

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИДЫ pCMV-VEGF165 НА РЕПАРАЦИЮ ПОЛНОСЛОЙНОЙ РАНЫ КОЖИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В.Г. Шестакова¹, В.В. Банин², Р.В. Деев³, Д.В. Баженов¹

¹ Тверской государственный медицинский университет России, Тверь, Россия

² Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

³ Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

EFFECT OF pCMV-VEGF165 PLASMIDES ON THE REPARATION OF FULL-LAYER SKIN WOUND IN EXPERIMENT

V.G. Shestakova¹, V.V. Banin², R.V. Deev³, D.V. Bazhenov¹

¹ Tver State Medical University of Russia, Tver, Russia

² A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

³ I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia

e-mail: shestvg@mail.ru

Проведено исследование регенерации полнослойной кожной раны в условиях стимулированного ангиогенеза, путем паравульнарного введения раствора, содержащего плазмиду pCMV-VEGF165. Воспалительная реакция в опытной группе крыс протекала интенсивнее и уже на 7 сутки лейкоцитарный вал в контроле шире в 1,3 раза, а на 14 сутки в опытной группе этот показатель в 2,2 раза меньше контрольных цифр. Показатели, характеризующие развитие грануляционной ткани на 7 сутки, во второй группе в 1,3 преобладают над контрольными значениями, через 14 суток, в связи с созреванием молодой соединительной ткани — в 1,1 раза. Наибольшие отличия в группах сравнения обнаружены в отношении степени эпителизации дефекта. Толщина эпителия на границе превышает контроль в 1,4 раза, толщина эпителиального пласта — 1,7 раза, а протяженность — 1,5 раза. По сравнению с контрольными значениями количество сосудов в опытной группе на 7 сутки были выше в 2,3 раза, на 14 сутки — 1,8 раза и на 21 сутки — 1,7 раза. Заживление полнослойной раны кожи в опытной группе протекало более интенсивно по сравнению с контролем, и эпителизация завершилась на 2 дня раньше. Кроме того, индукция ангиогенеза привела к формированию органоспецифического регенерата практически не отличимого от интактной кожи.

Ключевые слова: регенерация, индуцированный ангиогенез, грануляционная ткань, эпителий.

Ведение

Поверхностное расположение кожи определило тот факт, что этот орган обладает набором сложных генетически детерминированных механизмов защиты и восстановления целостности тканей при повреждении. Однако репарация тканей после нанесения раны по-прежнему остается одной из центральных проблем клинической медицины, и ни один из способов лечения ран не удовлетворяет потребностей практической медицины полностью [1]. Регенеративная медицина, основанная на использовании клеточных механизмов восстановления структур и функций организма, является фундаментальной основой «медицины будущего» и наиболее высокотехнологичная и бурно развивающаяся отрасль биомедицинской индустрии [2]. Индуцированный ангиогенез, как показывает ряд исследований последних лет, наиболее универсальный способ воздействия на регенерацию покровных тканей, однако пути реализации его стимулирующего эффекта пока не вполне изучены.

Целью настоящего исследования было оценить динамику изменений основных структур регенерирующей раны кожи при спонтанном заживлении и в условиях индуцированного ангиогенеза в зоне повреждения;

The study of the regeneration of a full-layer skin wound under conditions of stimulated angiogenesis was carried out by paravulnare injection of a solution containing the plasmid pCMV-VEGF165. The inflammatory reaction in the experimental group of rats was more intense and already on day 7, the leukocyte shaft in the control was 1.3 times wider, and on day 14 in the experimental group, this indicator was 2.2 times less than the control figures. The indicators characterizing the development of granulation tissue on day 7, in the second group, 1.3 prevail over the control values, after 14 days, due to the maturation of young connective tissue — 1.1 times. The greatest differences in the comparison groups were found in relation to the degree of epithelialization of the defect. The epithelium thickness at the border is 1.4 times the control, the epithelial layer thickness is 1.7 times, and the length is 1.5 times. Compared with the control values, the number of vessels in the experimental group on day 7 were 2.3 times higher, on day 14 — 1.8 times and on day 21 — 1.7 times. The healing of the full-thickness wound of the skin in the experimental group proceeded more intensively compared with the control, and epithelization was completed 2 days earlier. In addition, stimulation of angiogenesis led to the formation of an organ-specific regenerate practically indistinguishable from intact skin.

Keywords: regeneration, stimulated angiogenesis, granulation tissue, epithelium.

выявить основные отличия в течении регенераторного процесса и уточнить возможность использования этого метода стимуляции репарации в клинической практике.

