

Горишнова Г. Н., Девятаев А. М. Валиуллин В. В.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЖИ В УСЛОВИЯХ ДИАБЕТА

Казанский государственный медицинский университет, Россия

Хорошо известно, что одним из грозных осложнений сахарного диабета являются трофические поражения различных органов и тканей, что обусловлено развитием ангиопатий, приводящих к серьезным нарушениям функционирования многих органов и тканей.

Одним из органов, существенно повреждаемых при диабете, является кожа, причем, несмотря на кажущуюся хорошую изученность различных сторон функционирования кожи у диабетических больных, особенно применительно к диабетической стопе, мы мало знаем о клеточных основах повреждения кожи в этих условиях. Известно, что в здоровой коже поддерживается баланс между такими ключевыми процессами, как пролиферация, дифференцировка и гибель клеток. В условиях нарушенной трофики, безусловно, происходят сбои в этих процессах, что и приводит к появлению таких специфических кожных проявлений болезни, как: нарушение дифференцировки эпителиальных клеток, сухость кожных покровов, гибель клеток эпидермиса и дермы. Вместе с тем, цитологические аспекты таких нарушений при диабете до конца не ясны. Мало что известно о том, как изменяются процессы пролиферации клеток в эпидермисе и дерме в этих условиях, а также не понятно как сказывается нарушение трофики на процессы апоптоза в эпидермисе и дерме при диабетических ангиопатиях. Хорошим маркером на устойчивость клеток к апоптозу является белок BCL-2, выявление экспрессии которого говорит о невозможности клетки вступления в апоптоз [4].

Общепринято, что появление диабетической ангиопатии связано, как с нарушениями реологических свойств крови, так и повреждением эндотелиальных клеток сосудов высокими концентрациями глюкозы. Но все же, одной из решающих причин развития ангиопатий при диабете является нарушение процессов ангиогенеза, что, возможно связано в первую очередь с падением пролиферативной активности эндотелиальных клеток в этих условиях. В настоящее время существуют надежные маркеры пролиферации и одним из таких маркеров является PCNA — фактор, отражающий специфические особенности регуляторных систем, в том числе в коже при изменении ее регенераторной способности [1].

Известно, что пролиферативная активность эндотелиальных клеток поддерживается ангиогенными факторами, важнейшим из которых является эндотелиальный сосудистый фактор роста (VEGF), продуцируемый рядом клеток [5]. Сведения о роли нарушений ангиогенеза, а именно роли VEGF в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете, являются противоречивыми. Из имеющихся данных, можно с большой вероятностью утверждать, что при сахарном диабете имеет место повышение уровня VEGF в тканях. Он играет важную роль в ангиогенезе, определяя дифференцировку, пролиферацию эндотелия и его пространственную организацию [3]. Однако не ясно, как в этих условиях изменяется чувствительность эндотелиальных клеток к этому ангиогенному фактору. Для выявления рецепторов к VEGF в настоящее время используются специфические антитела к Flt-1, одному из видов высокоаффинных рецепторов к VEGF. Развитие трофических нарушений у диабетических больных, возможно, зависит также от нарушения целостности сосудов микроциркуляторного русла. Хорошим маркером на целостность базальной мембраны сосудов является количество и распределение специфического белка базальных мембран — коллагена IV типа, иммуногистохимическое выявление которого позволяет оценить нативность стенки сосуда [2]. Координация процессов пролиферации и дифференцировки в различных клеточных популяциях эпидермиса и дермы осуществляется только в условиях адекватной трофики кожи, которая обеспечивается состоянием сосудов. В настоящее время для определения степени развитости микроциркуляторного русла широко используется выявление белка CD 31. Данный белок является маркером, способным селективно выявлять гликопротеин с массой 130 kDa в эндотелии сосудов, что делает возможным определение уровня васкуляризации и соответственно плотности сосудистого компонента ткани [6].

Целью исследования явилось иммуногистохимическое изучение процессов пролиферации и устойчивости клеток к апоптозу, определение уровня васкуляризации, а также состояние базальной мембраны сосудов и чувствительность клеток к VEGF в коже ампутированной нижней конечности больных сахарным диабетом, с применением выше указанных маркеров. Забор материала проводился с двух зон: зоны ампутации и области гангрены. Контролем являлись фрагменты кожи здоровых людей, взятые при травматологических операциях.

Изучение пролиферации клеток эпидермиса в различных зонах ампутированной конечности больных диабетом показало, что по сравнению с непораженной кожей количество иммунопозитивных к PCNA кератиноцитов имеет тен-

денцию к падению. Так, в образцах кожи, взятых у здоровых людей, количество иммунопозитивных клеток составило $78,55 \pm 3 \%$ ($n = 6$, $p < 0,005$), что незначительно отличается от показателей в образцах кожи, взятых с области зоны ампутации нижней конечности — $81,1 \pm 8,4 \%$ ($n = 8$, $p < 0,005$). В то время как в образцах кожи, забор которых производился с пораженной гангреной области, процентное содержание иммунопозитивных клеток составило $57,83 \pm 4,8 \%$ ($n = 8$, $p < 0,005$).

