



Шестель И.В., Пикирения И.И.✉

Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Иммуногистохимические маркеры процессов репаративной регенерации кожных ран

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Пикирения И.И. – постановка проблемы, редактирование текста статьи, формирование выводов исследования; Шестель И.В. – разработка концепции статьи, составление черновика рукописи.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Подана: 09.02.2023

Принята: 20.03.2023

Контакты: 777pik@gmail.com

Резюме

Введение. Эффективное лечение длительно не заживающих ран и предотвращение перехода острых ран в хронические является актуальной проблемой современной медицины, несмотря на продолжительное и активное изучение этого явления.

Цель. На основании литературных данных представить иммуногистохимические маркеры, характеризующие репаративные процессы при повреждении и хронических ранах кожи.

Материалы и методы. Поиск информации по исследуемой теме проводился в таких электронных ресурсах, как PubMed, база данных NCBI и Scholar Google, по ключевым словам: chronic wound, regenerative repair of skin wounds, immunohistochemistry, stages of skin wound healing, immunohistochemical markers of healing.

Результаты. На основании литературных данных представлены фазы раневого процесса и иммуногистохимические маркеры, характерные для каждой из них. Отдельно описана роль различных факторов роста, ядерного белка Ki-67, фактора некроза опухоли, матриксных металлопротеиназ, интерлейкинов, фибронектина, Р-селектина, аквапорина, фибрина и коллагена.

Заключение. С помощью широкого спектра иммуногистохимических маркеров можно объективизировать течение раневого процесса, оценить скорость и эффективность репарации при повреждении и хронических ранах кожи, понять причину нарушения процесса репарации и вклад различных факторов в этот процесс. Иммуногистохимические исследования могут быть информативным и достоверным способом оценки эффективности новых методов лечения ран.

Ключевые слова: хроническая рана, регенеративная репарация ран кожи, иммуногистохимия, стадии заживления кожных ран, иммуногистохимические маркеры заживления



Irina V. Shestel, Ivan I. Pikirenia✉

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Immunohistochemical Markers of Reparative Regeneration of Skin Wounds

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Ivan I. Pikirenia – setting of the problem, editing the text of the article, the formation of the conclusions of the study; Irina V. Shestel – development of the concept of the article, drafting the manuscript.

Funding: the study was not sponsored.

Submitted: 09.02.2023

Accepted: 20.03.2023

Contacts: 777pik@gmail.com

Abstract

Introduction. Effective treatment of long-term non-healing wounds and prevention of the transition of acute wounds to chronic ones is an urgent problem of modern medicine, despite the long and active study of this phenomenon.

Purpose. Based on the literature data, present immunohistochemical markers that characterize reparative processes in damaged and chronic skin wounds.

Materials and methods. The search for information on the topic under study was carried out in the electronic resources PubMed, the NCBI database and Scholar Google using the keywords: chronic wound, regenerative repair of skin wounds, immunohistochemistry, stages of skin wound healing, immunohistochemical markers of healing.

Results. Based on the literature data, the phases of the wound process and immunohistochemical markers characteristic of each of them are presented in the article. The role of various growth factors, nuclear protein Ki-67, tumor necrosis factor, matrix metalloproteinases, interleukins, fibronectin, P-selectin, aquaporin, fibrin and collagen are separately described.

Conclusion. It is concluded that with the help of a wide range of IHC markers, it is possible to objectify the course of the wound process, evaluate the speed and effectiveness of repair in case of damage and chronic skin wounds, understand the cause and contribution of various factors in the violation of the repair process. IHC studies can be an informative and reliable method of evaluating the effectiveness of new methods of wound treatment.

Keywords: chronic wound, regenerative repair of skin wounds, immunohistochemistry, stages of skin wound healing, immunohistochemical markers of healing

■ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема заживления хронических ран является одним из важнейших вопросов для различных направлений клинической хирургии, а особенно – для онкологии, сосудистой хирургии, трансплантологии. Наличие длительно не заживающих ран существенно снижает качество жизни пациентов, несет угрозу опасных для жизни осложнений, а также требует значительных материальных

затрат [1, 2]. Несмотря на это, критерии, по которым рану можно было бы определить как острую или хроническую, достаточно вариабельны. Различные медицинские школы и ассоциации врачей предлагают различные трактовки этого понятия, часто достаточно сильно различающиеся между собой. Некоторые авторы считают хронической рану, существующую более 4 недель без признаков активной регенерации, за исключением обширных раневых дефектов. Другие увеличивают этот срок до 6 недель, 8 или 10 недель [3, 4]. Также существует определение, согласно которому хронической считается рана, которая не проходит нормальные фазы заживления, а последовательность процессов регенерации, наблюдаемая при заживлении острых ран, останавливается на одной из 4 различных стадий заживления [5]. Видимо, самым корректным определением является формулировка специального заседания Европейского общества репарации тканей: «Хронической следует считать рану, не заживающую в течение периода, который является нормальным для ран подобного типа или локализации». Все эти определения основаны на визуальной оценке размеров и состояния раны, без учета эффективности клеточных взаимодействий и биохимических процессов у конкретного пациента при определенном виде повреждения.

