

## ВПЛИВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА, ЩО КОДУЄ ІНСУЛІНОПОДІБНИЙ ФАКТОР РОСТУ, НА ЗАГОЄННЯ РАН ШКІРИ У МИШЕЙ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ

Ю.І. ЛЕОНОВ<sup>1</sup>, М.С. ШКУМАТ<sup>1</sup>, П.П. КЛИМЕНКО<sup>1</sup>, М.Ю. ГОВОРУН<sup>1</sup>,  
М.М. ГУЗИК<sup>2</sup>, Т.М. КУЧМЕРОВСЬКА<sup>2</sup>, І.М. ПІШЕЛЬ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України, Київ  
E-mail: leonov@geront.kiev.ua

<sup>2</sup> Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

*Одним із основних факторів, що можуть здійснювати вплив на стан та швидкість процесів регенерації шкіри, є IGF-1 (ген, що кодує інсуліноподібний фактор). Проведено морфологічне та молекулярно-біологічне дослідження ран шкіри мишей лінії FVB дикого типу та трансгенних тварин K14/mIGF-1 зі стрептозотоцин-індукованим діабетом. Показано збільшення експресії IGF-1, площі та товщини регенеруючого епітелію, кількості клітин Mac-1<sup>+</sup> в рані у трансгенних тварин порівняно з диким типом.*

**Ключові слова:** шкіра, загоєння ран, діабет, IGF-1, експресія.

**Вступ.** Пошкодження шкіри ініціює серію подій, які зрештою призводять до повної або часткової регенерації ушкодженої тканини [1, 2]. Загоєння ран – складний процес, що включає в себе кілька етапів (основні – запалення, проліферація і дозрівання) та вимагає участі багатьох типів клітин (тромбоцити, нейтрофіли, макрофаги, кератиноцити, фібробласти, ендотеліальні та нервові клітини, лімфоцити тощо) [3]. Спосіб, за допомогою якого різні популяції клітин модулюють функції інших клітинних популяцій, а також роль різних гормонів та факторів росту в цьому процесі становлять великий інтерес. Один з гормонів, що, як вважається, впливає на процес відновлення, є гормон росту (GH). Цей гормон успішно використовують для лікування дефектів росту та як чинник стратегії антистаріння [4]. Багато ефектів GH опосередковується через інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1) [5]. IGF-1 є мітогеном для кератиноцитів [6], і це стимулює вироблення колагену, глікозаміногліканів та синтез протеогліканів фібробластами шкіри. Основним дже-

релом циркулюючого IGF-1 в післяпологовий період життя є печінка, але IGF-1 також може бути вироблений і в багатьох інших тканинах, де він має паракринну активність. У контексті шкіри IGF-1 був визначений як активний паракринний стимулятор росту, що виділяється фібробластами і макрофагами для кератиноцитів у культурі клітин [7] з метою стимуляції їхньої ненаправленої міграції [8]. Для IGF-1 як лікувального засобу також був продемонстрований ефект прискорення загоєння ран шкіри – шляхом стимуляції впливу фібробластів на синтез колагену на додачу до свого мітогенного впливу на кератиноцити і фібробласти [2, 9]. В кератиноцитах IGF-1 стимулює проліферацію [10] і впливає на морфогенез волосяного фолікула [11–13]. Миші з виключеним рецептором IGF-1 вмирають незабаром після народження від дихальної недостатності та мають аномально тонкий і напівпрозорий шар епідермісу зі зменшеною кількістю волосяних фолікулів [11]. Досі не з'ясовані функції і механізми впливу IGF-1 на загоєння ран, але було чітко продемонстровано його вплив на цей процес. Так, зниження рівня IGF-1 при цукровому діабеті негативно впливає на загоєння ран шкіри діабетичних осіб при старінні [14]. Загоєння ран, в тому числі реепітелізація, уповільнена у хворих на цукровий діабет [14], який негативно впливає на процеси загоєння ран, в тому числі на гемостаз, запалення та ангіогенез. Ці порушення присутні в найрізноманітніших тканинах, в тому числі міокарді, скелетних м'язах, нервах та шкірі.

При пошкодженнях шкіри у хворих на цукровий діабет встановлено зміни кровообігу, порушення антимікробної активності нейтрофілів і дисфункціональний стан запалення, пов'язаний з аномальною дією хемокінів [15].

© Ю.І. ЛЕОНОВ, М.С. ШКУМАТ, П.П. КЛИМЕНКО,  
М.Ю. ГОВОРУН, М.М. ГУЗИК, Т.М. КУЧМЕРОВСЬКА,  
І.М. ПІШЕЛЬ, 2015

Запальна відповідь є необхідною умовою для початку репарації рани. На молекулярному рівні підвищення кількості mIGF-1 може значно скоротити активність прозапальних цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин альфа (TNF $\alpha$ ) та інтерлейкіну-1-бета (IL-1 $\beta$ ) і скоригувати вплив СС-хемокіна, який бере участь у привабленні моноцитів/макрофагів.

Мета дослідження – вивчити особливості впливу експресії трансгенного mIGF-1 на швидкість загоєння ран, а також провести аналіз імунологічних та молекулярно-біологічних механізмів дії mIGF-1 на процеси регенерації шкіри.

**Матеріали та методи.** Експерименти проведені на 3–4-місячних мишах-самцях лінії FVB з трансгеном K14/mIGF-1 (tg) та без нього (wt). В дослідженнях використовували мишей з гетерозиготним генотипом. Наявність чи відсутність трансгенного IGF-1 визначали генотипуванням у новонароджених. Тварини надані Європейською молекулярно-біологічною організацією (ЄМБЛ) і утримувалися на базі віварію Інституту геронтології. Досліди проводили на моделі стрептозотозин-індукованого діабету. Мишей розподілили на чотири групи: дикі тварини – wt; дикі тварини з діабетом – wtD; трансгенні тварини з діабетом – tgD. Тваринам внутрішньобрюшинно вводили 50 мг/кг стрептозотозину («Sigma», США) впродовж п'яти днів. Для експерименту відбирали тварин з рівнем глюкози > 15 ммоль/л.