Выявление рецепторов к VEGF в коже диабетических больных, как в зоне ампутации, так и в области конечности, пораженной гангреной, продемонстрировало, что в этих условиях обнаруживается более выраженная экспрессия рецепторов Flt-1 клетками эндотелия, по сравнению с кожей здоровых людей. Это коррелирует с данными подсчета количества сосудов сетчатого слоя дермы по результатам изучения экспрессии маркера эндотелия сосудов CD 31. Так, в сетчатом слое дермы ампутированной конечности на 1 мм^2 количество сосудов в зоне ампутации составило 63 ± 12 ($n = 8$, $p < 0,005$). В сетчатом слое дермы «пораженной гангреной части конечности» количество сосудов составило 54 ± 4 ($n = 8$, $p < 0,005$), в то время как в сетчатом слое дермы здоровых людей количество сосудов составляет 23 ± 6 ($n = 6$, $p < 0,005$).

Исследование кожи ампутированной конечности в различных зонах с использованием маркера антиапоптоза позволило обнаружить, что по сравнению с кожей здоровых людей происходит ослабление устойчивости клеток эпидермиса к апоптозу, о чем свидетельствуют данные, полученные при окрашивании образцов кожи на Vcl-2. Так, в образцах кожи, взятых у здоровых контролей, уровень средней интенсивности серого пикселя составил $89,69 \pm 3,4$ ($n = 6$, $p < 0,005$), что незначительно выше показателей в образцах кожи, взятых с области зоны ампутации нижней конечности — $81,58 \pm 7,8$ ($n = 8$, $p < 0,005$). В то время как в образцах кожи, забор которых производился с пораженной гангреной области, средняя интенсивность серого пикселя составляет $56,83 \pm 4,5$ ($n = 8$, $p < 0,005$).

Использование антител к коллагену IV типа для исследования кожи ампутированной конечности показало, что в образцах кожи зоны ампутации толщина стенок сосудов кожи составляет $6,4 \pm 0,2 \text{ мкм}$ ($n = 8$, $p < 0,005$). В то время как в образцах кожи с пораженной гангреной области толщина сосудов составляет $6,2 \pm 0,2 \text{ мкм}$ ($n = 8$, $p < 0,005$), тогда как толщина стенок сосудов в образцах ткани кожи, взятых у здоровых людей, составила $5,1 \pm 0,2 \text{ мкм}$ ($n = 6$, $p < 0,005$).

Таким образом, проведенное нами исследование позволило выявить, что в изученных препаратах патологически измененной кожи больных диабетом наблюдается резкое уменьшение количества способных к пролиферации клеток в эпидермисе и дерме по сравнению с кожей, незатронутой патологическим процессом, у тех же больных. Выявление VCL-2 показало, что количество клеток, вступающих в апоптоз, в зависимости от степени выраженности патологического процесса возрастает по сравнению с кожей неповрежденной области. Таким образом, иммуногистохимическое изучение кожи диабетических больных показало, что в условиях ангиопатии и в эпидермисе и в дерме нарушаются процессы пролиферации и устойчивости к апоптозу, что ведет к гибели клеток. Это проис-

ходит при выраженной экспрессии рецепторов к эндотелиальному сосудистому фактору роста в клетках эндотелия, а также, несмотря на наличие новообразованных сосудов, трофика ткани остается на низком уровне вследствие увеличения толщины сосудистой стенки и уменьшении его пропускной способности.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Использование* различных методов исследования процессов деления клеток эпителия и стромы на примере слизистой оболочки крупного хрящевого бронха / Т. Ф. Боровская [и др.] // Пульмонология. 2003. № 4. С. 26–30.

2. *Дедов, И. И.* Диабетическая нефропатия / И. И. Дедов, М. В. Шестакова. М. : Универсум Паблишинг, 2000.

3. *Северина, А. С.* Система ангиогенеза в норме и при сахарном диабете / А. С. Северина, М. В. Шестакова // Сахарный диабет. 2004. № 4. С. 38–42.

4. *Apoptosis* regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells / A. R. Bowen [et al.] // J. Invest. Dermatol. 2003. Vol. 120, № 1. P. 48–55.

5. *Cross, M., Claesson-Welsh L.* // TRENDS in Pharmacological Sciences. 2001. Vol. 22, № 4.

6. *Woodfin, A.* PECAM-1 : a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology / A. Woodfin, M. B. Voisin, S. Nourshargh // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007. Vol. 27. P. 2514–2523.