



ОЦЕНКА ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ ГЛУТАТИОНА В КЛЕТКАХ АУТОЖИРОВЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЛИПОФИЛЛИНГА В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1

И.Э. ХРУСТАЛЕВА¹
Е.П. СУХОПАРОВА²

¹⁾ *Российский государственный медицинский университет имени Н.И.Пирогова.*

²⁾ *Медицинская академия постдипломного образования Росздрава, г. Санкт-Петербург*

e-mail: khrustal@mail.ru

В статье изложены данные, касающиеся развития процессов перекисного окисления липидов и изменений в системе глутатиона в клетках аутожировых трансплантатов при экспериментальном моделировании липофиллинга. Также приведены результаты оценки влияния применения препарата рецепторного антагониста интерлейкина-1 на динамику данных процессов и выживаемость адипоцитов.

Ключевые слова: липофиллинг, аутожировой трансплантат, перекисное окисление липидов, малоновый диальдегид, восстановленный глутатион, глутатионредуктаза, сульфгидрильные группы белков, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, фиброз.

Актуальность темы. В последние годы все большее количество пациентов обращается к пластическим хирургам с целью коррекции контуров лица и тела [2-11]. Рост популярности пластической хирургии стимулирует докторов к поиску новых методик и технологий, позволяющих улучшить эстетический результат и повысить качество жизни пациента, при этом минимизировав операционные риски и сократив реабилитационный период [5, 7, 8-11]. Одной из малоинвазивных операций является липофиллинг. Однако некоторые затруднения в применении липофиллинга вызывает способность аутожирового трансплантата уменьшаться в объеме с течением времени и замещаться фиброзной тканью [2, 4, 5, 8, 11]. Это делает эстетический результат менее стойким и затрудняет прогноз операции [10].

В последние годы, в связи с возросшим интересом к липофиллингу, был принят ряд исследований, направленных на изучение технологии пересадки жировых клеток [2-5, 9]. Но, тем не менее крайне мало внимания уделяется патоморфологическим и биохимическим процессам, которые развиваются в реципиентной зоне и их влиянию на выживаемость клеток аутожирового трансплантата и развитию фиброза аутожирового трансплантата [2-11]. Наряду с этим накоплено большое количество сведений о значительном влиянии процессов перекисного окисления липидов и изменений в антиоксидантной системе на выживаемость клеток и развитие фиброза [1]. Исходя из этих предположений, для исследования были выбраны показатели, характеризующие, с одной стороны интенсивность окислительных процессов в клетках аутожирового трансплантата – малоновый диальдегид (МДА), с другой – показатели антиоксидантной системы (интенсивность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6Ф-ДГ), изменения уровня сульфгидрильных групп белков (СГ), уровня глутатионредуктазы (ГР) и уровня восстановленного глутатиона(ВГ))

Цель исследования. Повысить эффективность результатов липофиллинга за счет улучшения выживаемости адипоцитов в аутожировом трансплантате.

Материал и методы. Экспериментальная часть включала изучение 40 кроликов самцов, породы «шиншилла» с массой тела от 3 до 3,5 кг, в возрасте 75 дней, содержащихся в виварии клиники экспериментальных животных ВМедА им. С.М.Кирова в одинаковых условиях.

В рамках поставленных задач работа была разделена на 2 основные серии. В первой серии липофиллинг проводился по стандартной методике, во второй серии животным в реципиентную область перед выполнением пересадки вводился рецепторный антагонист интерлейкина-1 из расчета 0,1 мл на 1 мл аутожирового трансплантата. Срок наблюдения в обеих сериях составил 6 месяцев.

