© Н.Н.Голубцова, О.В.Васильева, В.В.Петров, А.Г.Гунин, 2016
УДК 611.13./.14:611.778-053

Н.Н.Голубцова[1], О.В.Васильева[2], В.В.Петров[2], А.Г.Гунин[2]

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА DLL4 И Jag-1 В ДЕРМЕ ЧЕЛОВЕКА В ОНТОГЕНЕЗЕ

[1] Кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины (зав. — проф. Л.А.Любовцева); [2] кафедра акушерства и гинекологии (зав. — проф. А.В.Самойлова), Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова, г. Чебоксары

Целью работы было исследование содержания регуляторов ангиогенеза — Dll4 и Jag-1 в дерме у человека в различные возрастные периоды. Dll4 и Jag-1 выявляли непрямым иммуногистохимическим методом в срезах кожи у плодов человека 20–40 нед развития и у людей в возрасте от рождения до 85 лет. Для исследования Dll4 было использовано 150 образцов кожи 72 людей женского пола и 78 — мужского, а для исследования Jag-1 — 120 образцов кожи 58 людей женского пола и 62 — мужского. Установлено, что иммунореактивностью в основном обладали эндотелиоциты. Сосуды, дающие положительные реакции на Dll4 и Jag-1, обнаруживаются по всей толщине дермы, как у плодов, так и людей всех возрастных групп. Экспрессия Dll4 в сосудах микроциркуляторного русла дермы увеличивалась от 20 нед внутриутробного развития до 20 лет. С дальнейшим увеличением возраста интенсивность реакции кровеносных сосудов на Dll4 снижалась. Экспрессия Jag-1 в кровеносных сосудах дермы увеличивалась с 20 нед внутриутробного развития до 85 лет.

Ключевые слова: *дерма, кровеносные сосуды, Dll4, Jag-1, онтогенез*

Одной из причин возрастных изменений кожи человека является прогрессивное уменьшение числа кровеносных сосудов в дерме [1, 10]. Однако механизмы этих изменений остаются во многом неизвестными. Их выяснению, вероятно, может способствовать изучение роли молекул, участвующих в регуляции ангиогенеза в онтогенезе [7]. Работы, направленные на исследование регуляции ангиогенеза, указывают на существенную роль в этом процессе сигнального пути Notch [2], представляющего собой комплекс рецепторов и лигандов, взаимодействие которых активирует процессы ангиогенеза [14]. Лигандами регуляторного пути Notch являются дельтаподобные лиганды 1, 2, 3 и 4 (Dll4), Jagged-1 (Jag-1) и Jagged-2 [5, 6]. В экспериментах на мышах показана противоположная функциональная роль Dll4 и Jag-1 в регуляции ангиогенеза [3]. Dll4 и Jag-1 являются важными участниками в Notch-пути и в образовании новых кровеносных сосудов. Однако остается открытым вопрос об участии Notch-лигандов — Dll4 и Jag-1 в кровоснабжении дермы человека в возрастном аспекте.

Цель настоящего исследования — определить содержание регуляторов ангиогенеза Dll4 и Jag-1 в дерме у человека в различные возрастные периоды.

Материал и методы. Объектом исследования служили кусочки кожи нижней части передней поверхности шеи, полученные при аутопсии плодов человека, и людей, умерших от различных причин. Из исследования были исключены люди с болезнями кожи. Образцы кожи брали в патологоанатомических отделениях больниц г. Чебоксары. Проведение исследования одобрено этическим комитетом медицинского факультета Чувашского государственного университета им. И.Н.Ульянова (протокол № 3/4 от 31.01.2014 г.). Кусочки кожи, не имевшие повреждений и патологических изменений, фиксировали в 4% параформальдегиде и заливали в парафин. Из блоков изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм. Dll4 и Jag-1 выявляли непрямым иммуногистохимическим методом [1]. В качестве первых антител использовали поликлональные кроличьи антитела к Dll4 (AHP1274, AbD Serotec, Великобритания) и поликлональные кроличьи антитела к Jag-1 (NBP1–90208, Novus Biologicals Inc., США) в разведении 1:50 на 0,05 М трис-буфере (pH 7,4) с добавлением 0,15 М натрия хлорида. Визуализацию антигенов проводили с помощью системы EnVision, конъюгированной с пероксидазой (K 4002, DakoCytomation, Дания). Продукт реакции окрашивался в коричневый цвет. Срезы докрашивали гематоксилином. В качестве контроля специфичности окрашивания применяли такую же процедуру обработки срезов, но вместо первых антител использовали нормальную кроличью сыворотку в конечной концентрации — 1%.