Своевременное выявление нарушения процесса заживления при помощи иммуногистохимических (ИГХ) маркеров сделает возможной диагностику нарушений заживления кожных ран на клеточном и молекулярном уровне, еще до того момента, когда нарушения станут очевидными при визуальной оценке. ИГХ-исследование – это метод микроскопического исследования, который основан на взаимодействии специфических маркированных антител с искомым веществом на гистологическом препарате, которое в данной реакции играет роль антигена. Таким образом, используя меченые антитела, можно точно идентифицировать содержание определенных клеток или молекул, оценить интенсивность биологических процессов, в том числе и процесса заживления. Определение стадии регенерации, на которой остановился процесс заживления, и причины этого нарушения поможет сделать процесс лечения раны более эффективным. Также использование данных иммуногистохимических исследований поможет оценить эффективность новых разрабатываемых способов лечения ран на экспериментальных моделях.

■ ЦЕЛЬ РАБОТЫ

На основании литературных данных представить ИГХ-маркеры, характеризующие репаративные процессы при повреждении и хронических ранах кожи.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск информации по исследуемой теме проводился в таких электронных ресурсах, как PubMed, база данных NCBI и Scholar Google, по ключевым словам: chronic wound, regenerative repair of skin wounds, immunohistochemistry, stages of skin wound healing, immunohistochemical markers of healing. Проанализировано 112 источников по теме исследования, в тексте приведены ссылки на 50 наиболее информативных из них.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе многочисленных исследований установлено, что острые раны заживают, проходя последовательно процессы свертывания (гемостаза), воспаления, синтеза



матрикса, ангиогенеза, фиброплазии, эпителизации, сокращения (контракции) и ремоделирования рубца [6], и эти процессы можно объединить в три фазы заживления: воспаления, пролиферации и созревания [7]. На каждой из этих фаз можно выделить наиболее значимые иммуногистохимические маркеры.

Фаза воспаления начинается непосредственно после нарушения целостности кожных покровов с интенсивной вазоконстрикцией, которая препятствует избыточной кровопотере и длится около 5–10 минут. После этого в результате выброса большого количества простагландинов происходит расширение сосудов и повышение проницаемости сосудистой стенки. Благодаря этим процессам в области повреждения скапливается большое количество лейкоцитов, моноцитов, лимфоцитов, макрофагов. Тромбоциты инициируют образование тромба для окончательной остановки кровотечения. Также тромбоциты продуцируют тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фибробластический фактор роста (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), β -тромбоглобулин, фактор тромбоцитов 4 (PF4), тромбоцитарный фактор ангиогенеза (PDAF), серотонин, брадикинин, простагландины, простаглицлины, тромбоксан и гистамин. В течение 24–48 часов синтезируется фибронектин, который в последующем служит матрицей для миграции фибробластов [8].

Фаза пролиферации обычно начинается со вторых суток после повреждения и длится по 10-е сутки, опосредуется различными типами клеток [9]. В течение 2–3 суток после травмы из покоящихся фиброцитов формируются фибробласты и мигрируют в рану на ранний экстрацеллюлярный матрикс, состоящий из фибронектина и гиалуронатов. Влияние на рост и функционирование обусловлено воздействием FGF. В эту фазу также происходит активный ангиогенез, который способствует продвижению фибробластов в рану и необходим для обеспечения их метаболических потребностей. Ангиогенез осуществляется при участии сосудистого фактора роста (VEGF), который стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток [10]. Синтез коллагена фибробластами начинается на 3–4-е сутки после повреждения и является характерным признаком этой фазы. В коже преимущественно обнаруживаются коллагены I и III типа, содержащие высокое количество гидроксипролина. Коллаген I типа через III тип формирует фибриллы, которые обеспечивают прочность тканей организма. Соотношение между коллагеном различных типов может служить достоверным маркером нарушения заживления. Кроме того, во время этой фазы в рану мигрируют миоциты, которые также синтезируют белки внеклеточного матрикса, преимущественно в виде коллагена, в результате чего начинает формироваться рубец [11].

Фаза ремоделирования является заключительной в заживлении ран и может продолжаться до 2 лет [12]. В это время происходит апоптоз уже ненужных сосудов, фибробластов и воспалительных клеток, коллаген III типа заменяется коллагеном I типа с помощью матриксных металлопротеиназ (MMP), синтезируемых макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками.