Характеристика используемого препарата. Рецепторный антагонист интерлейкина-1 (ИЛ-1) относится к семейству белков интерлейкина-1. Рецепторный антагонист ИЛ-1 играет уникальную роль, являясь эндогенным антагонистом ИЛ-1, он осуществляет баланс активностей интерлейкина-1 в крови и тканях. Функциональный ответ клеток на интерлейкина-1 осуществляется через их взаимодействие со специфическими рецепторами (IL-1RI и IL-1RII). Рецепторный антагонист ИЛ-1 конкурирует с интерлейкинами-1 за их взаимодействие с рецепторами и таким образом блокирует передачу сигнала в клетку от рецептора IL-1RI. Суперпродукция интерлейкина-1 приводит к развитию патологических процессов. В связи с этим рецепторный антагонист ИЛ-1 может являться весьма перспективным противовоспалительным препаратом.

Получение образцов для исследований. С целью получения образцов для исследований производили биопсию жировой ткани из реципиентной области вместе с кожным лоскутом и тканями, окружающими тканевой трансплантат, на 3, 5, 7, 30, 90, 180 сутки после операции. Образцы ткани хранились до момента исследования в сосуде Дюара с жидким азотом. Перед исследованием образцы ткани лабораторных животных извлекали из жидкого азота, взвешивали, измельчали и гомогенизировали в микроизмельчителе тканей при 3000 об./мин, добавляя охлажденный 0,1 М калий-фосфатный буфер с pH 7,4 в соотношении ткань : буфер – 1 : 6.

Полученный гомогенат использовали для определения концентрации восстановленного глутатиона, содержания сульфгидрильных групп белков, МДА. Для определения активности ГР, и Г-6-Ф-ДГ использовали очищенную цитоплазматическую фракцию, которую получали дифференциальным центрифугированием.

Результаты и обсуждение. При исследовании в тканях аутожирового трансплантата содержания малонового диальдегида (конечного продукта перекисных процессов) было выявлено его увеличение более чем в два раза практически на всем протяжении эксперимента.

В табл. 1 в динамике представлены результаты свидетельствующие, что действительно имеет место увеличение накопления в тканях АЖТ малонового диальдегида, на что указывает статистически значимые различия между 1 и 2 группами ($p \leq 0,05$).

Через 6 месяцев наблюдения нормализация уровня МДА не наблюдается. При предварительной защите тканей рецепторным антагонистом интерлейкина-1 отмечалось достоверно меньшее содержание МДА ($p \leq 0,05$) во все сроки с нормализацией к 180 суткам эксперимента.

Таблица 1

Динамика содержания МДА (мкмоль/г ткани) в клетках аутожировых трансплантатах с применением рецепторного антагониста интерлейкина-1 и без него (контроль $116,0 \pm 1,9$ мкмоль/г ткани)

Группы	Сроки исследования (сутки)					
	3	5	7	30	90	180
1 n = 40	194,2± 6,3	191,7± 4,5	191,5± 4,5	228,7± 1,6	174,2± 9,2	144,5±9,1
2 n = 40	159,1± 1,1	157,9± 1,6	156,8± 6,6	159,2± 5,3	135,2± 1,2	120,6±3,0
p – уровень значимости	1-2 < 0,05; 1- контр. < 0,05; 2 – контр. < 0,05					1- контр. < 0,05; 1-2 > 0,05; 2-контр. > 0,05

Накопление активных форм кислорода, перекисей в значительных количествах может сопровождаться целым рядом негативных изменений. Эти изменения касаются повреждения (разрыва) лизосом с выходом гидролитических ферментов, снижения прочности биологических мембран клеток, окисления сульфгидрильных групп глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, инактивацией глутатиона, липоевой кислоты и др. [1].

Известно, что повреждающему эффекту свободнорадикального окисления, накоплению активных форм кислорода противостоит система противоокислительной защиты, главным действующим звеном которой являются антиоксиданты – соединения способные тормозить, уменьшать интенсивность свободнорадикального окисле-

ния, нейтрализовывать свободные радикалы путем обмена своего атома водорода (в большинстве случаев) на кислород свободных радикалов. Важным звеном антиоксидательной системы являются биомолекулы, которые содержат сульфгидрильные группы. Основной мобильный фонд сульфгидрильных групп представляет собой глутатион (трипептид Glu-Cys-Gly), который содержится почти во всех клетках. Его антиоксидантное действие обеспечивают, в том числе, глутатионредуктаза, глутатион-S-трансфераза. Восстановленный глутатион осуществляет детоксикацию перекиси водорода (H_2O_2) и гидроперекисей, которые возникают при реакции активных форм кислорода с полиненасыщенными жирными кислотами мембран. Изменения уровня восстановленного глутатиона в клетках аутожирового трансплантата представлены в табл. 2.

