

**М.И.Завгородняя
Л.В.Макеева
О.С.Славчева
О.Н.Сулаева**

Запорожский государственный
медицинский университет

Ключевые слова: заживление
ран, воспаление, репарация,
ремоделирование кожи.

Надійшла: 16.08.2016

Прийнята: 02.09.2016

УДК 576.315.42:576.311]:616-018.1:616-092-036.12

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН

Реферат. Одной из актуальных проблем медицины является нарушение заживление ран. Репарация кожной раны - многофазный процесс, включающий взаимодействие различных клеток, факторов роста и цитокинов, и других сигнальных молекул, направленный на закрытие дефекта кожи и, как результат, восстановление целостности покровов тела. Целью данной работы является анализ современных данных о клеточных детерминантах и молекулярных механизмах течения раневого процесса. Помимо обсуждения механизмов смены клеточных популяций, авторы затрагивают вопросы возможности прогнозирования и управления процессом заживления кожных ран, новые стратегические направления лечения длительно незаживающих ран в рамках трансляционной медицины.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 19-23.

© М.И.Завгородняя, Л.В.Макеева, О.С.Славчева, О.Н.Сулаева, 2016

✉ oksanahistology@gmail.com

Zavgorodniaia M.I., Makeieva L.V., Slavcheva O.S., Sulaieva O.N. Cellular and molecular basics of the wound healing.

ABSTRACT. The skin as the biggest organ of human body plays the crucial role in protection and defence. Any kind of the skin injury leads to functional imbalance, whereas severe damage can be associated with human disability or even death. At the same time, the skin injury initiates the mechanisms of curbing damage and subsequently inducing repair. Repair of the skin wounds is a complex multiphase process that comprises the dynamic series of overlapping phases and involves numerous cell subsets, inflammatory mediators, cytokines, chemokines, growth factors, proteolytic enzymes and other signal molecules aimed at the closure of the skin defect and, as a result, the restoration of the integrity of the integument. The process of wound healing goes through several phases: inflammation, proliferation and remodeling. These phases are orchestrated by the interplay of the cells participating in each phase and molecules produced by these cells. Due to the growing body of scientific research, plenty of information about the cellular and molecular regularities of the healing process is available. However this does not reduce the number of patients with delayed healing or non-healing chronic wounds. That is why wound healing violation is still the actual problem of current medicine. The aim of this work was to assess the current data concerning the cellular determinants, and molecular mechanisms of the wound healing. In addition to discussing the mechanisms of the cell populations' exchange, the authors address questions of the ability to predict and manage the wound healing. The new strategies, including biotechnologies and cellular technologies in particular are discussed. Further investigation of the kinetics of different cell lines will allow detailing the role and mechanisms of different intercellular cooperation that is a prerequisite for the development of a new process of wound management strategy.

Key words: wound healing, inflammation, repair, skin remodelling.

Citation:

Zavgorodniaia MI, Makeieva LV, Slavcheva OS, Sulaieva ON. [Cellular and molecular basics of the wound healing]. *Morphologia*. 2016;10(3):19-23. Russian.

Повышенная частота незаживающих ран кожи предопределяет все возрастающий объем научных исследований сложного процесса, известного как "заживление ран". Проблемы нарушения заживления кожных ран по-прежнему остаются в фокусе внимания ученых всего мира [1, 2]. Несмотря на широкое внедрение в медицинскую практику современных методов диагностики и лечения, включая клеточную терапию, до сих пор актуальными остаются вопросы: Какие механизмы лежат в основе переключения фаз раневого процесса? Какие молекулы определяют кинетику клеточных популяций в кожной ране? Какие клетки могут быть потенциальными

мишенями таргетной коррекции течения раневого процесс? На эти и другие вопросы мы попытаемся ответить в рамках данного обзора.

