенная в те же интервалы времени, носит колебательный характер. Исходя из этого, в следующей серии опытов была увеличена температура нагрева до 43<sup>0</sup>С.

Вторая серия: суспензию только что выделенных клеток нагревали при температуре 43<sup>0</sup>С в течение 1 часа. Исследовали содержание БТШ70 в контрольной пробе и прогретых клетках через 3 часа (два опыта). На этих же сроках определяли жизнеспособность клеток (два опыта). Сравнивали количество колоний, образованных контрольными клетками и клетками, подвергнутыми температурной обработке, через 4 суток после нагрева (пять опытов). В результате получили, что уровень содержания БТШ70 в контрольной пробе и клетках прогретых при указанных условиях, определенный через 3 часа после прогрева, не различается. Жизнеспособность клеток, при тех же условиях, носит колебательный характер. Уровень колониеобразования клеток, подвергшихся температурному воздействию, изменяется недостоверно по сравнению с контрольным в каждом отдельном эксперименте.

Таким образом, показано, что не наблюдается изменения уровня содержания БТШ70 в прогретой суспензии эпидермальных кератиноцитов человека. Жизнеспособность клеток, подвергшихся температурному воздействию, изменяется; изменения носят колебательный характер. Образование колоний контрольными клетками и клетками, подвергшимися воздействию температуры, отличается между собой недостоверно.

Полученные результаты, вероятно, можно объяснить следующим образом. Поскольку эпидермальные кератиноциты выделяют из кожи, взятой в результате пластической операции, которая сама по себе является стрессорным фактором для данной ткани, то экспрессия БТШ70 уже достигла своего оптимального уровня, и, следовательно, все действия других факторов, в частности, температурных, не будут оказывать эффекта. Различные показания в степени колониеобразования у контрольных и прогретых клеток в каждом опыте могут объясняться индивидуальными особенностями доноров (возраст, состояние здоровья и др.).

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Вихрев Б.С., Бурмистров В.М. Ожоги. Руководство для врачей. М.:Медицина.1986.271с.
2. Михайлов И. Н. Структура и функция эпидермиса. М:Медицина.1979.240с.
- 3.Терских В.В., Васильев А.В. Эпидермальные кератиноциты человека и животных:проблема культивирования и трансплантации. М:Наука.1995.102с.
4. Маргулис В.А., Гужова И.В. Белки стресса в эукариотической клетке//Цитология.-2000.-т.42, №4.- с.323-338.
5. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of a strain of human epidermal keratinocytes the formation of keratinizing colonies from single cells// Cell 1975; 6: 331-4.

6. Юдинцева Н. М., Горелик Ю.В., Дьяконов И. А., Калмыкова Н. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. и др. Трансплантация аллогенных эпителиальных пластов на ожоговые раны//Цитология 1999; 41:328.