Таблица 2

Динамика уровня восстановленного глутатиона (мкмоль/г ткани) в клетках аутожировых трансплантатов с применением рецепторного антагониста интерлейкина-1 и без него (контроль $2,3 \pm 0,06$ мкмоль/г ткани)

Группы	Сроки исследования (сутки)					
	3	5	7	30	90	180
1n=40	1,88± 0,03	1,80± 0,09	1,75± 0,07	1,82± 0,04	1,95± 0,12	1,94± 0,06
2n=40	2,05± 0,06	1,99± 0,06	1,93± 0,07	2,14± 0,06	2,03± 0,01	2,11± 0,02
p – уровень значимости	1-2, 1- контр., 2 – контр. < 0,05			1- контр.<0,05;1-2, 2-контр >0,05		

Из представленных данных заметно, что содержание восстановленного глутатиона в тканях АЖТ второй группы (достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в тканях первой группы, что становится особенно заметно на завершающих стадиях эксперимента. Таким образом, в клетках АЖТ первой группы (без применения рецепторного антагониста интерлейкина-1) в большей степени расходуется антиоксидантная защита вследствие большей активности перекисных процессов.

Изменения содержания сульфгидрильных групп белков клеток в ткани аутожирового трансплантата представлены в табл. 3.

Анализ представленных в табл. 3 данных, свидетельствует о достоверном ($p < 0,05$) относительно нормальных значений снижении сульфгидрильных групп белков, как в первой, так и во второй исследуемых группах. Достоверных различий между группами в первые семь дней наблюдения не выявляется, относительно монотонная картина без нормализации показателей наблюдается в первой группе, а во второй только к сто восьмидесятым суткам эксперимента уровень сульфгидрильных групп приближается к норме.

Таблица 3

Динамика содержания сульфгидрильных групп белков (мкмоль/г ткани) в клетках аутожировых трансплантатов с применением рецепторного антагониста интерлейкина-1 и без него (контроль $6,33 \pm 0,38$ мкмоль/г ткани)

Группы	Сроки исследования (сутки)					
	3	5	7	30	90	180
1 n = 40	4,38±0,33	4,52±0,33	4,62±0,51	4,67±0,22	4,69±0,37	5,30±0,14
2 n = 40	4,96±0,14	5,12±0,22	5,28±0,30	5,47±0,20	5,33±0,18	6,16± 0,20
группы	3	5	7	30	90	180
p – уровень значимости	1-контр., 2-контр. <0,05; 1-2 > 0,05		1-контр. <0,05; 2-контр., 1-2>0,05	1-контр., 1-2<0,05; 2-контр. >0,05	1-контр. <0,05; 1-2, 2-контр.>0,05	1-2<0,05; 1-контр., 2-контр. >0,05

Глутатионредуктаза поддерживает достаточный уровень активного глутатиона путем восстановления его дисульфидной формы. Поэтому мы посчитали целесообразным исследовать уровень глутатионредуктазы в аутожировом трансплантате обеих групп. Эти данные представлены в табл. 4.