Исследование проводили с использованием светового микроскопа Olympus CX-21, цифровой камеры Olympus Camedia 4040z (Olympus, Япония), персонального компьютера. Интенсивность реакции на Dll4 или Jag-1 оценивали по 4 степеням окрашивания: без него, со слабым, средним и

Сведения об авторах:

Голубцова Наталья Николаевна (e-mail: golubnata@list.ru), кафедра общей и клинической морфологии и судебной медицины; *Васильева Ольга Валерьевна* (e-mail: olkin-mouse@ya.ru), *Петров Вадим Витальевич* (e-mail: vadim2304@yandex.ru), *Гунин Андрей Германович* (e-mail: drgunin@mail.ru), кафедра акушерства и гинекологии, медицинский факультет, Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова, 428000, г. Чебоксары, Московский пр., 15

сильным [11]. Степень окрашивания оценивали во всех сосудах дермы без разделения их на виды. Анализ интенсивности окрашивания сосудов при реакции на Dll4 и Jag-1 выполняли во всей толщине дермы без разделения на слои. Исследование препаратов проводили вслепую без исходного знания возраста и половой принадлежности субъекта. Затем данные об интенсивности окрашивания сопоставляли с возрастом и половой принадлежностью и определяли долю случаев с каждой степенью окрашивания во всех возрастных группах.

1-ю группу составили плоды 20–40 нед внутриутробного развития; 2-ю — люди 0–20 лет; 3-ю — 21–40 лет; 4-ю — 41–60 лет; 5-ю — 61–85 лет. Формирование групп было обусловлено тем, что в предыдущих исследованиях мы не установили принципиальных изменений числа кровеносных сосудов в дерме человека в пределах данных возрастных групп [1]. Для исследования Dll4 было использовано 150 кусочков кожи 72 женщин и 78 мужчин: в 1-й группе — 24 образца, во 2-й группе — 41 образец, в 3-й группе — 33 образца, в 4-й группе — 25 образцов, в 5-й группе — 27 образцов. Для исследования Jag-1 было использовано 120 кусочков кожи 58 женщин и 62 мужчин: в 1-й группе — 21 образец, во 2-й группе — 25 образцов, в 3-й группе — 21 образец, в 4-й группе — 25 образцов и в 5-й группе — 28 образцов. Был проведен анализ половых различий возрастных изменений исследованных параметров в дерме, для чего выполнен однофакторный дисперсионный анализ, где в качестве фактора использована половая принадлежность. Результаты этого анализа не установили значимого влияния пола на изменение степени окрашивания при реакции на Dll4 и Jag-1, что позволило объединить в одну группу образцы кожи мужчин и женщин. Значимость изменений оценивали с помощью критерия χ^2.

Результаты исследования. В сосудах микроциркуляторного русла дермы — артериолах, венулах и капиллярах — иммунореактивностью обладали в основном эндотелиоциты

Dll4-иммунопозитивные сосуды были выявлены во всей толщине дермы как у плодов, так и у людей всех возрастных групп. Однако в изученные возрастные периоды количество случаев с разной степенью окрашивания сосудов было неодинаковым. В дерме у плодов (1-я группа) большинство исследованных кусочков кожи содержали сосуды со слабой степенью окрашивания при реакции на Dll4 (*рис. 1; 2, а*). Лишь небольшую часть составили образцы кожи без окрашивания кровеносных сосудов или со средней степенью выраженности их реакции на Dll4 (см. рис. 1; 2, а).

В дерме у людей в возрасте 0–20 лет (2-я группа) доля образцов с сосудами, не дающих реакции на Dll4 и со слабым их окрашиванием, уменьшилась, а доля образцов, в которых сосуды имели среднюю степень окрашивания, в 1,5 раза увеличилась по сравнению с таковой в предыдущей группе (см. рис. 1; 2, а). В небольшом числе исследованных объектов в дерме выявлялись сосуды с сильной реакцией на Dll4 (см. рис. 1; 2, а).