Для заживления раны характерен процесс раневой контракции (начинается с конца первой недели), когда происходит уменьшение площади раневой поверхности, однако при хронической ране этот процесс носит беспорядочный и хаотичный характер, результатом чего может стать дезорганизация межклеточных взаимодействий и формирование косметического дефекта. В ряде исследований показано,

что в таких ранах присутствуют миофибробласты в большом количестве и активно синтезируется α -гладкомышечный актин (приблизительно на 12–15-е сутки) [13]. При высоком содержании в ране коллагена типа III в присутствии таких факторов роста, как TGF- β и PDGF, контракция может происходить за счет сокращения внеклеточного матрикса даже при отсутствии миофибробластов, приводя к образованию гипертрофических рубцов [14].

Еще одним отличием хронических ран от острых является формирование грануляционной ткани. Основным стимулом для этого является высокое содержание VEGF и FGF2 [15]. По данным некоторых исследований, в активно гранулирующих ранах наблюдается высокое содержание фактора некроза опухоли (TNF), TGF- β , TGF- α и PDGF, которые синтезируются тромбоцитами, лейкоцитами и моноцитами. После заживления раны миофибробласты подвергаются апоптозу, а грануляционная ткань превращается в бесклеточный коллагеновый матрикс, лишенный сосудов [6].

Трансформирующий фактор роста бета (TGF- β)

Суперсемейство белков-цитокинов TGF- β состоит из 33 изоформ. У млекопитающих в основном обнаруживаются изоформы TGF- β 1, - β 2 и - β 3, но при заживлении ран кожи преобладает TGF- β 1 [16]. Каждая изоформа выполняет уникальную функцию в процессе заживления ран и влияет на экспрессию коллагена в первичных фибробластах. TGF- β 1 и TGF- β 2 секретируются дегранулированными тромбоцитами, а также моноцитами и макрофагами во время пролиферативной стадии, тогда как TGF- β 3 продуцируется кератиноцитами на стадии эпителизации [17]. Первоначально считалось, что TGF- β способствует заживлению ран путем стимуляции ангиогенеза, пролиферации фибробластов, дифференцировки миофибробластов и синтеза коллагена, а также отложения внеклеточного матрикса. В настоящее время после ряда экспериментальных и клинических исследований это мнение изменилось в пользу того, что изоформы TGF- β 1 и TGF- β 2 обладают фибротической активностью и увеличение их концентрации на ранних стадиях заживления приводит к образованию гипертрофических рубцов [18], в то время как TGF- β RII и TGF- β 3 являются их антагонистами и уменьшают рубцевание [19].

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)

VEGF участвует в заживлении ран и секретируется тромбоцитами, макрофагами, фибробластами и кератиноцитами, является наиболее важным сигнальным фактором роста в ангиогенезе и васкулогенезе [16]. Семейство VEGF состоит из изоформ VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и VEGF-E, а также плацентарного фактора роста. VEGF-A является гетеродимерным гепарин-связывающим белком с молекулярной массой 45 кДа и одной из самых значимых проангиогенных молекул в коже [20]. В исследованиях было доказано, что VEGF благодаря своей тирозинкиназной активности действует как важный регулятор ангиогенеза (физиологического и патологического), индуцируя пролиферацию фибробластов и эндотелиальных клеток, а также способствуя неоваскуляризации, реэпителизации и отложению коллагена [21]. В процессе нормального заживления повышение концентрации VEGF характерно для фазы пролиферации, а при нарушениях регенерации – для хронических ран по причине его провоспалительной активности.



Тромбоцитарный фактор роста (PDGF)

PDGF – один из важнейших биохимических медиаторов заживления ран, воздействующий на все этапы этого процесса. Он секретируется преимущественно из α -гранул тромбоцитов, но также может выделяться из гранул кератиноцитов, макрофагов, фибробластов и эндотелия. Доказано, что PDGF стимулирует регенеративные процессы в дерме, стимулирует синтез коллагена и способствует ангиогенезу [22]. PDGF включает семейство гомодимерных или гетеродимерных факторов роста: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC и PDGF-DD; их основной мишенью являются дермальные фибробласты. Результатом влияния тромбоцитарного роста является модификация внеклеточного матрикса путем стимуляции синтеза коллагена, коллагеназы и гликозаминогликанов, уменьшение количества грануляционной ткани преимущественно в фазу пролиферации [23].

Фактор роста фибробластов (FGF)

FGF являются семейством полипептидных факторов роста, которые, как было показано, обладают значительной способностью к восстановлению и регенерации тканей, состоящих из различных типов клеток (нервная ткань, печень, кости, кожа, кишка, сердце, мышцы), стимулируя их пролиферацию и дифференцировку [24]. FGF в процессе заживления кожи контролирует миграцию кератиноцитов в рану, формирование грануляционной ткани, а также эпителизацию и ремоделирование. Нарушение уровня FGF, а также отсутствие рецепторов к нему на поверхности кератиноцитов значительно снижают эффективность репарации [25]. Повышение уровня FGF характерно для хронических ран.