Материал и методы

Дизайн исследования

Исследование было выполнено на 80 белых беспородных половозрелых крысах, подобранных по принципу аналогов с учетом массы тела (200–250 г.), пола (самки) и возраста (6–8 мес.), в соответствии с международными правилами гуманного обращения с лабораторными животными, «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (1986). Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ТГМУ (протокол № 9 от 14.10.2013). Всем животным за сутки до операции удаляли волосяной покров на спине. С целью стандартизации размеров наносимых кожных дефектов животным на обработанное спиртом операционное поле наносили контуры раны с помощью трафарета смоченного раствором йода. Затем под наркозом («Золитил-100» в дозе 8 мкг/кг) на дорсальной поверхности тела по границе отпечатка хирургическими остроконечными

Таблица 1. Морфометрические параметры регенерата кожи спины крыс контрольной группы на 7, 14 сутки эксперимента ($M \pm \sigma$)

Параметр	Сроки	7 сут. (n=20)	14 сут. (n=20)	p
Высота струпа (мкм)		324,1±12,92	213,7±16,58	0,0001
Высота лейкоцитарного вала (мкм)		142,6±16,33	88,2±8,59	0,0001
Глубина грануляционной ткани (мкм)		484,9±53,58	786,0±43,04	0,0001
Толщина эпителия на границе (мкм)		70,2±5,15	118,2±6,01	0,0001
Толщина эпителиального регенерата (мкм) на расстоянии 100 мкм от его края		20,8±2,71	39,3±2,64	0,0001
Протяженность эпителиального регенерата (мкм)		379,1±29,46	600,8±41,28	0,0001

прямыми ножницами удаляли лоскут кожи с подкожной жировой клетчаткой, формируя стандартные полно-слойные кожные раны площадью 225 мм² и глубиной до мышечного слоя. Раневая поверхность составляла в среднем 14,5% от площади тела. Животных разделяли на 2 группы: контрольная (n=40) и экспериментальная (n=40). Крысам первой группы паравульнарно (по 0,05 мл справа и слева от раны на расстоянии 2 мм под углом 45°) двукратно (на 2 и 7 сутки) вводили 0,1 мл 0,9% раствора NaCl. Животным экспериментальной группы аналогичным способом вводили 0,1 мл раствора «Неоваскулгена» (Институт Стволовых Клеток Человека, Россия).

Характеристика препарата

Препарат представляет собой высокоочищенную сверхскрученную форму плазмиды pCMV-VEGF165, кодирующей сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) под контролем CMV-промотора (управляющего участка ДНК). Рекомбинантная плазмидная ДНК состоит из следующих компонентов: фрагмента регуляторного участка (22 нуклеотидных пар), который определяет транскрипцию гена, минигена VEGF, при экспрессии которого синтезируется изоформа VEGF-A165, сигнала сплайсинга, сигнала полиаденилирования и терминатора транскрипции SV40.

Гистологическое исследование

Животных выводили из эксперимента на 7, 14, 21 сут., забирали биоптаты кожи и подлежащих тканей из области операции размерами 1,5×1,5 см, фиксировали в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) в течение 24 ч. с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов и изготовлением парафиновых блоков [3]. На микротоме Microm HM 430 (Microm International GmbH part of Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Germany) изготавливали гистологические препараты (шаг 4 мкм), окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. Для оценки структуры регенерата использовали методу микроскопической морфометрии. Подсчитывали количество сосудов в 10 полях зрения микроскопа (при увеличении 600), определяли размеры новообразованных структур регенерата: высоту струпа, лейкоцитарного вала, грануляционной ткани, пограничной зоны эпителия и протяженность эпителиального клина с помощью исследовательского микроскопа Olympus CX21 (Китай), видеокамеры MC-10 и пакета программ MCviewSetup, MCviewDshowSetup и MCviewTwainSetup (ЛОМО-микрoанализ, Россия).

Статистический анализ

Полученные данные подвергали статистической обработке с расчетом описательных показателей (среднее значение, стандартное отклонение, медиана, верхний и нижний квартили) в программе Microsoft Excel [4]. Для определения типа распределения количественных признаков использовали критерии Шапиро-Уилка (n<50), Колмогорова-Смирнова (n>50), а также использовали графический метод, основанный на анализе гистограмм распределения, величины асимметрии и эксцессы. Для оценки статистической значимости различий между группами по показателям, имеющим нормальное распределение, применяли t-критерий Стьюдента. Для сравнения экспериментальной и контрольной групп применяли U-критерий Манна-Уитни, для внутригрупповых сравнений на разных сроках наблюдения — критерий Вилкоксона. Выявление связи между переменными проводилось с помощью коэффициентов корреляции Спирмена (r_s), Пирсона (r_p). Для описания качественных данных использовали относительные частоты и 95% доверительные интервалы для доли. Уровень статистической значимости принимался за 0,05 (p).

