

© В.Г.Шестакова, Д.В.Баженов, В.В.Банин
УДК 615.5-001.4-003.93:599.323.4

В.Г.Шестакова¹, Д.В.Баженов², В.В.Банин³

СВЯЗЬ ВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РЕГЕНЕРАТА КОЖИ С ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЕГО КЛЕТОК

¹ Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — доц. В.Г.Шестакова), ² кафедра анатомии человека (зав. — чл.-кор. РАН проф. Д.В.Баженов), ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» МЗ РФ;

³ кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — чл.-кор. РАН проф. В.В.Банин) ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» МЗ РФ

Проведено гистологическое, морфометрическое и иммуногистохимическое исследование корреляции степени развития микроциркуляторного русла и уровня пролиферативной активности клеток в зоне заживления полнослойной хирургической кожной раны у крыс. Сопоставлены результаты, полученные при спонтанном течении репаративного процесса (контрольная группа, $n = 20$) и в условиях стимуляции ангиогенеза путем двукратного паравульнарного введения 0,1 мл Неоваскулгена — плазмиды pCMV-VEGF165, кодирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста (подопытная группа, $n = 20$). При морфометрическом анализе материала, полученного на 7-, 14-е и 21-е сутки, обнаружено, что количество кровеносных сосудов в новообразованной грануляционной ткани у крыс подопытной группы в среднем в 1,9 раза выше, чем в контрольной группе. Иммуногистохимические исследования продемонстрировали концентрацию пролиферативных процессов в периваскулярной зоне, особенно у животных в условиях стимуляции ангиогенеза. Применение Неоваскулгена привело к формированию более плотной сети микрососудов, усилению пролиферации клеток, сокращению общих сроков заживления и формированию органоспецифического регенерата.

Ключевые слова: кожа, регенерация, стимулированный ангиогенез, грануляционная ткань, пролиферация

Патогенез раневого процесса в значительной мере связан с ликвидацией микроциркуляторных нарушений и дефицита капиллярного кровотока в области повреждения, ведущих к длительно существующей гипоксии [3]. Известно также, что спонтанное заживление достаточно больших полнослойных кожных дефектов обычно завершается формированием рубца, лишенного кожных дериватов [1]. Ликвидация последствий гипоксии и успешность репарации обширной кожной раны зависят от эффективности развития грануляционной ткани, новообразования микрососудов и их роста в подэпителиальные слои дермы. Можно ожидать, что в условиях фармакологической стимуляции ангиогенеза более интенсивное развитие микрососудов окажется полезным для полноценной регенерации кожи.

Целью настоящего исследования было выявление зависимости между степенью развития микрососудов и общей пролиферативной активностью клеток в регенерирующих тканях кожных ран у крыс при спонтанном течении раневого процесса и при использовании специфического стимулятора ангиогенеза.

Материал и методы. Исследования выполнены на 40 белых беспородных половозрелых крысах, подобранных по принципу аналогов с учетом массы тела (200–250 г), пола (самки) и возраста (6–8 мес). Крысам под эфирным наркозом на дорсальной поверхности тела наносили стандартные полнослойные кожные раны, площадью 225 мм² (в среднем 14,5% от площади тела). Животные составили 2 группы: контрольную и подопытную. Крысам контрольной группы ($n = 21$) паравульнарно двукратно (на 2-е и 7-е сутки) вводили 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Животным подопытной группы ($n = 21$) вводили 0,1 мл раствора Неоваскулгена. Этот препарат разработан в ОАО «ИСКЧ» и производится на базе ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ. Он представляет собой высокоочищенную сверхскрученную форму плазмиды pCMV-VEGF165, кодирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) под контролем промотора (управляющего участка ДНК). Экспериментальные манипуляции выполняли в соответствии с международными правилами обращения с лабораторными животными, в том числе «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях», 1986 г. На работу получено разрешение Этического комитета ФГБОУ ВО «Тверской ГМУ» № 9 от 14.10.13 г.

Материал для исследования забирали на 7-, 14-е и 21-е сутки (по 7 животных из каждой группы в каждый срок). Фрагменты кожи и подлежащих тканей из краев ран разме-

Сведения об авторах:

Шестакова Валерия Геннадьевна (e-mail: shestvg@mail.ru), кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, *Баженов Дмитрий Васильевич* (e-mail: bajenovd@mail.ru), кафедра анатомии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» МЗ РФ, 170100, г. Тверь, ул. Советская, 4

Банин Виктор Васильевич (e-mail: v.banin@mail.ru), кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» МЗ РФ, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

рами 1,5×1,5 см фиксировали в 10 % растворе забуференного формалина (pH 7,4) в течение 24 ч, обезвоживали и заливали в парафин. На стандартных срезах толщиной 4 мкм, окрашенных гематоксилином–эозином, подсчитывали количество сосудов и их протяженность в 10 полях зрения микроскопа (×600) с помощью исследовательского микроскопа Olympus CX21 (Olympus, Китай), видеокамеры MC-10 и пакета программ (ЛОМО-микроанализ, Россия).