У людей 21–40 лет (3-я группа) преобладали образцы кожи с кровеносными сосудами, имеющими слабую реакцию на Dll4 (см. рис. 2, а). Доля случаев с сосудами без окрашивания, так же как и с сосудами с сильной реакцией на Dll4, снизилась по сравнению с таковой в возрасте 0–20 лет (см. рис. 2, а).

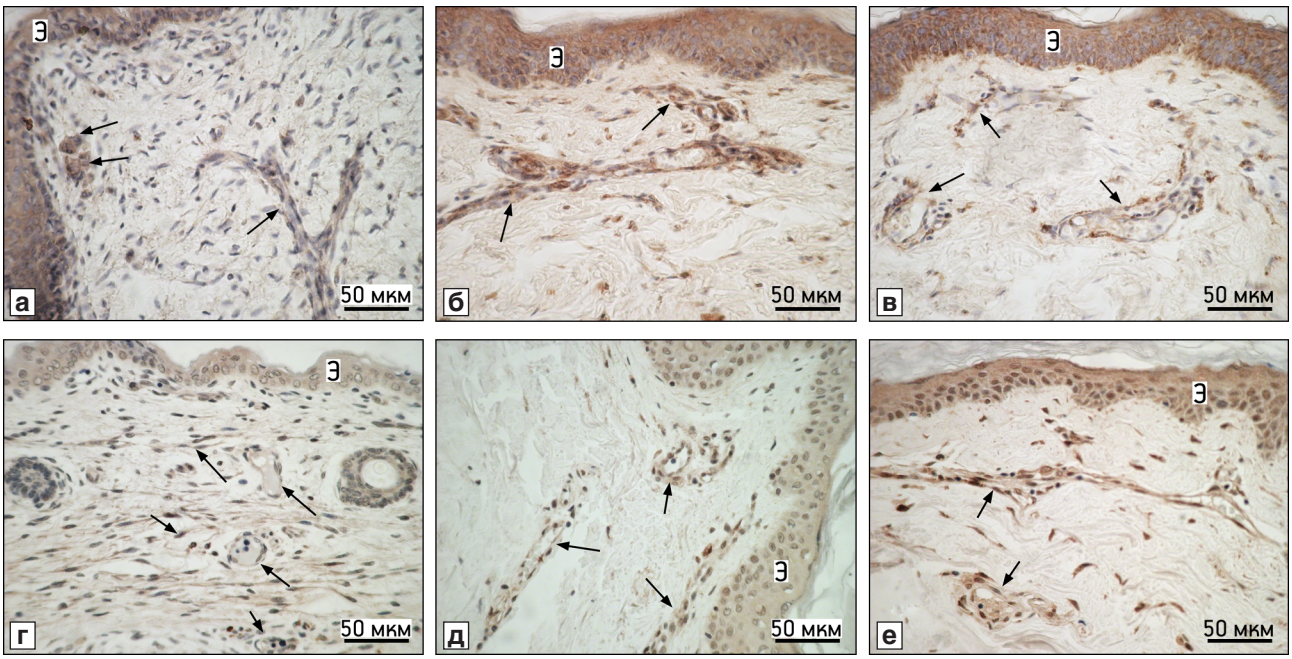

Рис. 1. Кожа человека.

а — кожа плода мужского пола 34 нед развития; б — кожа мальчика 7 лет; в — кожа мужчины 66 лет; г — кожа плода мужского пола 36 нед развития; д — кожа мужчины 34 лет; е — кожа мужчины 71 года. Э — эпидермис; стрелки — кровеносные сосуды дермы. а—в — иммуногистохимическая реакция на Dll4; г—е — на Jag-1