Как известно, повреждение кожи запускает сложный каскад организованных во времени и пространстве событий, обеспечивающих восстановление гомеостаза и закрытие раневой поверхности [2]. Данный процесс включает несколько фаз: воспаление, пролиферации (образование грануляций и эпителизация) и ремоделирование [3]. Каждая из фаз характеризуется реализацией определенных процессов с участием различных клеток.

Фаза воспаления

Закономерно, что повреждение сопровождается сосудистой реакцией и активацией системы гемостаза [4]. Этот процесс инициируется с первых секунд после повреждения и занимает несколько часов. Помимо эндотелия и тучных клеток, ключевыми клетками-участницами инициации воспаления являются тромбоциты [2]. Несмотря на то, что тромбоциты не имеют ядра, при активации в них происходит сигнал-зависимая трансляция резидуальной мРНК и, как следствие, *de novo* синтез белков, включая цитокины (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 и фактор некроза опухоли – TNF- α), хемокины и рецепторов, включая гликопротеины (GP-рецепторы) и P-селектин [5; 6].

Участие тромбоцитов в реализации воспаления и работе иммунной системы во многом прояснилось благодаря развитию протеомики и транскриптомики. На сегодня тромбоциты относят к системе врожденного иммунитета. Они считаются неотъемлемым элементом защиты при повреждении благодаря: 1) присутствию на плазмолемме Toll-like рецепторов (TLR2 и TLR4), обеспечивающих распознавание PAMP, DAMP, MAMP [6]; 2) продукции липидных медиаторов воспаления и факторов разрешения воспалительного ответа [4]; 3) способности секретировать хемокины, модулирующие активность лейкоцитов и других клеток [7]; 4) генерации активных радикалов кислорода стимулированными тромбоцитами [6]; 5) взаимодействию тромбоцитов с системой комплемента [5]; 6) продукции антимикробных факторов и киноцидинов [5]; 7) способности к контактному взаимодействию с лейкоцитами, с формированием тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов [7].

Развертывание фазы воспаления в течение 1-х суток неразрывно связано с активацией и миграцией в рану нейтрофилов [8]. Последние принимают участие в образовании тромба, удаляют поврежденные структуры ткани, фагоцитируют микробов с использованием набора протеаз (эластаза, катепсин G, PR-3, и uPA), секретируют широкий спектр эйкозаноидов, катионных белков и активных форм кислорода (ROS), потенцируют воспаление в ране, принимают участие в регуляции дифференцировки миофибробластов [2, 3].

Важными регуляторами течения воспаления и его разрешения являются макрофаги, предшественники которых – моноциты, мигрируют из крови в зону раневого дефекта через 24-48 ч. Именно с макрофагами на сегодня связывают нарушение механизмов разрешения воспаления [9]. Под действием классических активаторов (INF γ , бактериальный липосахарид, TNF- α) моноциты, рекрутированные в место повреждения из крови, дифференцируются в M1-макрофаги [10, 11]. Данный фенотип считается провоспалительным

и характеризуется высокой экспрессией NF-kB – классического регулятора провоспалительных событий, а также включением метаболизма L-аргинина через iNOS-путь [12]. M1-макрофаги обеспечивают неспецифическую защиту и индуцируют развитие острой воспалительной реакции за счет продукции активных радикалов кислорода, провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23), хемокинов [11]. Разрешение воспаления ассоциировано с изменением фенотипа макрофагов и включение M2-фенотипа [9]. M1-макрофаги обеспечивают неспецифическую защиту и индуцируют развитие острой воспалительной реакции за счет продукции активных радикалов кислорода, провоспалительных цитокинов – IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, хемокинов, привлекающих в зону повреждения нейтрофилы, эозинофилы и моноциты, которые пополняют пул макрофагов в зоне раны, а также разные подтипы лимфоцитов [9, 12].