Постановку иммуногистохимической реакции осуществляли согласно рекомендациям фирмы-производителя. После депарафинирования и регидратации срезов проводили демаскировку антигенов в микроволновой печи в цитратном буфере при pH 6,0. Для предотвращения фонового окрашивания инкубировали препарат в блоке эндогенной пероксидазы и промывали в растворе Tris-буфера при pH 7,6 (Cell Marque, США). Для проведения иммуногистохимической реакции использовали моноклональные антитела к Ki-67 (GeneTex, Inc, США) — ядерному антигену, маркеру пролиферации клеточных популяций, присутствующему на всех стадиях клеточного цикла. Докраску препаратов проводили в иммуностейнере Autostainer 720 (Thermo Fisher Scientific, США), инкубацию с антителами проводили в термостате. При изучении и фотографировании микропрепаратов использовали микроскопы Scanscope Aperio (Leica, Германия) и Nikon eclipse DS-Fi 2 (Nikon, Япония). Подсчет числа меченых ядер проводили в режиме сканирования с использованием программы Aperio ScanScore Console (Leica, Германия). Оценку выраженности экспрессии маркера проводили полуколичественным методом: синий цвет — немеченые клетки, желтый, оранжевый и красный цвета — слабая, средняя и высокая степень мечености соответственно. Различная степень выраженности экспрессии маркера связана с различной интенсивностью синтетических процессов, протекающих в клетках в различные фазы (митотическую, G₁, S, G₂) клеточного цикла.

Наблюдения проводили с учетом топографии раны, выделяя пограничную область, центр и дно раны. Пограничная

область — это участок неповрежденной кожи (эпидермис и дерма) на границе с полнослойным раневым дефектом. Центр раны — область новообразующейся грануляционной ткани в центре дефекта под струпом и лейкоцитарным валом. Дно раны — область, граничащая с нижележащей неповрежденной мышечной тканью.

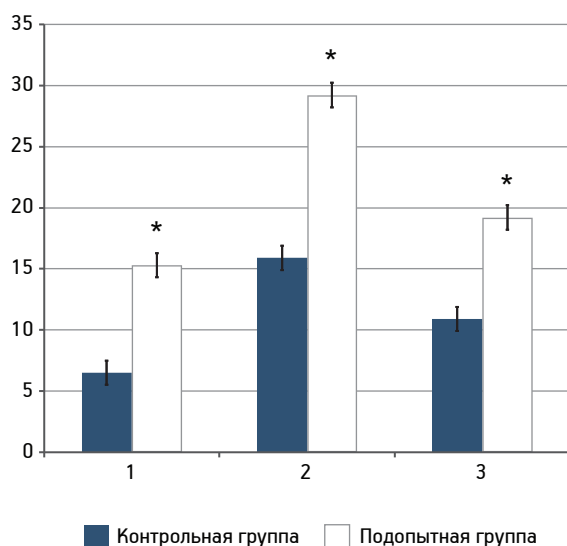
Цифровой материал обрабатывали статистически по общепринятой методике, с использованием пакета программ Excel.

Результаты исследования. У животных контрольной группы мы наблюдали закономерное стандартное течение процесса заживления раны кожи. Сравнительный анализ данных морфометрического исследования уже на 7-е сутки показал значимые различия между контрольной и подопытной группами. В контроле раневой дефект был заполнен новообразованной незрелой соединительной тканью, содержащей вертикально ориентированные тонкостенные широкие сосуды с немногочисленными «почками роста» и клеточные элементы в основном гематогенного происхождения. В группе животных, получавших Неоваскулген, хорошо сформированная новообразованная соединительная ткань имела типичное строение и включала множество кровеносных сосудов. Многочисленные сосудистые «почки» свидетельствовали об активном ангиогенезе. Количество микрососудов в подопытной группе значимо превышало контрольные значения в среднем в 2,2 раза (рисунк).

В эти же сроки наибольшая пролиферативная активность отмечена в дне и центре раны, где активно разворачивались процессы, связанные с новообразованием грануляционной ткани, заполняющей всю область дефекта. Доля меченых клеток (в процентах) у животных подопытной группы более чем в 2 раза превышала контрольные показатели (таблица).