**Модель пошкоджень шкіри.** Всі маніпуляції з тваринами здійснювали під кетаміновим наркозом (10 мг/кг). Хутро на ділянці спини видаляли голінням, шкіру промивали 70%-ним етанолом і наносили чотири рани на всю товщину шкіри (5 мм в діаметрі). Тварин на період загоєння розміщували індивідуально. На 5-й та 8-й день після травми у дослідних тварин під кетаміновим наркозом вирізали рану та 3 мм оточуючої шкіри.

Рани розрізали навпіл у напрямку росту хутра. Одну половину зразка обробляли для морфологічного дослідження, іншу заморожували і зберігали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до виділення РНК. Зовнішню частину рани та гранульомну тканину зберігали і обробляли окремо. Зразки шкіри/рани переводили в парафін для отримання зрізів

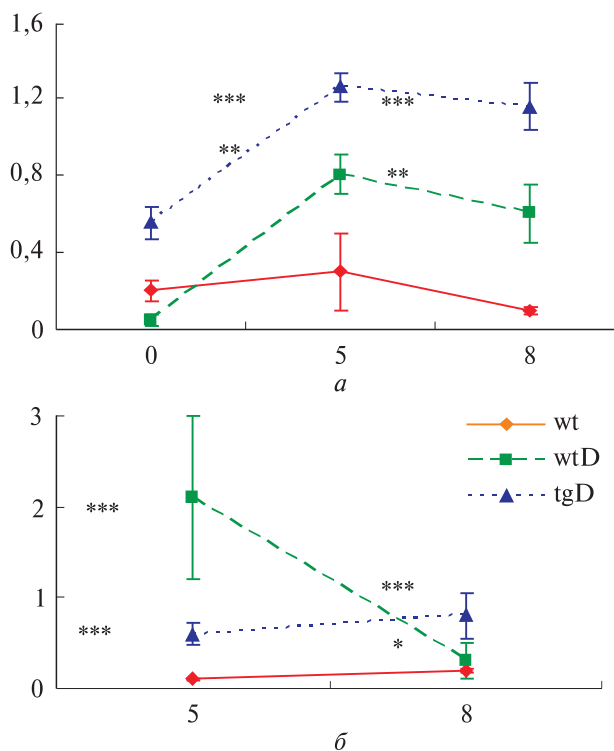
товщиною 7 мкм, після чого за допомогою ксилолу вони були регідратовані в етанол. Зрізи проаналізовані після фарбування по Масону, трикольорове забарвлення («Sigma-Aldrich», США). Для проведення імуногістохімії зрізи інкубували в 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  з метою інактивації ендogenous пероксидів. Потім інкубували з первинними антитілами: 1) маркер клітинної проліферації Ki67 кролячий IgG1K клон B56, BD Biosciences; 2) маркер проліферації клітин для ендотеліальних клітин кроля CD31, Abcam; 3) маркер для гранулоцитів Gr1 щурячий IgG2b/к, BD Biosciences; 4) маркер для макрофагів CD11b/Mac1 щурячий (DA) IgG2b/к, BD Biosciences. Як вторинні антитіла використовували козячі антикролячі-HRP та козячі антищурячі-HRP («Vector Laboratories», ОК). Для забарвлення зрізи інкубували з субстратом пероксидази DAB і вивчали під світловим мікроскопом (Leica DC500). Зображення отримані та оброблені за допомогою програмного забезпечення Adobe Photoshop.

Для кількісного морфометричного аналізу площі, товщини регенеруючого епітелію (потовщеної ділянки шкіри), довжини регенеруючого епітелію, довжини відкритої рани, загальної довжини рани (суми довжини регенеруючого епітелію і відкритої рани) використовували програмне забезпечення «Image J».

**Молекулярно-біологічні дослідження.** Проводили дослідження рівня експресії РНК відповідних генів. Виділення РНК здійснювали згідно з інструкцією набору «Рибозоль» («АмпліСенс», РФ), обробку ДНКазою – за інструкцією виробника («Thermo Scientific», ЕС).

Зворотну транскрипцію та отримання кДНК проводили згідно з інструкцією набору «Реверта-Л» («АмпліСенс», РФ). Ампліфікаційну суміш готували з використанням реактивів фірми «Thermo Scientific» (ЕС). Кінцевий об'єм суміші для ампліфікації в кожному зразку становив 25 мкл.

Склад ампліфікаційної суміші: по 0,5 мкл (1 мкг/мкл) праймерів R та F відповідного гена, 2 мкл dNTP (2 мМ), 7 мкл DEPC-обробленої води, 10 мкл розчину досліджуваної кДНК, 5 мкл буфера для ПЛР (2,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ), 0,2 од *Taq*-полімерази. Ампліфікацію проводили на термоциклері «Corbett Research», Австралія.