Эпидермальный фактор роста (EGF)

EGF секретируется тромбоцитами, макрофагами, фибробластами и кератиноцитами и способствует регенерации кожи. При связывании с рецептором эпидермальный фактор роста активирует тирозинкиназный сигнальный путь, в результате чего стимулирует образование фибронектина (который входит в состав внеклеточного матрикса), но не оказывает воздействия на образование коллагена [26]. Также результатом воздействия EGF является увеличение количества фибробластов в ране и увеличение скорости деления кератиноцитов.

Трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α)

TGF- α принадлежит к семейству эпидермальных факторов роста. Зрелая форма TGF- α представляет собой полипептид из 50 аминокислот и является аутокринным/паракринным фактором роста. TGF- α проявляет все свои биологические эффекты путем связывания и активации 170-кДа рецептора тирозинкиназы клеточной поверхности [27].

Во время заживления кожных ран критическим этапом является инициация резидентных эпидермальных и дермальных клеток от края раны к центру. Кератиноциты мигрируют через дно раны от края разреза, чтобы в конечном итоге закрыть рану посредством реэпителизации. Дермальные фибробласты и дермальные микроваскулярные эндотелиальные клетки человека начинают перемещаться в рану после миграции кератиноцитов, при этом откладывают белки матрикса, которые

сокращаются и реконструируют эпителизованную рану. Миграция кератиноцитов в значительной степени обусловлена TGF- α и не подвержена влиянию цитокинов семейства TGF- β , присутствующих в ране [28]. Напротив, присутствие TGF- β блокирует миграцию дермальных клеток даже в присутствии их факторов роста. Однако TGF- α не обладает митогенной активностью и не стимулирует деление клеток. Наибольшая концентрация TGF- α характерна для воспалительной фазы заживления.

Маркер пролиферации Ki-67

Ki-67 – ядерный белок, связанный с клеточным циклом, синтезируемый всеми пролиферирующими клетками активного клеточного цикла, в покоящихся клетках он не определяется [29]. Антитела Ki-67 специфически взаимодействуют с внутриядерными антигенами клеток активной пролиферативной фазы, их использование целесообразно при оценке пролиферирующих клеток в различных нормальных, опухолевых и регенеративных тканях, в том числе и при оценке процесса репарации кожных ран и активности роста грануляций. Идентификация Ki-67 с помощью ИГХ хорошо себя зарекомендовала и считается быстрым и надежным методом измерения доли роста исследуемой клеточной популяции [30]. Для прогноза благополучного заживления гранулирующей раны индекс Ki-67 должен быть выше 7%.

Фактор некроза опухоли (TNF- α)

TNF- α представляет собой воспалительный цитокин, продуцируемый макрофагами и моноцитами во время фазы острого воспаления, обеспечивающий широкий спектр сигнальных путей внутри клеток, приводящих к некрозу или апоптозу [31]. Длительное повышение его концентрации приводит к замедлению процесса репарации. В клинических исследованиях повышение содержания TNF- α обнаруживалось у людей, имеющих хронические раны или склонных к нарушению заживления. Обладая провоспалительным действием, этот цитокин уменьшает количество коллагена, гидроксипролина и грануляционной ткани в ранах, приводя к нарушению их заживления. Напротив, блокада TNF- α приводит к ускорению заживления хронических раневых дефектов [32].

Матриксные металлопротеиназы -1, -2, -8, -9 (MMPs -1, -2, -8, -9)

MMPs представляют собой ряд цинк-зависимых протеиназ, которые известны своей критически важной ролью в процессе ремоделирования тканей [33]. Наиболее важной функцией MMPs является протеолитическое расщепление коллагена и деградация других элементов экстрацеллюлярного матрикса. В настоящее время известно 23 типа MMP. Ингибиторы матриксных металлопротеиназ (TIMP) также играют важную роль в метаболизме коллагена в процессе заживления и представляют собой специфические белки, которые регулируют функцию MMP. Существует 4 специфических типа TIMP, которые блокируют активность MMP, связываясь с ними в соотношении 1:1 [34]. Роль TIMP заключается в обеспечении процессов ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса во время процесса заживления.

Экспрессия MMP-1 достигает пика на 1-й день после травмы в базальных кератиноцитах, мигрирующих по краю раны, с последующим постепенным снижением до завершения реэпителизации. MMP-1 обеспечивает связывание коллагена I типа



с интегринами. Экспрессия MMP-2 на краях острых ран связана с экспрессией ламинина-332 и повышением миграции кератиноцитов. В хронических незаживающих ранах наблюдается высокий уровень MMP-1. Повышенная экспрессия MMP-8 в хронических ранах нарушает заживление, вызывая разрушение коллагена I типа. MMP-9 играет важную роль в миграции кератиноцитов при эпителизации ран. Гипоксия (отличительная особенность хронических ран) активирует миграцию кератиноцитов и повышает активность MMP-9. MMP-2 и MMP-9 играют роль в регуляции ангиогенеза во время заживления ран посредством активации проангиогенных цитокинов, включая TNF- α и VEGF, и путем образования антиангиогенных пептидов [35].