Обращает на себя внимание то, что у крыс, которым вводился Неоваскулоген, наивысшая экспрессия маркера (количество клеток, окрашенных в красный и оранжевый цвета) выявляется в стенках новообразующихся сосудов и периваскулярной зоне, тогда как у животных контрольной группы наблюдалось диффузное распределение клеток с маркером Ki-67. В препаратах животных подопытной группы доля меченых клеток превышает контрольные показатели в пограничной области, центре и дне раны в 2,0, 2,5 и 2,1 раза соответственно.

В последующем различия между сравниваемыми группами проявлялись еще более отчетливо. В контрольной группе на 14-е сутки под эпителием располагалась молодая соединительная ткань. В центральном участке, под небольшим струпом, сохранялись отдельные крупные вертикальные сосуды. Эпителий нарастал с краев раны к центру



Количество сосудов в грануляционной ткани у животных контрольной (темные столбцы) и подопытной групп (светлые столбцы) в различные сроки после нанесения кожной раны.

По оси ординат — количество сосудов в 10 полях зрения при увеличении микроскопа ×600. По оси абсцисс — сроки наблюдения: 1 — 7-е сутки, 2 — 14-е сутки, 3 — 21-е сутки.
* Различия значимы по сравнению с данными в контрольной группе

**Доля меченых клеток (%) в грануляционной ткани регенерата на 7-е и 14-е сутки после операции
у животных контрольной и подопытной (получавших Неоваскулген) групп**

Сроки наблюдений	Контроль			Неоваскулген		
	Пограничная область	Центр раны	Дно раны	Пограничная область	Центр раны	Дно раны
7-е сутки	17,5	14,0	19,5	35,5	36,0	41,5
14-е сутки	23,5	20,0	22,0	26,5	31,0	33,5

двумя пластами навстречу друг другу, базальная мембрана имела ровные контуры. Среди клеток соединительной ткани обращал на себя внимание хорошо выраженный слой горизонтально ориентированных фибробластов. Число микрососудов заметно превышало показатель, характерный для предыдущего срока (см. рисунок), однако растущих капилляров не очень много. В подопытной группе животных к 14-м суткам эпителизация раневого дефекта практически завершалась. По этой причине мы не проводили иммуногистохимическое исследование на 21-е сутки. Пласт новообразованного эпителия покрывал всю площадь раны. Он состоял из нескольких слоев клеток, в которых уже отмечалась вертикальная дифференциация; образовывал многочисленные выросты в сосочковый слой дермы. Количество сосудов в новообразованной ткани у животных, получавших «Неоваскулген», в 1,7 раза превышало таковое у контрольных крыс.

Как в контроле, так и при использовании ангиоактивного препарата, очаги пролиферативной активности клеток дермы распространялись на всю область раны, и по сравнению с предыдущим сроком можно было отметить возрастание доли меченых клеток в пограничной зоне в 1,3 раза. В дне и центре раны доля меченых клеток сохранялась относительно высокой. У животных, получавших Неоваскулоген, относительное содержание меченых клеток превышало этот показатель в группе контрольных животных в 2,1–2,5 раза. У животных контрольной группы преобладали клетки со слабой и средней степенью экспрессии маркера (желтое и оранжевое окрашивание), тогда как в подопытной группе сохранялась высокая концентрация пролиферирующих клеток с преобладанием высокой и средней степени экспрессии (оранжевое и красное окрашивание), особенно в периваскулярных зонах.

На 21-е сутки у контрольных животных в большинстве случаев раны покрыты эпителиальным пластом, состоящим из 8–10 рядов клеток. Базальная мембрана — ровная, молодая соединительная ткань, располагающаяся под эпителием, не образовывала сосочков, типичных для этого слоя дермы. Дериваты кожи (волосы, сальные и потовые железы) отсутствовали. В этот же

период у животных, получавших «Неоваскулген», на протяжении всего новообразованного эпителиального регенерата базальная мембрана и прилежащие базальные слои эпидермиса образуют отчетливые выросты в подлежащую дерму, чередующиеся с дермальными сосочками. Регулярно встречаются волосяные фолликулы, сальные и, изредка, потовые железы. В целом строение регенерата близко к строению интактной кожи. Количество сосудов в дерме в 1,9 раза выше, чем в новообразованной соединительной ткани у контрольных животных. Подсчет доли клеток, экспрессирующих Ki-67, в этот срок не проводился.

При макроскопическом изучении место имевшегося дефекта у контрольных животных хорошо определяется, а в подопытной группе оно практически неразлично на фоне неповрежденных участков и покрыто густой шерстью.