**Рис. 1.** Рівень експресії IGF-1 (по вертикалі) в шкірі (а) та гранульомній тканині (б) дослідних тварин. \* P (t) < 0,05 порівняно з тою ж тканиною в групі диких тварин з діабетом; \*\* P (U) < 0,05 порівняно з неушкодженою шкірою тієї ж групи; \*\*\* P (U) < 0,05 порівняно з тою ж тканиною у групі диких тварин; по горизонталі – день після травми

Праймери розроблені фірмами «Invitrogen» (США) (для IGF-1, трансгенного та тотального) та «СибЭнзим» РФ (GAPDH):

Ген	Послідовність
GAPDH	F GGT GAA GGT CGG TGT GAA CGG A R TGT TAG TGG GGT CTC GCT CCT G
IGF-1 (tg)	F TAC CAG CTC GGC CAC AGC C R CCG GAT GGA ACG AGC TGA C
IGF-1 (total)	F TGC TCT TCA GTT CGT GTG R ACA TCT CCA GTC TCC TCA G

Кількість циклів ампліфікації визначені попередніми експериментами для отримання найкращих результатів: GAPDH – 30, всі інші – 40. Аналіз продуктів ПЛР проводили електрофорезом у 1,5%-ному агарозному гелі, забарвленому 0,5 мкг/мл бромистого етидію, протягом

20 хв. Фотографії гелю отримані за допомогою цифрової камери Canon PowerShot A75, щільність смуг проаналізовано програмним забезпеченням для аналізу зображень BioTestColor (Біо Тест v.2.1, «Амплиценс», РФ). Рівень експресії мРНК стандартизований за рівнем експресії GAPDH як внутрішнього контролю.

Статистичну обробку даних здійснювали методом Фішера. Для порівняння між групами використовували програмне забезпечення ANOVA для декількох груп або непарний t-тест на дві групи. Статистичну різницю вважали достовірною при p < 0,05.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Експресія IGF-1 під час загоєння ран у мишей з діабетом. В наших експериментах трансгенним мишам переносили ген шурячого mIGF-1, який вбудовано під контроль промотора K14. Відомо, що експресія трансгенного фрагмента виявлена в шкірі, але не в печінці або серці мишей K14mtg [16]. Гібридизація *in situ* підтвердила експресію трансгенів mIGF-1 у K14-позитивних клітинах базального шару епідермісу та у зовнішній оболонці кореня і опуклій частині волосяних фолікулів [16]. У наших експериментах для визначення загальної експресії гена IGF-1 використовувались праймери як для tg IGF-1, так і для продукції власного IGF-1 (рис. 1). Загальний рівень експресії IGF-1 мав тенденцію до зниження в неушкодженій шкірі мишей дикого типу з діабетом і до збільшення – у діабетичних трансгенних мишей порівняно з інтактними тваринами. На 5-й і 8-й день після травми експресія гена IGF-1 була значно вищою в шкірі діабетичних мишей дикого типу порівняно з 0-м днем, а у трансгенних тварин значно вище в шкірі та гранульомній тканині порівняно з інтактними мишами дикого типу, а також в гранульомній тканині на 8-й день порівняно з діабетичними тваринами дикого типу (рис. 1).

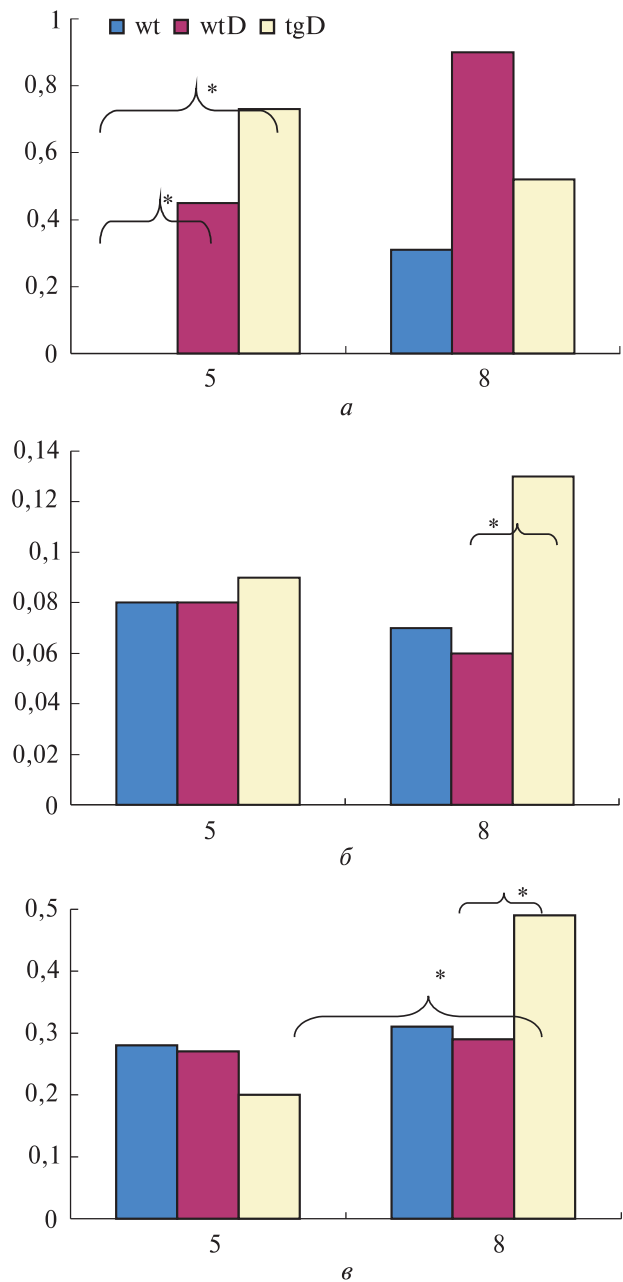
Таким чином, експресія гена IGF-1 в пошкодженій шкірі значно збільшується порівняно з неушкодженою тканиною на 5-й і 8-й дні у мишей з діабетом, а у групі трансгенних тварин з діабетом збільшення зафіксовано тільки як тенденція, але рівні мРНК IGF-1 в шкірі тварин цієї групи були значно вищими у порівнянні з диким типом. На 5-й день в гранульомній тканині обох груп з діабетом рівень експресії

IGF-1 був вищим, на 8-й день підвищений рівень мРНК зберігався лише в групі трансгенних мишей. Вважаємо, що максимальний ефект від трансгенного IGF-1 може зберігатися протягом всього періоду загоєння.