M2-тип макрофагов образуется при действии альтернативных стимуляторов (глюкокортикоидов, IL-4, IL-3, IL-10, TGF β) [2]. Изучение механизмов трансформации фенотипов макрофагов привело к переосмыслению их роли в регуляции раневого процесса [12]. Если раньше макрофагам отводилась роль дирижеров воспалительно-репаративного процесса, то в результате открытия и изучения классических и альтернативных путей регуляции фенотипов макрофагов стала понятной роль микроокружения – тех клеточных популяций в зоне раны, которые определяют специфику межклеточных коопераций и продукцию тех или иных регуляторных коктейлей [3]. Так, превалирование в зоне повреждения нейтрофилов, NK, Th1 и антигенпрезентирующих клеток, являющихся продуцентами INF γ и TNF α , предопределяет трансформацию моноцитов в M1-тип макрофагов. Тогда как превалирование тучных клеток, Th2 и Treg и гранулоцитов, являющихся продуцентами IL-4, IL-10 и TGF β способствует формированию M2-фенотипа макрофагов [9, 12].

При этом трансформация в M2-фенотип сопровождается снижением экспрессии NF-kB и переключением метаболизма L-аргинина с iNOS пути на аргиназу 1. Эти события сопровождаются переходом на репаративный фенотип – снижается продукция провоспалительных регуляторов и усиливается образование противовоспалительного IL-10, а также секреции TGF- β и простагландина E2 (PGE2) [1]. Кроме того, M2-макрофаги продуцируют широкий спектр факторов роста, стимулирующих ангиогенез (VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия) и репарацию дермы и эпидермиса (FGF – фактор роста фибробластов, EGF – эпидермальный фактор роста, TGF β -трансформирующий фактор роста) [13].

Фаза пролиферации

Во время этой фазы длящейся с 3 по 14 сут-

ки происходит формирование грануляционной ткани, эпителизация раневой поверхности и ангиогенез. Особенностью грануляционной ткани является особый клеточный состав: в ней много макрофагов, плюрипотентных прогениторов фибробластической линии и миофибробластов, а также большое количество эндотелиоцитов, выстилающих многочисленные новообразованные капилляры [13]. Межклеточное вещество грануляционной ткани богато фибронектином, гиалуроновой кислотой и коллагеном III типа, который в процессе ремоделирования заменяется коллагеном I типа. Источником формирования грануляционной ткани, заполняющей раневую дефект, являются края и дно раны. Из этих зон макрофаги, миофибробласты и капилляры мигрируют в сторону раны, формируя взаимосвязанные функциональные комплексы (модули заживления). Миофибробластам при заживлении посвящено огромное количество исследований, позволивших установить источники и механизмы формирования клеток данной линии, ключевые стимуляторы и продукты секреторной активности данных клеток [14; 15]. Важно подчеркнуть, что помимо компонентов межклеточного матрикса, миофибробласты секретируют многочисленные факторы роста, стимулирующие ангиогенез и эпителизацию раны, в частности, VEGF, фактор роста кератиноцитов (KGF) и EGF [15]. Не менее важным является и клинический аспект управления активностью миофибробластов. Изучение механизмов активации МФБ показало, что помимо механического стресса, ключевыми регуляторами формирования, пролиферации и дифференцировки миофибробластов являются TGF β и фактор роста тромбоцитарного происхождения (PDGF) [14]. К наиболее важным источникам синтеза TGF β относятся M2 макрофаги и Treg клетки, в то время как основным продуцентом PDGF закономерно являются тромбоциты. Причем данный фактор роста, как впрочем и другие факторы роста, включая TGF β и VEGF, накапливаются в α -гранулах тромбоцитов. Активация тромбоцитов и секреция альфа-гранул обеспечивает высвобождение факторов роста и стимуляцию репаративных процессов. Данный факт положен в основу использования аутологичной богатой тромбоцитами плазмы для стимуляции заживления хронических кожных ран, а также в других областях медицины, включая стоматологию, гинекологию, травматологию, косметологию и пр. [16].