Результаты

Данные, полученные при морфометрии структур кожного регенерата на 7 и 14 сут. в контрольной группе приведены в табл. 1. Были выявлены статистически значимые межгрупповые различия между морфометрическими параметрами на этапах эксперимента (7 суток и 14 суток). Данные высоты струпа и лейкоцитарного вала снижаются в процессе репарации, а показатели глубины грануляционной ткани, толщины и протяженности эпителия напротив закономерно возрастают.

Определение количества сосудов грануляционной ткани показало значительное отличие показателей на разных сроках эксперимента. К сроку 14 сут. показатель нарастал, а затем наблюдалось его снижение в связи с созреванием грануляционной ткани и ремоделированием ее в молодую соединительную ткань (табл. 2).

В экспериментальной группе были выявлены статистически значимые межгрупповые различия между морфометрическими параметрами на сроках 7 и 14 сут. (табл. 3).

Показатели высоты струпа и лейкоцитарного вала снижались в процессе репарации, а значения глубины грануляционной ткани, толщины и протяженности эпителия, напротив, возрастали, что связано с закономерной стадийностью восстановительного процесса. Обращает на себя внимание выраженное развитие грануляционной ткани и большая протяженность эпителиального регенерата.

При оценке количества сосудов, были выявлены статистически значимые различия между показателями

Таблица 2. Количество сосудов в регенерате кожи спины крыс контрольной группы на 7, 14, 21 сут. после операции.

Сроки	7 сут.	14 сут.	21 сут.
Количество сосудов грануляционной ткани	6,5±1,10*	15,9±1,90*	10,9±1,30*

* различия при сравнении с предыдущим сроком статистически значимы при $p < 0,05$.

Таблица 3. Морфометрические параметры регенерата кожи спины крыс экспериментальной группы на 7 и 14 сут. после операции ($M \pm \sigma$)

Параметр	Сроки	7 сут. (n=20)	14 сут. (n=20)	P
Высота струпа (мкм)		333,6±15,23	165,3±12,32	0,0001
Высота лейкоцитарного вала (мкм)		119,4±10,99	40,2±7,42	0,0001
Глубина грануляционной ткани (мкм)		609,2±51,71	721,7±49,06	0,0001
Толщина эпителия на границе (мкм)		99,2±9,27	130,4±10,89	0,0001
Толщина эпителиального регенерата (мкм) на расстоянии 100 мкм от его края		35,4±4,11	58,2±2,55	0,0001
Протяженность эпителиального регенерата (мкм)		563,8±33,01	877,9±37,95	0,0001

Таблица 4. Количество сосудов в регенерате кожи спины крыс экспериментальной группы на 7, 14, 21 сут. после операции.

Сроки	7 сут.	14 сут.	21 сут.
Количество сосудов грануляционной ткани	15,3±1,20	29,2±2,00	19,2±1,70

в экспериментальной группе на разных сроках наблюдения (табл. 4). При этом, по сравнению с контрольными значениями количество сосудов в экспериментальной группе на 7 сут. было больше в 2,3 раза, на 14 сут. — 1,8 раза и на 21 сут. — в 1,7 раза. Различия были статистически значимы. Выявленные в процессе морфометрии особенности структур регенерата коррелируют с данными полученными при планиметрии. Заживление полнослойной раны кожи в опытной группе протекает более интенсивно по сравнению с контролем, и полная эпителизация завершается на 2 дня раньше. Кроме того, стимуляция ангиогенеза приводит к формированию органоспецифического регенерата практически не отличимого от интактной кожи.

Обсуждение

Согласно данным литературы, формирование сосудов происходит по определенной программе, сигналом для реализации которой может являться травма, индуцирующая гипоксию [5]. Гипоксия повышает экспрессию ряда генов, в том числе *VEGF* [6]. В процесс вовлекаются и другие факторы роста, активируются клетки эндотелия, при связывании факторов роста со специфическими рецепторами на их поверхности. На ранних этапах неповрежденные сосуды в зоне, прилегающей к ране, расширяются, их стенка становится проницаемой, осуществляется выход клеточных элементов, участвующих в развитии фазы воспаления [7]. Сами эндотелиальные клетки вырабатывают биологически активные вещества, разрушающие базальную мембрану, что приводит к возможности их миграции в направлении очага повреждения и размножении [5]. При появлении в стенке сосудов перicyтов, а тем более гладких миоцитов, наступает стабилизация роста капилляров и формируется базальная мембрана, в образовании которой участвуют как эндотелиоциты, так и перicyты [8, 9]. Однако в условиях

введения плазмиды *pCMV-VEGF165*, кодирующей *VEGF*, этот процесс, по-видимому, может видоизменяться и пролонгироваться, в связи с чем формируется более плотная сеть микрососудов, обеспечивая дополнительный приток кислорода и биологически активных веществ к поврежденной зоне.