**Морфометричні показники загоєння ран.** Відомо, що у пацієнтів з цукровим діабетом рани загоюються погано. В нашому дослідженні довжина відкритої рани була значно вищою у тварин дикого типу і трансгенних тварин з діабетом порівняно з інтактними мишами на 5-й день після травми. Але довжина відкритої рани у трансгенних мишей з діабетом мала тенденцію до зниження порівняно з діабетичними тваринами дикого типу на 8-й день після травми (рис. 2, а). Значні відмінності в зростанні площі регенеруючого епітелію зафіксовані між діабетичними тваринами дикого типу та у трансгенних тварин на 8-й день після травми (рис. 2, в). Площа регенеруючого епітелію у трансгенних тварин збільшилася за рахунок його потовщення. Крім того, відмінності за цим параметром знайдені в групі трансгенних тварин з діабетом між 5-м і 8-м днями ( $p < 0,05$ ; рис. 2, б).

Морфологічні дослідження ран на 5-й день після травми показали у всіх групах великі скупчення жирової сполучної тканини і формування гранульомної тканини на кордоні країв рани. Крім того, у тварин на 5-й день спостерігалось утворення волосяних фолікулів поруч з ранюю, яке було інтенсивніше у трансгенних мишей зі стрептозотин-індукованим діабетом (tgD) порівняно з тваринами контрольної групи (wt) і особливо з діабетичними тваринами дикого типу (wtD) (рис. 3 а, б). У всіх групах тварин на 8-й день після нанесення ран інтенсивно формувалась гранульомна тканина та збільшувалась кількість фіброзного компоненту. У регенеруючій шкірі трансгенних мишей відбувалось більш виражене потовщення епітеліального шару (акантоз), ніж у тварин дикого типу (рис. 3, в, г).

Збільшення проліферації епітеліальних клітин у рані зафіксовано у всіх групах на 5-й та 8-й день. Не знайдено значних відмінностей у експресії Ki67<sup>+</sup>, яка в основному спостерігалась в базальних клітинах, меншою мірою – в шиповидних клітинах. У волосяних фолікулах також знайдено велику кількість клітин Ki67<sup>+</sup>. Значної різниці у кількості вказаних епітелі-



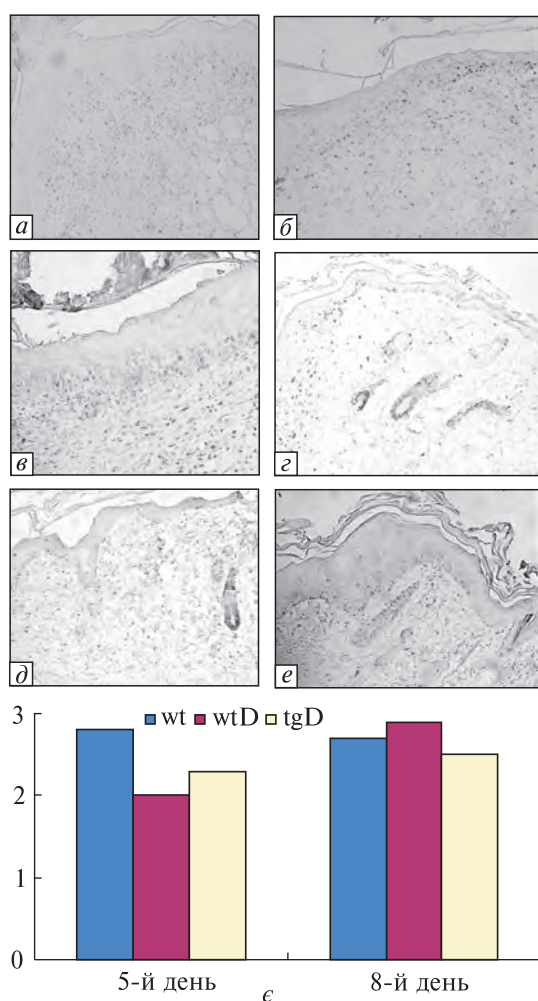
**Рис. 2.** Морфометричні параметри загоєння ран (по вертикалі, мм): а – довжина відкритої рани; б – товщина регенеруючого епітелію; в – площа регенеруючого епітелію; по горизонталі – день після травми

альних клітин між 5-м та 8-м днями після нанесення травми в усіх досліджуваних групах не встановлено (рис. 4). CD31<sup>+</sup> ендотеліальні клітини кровоносних капілярів, венул і артеріол





**Рис. 3.** Зрізи рани мишей з діабетом, трансгенних (а) і дикого типу (б) на 5-й день: велике скупчення жирової і сполучної тканини, між краями рани утворюється гранульозна тканина (стрілками зазначено формування волосяних фолікулів); в – зріз рани трансгенної тварини з діабетом на 8-й день, різко виражене потовщення епітелію – акантоз; з – регенерація шкіри тварини дикого типу з діабетом на 8-й день, гіперплазія і гіпертрофія епітелію, базальний і шипоподібний шари не виражені. Зб. 100



**Рис. 4.** Кі 67<sup>+</sup> клітини у регенеруючій рані мишей на 5-й день після травми: а – дикого типу; б – дикого типу з діабетом; в – трансгенних тварин з діабетом; з – збільшення Кі67<sup>+</sup> у волосяних фолікулах мишей дикого типу; д – дикого типу з діабетом; е – трансгенних тварин з діабетом. Зб. 200; с – кількість епітеліальних клітин Кі67<sup>+</sup> у мишей (коефіцієнт Каплова)

виявлено в жировій сполучній тканині ран на 5-й і 8-й день після травми у мишей всіх досліджуваних груп (рис. 5) та в чистих шарах шкіри навколо рани, де знайдені кровоносні капіляри, які проростають в гранульозну тканину, але середня кількість капілярів на одиницю площі не відрізнялася у диких та трансгенних мишей.