Интерлейкины (IL)

IL-2, цитокин со сложным сигнальным каскадом, секретируется в активной форме многими клетками, участвующими в заживлении ран, включая макрофаги и кератиноциты. Он оказывает как системное действие, стимулируя продукцию T- и B-лимфоцитов, так и местное, способствуя пролиферации и дифференцировке иммунных и кожных клеток в ране [36]. Самых высоких уровней концентрация IL-2 достигает на 1-е и 5-е сутки раневого процесса.

IL-4 – плейотропный цитокин, способный активировать клетки соединительной ткани и стимулировать накопление макромолекул внеклеточного матрикса. В эксперименте экспрессия IL-4 была обнаружена в нижних слоях дермы под раной уже на 1-й день после повреждения. Экспрессия IL-4 была максимальной к 4-му дню, затем постепенно снижалась и полностью исчезала к 21-му дню после повреждения. Местное введение IL-4 на экспериментальные раны у мышей значительно ускоряло скорость заживления, тогда как антисмысловые олигонуклеотиды IL-4 значительно тормозили заживление [37].

IL-6 является ключевым модулятором воспалительного и репаративного процесса: он участвует в дифференцировке, активации и пролиферации лейкоцитов, эндотелиальных клеток, кератиноцитов и фибробластов [38]. Высвобождаемый макрофагами на ранней стадии в ответ на повреждение, IL-6 индуцирует высвобождение провоспалительных цитокинов из тканевых резидентных макрофагов, кератиноцитов, эндотелиальных клеток и стромальных клеток. Также было доказано, что IL-6 индуцирует хемотаксис лейкоцитов в рану [39]. При нормальном заживлении ран экспрессия IL-6 значительно снижается во время фазы ремоделирования; считается, что это связано с апоптозом инфильтрирующих воспалительных лейкоцитов и последующим снижением передачи сигналов цитокинов. Моноциты и макрофаги секретируют IL-1 β и TNF- α в ответ на воздействие IL-6, который индуцирует продукцию фактора роста кератиноцитов (KGF) фибробластами [40]. Нарушения концентрации IL-6 могут приводить как к замедлению процесса заживления раны, так и к формированию патологических гипертрофических рубцов.

IL-10 необходим для механической целостности при заживлении ран. Отсутствие IL-10 приводит к выраженной воспалительной реакции с усилением моноцитарной инфильтрации раневого ложа. Как мощный противовоспалительный цитокин, IL-10 дезактивирует моноциты и макрофаги, снижает продукцию провоспалительных цитокинов и позволяет развиваться физиологически нормальной ткани без избыточного фиброза [41].

Фибронектин

Фибронектин представляет собой адгезивную молекулу, которая играет решающую роль в заживлении ран (формирование внеклеточного матрикса), а также в процессе реэпителизации. Он является гликопротеином, который обнаруживается во всех видах тканей и необходим для различных взаимодействий между клетками и матриксом [42]. Основной функцией фибронектина является клеточная адгезия, второстепенной – опосредование клеточного роста и клеточной миграции [43]. При заживлении ран фибронектин функционирует на всех стадиях репаративного процесса. После созревания рубца он расщепляется и замещается коллагеном [44], таким образом, снижение содержания фибронектина является признаком завершения процесса заживления. Повышенное содержание фибронектина является ИГХ-маркером незрелого рубца.

P-селектин

P-селектин представляет собой молекулы адгезии, находящиеся в α -гранулах покоящихся тромбоцитов и в тельцах Вейбеля – Паладе эндотелиальных клеток. При активации он быстро перемещается на клеточную мембрану из мест хранения и участвует в начальных стадиях захвата и связывания циркулирующих нейтрофилов и моноцитов при свертывании крови при повреждении сосудов [45]. Резкое увеличение содержания P-селектина наблюдается в первые 6 часов с момента формирования раны. После разрушения или повреждения эндотелия P-селектин и интегрины, экспрессируемые на тромбоцитах, могут обеспечить поверхность для рекрутирования и последующей миграции лейкоцитов, включая моноциты, опосредуя первые этапы индуцированной травмой гиперплазии неоинтимы. В эксперименте блокада P-селектина или его лиганда приводила к ингибированию образования грануляционной ткани, позднему ангиогенезу и уменьшению инфильтрации раны нейтрофилами и макрофагами [46].