Кроме того, развитие и внедрение в практическую медицину клеточных технологий привело к широкому использованию мезенхимальных стромальных стволовых клеток, получаемых из красного костного мозга или аутофибробластов, выделяемых из дермы кожи, в целях стимуляции заживления обширных ран кожи (после ожогов, травм) [17]. Не менее перспективным считается

использование прогениторов, выделяемых из гиподермы. Обилие в гиподерме сосудов микроциркуляторного русла, окруженных перicyтами, которые являются источником формирования миофибробластов, позволяет рассматривать гиподерму как важный источник прогениторов для клеточной терапии обширных ран. На сегодня стали реальностью использование технологий липофилинга и липографтинга (введение или трансплантация прогениторов, выделенных из жировой ткани) как для стимуляции репаративных процессов в хирургии, так и для борьбы с возраст-ассоциированными изменениями кожи в эстетической медицине [2; 17].

Процесс реэпителизации также требует формирования новых клеток и их миграции для замещения погибших в результате повреждения кератиноцитов. Учитывая, что воспаление и образование грануляционной ткани сопровождается освобождением широкого спектра факторов роста и цитокинов, стимулирующих пролиферацию кератиноцитов, реэпителизация раны, казалось бы, не является проблемой. Однако, в реальности при глубоких повреждениях кожи, погибает не только эпидермис, но и эпителиальные производные кожи – волосяные фолликулы и железы. В обсуждении возможностей их восстановления особое значение приобретают эпителиальные стволовые клетки (ЭСК) [18]. В физиологических условиях ЭСК являются источником развития различных клеточных популяций, обеспечивающих формирование эпителиальных структур кожи – интерфолликулярного эпидермиса, волосяных фолликулов, сальных и потовых желез [17; 19]. Источником всех этих клеточных линий являются ЭСК, расположенные в области ложа волосяного фолликула (ВФ) [20]. В онтогенезе они являются источником формирования волос, а позднее и стволовых клеток сальных желез. При повреждении кожи, ЭСК ложа ВФ становятся источником восстановления интерфолликулярного эпителия [20]. Предполагается также, что есть особая группа ЭСК, обеспечивающих регенерацию эккриновых потовых желез [19]. В физиологических условиях пролиферация клеток в составе этих желез очень низкая, но она драматически нарастает при раневом процессе, и может обеспечивать частичное восстановление интерфолликулярного эпидермиса [18]. При этом стоит отметить, что полноценное восстановление эпидермиса и эпителиальных структур кожи, возможно лишь при условии сохранения ЭСК. Их потеря при глубоком повреждении, сопровождающемся разрушением ВФ, ведет к нарушению не только механизмов реэпителизации, но и гистоархитектоники дермы, утратившей структурообразующие микромодули ВФ и желез [20]. Это неизбежно проявляется в следующей фазе процесса заживления ран – ремоделировании.

Фаза ремоделирования

Ремоделирование подразумевает под собой процесс перестройки грануляционной ткани и замещение ее зрелой соединительной тканью, часто с формированием рубца. На этом этапе заживления существенные изменения претерпевает состав внеклеточного матрикса. Коллаген III типа замещается более прочным коллагеном I типа и снижается содержание фибронектина, меняется пространственная организация коллагена. Важную роль в процессе ремоделирования играют металлопротеиназы (ММП-1,2,3,9), обеспечивающие деградацию компонентов внеклеточного матрикса [1, 3]. Эффекты ММП ограничиваются действием тканевых ингибиторов (ТИМП). Баланс активности ММП и ТИМП по сути предопределяет объем межклеточного матрикса и вероятность формирования атрофических или

гипертрофических рубцов [13]. Реализация процесса ремоделирования занимает недели и месяцы и неизбежно сопровождается активацией системы адаптивного звена иммунитета. Так, исследования Motwani MP et al. [21] показали позднее (через 21-22 сут) повышение уровня E2, и изменение количества в зоне раны макрофагов и Т-лимфоцитов, включая Treg. Это требует дальнейшего изучения роли иммунокомпетентных клеток в механизмах заживления ран.

Таким образом, заживление ран является сложным многофакторным процессом, реализующимся на динамических взаимодействиях клеток и регуляторов. Дальнейшее изучение кинетики клеток разных линий позволит оценить роль и механизмы реализации разных межклеточных коопераций, что является условием разработки новой стратегии управления раневым процессом.