Обсуждение полученных данных. Новообразование сосудов при раневом процессе происходит по определенной программе, причем сигналы для роста новых сосудов индуцируются как самими травмированными тканями, так и последствием травмы — тканевой гипоксией [3]. Гипоксия повышает экспрессию ряда генов некоторых факторов роста, в том числе VEGF [7]. На ранних этапах неповрежденные сосуды в зоне, прилегающей к ране, расширяются, их стенка становится проницаемой, осуществляется выход клеточных элементов, участвующих в развитии воспаления [4]. Эндотелиальные клетки вырабатывают биологически активные вещества, разрушающие базальную мембрану, что приводит к возможности их миграции в направлении очага повреждения и размножения [3]. Значительный вклад в пул пролиферирующих клеток вносят перициты, которые в этой фазе ангиогенеза мигрируют из стенки сосудов, активно делятся и, по-видимому, являются родоначальниками ряда клеток соединительной ткани, также способных к пролиферации [2, 5]. Наши данные отчетливо демонстрируют концентрацию пролиферирующих клеток в периваскулярных зонах, особенно около растущих микрососудов. Этот феномен доминирует у животных, которым стимулировали ангиогенез путем введения плазмиды, кодирующей VEGF. Под ее влиянием происходит усиленная

выработка VEGF, стимулирующего клетки эндотелия, что приводит к росту кровеносных сосудов (васкуляризации) в области введения. По мере «созревания» соединительной ткани дермы стенки микрососудов стабилизируются, и формируется новая базальная пластинка. Ведущая роль здесь также принадлежит перицитам, которые «рекрутируются» в стенки микрососудов из окружающей ткани [2, 6]. В условиях введения плазмиды pCMV-VEGF165, кодирующей VEGF, процессы новообразования микрососудов и формирования новой капиллярной сети существенно интенсифицируются. Это приводит не только к увеличению числа сосудов, что достаточно очевидно, но и к стимуляции пролиферативной активности клеток в зонах сосудистого роста. Более того, стимуляция роста и новообразования микрососудов способствует более раннему и полноценному восстановлению эпидермиса и «созреванию» кожи как органа в зоне раны. Можно заключить, таким образом, что дополнительная стимуляция ангиогенеза сопровождается возрастанием общего регенераторного потенциала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Н.Т., Никитюк Д.Б., Клочкова С.В. Аналитическая морфология репаративной регенерации в коже под действием различных региональных факторов // Журн. анат. гистопатол. 2015. Т. 4, № 1. С. 26–38.
2. Банин В.В. Роль пероцитов в механизме новообразования сосудов регенерирующей соединительной ткани // Морфология. 2004. Т. 124, вып. 1. С. 45–50.
3. Козлов В.И. Капилляроскопия в клинической практике. М.: Практическая медицина, 2015.
4. Шестакова В.Г., Банин В.В., Баженов Д.В. Особенности новообразования грануляционной ткани в полнослойной хирургической ране при стимуляции ангиогенеза «Неоваскулгеном» // Журн. анат. гистопатол., 2015. Т. 4. № 3. С. 140.
5. Díaz-Flores L.R., Gutiérrez J.F., Madrid H. et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche // Histol. Histopathol. 2009. Vol. 24. P. 909–969.
6. Hudlicka O., Tyler K.R. Angiogenesis. The Growth of the Vascular System. London: Acad. Press, 1986.
7. Silvestre J.S., Tamarat R., Ebrahimian T.G. et al. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis // Circ. Res. 2003. Vol. 93. P. 114–123.

Поступила в редакцию 19.12.2016
Получена после доработки 15.03.2017

THE ASSOCIATION BETWEEN THE VASCULARIZATION OF SKIN REGENERATE AND THE PROLIFERATIVE ACTIVITY OF ITS CELLS

V.G. Shestakova¹, D.V. Bazhenov², V.V. Banin³

Using histological, morphometric and immunohistochemical methods, the correlation between the degree of development of the microcirculatory bed and the level of cell proliferative activity was studied in the healing zone of rat full-layer surgical skin wound. The comparison was made between the results obtained during spontaneous course of the reparative process (control group, n = 20) and under the conditions of angiogenesis stimulation by twofold paravulvular injection of 0.1 ml of Neovascultene pCMV-VEGF165 plasmid encoding endothelial vascular growth factor (experimental group, n = 20). Morphometric analysis of the material obtained on Days 7, 14 and 21 showed that the number of blood vessels in the newly formed granulation tissue in the experimental group was 1.9 times higher than in the control. Immunohistochemical studies have demonstrated the concentration of proliferative processes in the perivascular zone, especially in animals with stimulated angiogenesis. The use of Neovascultene resulted in the formation of the denser network of microvessels, the increased cell proliferation, the reduction of overall healing times and the formation of organospecific regenerate.

Key words: skin, regeneration, stimulated angiogenesis, granulation tissue, proliferation

¹ Department of histology, embryology and cytology, ² department of Human Anatomy, Tver' State Medical University; ³ department of histology, embryology and cytology, A.I. Yevdokimov Medico-Stomatological University, Moscow