Аквапорин 3 (AQP3)

AQP3 представляет собой трансмембранный переносчик воды и глицерина, экспрессируемый в плазматических мембранах кератиноцитов базального слоя эпидермиса в нормальной коже [47]. В эксперименте было доказано нарушение заживления кожных ран у мышей при дефиците AQP3, что является результатом выраженного нарушения миграции и пролиферации эпидермальных клеток. Заживление ран *in vivo* было завершено на 80% у мышей дикого типа через 5 дней по сравнению с завершением на 50% у мышей с отсутствующим AQP3, со снижением числа пролиферирующих кератиноцитов. После нейтрализации AQP3 в клеточных культурах кератиноцитов (в результате чего снижалась проницаемость клеточной мембраны для воды и глицерола) миграция клеток замедлялась более чем в два раза [48].

Фибрин

Фибрин образуется из фибриногена на стадии коагуляции и образует белковую сеть, обеспечивающую временную поддержку заживления ран. Структурный состав фибрина и связывание его с клетками и белками в значительной степени определяют эффективность процесса заживления ран, опосредуя миграцию фибробластов и ангиогенез. Помимо функции временного матрикса, фибрин активно рекрутирует



клетки для запуска фибрин-опосредованных ответов, таких как клеточная адгезия, миграция, пролиферация [49].

Коллагены I и III типов

Коллаген, один из наиболее распространенных белков в организме, является основным компонентом внеклеточного матрикса. Ключевые этапы процесса во всех фазах заживления ран зависят от внеклеточного матрикса, коллагена и его соединений. В ответ на повреждение коллаген вызывает активацию и агрегацию тромбоцитов, что приводит к отложению фибринового сгустка в месте повреждения. В воспалительной фазе заживления ран активация иммунных клеток стимулирует секрецию провоспалительных цитокинов, которые влияют на миграцию фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток. Фибробласты способствуют отложению коллагена. Одновременно при деградации коллагена высвобождаются фрагменты, которые способствуют пролиферации фибробластов и синтезу факторов роста, что приводит к ангиогенезу и реэпителизации. Наконец, ремоделирование внеклеточного матрикса (баланс синтеза нового матрикса и активности деградации матриксных металлопротеиназ) определяет приобретение прочности на разрыв [50]. Резкое увеличение синтеза коллагена экстрацеллюлярного матрикса фибробластами начинается на 3–4-е сутки после повреждения. Коллаген III синтезируется первым на ранних стадиях заживления ран и заменяется коллагеном I, доминирующим коллагеном кожи. Коллагены I и III преимущественно расщепляются MMP-1 (также называемой коллагеназой-1) и MMP-8 (коллагеназой-2). В нормальной коже коллаген типа I и типа III существует в пропорции приблизительно 4:1. В гипертрофических и незрелых рубцах содержится около 33% коллагена типа III, с изменением соотношения коллагена типа I и типа III до 2:1 [8]; таким образом, по соотношению коллагена различного типа можно достоверно выявить нарушения заживления.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая приведенные данные, можно констатировать, что в первой фазе заживления ран (включая процесс коагуляции), т. е. в период до 2 суток с момента повреждения, информативным в плане оценки регенераторного потенциала может быть определение содержания фибронектина: снижение его концентрации уже на такой ранней стадии дает информацию о последующем нарушении миграции клеток в рану и замедлении регенераторных процессов. Также для этой фазы характерным является повышение содержания EGF и P-селектина. Контроль содержания интерлейкинов в области ран является информативным с первых часов после повреждения и до окончания фазы пролиферации. Определение уровня TGF- β важно на всем протяжении процесса заживления, поскольку слишком высокое содержание этого фактора на ранних стадиях заживления может привести к формированию гипертрофических рубцов, но критическую важность этот показатель приобретает во время фазы пролиферации, когда достаточная концентрация является необходимой для формирования прочного рубца. VEGF, FGF2 и TNF способствуют активному развитию грануляционной ткани и поддержанию воспаления, и поэтому выявление во время исследования повышенного содержания данных маркеров будет свидетельствовать о начале перехода острого раневого процесса в хронический с последующим формированием неполноценного рубца, однако их адекватная концентрация должна

поддерживаться на протяжении всей фазы пролиферации, обеспечивая образование новых сосудов. Начало фазы пролиферации обозначается началом синтеза коллагена III типа, а по соотношению содержания коллагена типа I и типа III можно оценить завершенность регенеративных процессов. Концентрация MMPs в конце фазы пролиферации и в стадии ремоделирования является еще одним важным показателем перехода острого процесса в хронический, поскольку при слишком высокой концентрации металлопротеиназы нарушают соотношение коллагенов различного типа и вместо того, чтобы способствовать ремоделированию рубца, нарушают его прочность. Содержание же аквапорина 3 и Ki-67 на достаточном уровне обеспечивает нормальное течение процессов заживления на протяжении всего процесса регенерации.

С помощью широкого спектра ИГХ-маркеров можно объективизировать течение раневого процесса, оценить скорость и эффективность регенерации при повреждении и хронических ранах кожи, понять причину нарушения процесса заживления и вклад различных факторов в этот процесс. Благодаря высокой специфичности ИГХ-исследования могут быть информативным и достоверным методом оценки эффективности как известных, так и новых методов лечения ран.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Driver V.R., Blume P.A. (2014) Evaluation of wound care and health-care use costs in patients with diabetic foot ulcers treated with negative pressure wound therapy versus advanced moist wound therapy. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, vol. 104, no 2, pp. 147–53.
2. Westby M.J., Norman G., Dumville J.C., Stubbs N., Cullum N. (2016) Protease-modulating matrix treatments for healing venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 12, no 12, CD011918.
3. Robson M.C. (1997) Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *The Surgical Clinics of North America*, vol. 77, no 3, pp. 637–650.
4. Obolenskiy V.N. (2016) Modern treatment methods of the chronic wounds. *Medical Council*, no 10, pp. 148–154.
5. Gupta S., Andersen C., Black J. (2017) Management of Chronic Wounds: Diagnosis, Preparation, Treatment, and Follow-up. *Wounds*, vol. 29, no 9, pp. 19–36.
6. Desmoulière A., Redard M., Darby I., Gabbiani G. (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.*, vol. 146, no 1, pp. 56–66.
7. Takeo M., Lee W., Ito M. (2015) Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, vol. 5, no 1, a023267.
8. Abaev Y.K. (2009) Healing of acute and chronic wounds. *Military medicine*, vol. 4, pp. 59–65.
9. Nourian Dehkordi A., Mirahmadi Babaheydari F., Chehelgerdi M., Raeisi Dehkordi S. (2019) Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 10, article number: 111.
10. Herrmann J.L., Weil B.R., Abarbanell A.M., Wang Y., Poynter J.A., Manukyan M.C., Meldrum D.R. (2011) IL-6 and TGF- α Costimulate mesenchymal stem cell vascular endothelial growth factor production by ERK-, JNK-, and PI3K-mediated mechanisms. *Shock*, no 35, pp. 512–516.
11. Darby I.A., Laverdet B., Bonté F., Desmoulière A. (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, vol. 7, pp. 301–311.
12. Broughton G., Janis J.E., Attinger C.E. (2006) Wound healing: an overview. *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 117, pp. 1–32.
13. Ehrlich H.P. (1988) Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye*, vol. 2, pp. 149–157.
14. Tredget E.E., Nedelec B., Scott P.G., Ghahary A. (1997) Hypertrophic scars, keloids, and contractures. The cellular and molecular basis for therapy. *Surg. Clin. North Am.*, vol. 77, no 3, pp. 701–730.
15. Martin P. (1997) Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science*, vol. 276, pp. 75–81.
16. Borena B., Martens A., Broeckx S.Y., Meyer E., Chiers K., Duchateau L., Spaas J.H. (2015) Regenerative skin wound healing in mammals: state-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. *Cell Physiol Biochem*, vol. 36, no 1, pp. 1–23.
17. Zhu Z., Ding J., Shankowsky H.A., Tredget E.E. (2013) The molecular mechanism of hypertrophic scar. *J. Cell. Commun. Signal.*, vol. 7, no 4, pp. 239–252.
18. Wang R., Ghahary A., Shen Q., Scott P.G., Roy K., Tredget E.E. (2000) Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor-beta1 mRNA and protein than normal skin and cells. *Wound Repair Regen*, vol. 8, no 2, pp. 128–137.
19. Lu L., Saulis A.S., Liu W.R., Roy N.K., Chao J.D., Ledbetter S., Mustoe T.A. (2005) The temporal effects of anti-TGF-beta1, 2, and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 201, no 3, pp. 391–397.
20. Park U., Kim K. (2017) Multiple growth factor delivery for skin tissue engineering applications. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 22, pp. 659–70.
21. Aliano R.D., Tepper O.M., Pelo C.R., Bhatt K.A., Callaghan M., Bastidas N., Bunting S., Steinmetz H.G., Gurtner G.C. (2004) Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol.*, vol. 164, pp. 1935–1947.
22. Abramov Y., Hirsch E., Ilievski V., Goldberg R.P., Botros S.M., Sand P.K. (2012) Expression of platelet-derived growth factor-B mRNA during vaginal vs. dermal incisional wound healing in the rabbit. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 162, pp. 216–20.



23. Berlanga-Acosta J., Gavilondo-Cowley J., Barco-Herrera D.G., Martín-Machado J., Guillen-Nieto G. (2011) Epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) as tissue healing agents: clarifying concerns about their possible role in malignant transformation and tumor progression. *J. Carcinog. Mutagen.*, vol. 2, pp. 1–14.
24. Maddaluno L., Urwyler C., Werner S. (2017) Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development*, vol. 144, pp. 4047–4060.
25. Meyer M., Müller A., Yang J., Moik D., Ponzio G., Ornitz D.M., Grose R., Werner S. (2012) FGF receptors 1 and 2 are key regulators of keratinocyte migration in vitro and in wounded skin. *J. Cell. Sci.*, vol. 125, no 23, pp. 5690–5701.
26. Komelyagina E.J., Antsiferov M.B. (2019) Growth factors in the treatment of ulcerative defects in diabetic foot syndrome. *Diabetes mellitus*, vol. 22, no 4, pp. 377–383.
27. Cheng C., Fan J., Fedesco M., Guan S. (2008) Transforming Growth Factor α (TGF α)-Stimulated Secretion of HSP90 α : Using the Receptor LRP-1/CD91 To Promote Human Skin Cell Migration against a TGF β -Rich Environment during Wound Healing. *ASM Journals Molecular and Cellular Biology*, vol. 28, no 10, pp. 3344–3358.
28. Bandyopadhyay B., Fan J., Guan S., Li Y., Fedesco M., Barksdale J., Chen M., Woodley D.T., Li W. (2006) A "traffic control" role for TGF β 3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *J. Cell Biol.*, vol. 172, pp. 1093–1105.
29. Jonat W., Arnold N. (2011) Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Ann Oncol*, vol. 22, no 3, pp. 500–502.
30. Brown D.C., Gatter K.C. (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*, vol. 40, no 1, pp. 2–11.
31. Idriss H.T., Naismith J.H. (2000) TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.*, vol. 50, no 3, pp. 184–95.
32. Ashcroft G.S., Jeong M.J., Ashworth J.J., Hardman M., Jin W., Moutsopoulos N., Wild T., McCartney-Francis N., Sim D., McGrady G., Song X.Y., Wahl S.M. (2012) Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*, vol. 20, no 1, pp. 38–49.
33. Das S., Mandal M., Chakraborti T., Mandal A., Chakraborti S. (2003) Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 253, no 1–2, pp. 31–40.
34. Stamenkovic I. (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.*, vol. 200, no 4, pp. 448–464.
35. Caley M.P., Martins V.L., O'Toole E.A. (2015) Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, vol. 4, no 4, pp. 225–234.
36. Doersch K.M., DelloStritto D.J., Newell-Rogers M.K. (2017) The contribution of interleukin-2 to effective wound healing. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, vol. 242, no 4, pp. 384–396.
37. Salmon-Ehr V., Ramont L., Godeau G. (2000) Implication of Interleukin-4 in Wound Healing. *Lab. Invest.*, vol. 80, pp. 1337–1343.
38. Johnson B.Z., Stevenson A.W., Prêle C.M., Fear M.W., Wood F.M. (2020) The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicine*, vol. 8, p. 101.
39. Weissenbach M., Claßen T., Weber C., Spitzer D., Wirth D., Vestweber D., Heinrich P.C., Schaper F. (2004) Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration. *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, pp. 2895–2906.
40. Madej M.P., Töpfer E., Boraschi D., Italiani P. (2017) Different Regulation of Interleukin-1 Production and Activity in Monocytes and Macrophages: Innate Memory as an Endogenous Mechanism of IL-1 Inhibition. *Front. Pharm.*, vol. 8, no 8, p. 355.
41. King A., Balaji S., Le L.D., Crombleholme T.M., Keswani S.G. (2014) Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, vol. 3, no 4, pp. 315–323.
42. Alberts B. (2008) *Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix*. New York Garland Science: Taylor & Francis, p. 1191.
43. Li J., Chen J., Kirsner R. (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.*, vol. 7, no 25, pp. 9–18.
44. Stamenkovic I. (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.*, vol. 200, no 4, pp. 448–464.
45. Caley M.P., Martins V.L., O'Toole E.A. (2015) Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, vol. 4, no 4, pp. 225–234.
46. Tomita H., Iwata Y., Ogawa F., Komura K. (2009) P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Contributes to Wound Healing Predominantly as a P-Selectin Ligand and Partly as an E-Selectin Ligand. *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 129, no 8, pp. 2059–2067.
47. Hara-Chikuma M., Verkman A.S. (2008) Roles of Aquaporin-3 in the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 128, no 9, pp. 2145–2151.
48. Hara-Chikuma M., Verkman A.S. (2008) Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J. Mol. Med. (Berl)*, vol. 86, no 2, pp. 221–231.
49. Laurens N., Koolwijk P., de Maat M.P.M. (2006) Fibrin structure and wound healing. *J. Thromb Haemost.*, vol. 4, pp. 932–939.
50. Reinke J.M., Sorg H. (2012) Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res.*, vol. 49, pp. 35–43.