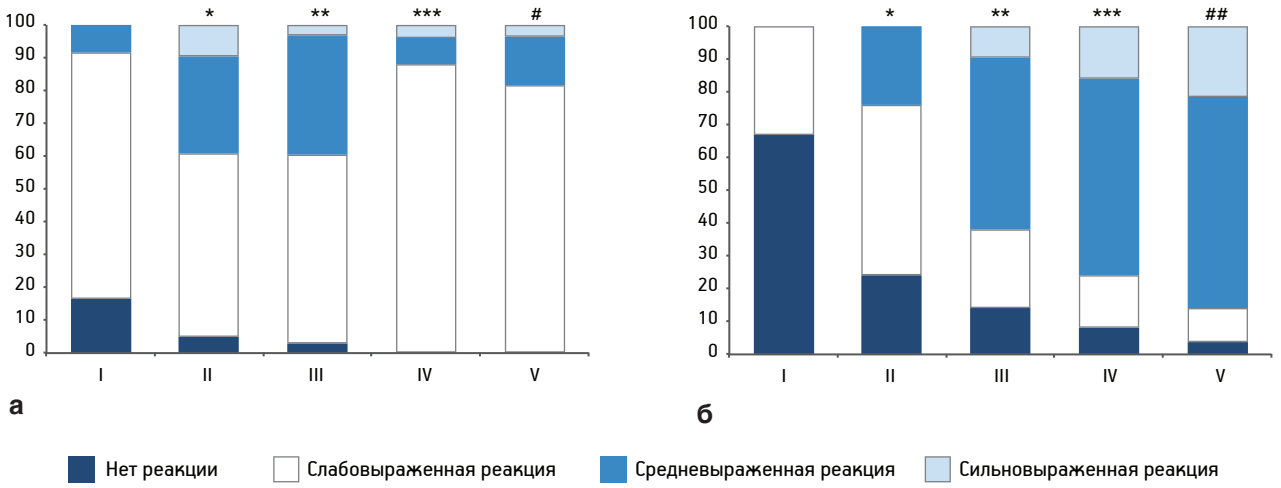

Рис. 2. Относительное содержание образцов кожи с Dll4 (а) и Jag-1-позитивными (б) кровеносными сосудами в дерме у людей различных возрастных групп.

По оси абсцисс — возрастные группы: I — плоды 20–40 нед развития; II — 0–20 лет; III — 21–40 лет; IV — 41–60 лет; V — 61–85 лет; по оси ординат — доля образцов кожи с различной степенью выраженности иммуногистохимической реакции сосудов (%); различия значимы: * между II и I группами; ** III и II группами; *** IV и III группами при $P<0,01$; # различия между V и IV группами не значимы; ## различия между V и IV группами значимы при $P<0,05$

В 4-й группе (41–60 лет) преобладали образцы кожи, в дерме которой сосуды имели слабую реакцию на Dll4. Доля образцов с такими сосудами была примерно в 2,6 раза больше, чем в 3-й группе (см. рис. 2, а). Лишь небольшую долю составляли образцы кожи с кровеносными сосудами, имеющими среднее и сильное окрашивание при реакции на Dll4 (см. рис. 2, а).

В 5-й группе (61–85 лет), так же как в предыдущей возрастной группе, преобладали образцы, в которых сосуды имели слабую реакцию на Dll4 (см. рис. 1; 2, а). В небольшой доле образцов кожи кровеносные сосуды имели среднюю и сильную степень реакции на Dll4 (см. рис. 2, а).

Таким образом, исследования продемонстрировали, что экспрессия Dll4 в кровеносных сосудах в дерме увеличивается от 20–40 нед внутриутробного развития до 20 лет. С дальнейшим увеличением возраста интенсивность реакции кровеносных сосудов на Dll4 снижается.

Сосуды, дающие положительную реакцию на Jag-1, были выявлены во всей толщине дермы как у плодов, так и у людей всех исследованных возрастных групп. Однако в исследованных группах людей количество случаев с разной степенью выраженности реакции сосудов на Jag-1 было неодинаковым. У плодов (1-я группа) большинство образцов кожи содержали сосуды со слабой степенью реакции на Jag-1 (см. рис. 1; 2, б). У людей в возрасте 0–20 лет (2-я группа) в половине изученных кусочков кожи сосуды в дерме давали реакцию на Jag-1 (см. рис. 2, б). У людей 21–40 лет (3-я группа) почти в 2 раза снизилась доля образцов кожи, в которых кровеносные сосуды или не давали реакции, или обладали слабой реакцией на Jag-1 по сравнению с таковой в предыдущей возрастной группе (см. рис. 1; 2, б). Доля исследованных фрагментов кожи, содержащих кровеносные сосуды со средней интенсивностью реакции на Jag-1, напротив, увеличилась более чем в 2 раза. Лишь небольшую долю составили образцы, в которых кровеносные сосуды имели сильно выраженную реакцию на Jag-1 (см. рис. 2, б).