Таблица 4

Динамика активности глутатионредуктазы (мкмоль/мин г ткани) в клетках аутожировых трансплантатов с применением рецепторного антагониста интерлейкина-1 и без него (контроль $38,46 \pm 2,02$ мкмоль/мин г ткани)

Группы	Сроки исследования (сутки)					
	3	5	7	30	90	180
	2	3	4	5	6	7
1 n = 40	39,49±1,81	39,46± 2,01	39,50± 3,74	35,54± 2,05	32,10± 0,86	27,33± 1,54
2 n = 40	48,47± 0,84	50,01± 0,93	57,71± 2,71	45,72± 3,52	36,49± 1,11	40,38± 3,41
p – уровень значимости	2-контр., 1-2<0,05; 1-контр.>0,05			1-2 ≤ 0,05; 1-контр., 2-контр. >0,05	1-контр., 1-2<0,05; 2-контр.>0,05	

Анализируя данные, представленные в табл. 5 можно сказать, что достоверные различия в уровнях активности ГР ($p \leq 0,05$) между первой (без применения рецепторного антагониста интерлейкина-1) и второй группой (с применением рецепторного антагониста интерлейкина-1) выявлены в раннем послеоперационном периоде (третьи, пятые и седьмые сутки) и в отдаленные сроки наблюдения.

Таблица 5

Динамика активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (мкмоль/мин г ткани) в клетках аутожировых трансплантатов с применением рецепторного антагониста интерлейкина-1 и без него (контроль $55,71 \pm 3,82$ мкмоль/мин г ткани)

Группы	Срок (сутки)					
	3	5	7	30	90	180
1 n = 40	76,81± 6,64	78,61± 6,61	80,51± 6,32	41,07± 6,38	37,66± 6,40	36,31± 6,85
2 n = 40	89,35± 4,29	93,45± 4,31	97,67± 4,64	50,47± 4,10	54,85± 6,09	58,86± 2,41
p – уровень значимости	1 – контр., 2 – контр.<0,05; 1-2>0,05			1 – контр, 2 – контр, 1-2>0,05	1 – контр., 2 – контр., 1-2>0,05	1-2<0,05; 1– контр., 2-контр. > 0,05

Одним из факторов, способствующих поддержанию антиоксидантной защиты и энергетического обеспечения клеток аутожирового трансплантата, как в первой, так и второй группе животных является активация ключевого фермента пентозофосфатного пути обмена глюкозы. Активация глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы способствует поддержанию уровня клеточного НАДФН, необходимого для функционирования цикла обмена восстановленного глутатиона, основного клеточного антиоксиданта.

Достоверно более высокая активность Г-6ФДГ одного из ключевых ферментов этого цикла именно у животных второй экспериментальной группы, что особенно выражено в отдаленные сроки наблюдения ($p < 0,05$) (табл. 5) свидетельствует о формировании в ткани аутожировых трансплантатов этой группы адаптационных механизмов, направленных на сохранение антиоксидантного и энергетического потенциала клеток.

Следует отметить, что в первой группе экспериментальных животных на 180 сутки активность ферментов Гл-6-ф-ДГ и глутатионредуктазы была даже снижена по сравнению с контрольной группой, что может служить признаком отрицательного прогноза для выживания адипоцитов при выполнении липофиллинга без защиты тканей АЖТ рецепторным антагонистом интерлейкина-1.

Таким образом, динамика биохимических процессов, наблюдаемая в ткани аутожирового трансплантата, как первой, так и второй группы идентична. Однако обращает на себя внимание различие в степени выраженности данных процессов. Очевидно, что во второй группе экспериментальных животных интенсивность перекисного окисления липидов выражена меньше. Об этом свидетельствует изменение количества малонового диальдегида, которое к 180 суткам эксперимента нормализуется (табл. 1).

Полученные данные могут косвенным образом свидетельствовать, что во второй группе животных (выполнялся липофиллинг с предварительной обработкой области



трансплантации рецепторным антагонистом интерлейкина-1) воспалительная реакция в реципиентной области менее выражена.