Литературные источники References

1. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453:314-21.
2. Nauta A, Gurtner G, Longaker M. Wound healing and regenerative strategies. *Oral Dis*. 2011; 17: 541-9.
3. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25:9-18.
4. Gorokhova V.S., Chernovol P.A., Chernovol V.P., Sulaeva ON. [The variability of response of thrombocytes to ADP: from theory of thrombogenesis to practical application of plasma rich in thrombocytes]. *Klin lab diagn*. 2016; 61(6): 363-7.
5. Brass L. Understanding and Evaluating Platelet Function. *Hematology*. 2010; 10:387-96.
6. Barinov EF, Prylutska I, Maximenko O et al. Mechanisms of the platelet-leukocyte aggregates formation in the peripheral blood of patients with ischemic stroke. *J Health Sci*. 2013; 3(5): 637-48.
7. Barinov EF, Sulaeva ON. [Molecular mechanisms of thrombogenesis]. *Morfologiya*. 2011;139(3):85-8. Russian.
8. Wilgus TA, Sashwati R., McDanie JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care*. 2013; 2(7):379-88.
9. Gilroy D, De Maeyer R. New insights into the resolution of inflammation. *Semin Immunol*. 2015; 27(3):161-8.
10. Barinov EF, Sulaeva ON, Barinova ME. [Blood monocytic L-arginine metabolic changes in diabetic foot syndrome]. *Klin lab diagn*. 2010; 5:16-9.
11. Barinova ME, Iel's'kyi VM, Barinov EF, Sulaeva OM. [Functional activity of monocytes and mechanisms of iNOS intracellular regulation during wound process]. *Fiziol Zh*. 2011;57(1):36-44. Russian.
12. Barinova ME, Sulayeva ON. [Heterogeneity of macrophages reaction during foot wounds healing in diabetic patients]. *Morphologia*. 2009;3(1):22-7. Russian.
13. Bizunesh M, Borena A, Martens S et al. Regenerative skin wound healing in mammals: state-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36:1-23.
14. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech*. 2010; 43:146-55
15. Klingberg F., Hinz B., White E.S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis *J Pathol*. 2013;229:298-309
16. Compos R, Parraza DN, Barandiaran AF. Platelet-rich plasma in skin ulcer treatment. *Wounds*. 2013; 25(9): 256-62.
17. Donati G, Watt FM. Stem cell heterogeneity and plasticity in epithelia. *Cell Stem Cell*. 2015;16:465-76.
18. Arwert EN, Hoste E, Watt FM. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:170-80.
19. Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J Cell Commun Signal*. 2016; 10(2): 103-20.
20. Barinov EF, Sulaeva ON. [Histophysiology of hair follicles: current concept]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2003;35(4):65-77. Russian.
21. Motwani MP, Flint JD, De Maeyer RP, et al. Novel translational model of resolving inflammation triggered by UV-killed E. coli. *J Pathol Clin Res*. 2016; 4;2(3):154-65.

Завгородня М.І., Макєєва Л.В., Славчева О.С., Суласєва О.М. Клітинні та молекулярні основи загоєння ран.

Реферат. Однією з актуальних проблем медицини є порушення загоєння ран. Репарація шкірної рани - багатофазний процес, що включає взаємодію різних клітин, факторів росту, цитокінів та інших сигнальних молекул, спрямований на закриття ранового дефекту та, як результат, відновлення цілісності шкіри. Метою даної роботи є аналіз сучасних даних про клітинні детермінанти і молекулярні механізми перебігу ранового процесу. Крім обговорення механізмів зміни клітинних популяцій, автори торкаються питання можливості прогнозування і управління процесом загоєння шкірних ран, розробки нових стратегічних напрямків лікування хронічних ран в рамках трансляційної медицини.

Ключові слова: загоєння ран, запалення, репарація, ремоделювання шкіри.