В возрастной группе от 41–60 лет (4-я группа) доля кусочков кожи с сосудами, имеющими среднюю или сильную степень реакции на Jag-1, стала больше, чем в предыдущей возрастной группе (см. рис. 2, б).

В 5-й группе (61–85 лет) большинство исследованных образцов кожи содержали сосуды со средней степенью выраженности реакции на Jag-1 (см. рис. 1; 2, б). У людей от 61 года до 85 лет наблюдалась максимальная доля образцов с сосудами, обладающими сильной степенью реакции на Jag-1 (см. рис. 2, б).

Таким образом, с возрастом происходило увеличение доли образцов, в дерме которых находились сосуды с большой интенсивностью реакции. Это свидетельствует об увеличении экспрессии Jag-1 в кровеносных сосудах дермы у человека с возрастом.

Обсуждение полученных данных. Нами выявлены иммунопозитивные сосуды микроциркуляторного русла в дерме у плодов и людей различных возрастных групп. Исследованные в

работе Notch-лиганды Dll4 и Jag-1 синтезируются в эндотелиоцитах и после связывания с рецепторами могут влиять на транскрипцию в лиганд-экспрессирующих клетках и рост кровеносных сосудов [9]. Исследования продемонстрировали, что экспрессия Dll4 в сосудах дермы увеличивается от 20–40 нед внутриутробного развития до 20 лет. С дальнейшим увеличением возраста интенсивность реакции кровеносных сосудов на Dll4 снижается. Существует мнение, что Dll4 играет особую роль именно в период эмбрионального развития [3]. Однако, скорее всего, низкий уровень экспрессии Dll4, выявленный в этот период, недостаточен для того, чтобы стимулировать или блокировать ангиогенез у плодов. Вместе с тем, высокое содержание этого лиганда в возрасте от 0 до 20 лет может индуцировать ингибирование ангиогенеза, которое проявляется с возрастом [4]. Это предположение о роли Dll4 в качестве тормозного сигнала для ангиогенеза в дерме согласуется с наблюдениями изменения численности сосудов в дерме в возрастном аспекте. Установлено, что именно в 20 лет происходит резкое уменьшение количества сосудов микроциркуляторного русла в дерме [1], но не установлены причины этих изменений. Некоторые механизмы, связанные с зависимым от возраста ухудшением кровоснабжения, были изучены при действии ультрафиолетового (УФ) света. Было показано, что УФ-облучение приводит к повышению активности ангиогенных факторов, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [12]. Эти наблюдения послужили основанием считать, что VEGF, выделяемый кератиноцитами, является главным источником ангиогенной активности в коже. Взаимодействия между VEGF и его рецепторами второго и третьего типов модулируют Notch-сигнализацию и ее влияние на ангиогенез [3, 6]. Таким образом, показано, что сигнальный путь Notch играет решающую роль в функционировании эндотелиоцитов [14]. Полагают, что Dll4-Notch-сигнализация действует в качестве выключателя ангиогенеза путем снижения чувствительности эндотелиальных клеток к VEGF [8]. Синтез Dll4 в эндотелиоцитах индуцируется VEGF, что приводит к формированию так называемых tip-клеток, которые располагаются в терминальном участке вновь формируемого сосуда [13]. Затем Dll4, продуцируемый в tip-клетках, действует на Notch 1 и 4, расположенные на соседних эндотелиоцитах. В результате этого в них резко уменьшается количество рецепторов второго типа VEGF. Эти клетки превращаются в так называемые stalk-клетки, которые локализуются позади tip-клеток и формируют эндотелиальную выстилку ствола нового кровеносного сосуда. Jag-1 в stalk-эндотелиоцитах активирует синтез Notch 3 в залегающих глубже клетках [13]. По всей видимости, постепенное повышение содержания Jag-1 в дерме у человека с возрастом от 20 нед внутриутробного развития и до 85 лет также оказывает ингибирующее влияние на формирование новых кровеносных сосудов.