В нашем исследовании, генопосредованная индукция ангиогенеза обеспечивала значительные изменения регенерата при заживлении кожной раны у крыс. При сравнительном анализе данных морфометрии структур регенерата в контрольной и экспериментальной группах на ранних сроках исследования высота струпа практически не отличалась, через 14 сут. в экспериментальной группе струп был тоньше в 1,3 раза. Воспалительная реакция в этой же группе протекала интенсивнее и уже к 7 сут. лейкоцитарный вал в контроле был шире в 1,3 раза, а на 14 сут. в экспериментальной группе этот показатель имел значение в 2,2 раза меньше контроля. Показатели, характеризующие развитие грануляционной ткани на сроке 7 сут., в экспериментальной группе в 1,3 превосходили контрольные значения, через 14 сут. — в 1,1 раза. Наибольшие отличия в группах сравнения обнаружены в отношении степени эпителизации дефекта. Толщина эпителия на границе в экспериментальной группе превышала показатель в контроле в 1,4 раза, толщина эпителиального пласта — в 1,7 раза, а протяженность — в 1,5 раза.

Заключение

В результате проведенного нами исследования показано, что стимулированный ангиогенез ускоряет и оптимизирует репаративную регенерацию. В процессе развития сосудов в области раны происходят последовательные изменения от возникновения первичного капиллярного сплетения, с характерной вертикальной ориентацией, до его трансформации в органоспецифическое

микроциркуляторное русло. Структурная перестройка в условиях стимулированного ангиогенеза, по-видимому, обеспечивает оптимальное трофическое снабжение

вновь образующихся тканей и приводит к формированию регенерата кожи со всеми производными, практически не отличимого от неповрежденной кожи.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Алексеева Н.Т., Никитюк Д.Б., Клочкова С.В. Аналитическая морфология репаративной регенерации в коже под действием различных региональных факторов. Журнал анатомии и гистопатологии 2015; 4(1): 26–38. (Alekseeva N.T., Nikityuk D. B., Klochkova S.V. Analytical morphology of reparative regeneration in the skin under the influence of various regional factors. Journal of Anatomy and Histopathology 2015; 4 (1): 26–38.)

2. Целуйко С.С., Кушнарев В.А. Регенеративная биомедицина: достижения и перспективы. Амурский медицинский журнал 2016; 1: 7–15. (Celujko SS, Kushnarev VA. Regenerativnaja biomedicina: dostizhenija i perspektivy. Amurskij medicinskij zhurnal. 2016; 1: 7–15.)

3. Семченко В.В., Барашкова С.Ф., Ноздрин В.Н. и др. Гистологическая техника: учебное пособие. 3-е изд. Омск-Орел: Омская областная типография; 2006. с. 290. (Semchenko V.V., Barashkova S.F., Nozdryn V.N. et al. Histological technique: a tutorial. 3rd ed. Omsk-Oryol: Omsk Regional Printing House; 2006. p. 290.)

4. Борздова Т.В. Основы статистического анализа и обработка данных с применением Microsoft Excel: учебное пособие. Минск: ГИУСТ БГУ; 2011. с. 109. (Borzdova T.V. Basics of statistical analysis and data processing using Microsoft Excel: a tutorial. Minsk: GIUST BSU; 2011. p. 109.)

5. Козлов В.И. Капилляроскопия в клинической практике. Монография. Москва: Практическая Медицина; 2015. с. 232. (Kozlov V.I. Capillaroscopy in clinical practice. Monograph. Moscow: Practical Medicine; 2015. p. 232.)

6. Silvestre J.S., Tamarat R., Ebrahimian T.G., Le-Roux A. et al. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. Circulation Research 2003; 93: 114–23.

7. Шестакова В.Г., Банин В.В., Баженов Д.В. Особенности новообразования грануляционной ткани в полнслойной хирургической ране при стимуляции ангиогенеза «Неоваскулгеном». Журнал анатомии и гистопатологии 2015; 4(3): 140. (Shestakova V.G., Banin V.V., Bazhenov D.V. Peculiarities of granulation tissue neoplasm in a full-layer surgical wound upon angiogenesis stimulation by "Neovascugen". Journal of Anatomy and Histopathology 2015; 4 (3): 140.)

8. Банин В.В. Роль перicyтов в механизме новообразования сосудов регенерирующей соединительной ткани. Морфология 2004; 125(1): 45–50. (Banin V.V. The role of pericytes in the mechanism of vascular neoplasm regenerating connective tissue. Morphology 2004; 125 (1): 45–50.)

9. Hudlicka O., Tyler K.R. Angiogenesis. The growth of the vascular system. London; Orlando, FL: Academic Press; 1986. p. 131.

Поступила: 12.07.2019