Вероятно, использование антагониста рецепторов ИЛ-1 первоначально ограничивает развитие воспалительной реакции и способствует меньшей активации процессов свободнорадикального окисления, которые лежат в основе гибели клеток. В свою очередь, умеренная активация процессов перекисного окисления липидов позволяет клеткам сохранить свой антиоксидантный потенциал, защитить их от действия свободных радикалов и дальнейшего запуска реакций воспаления. Так как продукты перекисного окисления липидов принимают заметное участие в механизмах формирования фиброза тканей, можно считать, что сохранение внутриклеточной антиоксидантной защиты у животных второй экспериментальной группы позволяет добиться существенного уменьшения развития фиброза.

Выводы.

1. При проведении липофиллинга экспериментальным животным в клетках аутожирового трансплантата запускаются процессы перекисного окисления липидов, и происходит истощение системы антиоксидантной защиты.

2. Ведение в реципиентную область при выполнении липофиллинга рецепторного антагониста интерлейкина-1 снижает выраженность процессов перекисного окисления липидов и сохраняет антиоксидантный потенциал клеток аутожирового трансплантата.

Литература

1. Серов, В.В. Воспаление. / В.В. Серов, В.С. Пауков // Руководство для врачей. – М.: Медицина, 1995. – С. 78-84.
2. Шандалов, Л.Б. Контурная пластика жировой тканью / Л.Б. Шандалов // Вестн. хир. им. Грекова. – 1972. – Т.109, №12. – С.62-54.
3. Amar, R.E. Adipocyte microinfiltration in the face or tissue restructuration with fat / R.E. Amar // Ann. Chir. Plast. Esthet. – 1999. – Vol.44, № 6. – P.593-608.
4. Bartynski, J. Histopathologic evaluation of adipose autografts in a rabbit ear model / J. Bartynski, M.S. Marion, T.D. Wang // Otolaryngol. Head. Neck. Surg. – 1990. – Vol. 102, №4. – P.314-321.
5. Carpaneda, C.A. Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants. / C.A. Carpaneda, M.T. Riberiro // Aesth. Plast. Surg. – 1994. – Vol. 18, №1. – P17-19.
6. Fat injection/ A. Chajchir[et al.] // Aesth. Plast. Surg. – 1990. – Vol.14, №.2. – P.127-136.
7. Coleman, W.P. Fat transplantation / W.P. Coleman // Dermatol. Clin. – 1999. – Vol. 17, №4. – P.891-898.
8. Di Giuseppe A.: Innessi dermo adiposi per la correzione di difetti di proiezione del labbro superiore. Rev Ital Cir Plast 1988; 20:377.
9. Fournier, P.F. Liposculpture: the syringe technique / P.F. Fournier. – Paris: Arnette. – 1991. – 412 p.
10. Illouz, Y.G. L utilization de la grasse aspire combler les defaut cutaneus./ Y.G. Illouz // La Rev. de Chir. Esthet. De la Langua Fracaise. – 1985. – Vol.10., №9 – P.40-45.
11. Matarasso, A Autologous fat transplantation / A. Matarasso, S.L. Matarasso // Plast. Reconstr. Surg. – 1995. – Vol.95, №5. – P.933.

EVALUATION OF LIPID PEROXIDATION AND CHANGES IN THE GLUTATHIONE IN THE CELLS OF AUTOADIPOSAI GRAFTS DURING LIPOFILLING DURING THE USAGE OF RECEPTOR INTERLEUKIN-1 ANTAGONIST

I. Ae.KHRUSTALEVA¹
E.P. SUKHOPAROVA²

¹Russian State Pirogov Medical University.

²St.-Petersburg medical academy of postgraduate education

e-mail: khrustal@mail.ru

The article presents data concerning the development of lipid peroxidation and changes in the system of glutathione in the cells of autoadiposal transplants in experimental modeling lipofilling. Also shows the results of assessing the impact of the drug receptor antagonist, interleukin-1 on the dynamics of these processes and the survival of adipocytes.

Key words: lipofilling, autoadiposal transplant, lipid peroxidation, malondialdehyde, reduced glutathione, glutathione reductase, sulfhydryl groups of proteins, glucose-6-phosphate dehydrogenase, fibrosis.