Таким образом, экспрессия Dll4 в кровеносных сосудах дермы увеличивается от 20–40 нед внутриутробного развития до 20 лет, после чего постепенно снижается. Экспрессия Jag-1 увеличивается от 20 нед внутриутробного развития до 85 лет. Эти данные демонстрируют роль лигандов Dll4 и Jag-1 в регуляции ангиогенеза в возрастном аспекте.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Чувашской Республики (13-04-97112_р_поволжье_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гунин А.Г., Петров В.В., Васильева О.В. и др. Кровеносные сосуды в дерме человека в процессе старения // Успехи геронтол. 2014. Т. 27, вып. 1. С. 54–61.
2. Abbas O.L., Borman H., Terzi Y.K. et al. Inhibition of the Notch pathway promotes flap survival by inducing functional neoangiogenesis // Ann. Plast. Surg. 2015. Vol. 74. P. 534–540.
3. Benedito R., Rocha S.F., Woeste M. et al. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling // Nature. 2012. Vol. 484, № 7392. P. 110–114.
4. Camelo S., Raoul W., Lavalette S. et al. Delta-like 4 inhibits choroidal neovascularization despite opposing effects on vascular endothelium and macrophages // Angiogenesis. 2012. Vol. 15. P. 609–622.
5. D'Souza B., Meloty-Kapella L., Weinmaster G. Canonical and non-canonical Notch ligands // Curr. Top. Dev. Biol. 2010. Vol. 92. P. 73–129.
6. Kume T. Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. Vol. 727. P. 210–222.
7. Lee J.H., Yoo J.H. Knockdown of moesin expression accelerates cellular senescence of human dermal microvascular endothelial cells // Yonsei. Med. J. 2010. Vol. 51. P. 438–447.
8. Leslie J.D., Ariza-McNaughton L., Bermange A.L. et al. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis // Development. 2007. Vol. 134, № 5. P. 839–844.
9. Liu Z.J., Shirakawa T., Li Y. et al. Regulation of Notch 1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis // Mol. Cell Biol. 2003. Vol. 23. P. 14–25.
10. Nikolakis G., Makrantonaki E., Zouboulis C.C. Skin mirrors human aging // Horm. Mol. Biol. Clin. Investig. 2013. Vol. 16, № 1. P. 13–28.
11. Rizzardi A.E., Johnson A.T., Vogel R.I. et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring // Diagn. Pathol. 2012. Vol. 7, № 42. P. 1–10.
12. Sawane M., Kajiya K. Ultraviolet light-induced changes of lymphatic and blood vasculature in skin and their molecular mechanisms // Exp. Dermatol. 2012. Vol. 21, № I. P. 22–25.

13. Thomas J., Baker K., Han J. et al. Interactions between VEGFR and Notch signaling pathways in endothelial and neural cells // Cell. Mol. Life Sci. 2013. Vol. 70. P. 1779–1792.

14. Yan M., Plowman G.D. Delta-like 4/Nath signaling and its therapeutic implications // Clin. Cancer Res. 2007. Vol. 13, № 24. P. 7243–7246.

Поступила в редакцию 28.04.2015
Получена после доработки 24.07.2015

CHANGES OF THE CONTENT OF DLL4 AND Jag-1 ANGIOGENESIS REGULATORS IN HUMAN DERMIS IN ONTOGENESIS

N.N.Golubtzova[1], O.V.Vasiliyeva[2], V.V.Petrov[2], A.G.Gunin[2]

The goal of this study was to examine the contents of Dll 4 and Jag-1 angiogenesis regulators in human dermis at different age periods. Dll4 and Jag-1 were demonstrated by indirect immunohistochemistry in skin sections of fetuses of 20–40 gestational weeks and in persons aged from birth to 85 years. Dll4 was studied in 150 skin samples of 72 females and 78 males, while Jag-1 was examined in 120 samples of 58 females and 62 males. It is found that the immunoreactivity was mainly expressed by the endothelial cells. Vessels, which gave a positive reaction to Dll4 and Jag-1, were found throughout the entire thickness of the dermis, both in fetuses, and people of all age groups. Expression of Dll4 in the vessels of dermal microvasculature was shown to increase from 20 weeks of gestation to 20 years. With the further age increase, the intensity of the reaction of blood vessels for Dll4 was decreased. Expression of Jag-1 in dermal microvessels was enhanced from 20 weeks of gestation to 85 years. The results are discussed in connection with the role of Dll4 and Jag-1 in angiogenesis in human dermis during ontogeny.

Key words: *dermis, ontogeny aging, skin, angiogenesis, blood vessels, Dll4, Jag-1*

[1] Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine; [2] Department of Obstetrics and Gynecology, I.N.Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary