

В.М. Єльський, М.Е. Барінова

Кінетика кератиноцитів епідермісу шкіри хворих на синдром діабетичної стопи

Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

Ключові слова: цукровий діабет, рани, епідерміс.

З метою з'ясування механізмів порушення загоєння ран при цукровому діабеті (ЦД) проведено аналіз морфогенетичних процесів в епідермісі у 40 хворих на синдром діабетичної стопи (Wagner III-IV). У 18 (45%, 1 група) пацієнтів мало місце загоєння ран, у 2-у групу ввійшли 16 (40%) хворих з тривалим не загоєнням ран, а в 3-ю – 6 (15%) осіб з прогресуванням гнійно-некротичного ураження кінцівок. Показано, що за умов ЦД у крайовій зоні ран має місце порушення кінетики кератиноцитів, зумовлене зміною просторового розподілу проліферації, порушенням міграції, зниженням диференціації й посиленням апоптозу клітин. Порушення морфогенезу епідермісу за умов ЦД варіює від гіперпроліферації до гіпопластичних процесів, що обмежує швидкість формування нових клітин й ефективність епітелізації ранової поверхні.

Кинетика кератиноцитов эпидермиса кожи больных с синдромом диабетической стопы

В.Н. Ельский, М.Э. Баринаова

С целью выяснения механизмов нарушения заживления ран при сахарном диабете (СД) проведен анализ морфогенетических процессов в эпидермисе у 40 больных на синдром диабетической стопы (Wagner III-IV). У 18 (45%, 1 группа) пациентов имел место заживления ран, во 2-ю группу вошли 16 (40%) больных с продолжительным незаживлением ран, а в 3-ю - 6 (15%) пациентов с прогрессирующим гнойно-некротическим процессом. Показано, что при СД в краевой зоне ран имеет место нарушение кинетики кератиноцитов, обусловленное изменением пространственного распределения пролиферации, нарушением миграции, снижением дифференцировки и усилением апоптоза клеток. Нарушение морфогенеза эпидермиса при СД варьирует от гиперпролиферации до гипопластических процессов, ограничивающих скорость формирования новых клеток и эффективность эпителизации раневой поверхности.

Ключевые слова: сахарный диабет, раны, эпидермис.*Патология. – 2009. – Т.6., №3. – С. 56-58*

Kinetic of skin epidermal keratinocytes in patients with diabetic foot syndrome

V.N. Yelsky, M.E. Barinova

To investigate the mechanisms of skin wounds non-healing at diabetes mellitus (DM) the analysis of morphogenic processes in epidermis in 40 patients with diabetic foot syndrome (Wagner III-IV). Wound healing was detected in 18 patients (45%, 1 group). The 2nd group includes 16 (40%) patients with non-healed wounds and 3rd group consists of 6 patients (15%) with progression of pio-necrotic process. It was shown that alteration of keratinocytes kinetic in the marginal zone at DM took place. It was due to changes in special distribution of proliferation and migration, alteration of differentiation and increase of apoptosis. Dismorphogenesis of epidermis varied from hyperproliferation to hypoplastic processes that limited the rate of new cells formation and efficacy of skin wounds epithelization.

Key words: diabetes mellitus, wounds, epidermis.*Pathologia. 2009; 6(3): 56-58*

Незважаючи на високий регенераторний потенціал тканин шкіри, хворі на синдром діабетичної стопи (СДС) страждають на тривале незагоєння ран кінцівок [6]. Ця проблема пов'язана не тільки з метаболічними розладами, порушенням імунологічної реактивності організму та гнійно-некротичним характером ураження кінцівок, розвитком ангіо- і нейропатії, але й з порушенням морфогенетичних процесів в тканинах шкіри [5]. Так, відомо, що розвиток цукрового діабету супроводжується зміною проліферації та диференціювання клітин епідермісу та дерми. Це пов'язують не тільки зі змінами системного нейрогуморального контролю, але й з порушенням локальних регуляторних систем, цитокінової мережі та широкого кола факторів росту [6]. Відомо, що процес загоєння ран шкіри контролює широкий спектр регуляторів, до яких належать естрогени, глюкокортикоїди, інсулін, соматостатин, фактор росту судинного ендотелію (VEGF), фактор росту фібробластів, морфогенетичний білок кістки (BMP), інсуліноподібний фактор росту (ILGF), епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту кератиноцитів (EGF), фактор росту сполучної тканини (CTGF) та трансформу-

ючий фактор росту (TGFβ). Крім того, морфогенетичні процеси в дермі та епідермісі контролюються такими цитокінами, як ІЛ-1, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-13, фактор некрозу пухлин α (ФНПа) та багато інш. [3, 5]. За умов багатофакторного нейрогуморального та локального контролю репарації сполучної тканини та епідермісу дуже складно розібратися в механізмах порушення ранового процесу за умов цукрового діабету. Тим більше, що реалізація кожної його фази, зокрема епітелізація ранової поверхні та відтворення бар'єрних властивостей шкіряного покриву, залежить від ефективності попередніх етапів - запалення та формування грануляційної тканини [3]. Найбільш доцільним рішенням проблеми аналізу механізмів порушення епітелізації ран шкіри є адекватний аналіз виразності та характеру зміни морфогенетичних процесів в епідермісі в динаміці ранового процесу у співставленні з його результатом. Саме це й стало метою нашої роботи.

Матеріал і методи дослідження. Проведено кількісну морфологічну оцінку шкіри 40 хворих на ЦД 2-го типу, що надійшли в хірургічне відділення із гнійно-некротичним ураженням нижніх кінцівок (Wagner

III-IV). Біопсійний матеріал одержували на момент первинної операції (викриття флегмони, ампутація), і при повторних некректоміях. У 18 (45%) пацієнтів хірургічне лікування на фоні традиційної терапії сприяло загоєнню рани протягом 28 ± 4 днів (1 група). У 16 (40%) хворих у процесі лікування виникла необхідність виконання багатоетапної некректомії локальних вогнищ вторинного некрозу і мав місце тривалий (понад 1,5 місяця) перебіг ранового процесу (2 група). В 6 хворих (15%, 3 група) патологічний процес носив прогресуючий характер з розширенням зони деструктивного ураження, необхідністю виконання висхідних ампутацій.

Біопсійний матеріал був представлений крайовою зоною шкіри, яка вважається джерелом регенерації та епітелізації ранових дефектів. Фрагменти шкіри фіксували в 10% розчині формаліну на фосфатному буфері (рН=7,4). Виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 5 ± 1 мкм. Зрізи забарвлювали гематоксидом та еозином. Вимірювали товщину епідермісу, підраховували кількість рядів клітин у кожному шарі. Варіабельність товщини оцінювали на підставі аналізу даних параметрів на гребінцях та сосочках. Аналіз кінетики кератиноцитів включав оцінку процесів проліферації, диференціації та апоптозу клітин. З цією метою проводили імуноцитохімічне дослідження з використанням моноклональних антитіл до Ki-67, цитокератину 14 і p53. Кількісну оцінку експресії молекул проводили з урахуванням топографії по горизонталі та вертикалі, оцінюючи питому щільність (ПЩ) - кількість імунопозитивних клітин на 100 клітин кожного шару. При інтерпретації кінетики клітин зставляли ПЩ Ki-67 і p53 позитивних клітин. Аналіз проліферації кератиноцитів проводили з урахуванням напрямку площини веретена розподілу, фіксуючи горизонтальні й вертикальні картини мітозу й співвідношення між ними. Контрольну групу склали 10 біоптатів шкіри добровольців, що не страждали на ЦД при операціях на нижніх кінцівках. Отримані результати обробляли статистично [1] з використанням параметричних і непараметричних критеріїв у рамках програм MedStat й Statistica [2].

Результати дослідження та обговорення. У крайовій зоні ран контрольної групи аналіз проліферації виявив посилення мітотичної активності клітин базального шару епідермісу. Це проявлялося вираженою експресією Ki-67 у клітинах базального й супрабазального шарів як на гребінцях, так і на внутрішній поверхні сосочків. Частота Ki-67 позитивних клітин складала $52,3 \pm 12,4\%$. При цьому градієнт товщини між гребінцями й сосочками був згладженим і становив $1,2 \pm 0,14$. Кількість шарів кератиноцитів в області гребінців досягав 7 ± 1 , а на сосочках – 5 ± 1 . Цитокератин 14 експресувався переважно в базальному шарі, хоча слабка реакція на даний білок реєструвалася й у нижніх відділах остистого шару. Активність апоптозу в епідермісі країв ран у осіб контрольної групи, була низькою - лише поодинокі клітини в базальному шарі мали позитивну імуноцитохімічну реакцію.

Епідерміс країв ран хворих на СДС мав ряд патоморфологічних особливостей. Перифокальна зона рани була інтенсивно інфільтрована нейтрофілами. Виразний набряк призводив до розширення міжклітинних просторів між кератиноцитами з появою ламінарних

каналів шириною до 40 мкм. У клітинах базального й остистого шарів відзначалися явища вакуолізації, перинуклеарного набряку, каріопікнозу та лізису. Крім ознак гострої зміни структури епідермісу, асоційованої з запаленням, у крайовій зоні ран пацієнтів з СДС мало місце порушення морфогенезу, яке визначало специфіку репаративних процесів в тканині.

Товщина епідермісу широко варіювала, у результаті чого співвідношення товщини на гребінцях і сосочках становило у 1-й групі $1,53 \pm 0,23$ й $2,11 \pm 0,18$ в 2-й групі, хоча в 3-й групі даний показник не мав статистично значущих відмінностей від контролю. Причому збільшення даного коефіцієнта в 2-й групі було пов'язане зі зменшенням товщини епідермісу в області сосочків при вираженому стовщенні гребінців. Базальний шар епідермісу за умов СДС відрізнявся вираженим поліморфізмом будови клітин на гребінцях і сосочках. Так, в області гребінців клітини були високими призматичними з витягнутими гіперхромними ядрами. Фігури тілофазі характеризувалися вертикальним положенням дочірніх ядер, поміж клітинами часто реєструвалися широкі щілини. На відміну від цього, в області сосочків базальні кератиноцити характеризувалися у 2 рази нижчою щільністю за рахунок збільшення ширини клітин, зниження їхньої висоти та округлення ядер. В остистому шарі сумарна кількість рядів клітин варіювала від 3-4 в області сосочків до 25 в області гребінців. В 3 групі епідерміс був тонким, без виразних гребінців та сосочків. В базальному та остистому шарах більша частина клітин мали ознаки глибокої дистрофії.

Аналіз експресії Ki-67 показав, що в основі гетерогенності товщини та багатошаровості епідермісу лежить просторовий градієнт проліферації клітин. Так, у пацієнтів 1-ї групи на гребінцях мала місце гіперпроліферація. ПЩ Ki-67⁺ клітин у базальному шарі гребінців епідермісу становив $76,8 \pm 2,5\%$. На відміну від цього, в області сосочків було зареєстроване різке зниження частоти експресії Ki-67 – до $26,5 \pm 2,3\%$. Особливістю морфогенезу ран в 2-й групі було розташування Ki-67⁺ клітин у базальному шарі винятково в області верхівки гребінців, тоді як на їхніх бічних поверхнях клітини у стані мітозу виявлялися набагато рідше, а в області сосочків – проліферуючі клітини були відсутні. За рахунок цього сумарний індекс проліферації в базальному шарі виявився на $49,3\%$ нижчим за такий у контрольній групі ($p < 0,01$). В області гребінців експресія Ki-67 відзначалася також у остистому шарі. Причому не тільки в його нижніх (супрабазальних) відділах, але також у центральній і поверхневій зонах. В 3-й групі потоншення епідермісу було зумовлене різким пригніченням проліферації кератиноцитів. Зниження кількості клітин по вертикалі було пов'язане не тільки зі зміною проліферації, але й з посиленням апоптозу клітин епідермісу за умов СДС. Максимальна експресія p53 в 2-й групі спостерігалася переважно в остистому і зернистому шарах, а також в окремих клітинах базального шару. В 3-й групі p53⁺ клітини виявлялися дифузно в епідермісі. Характерно, що у 1-й групі, в апоптоз залучалися переважно клітини базального шару гребінців - тобто зони з максимально високим рівнем проліферації. Крім того, p53-позитивні клітини виявлялися й у супрабазальному шарі.

Зміна швидкості утворення й загибелі клітин в епі-

дермісі супроводжувалася також порушенням їх диференціації. Такий висновок було зроблено на підставі аналізу кількості клітин у різних шарах епідермісу. В 1-й групі мало місце порушення формування рогового шару за рахунок дизморфогенезу зернистого шару, що проявлялося зростанням товщини шару, округленням ядер, зміною тінкторіальних властивостей кератиноцитів. У 2-й групі типовими були зміни в остистому шарі з формуванням концентричних шаруватих утворень. В пацієнтів 3-ї групи загальне зменшення товщини епідермісу супроводжувалося порушенням формування й відсутністю зернистого та рогового шарів. Ці спостереження підтверджувалися зміною експресії цитокератину 14, що в здоровому епідермісі вважається маркером недиференційованих клітин. У 1-й групі позитивна реакція на кератин 14 захоплювала частину остистого шару, а у 2-й групі поширювалася до зернистого шару.

Таким чином, дані відображають порушення кінетики кератиноцитів за умов СДС. Причому останнє включає зміну кількості клітин, залучених у поділ, міграцію й тривалість життєвого циклу кератиноцитів. Як показали проведені раніше дослідження, у шкірі хворих на СДС має місце редукція й порушення структурної цілісності більшості похідних - волосяних фолікулів і залоз, що може пояснювати обмеженість репаративних можливостей шкіри за умов ЦД. Можна припустити, що в 1-й та 2-й групах порушення міграції на фоні посилення проліферації клітин, пов'язане з порушенням інтегрин-асоційованого механізму. Експериментальні дослідження підтвердили, що зниження експресії одного з представників кіназ, пов'язаних з елементами цитоскелету, ФАК, веде до зниження міграції кератиноцитів і порушення механізмів епітелізації ран різного генезу.

На гребінцях епідермісу 1-ї й 2-ї груп мали місце асиметричні варіанти мітозів. В інтерпретації механізмів регуляції взаємин між симетричними й асиметричними розподілами не можна обійтися без феномена мікро-ніші, що передбачає існування унікальних умов для підтримки життєздатності, самопідтримання й комітування СК. На сьогоднішній день провідним фактором комітування СК епідермісу вважається Notch - транскрипційний фактор, експресія якого асоційована із включенням групи генів, що ініціюють реорганізацію цитоскелету, рецепторного апарата та диференціацію клітин остистого шару [4]. Показано, що в умовах цитокінової прозапальної активації та підвищення рівня TGF β можливе посилення проліферації, але при цьому наростає і апоптоз кератиноцитів [3]. Імовірно, аналогічні події мають місце за умов СДС. Стимуляторами експресії TGF можуть бути катехоламіни та ангіотензин II, а також прозапальні цитокіни, включаючи IL-1 і IL-6. Активация за цих умов апоптозу та міжгрупові даного показника розходження відображають специфіку механізмів ініціації загибелі клітин. Так, у 1-й групі апоптоз був сполучений переважно з посиленням асиметричного розподілу кератиноцитів при зниженні латеральної міграції. В 2-й групі посилення апоптозу було пов'язано

переважно із клітинами остистого та зернистого шарів, що, з огляду на порушення диференціації клітин, може бути закономірним фактом, який лімітує порушення інтактності генома в умовах ішемії й формування АФК. Дифузійна індукція апоптозу в 3-й групі при інгібуванні проліферації та міграції клітин, імовірно, є результатом дії системних факторів. У цьому контексті, експресія p53 має важливість не тільки як індуктор апоптозу, але й є регулятором клітинного й життєвого циклу кератиноцитів в умовах дії альтеруючих факторів, енергодефіциту й/або дизбалансу регуляторних молекул. Специфіка ефектів даного проапоптогену в епідермісі вивчена мало. Роль p53 в основному з'ясована в високоспеціалізованих клітинах з тривалим життєвим циклом - нейронах, кардіоміоцитах та ін. У рамках теорії мікроніші СК й колонкової організації, в епідермісі при СДС, імовірно має місце порушення балансу між Notch і p63, напрямок якого визначає гіпер- або гіпопроліферацію з потовщенням (1-ї й 2-ї групи) або потоншенням (3-ї) остистого шару. І, нарешті, у трактуванні порушення бар'єрних властивостей епідермісу за умов СДС не можна залишити без уваги порушення диференціації клітин зі збереженням експресії цитокератину 14. Даний кератин, як і кератин 5, вважається маркером недиференційованих (прогеніторних) клітин епідермісу [4]. Їх диференціація супроводжується включенням більш, ніж 150 генів. Збереження експресії може розглядатися як результат порушення процесів комітування, що підтверджується збереженням високої проліферації в 2-й групі, і, по суті, є відображенням порушення організації остистого шару. У зв'язку із цим, зміна спектра цитокератинів, що продукуються, відбиває не тільки факт порушення клітинної диференціації, але також припускає зниження резистентності клітин до механічного навантаження.

Таким чином, за умов СДС в епідермісі на фоні посилення апоптозу має місце порушення проліферації (яка варіює від локальної гіперпроліферації до гіпопластичних процесів) і міграції клітин, що обмежує швидкість формування нових клітин й ефективність епітелізації ранової поверхні.

Література

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия – М.: Медицина, 1991.– 381 с.
2. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики.– Д., 2006.– 211 с.
3. Braiman-Wiksmann L., Solomonik I., Spira R., Tennenbaum T. Invited Review: Novel Insights into Wound Healing Sequence of Events // Toxicol. Pathol. - 2007. – Vol. 35.– P. 767-779.
4. Lin H. Cell biology of stem cells: an enigma of asymmetry and self-renewal // J. Cell Biol.– 2008.– Vol. 180.– P. 257-260
5. Lobmann R., Schultz G. Molecular fundamentals of wound healing in diabetic foot syndrome // Med. Klin.– 2003.– Vol. 98.– P.292 –301.
6. Sotiropoulou P. A., Candi A., Blanpain C. The Majority of Multipotent Epidermal Stem Cells Do Not Protect Their Genome by Asymmetrical Chromosome Segregation // STEM CELLS. – 2008. – Vol. 26. – P. 2964–2973.
7. Sweitzer S.M. What is the future of diabetic wound care? // Diab. Educ. – 2006.– Vol. 32, №.– P. 197-210.

Відомості про авторів:

Сльський Віктор Миколайович, член-кор. АМН України, д.мед.н., професор, зав. каф. патологічн. фізіології ДонНМУ.

Барінова Марія Едуардівна, к.мед.н., доцент кафедри дерматовенерології ДонНМУ.

Адреса для листування: член-кор. АМН України, професору Сльському В.М.

Кафедра патологічної фізіології, Донецький національний медичний університет, пр. Ілліча, 16, м. Донецьк, 83003