Загоєння ран у трансгенних мишей з діабетом супроводжувалось прискороною реепітелізацією – більшою товщиною та площею регенеруючого епітелію, що відповідає даним Semenova et al. [16]. Відмінностей в кількості клітин Кі67<sup>+</sup> та ендотеліальних клітин CD-31<sup>+</sup> між трансгенними і дикими тваринами з діабетом не знайдено, але підвищувався рівень експресії гена VEGF в гранульозній тканині трансгенних тварин з діабетом порівняно з диким типом. Цей факт дозволив припустити, що, незважаючи на відсутність відмінностей у кількості клітин CD31<sup>+</sup>, інтенсивність ангиогенезу в гранульозі трансгенних мишей може бути вищою.

*Особливості реакції запалення під час загоєння рани у K14/mIGF-1 мишей з діабетом.* Прискорена реепітелізація у IGF-1 трансгенних мишей може виникнути внаслідок прямого впливу mIGF-1 на кератиноцити або завдяки непрямому ефекту, який опосередковується строною. У ранній фазі процесу відновлення клітини запалення є особливо важливими регуляторами міграції та проліферації кератиноцитів [17]. Semenova et al. [16] встановили, що в інфільтраті на більш пізньому етапі лікування (5-й день) знаходяться нейтрофіли та макрофаги, які проникли в рану, але їх число не відрізняється у трансгенних та тварин дикого типу. Автори також не спостерігали істотних відмінностей в експресії різних хемокінів, цитокінів і факторів

росту, які пов'язані із запальною відповіддю в рані [16]. У нашій роботі також не зафіксовано істотних відмінностей у проникненні нейтрофілів і макрофагів між діабетичними тваринами дикого типу та трансгенними, але спостерігалося збільшення кількості моноцитів/макрофагів (Mac-1<sup>+</sup>) і гранулоцитів (Gr-1<sup>+</sup>) (рис. 6) в гранульомній тканині диких тварин з діабетом на 8-й день після травми та тенденція до зменшення їхньої кількості у трансгенних мишей з діабетом. Значно більше їх потрапляло в рану у тварин дикого типу з діабетом шляхом інтенсивної інфільтрації через стінки капілярів (рис. 6, в, ж). Вважаємо, що більша кількість моноцитів/макрофагів та гранулоцитів в рані тварин з діабетом свідчить на користь посилення запальних процесів, в той же час трансгенний IGF-1 не має істотного впливу на інтенсивність цього процесу.

Відомо, що у ранах щурів з діабетом знижена експресія IGF-I і IGF-II [18]. Дослідження Blakutny et al. [14] продемонстрували, що у людини рівень IGF-I знижується або відсутній в епідермісі, а також у фібробластах шкіри при діабеті та діабетичних ранах. IGF-I в умовах культивування клітин має важливе значення для проліферації кератиноцитів, а також стимулює міграцію кератиноцитів [19, 20]. Наявність IGF в ексудаті рани можна пояснити міграцією кератиноцитів, епітеліальних клітин сусідніх волосяних фолікулів, фібробластів грануляційної тканини, клітин запалення та сироватки [18, 21]. Гальмування загоєння ран може бути частково пов'язане зі змінами в системі IGF. У наших експериментах експресія генів IGF-1 була нижчою в неушкодженій шкірі мишей з діабетом і збільшеною в шкірі трансгенних мишей K14/mIGF-1. На 5-й день після травми високий рівень експресії IGF-1 у шкірі та гранульомній тканині спостерігався в обох лініях мишей з діабетом, але на 8-й день його рівень збільшився лише у гранульомній тканині трансгенних діабетичних тварин порівняно з діабетичними тваринами дикого типу. Морфологічні зміни діабетичної рани у диких та трансгенних мишей свідчать про прискорений поділ епітеліальних клітин у трансгенних мишей. Цей поділ може призводити до потовщення шару епітеліальних клітин і розвитку акантозу, що відповідає даним Semenova et al. [16]. Але підвищення проліферації клітин епітелію не

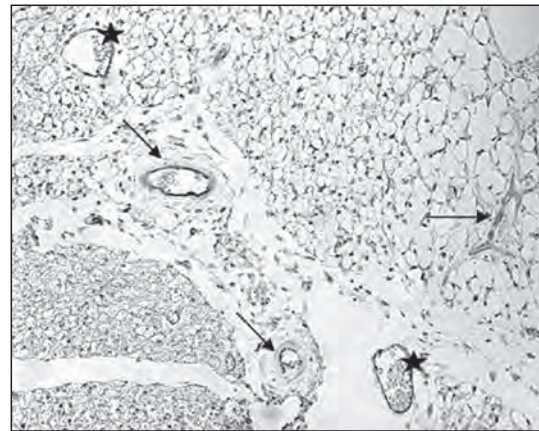
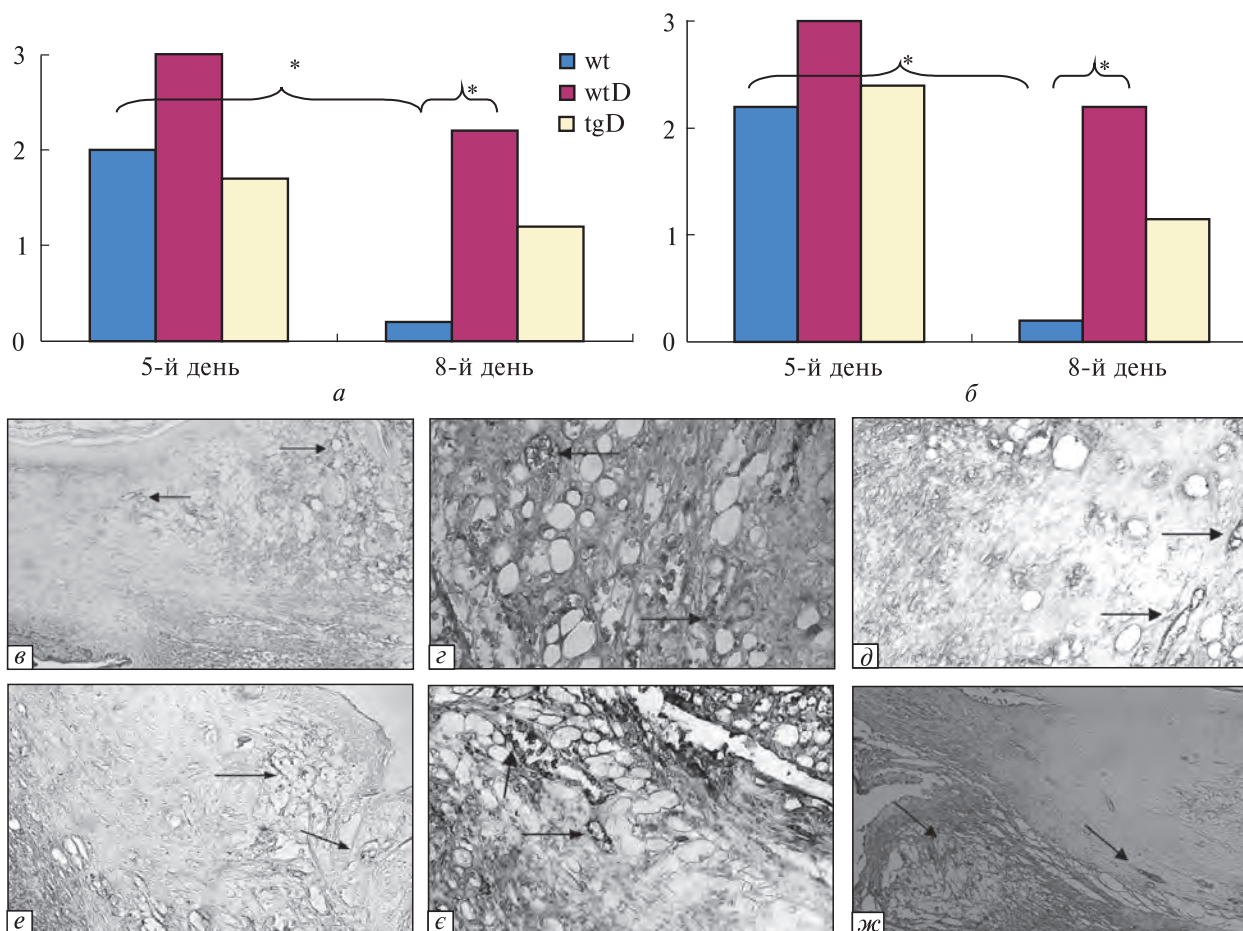


Рис. 5. Жирова сполучна тканина на 5-й день загоєння ран у трансгенних мишей з діабетом. Стрілками позначені клітини CD31<sup>+</sup> в артеріолах, зірочкою – у венулах. 36. 200

прискорює загоєння ран у трансгенних мишей з діабетом. IGF-1 ідентифікований як активний паракринний стимулятор росту, що виділяється фібробластами в культурі кератиноцитів *in vitro* [7], він може стимулювати ненаправлену міграцію кератиноцитів [22]. При лікуванні ран за допомогою IGF-1 встановлено, що при стимуляції фібробластів зростає синтез колагену на додачу до мітогенного впливу на кератиноцити і фібробласти. Клінічне застосування IGF-I характеризувалося збільшенням реепітелізації [23], ангіогенезом [24], шкірними відкладеннями колагену [25]. Місцеве застосування IGF-I може також поліпшити стан ран, що погано загоюються у хворих на діабет [26]. У нашій моделі mIGF-1 трансгена експресується в кератиноцитах шкіри, зокрема в дермі [16]. В дермі розгалужена система кровоносних судин, що має вирішальне значення для життєздатності шкіри. Коли кровоносних судин недостатньо, або вони аномальні чи пошкоджені (як це відбувається при опіках, важких травмах або хронічних захворюваннях, таких як цукровий діабет), життєздатність тканин знаходиться в небезпеці, що призводить до поганого загоєння ран і хронічних виразок шкіри. Таким чином, ми вважаємо, що пряма дія mIGF-1 трансгена може вплинути на міграцію кератиноцитів через/або ангіогенез в рані. Ангіогенез відбувається під час нормального загоєння рани і регулюється багатьма факторами росту, в тому числі IGF-1.



**Рис. 6.** Клітини в ранах тварин різних груп: *а* – Mac-1<sup>+</sup> (коефіцієнт Каплова, \*  $p < 0,05$ ); *б* – Gr-1<sup>+</sup> (\*  $p < 0,05$ ); *в* – 8-й день, проникнення моноцитів/макрофагів через кровоносні капіляри відсутнє у мишей дикого типу; *д* – у трансгенних мишей з діабетом ( $\times 200$ ); *е* – спостерігається проникнення у тварин дикого типу з діабетом (стрілки) ( $\times 400$ ); *ж* – 8-й день, невелика кількість гранулоцитів в рані мишей дикого типу; *з* – інфільтрація гранулоцитів крізь стінки кровоносних капілярів у мишей дикого типу з діабетом (стрілки) ( $\times 400$ ); *и* – у трансгенних мишей з діабетом, інфільтрація відсутня (стрілки) ( $\times 200$ )

Він стимулює судинну ЕС міграцію та формування трубки [27] і сприяє ангиогенезу аорти щурів *in vitro* [28]. IGF-1 може бути потенційним посередником судинних реакцій росту при інсулінозалежному діабеті та гіперінсулінемії [29]. Процес ангиогенезу тісно пов'язаний з формуванням грануляційної тканини. Це залежить від узгоджених дій декількох факторів і здійснюється за допомогою різних клітин. До них належать макрофаги і кератиноцити, які виробляють ангиогенні фактори, такі як фактор росту ендотелію судин [30, 31]. Тому ми використовували різні тканини рани для аналізу, зокрема шкіру та грануляційну тканину. Велику

кількість CD31<sup>+</sup> ендотеліальних клітин виявили у капілярах рани, артеріолах та венулах в обох групах мишей з діабетом на 5-й і 8-й день після травми. Цей факт може свідчити про високу активну проліферацію ендотеліальних клітин і, відповідно, активний судинний генез в рані. Але середня кількість капілярів на одиницю площі в нашому експерименті не відрізнялася у диких і трансгенних тварин з діабетом.

Загоєння ран являє собою динамічний процес, що включає реепітелізацію, ангиогенез, запалення і формування грануляційної тканини. Рецептори факторів росту, як і у випадку рецепторів IGF-1, при зв'язуванні їхніх лігандів іні-



ціують сигнальні каскади, які активують модуляції різних клітинних процесів, що мають важливе значення для загоєння ран [32]. Крім того, в процесі ангиогенезу ми звернули особливу увагу на фази запалення рани у піддослідних тварин. Клітини запалення мігрують в рану (хемотаксис) та створюють фазу запалення, яка характеризується послідовною інфільтрацією нейтрофілів, макрофагів і лімфоцитів [37, 38]. Макрофаги відіграють кілька ролей в загоєнні ран. На початку макрофаги синтезують цитокіни, що стимулюють запальні реакції шляхом залучення та активації додаткових лейкоцитів. Макрофаги також несуть відповідальність за апоптоз клітин (включаючи нейтрофіли), тим самим сприяючи зменшенню запалення. Після активації апоптозу клітин макрофаги переходять в стан, який стимулює репаративні кератиноцити, фібробласти та ангиогенез, що сприяє регенерації тканини [33, 34]. Таким чином, макрофаги сприяють переходу до проліферативної фази загоєння.

**Висновки.** Миші K14m/IGF1 з діабетом характеризуються значним збільшенням експресії IGF-1 в гранульомній тканині на 8-й день після травми порівняно з мишами дикого типу. Цей період характеризується значним збільшенням площі та товщини регенеруючого епітелію, але достовірної різниці між трансгенними тваринами та тваринами дикого типу не знайдено. Загоєння ран у мишей зі стрептозотоксин-індукованим діабетом супроводжується збільшенням у рані клітин Mac-1<sup>+</sup>.

#### EFFECT OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR TRANSGENE ON WOUND HEALING IN MICE WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

*Y. Leonov, M. Shkumat, P. Klymenko, M. Hovorun, M. Guzyk, T. Kuchmerovska, I. Pishel*

Institute of Gerontology them. D.F. Chebotarev NAMS of Ukraine, Kyiv  
E-mail: leonov@geront.kiev.ua  
Palladin Institute of Biochemistry NAS of Ukraine, Kyiv

One of the main factors that can exert influence on the position and rate of skin regeneration process is IGF-1. Morphological and molecular biological studies of skin wounds of FVB wild-type mice and transgenic animals K14/mIGF-1 with streptozotocin-induced diabetes were carried out. An increase of IGF-1 expression, area and thickness of the regenerating epithelium, the number

of Mac-1<sup>+</sup> cells in the wound in transgenic animals compared with wild-type was shown.

#### ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ИНСУЛИНОПОДОБНЫЙ ФАКТОР, НА ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН КОЖИ У МЫШЕЙ СО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ

*Ю.И. Леонов, М.С. Шкумат, П.П. Клименко, М.Ю. Говорун, М.М. Гузык, Т.М. Кучмеровская, И.М. Пишель*

Одним из основных факторов, влияющих на состояние и скорость процессов регенерации кожи, является IGF-1 (ген, кодирующий инсулиноподобный фактор). Проведено морфологическое и молекулярно-биологическое исследование ран кожи мышей линии FVB дикого типа и трансгенных животных K14/mIGF-1 со стрептозотоксин-индуцированным диабетом. Показано увеличение экспрессии IGF-1, площади и толщины регенерирующего эпителия, количества клеток Mac-1<sup>+</sup> в ране у трансгенных животных по сравнению с диким типом.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Keller U. auf dem, Kumin A., Braun S., Werner S. Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds // J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. – 2006. – **11**, № 1. – P. 106–111.
2. Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration // Science. – 1997. – **276**, № 5309. – P. 75–81.
3. Grazul-Bilska A., Johnson M., Bilski J. et al. Wound healing : The role of growth factors // Drugs Today. – 2003. – **39**, № 10. – P. 787–795.
4. Cummings D., Merriam G. Growth hormone therapy in adults // Ann. Rev. Med. – 2003. – **54**. – P. 513–533.
5. Green H., Morikawa M., Nixon T. A dual effector theory of growth-hormone action // Differentiation. – 1985. – **29**, № 3. – P. 195–198.
6. Eming S., Snow R., Yarmush M., Morgan J. Targeted expression of insulin-like growth factor to human keratinocytes: modification of the autocrine control of keratinocyte proliferation // J. Invest. Dermatol. – 1996. – **107**, № 1. – P. 113–120.
7. Barreca A., De Luca M., Del Monte P. et al. In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors // J. Cell Physiol. – 1992. – **151**, № 2. – P. 262–268.
8. Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own risk // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – **90**, № 13. – P. 5889–5892.
9. Guler H., Zapf J., Scheiwiller E., Froesch E. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates



- growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1988. — **85**, № 13. — P. 4889–4893.
10. *Tavakkol A., Elder J., Griffiths C. et al.* Expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-1 receptor mRNA and proteins in human Skin // J. Invest. Dermatol. — 1992. — **99**, № 3. — P. 343–349.
  11. *Johansson O., Liu P.O.* Gamma-melanocyte stimulating hormone ( $\gamma$ -MSH)-like immunoreactivity is present in certain normal human keratinocytes // Exp. Dermatol. — 1993. — **2**, № 5. — P. 204–208.
  12. *Philpott M., Sanders D., Kealey T.* Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro // J. Invest. Dermatol. — 1994. — **102**, № 6. — P. 857–861.
  13. *Rudman S., Philpott M., Thomas G., Kealey T.* The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen? // J. Invest. Dermatol. — 1997. — **109**, № 6. — P. 770–777.
  14. *Blakytyn R., Jude E.B., Martin Gibson J. et al.* Lack of insulin-like growth factor I (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers // J. Pathol. — 2000. — **190**, № 5. — P. 589–594.
  15. *Wetzler C., Kampfner H., Stallmeyer B. et al.* Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair // J. Invest. Dermatol. — 2000. — **115**. — P. 245–253.
  16. *Semenova E., Koegel H., Hasse S. et al.* Overexpression of mIGF-1 in keratinocytes improves wound healing and accelerates hair follicle formation and cycling in mice // Amer. J. Pathol. — 2008. — **173**, № 5. — P. 1295–1310.
  17. *Werner S., Grose R.* Regulation of wound healing by growth factors and cytokines // Physiol. Rev. — 2003. — **83**, № 3. — P. 835–870.
  18. *Brown D.L., Kane C.D., Chernaousek S.D., Greenhalgh D.G.* Differential expression and localization of insulin-like growth factors I and II in cutaneous wounds of diabetic and nondiabetic mice // Amer. J. Pathol. — 1997. — **151**, № 3. — P. 715–724.
  19. *Telasky C., Tredget E.E., Shen Q. et al.* IFN- $\alpha$ 2b suppresses the fibrogenic effects of insulin-like growth factor-1 in dermal fibroblasts // J. Interferon Cytokine Res. — 1998. — **18**, № 8. — P. 571–577.
  20. *Neely E.K., Morhenn V.B., Hintz R.H. et al.* Insulin-like growth factors are mitogenic for human keratinocytes and a squamous cell carcinoma // J. Invest. Dermatol. — 1991. — **96**, № 1. — P. 104–110.
  21. *Gartner M.H., Benson J.D., Caldwell M.D.* Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound // J. Surg. Res. — 1992. — **52**, № 4. — P. 389–394.
  22. *Ando Y., Jensen P.J.* Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration // J. Invest. Dermatol. — 1993. — **100**, № 5. — P. 633–639.
  23. *Bhora F.Y., Dunkin B.J., Batzri S. et al.* Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin // J. Surg. Res. — 1995. — **59**, № 2. — P. 236–244.
  24. *Roesel J.F., Nanney L.B.* Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair // J. Surg. Res. — 1995. — **58**, № 4. — P. 449–459.
  25. *Ghahary A., Tredget E.E., Shen Q.* Insulin-like growth factor-II/mannose 6 phosphate receptors facilitate the matrix effects of latent transforming growth factor-beta1 released from genetically modified keratinocytes in a fibroblast/keratinocyte co-culture system // J. Cell Physiol. — 1999. — **180**, № 1. — P. 61–70.
  26. *Bitar M.S., Pilcher C.W., Khan I., Waldbillig R.J.* Diabetes-induced suppression of IGF-1 and its receptor mRNA levels in rat superior cervical ganglia // Diabetes Res. Clin. Pract. — 1997. — **38**, № 2. — P. 73–80.
  27. *Nakao-Hayashi J., Ito H., Kanayasu T. et al.* Stimulatory effects of insulin and insulin-like growth factor I on migration and tube formation by vascular endothelial cells // Atherosclerosis. — 1992. — **92**, № 2/3. — P. 141–149.
  28. *Nicosia R.F., Nicosia S.V., Smith M.* Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro // Amer. J. Pathol. — 1994. — **145**, № 5. — P. 1023–1029.
  29. *Frystyk J., Ledet T., Moller N. et al.* Cardiovascular disease and insulin-like growth factor I // Circulation. — 2002. — **106**. — P. 893–895.
  30. *Sunderkotter C., Steinbrink K., Goebeler M. et al.* Macrophages and angiogenesis // J. Leukoc. Biol. — 1994. — **55**, № 3. — P. 410–422.
  31. *Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis // Amer. J. Pathol. — 1995. — **146**, № 5. — P. 1029–1039.
  32. *Werner S., Grose R.* Regulation of wound healing by growth factors and cytokines // Physiol. Rev. — 2003. — **83**, № 3. — P. 835–870.
  33. *Gosain A., DiPietro L.A.* Aging and wound healing // World J. Surg. — 2004. — **28**, № 3. — P. 321–326.
  34. *Campos A.C., Groth A.K., Branco A.B.* Assessment and nutritional aspects of wound healing // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. — 2008. — **11**. — P. 281–288.

Надійшла 02.08.13