

ЗАЖИВЛЕНИЕ РАН И ИХ КРОВΟΣНАБЖЕНИЕ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ПРИ БЛОКАДЕ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ И КОНСТИТУТИВНОЙ NO-СИНТАЗ

А. А. Слиецанс, Е. М. Ломкина, И. Н. Тюренков

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей,
лаборатория фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии*

В работе показана роль NO-системы в механизмах ранозаживления при сахарном диабете. Блокада эндотелиальной синтазы оксида азота — eNOs (с помощью L-NAME) при сахарном диабете способствует снижению локального кровотока в ране и удлинению времени заживления раны. Блокада индуцибельной синтазы оксида азота — iNOs (аминогуанидин) способствует ускорению репарации ран.

Ключевые слова: сахарный диабет, раны, оксид азота, аминогуанидин, N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME).

WOUND HEALING AND BLOOD FLOW IN RATS WITH DIABETES DURING BLOCKADE OF INDUCIBLE AND CONSTITUTIVE NO-SYNTHASE

A. A. Slietsans, E. M. Lomkina, I. N. Tyurenkov

The article shows the role of NO-system in the mechanisms of wound healing in diabetes. Blockade of endothelial nitric oxide synthase — eNOs (with L-NAME) in diabetes reduces local blood flow in the wound, and slows down wound healing. The blockade of inducible nitric oxide synthase — iNOs (aminoguanidine) accelerates wound repair.

Key words: diabetes, wounds, nitric oxide, aminoguanidine, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние NO-системы на показатели микроциркуляции и динамику заживления ран при сахарном диабете.

Актуальность вопроса репарации ран в настоящее время несомненна [2]. Данные литературы свидетельствуют о высокой роли NO-системы в патогенезе диабетических ран [6]. Так, оксид азота, образующийся под влиянием конститутивной эндотелиальной NO-синтазы, обладает вазодилатирующими свойствами и снижает повышенную агрегацию тромбоцитов за счет подавления действия вазоконстрикторов (тромбоксана A₂, серотонина и др.), то есть действует в качестве ингибирующего фактора, регулирует тромбообразование и адгезию тромбоцитов к поверхности сосудов [10], что способствует улучшению кровоснабжения в ране. Нарушения в работе NO-системы, а также блокада eNOs вызывают снижение показателей микроциркуляции в поврежденной области [3].

Оксид азота, продуцируемый под влиянием iNOs, с одной стороны, действует как специфическая эффекторная молекула, находясь в макрофагах, обеспечивая антимикробный эффект [9]. С другой стороны такой оксид азота, превращаясь в пероксинитрит, участвует в деструкции б-клеток поджелудочной железы, нарушается секреция инсулина, в первую очередь за счет активации транскрипционных факторов (NF-kb), и гиперпродукции свободных радикалов [5]. Блокатор iNOs — аминогуанидин уменьшает тяжесть протекания воспалительной реакции не только при сахарном диабете [4], но и на моделях животных при септичес-

ком шоке, повышает выживаемость при введении эндотоксинов.

Задачей настоящего исследования являлось изучение блокады роли NO-системы в течении репаративных процессов кожных ран при сахарном диабете в условиях раздельной блокады эндотелиальной (eNOs) и индуцибельной (iNOs) синтаз оксида азота.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 90 крысах-самцах Wistar, полученных из питомника лабораторных животных «Столовая» РАМН, (Московская обл.). Животные содержались в стандартных условиях вивария, согласно правилам GLP при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96), Международным рекомендациям по защите позвоночных животных (1997).

Животные были разделены на следующие группы: Рана — группа животных с моделированными ранами, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме; Рана + L-NAME, Рана+аминогуанидин — группы животных с плоскостными ранами, которым вводили L-NAME, аминогуанидин; Рана + СД — группа крыс с экспериментальным сахарным диабетом и моделированными ранами, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме; Рана + СД + L-NAME, Рана + СД + аминогуанидин — группы крыс с экспериментальным сахарным диабетом и моделированными ранами, которым вводили L-NAME, аминогуанидин. Сахарный диабет вызывался введением стрептозотоцина (45 мг/кг, однократно, в/в). Че-

рез 72 ч производили количественное определение глюкозы в крови глюкозооксидазным методом на спектрофотометре (ПЭ-5400В, ЭКРОС). В дальнейшее исследование отбирали животных с уровнем глюкозы крови 12 ммоль/л и выше.

После подтверждения развития сахарного диабета моделировались плоскостные раны у наркотизированных животных на предварительно дэпигированной коже спины, в межлопаточной области по специальному трафарету, скальпелем путем иссечения кожи размером 20 x 30 мм [600 мм² по методике Слуцкого Л. И. (1969)]. В работе были использованы блокатор эндотелиальной NOs: N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME), в дозе 25 мг/кг; блокатор индуцибельной NOs амингуанидин, в дозе 50 мг/кг, которые вводились в течение 14 дней внутривенно.

Площадь раны измеряли «весовым методом», который заключался в следующем. Заранее на торсионных весах определялся вес 1 см² кальки. Для измерения площади раны на последнюю накладывали отмытую рентгеновскую пленку и на ее обратной стороне обводили фломастером контуры раны. Полученный рисунок переносили на кальку, а затем вырезали «контур раны» и взвешивали. Полученный вес делили на вес 1 см² кальки. На 3, 7, 14, 21 сут. производили измерение площади раны и вычисляли процент уменьшения величины раны за каждые 7 сут.

Уровень кровотока в ране регистрировали с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 (рабочая частота 25 МГц, диаметром 0,3 см) и компьютерной программы MM-D-KMinimax Doppler v.1.7. (Санкт-Петербург, Россия) в области раневой поверхности [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После моделирования ран в течение первых трех суток эксперимента наблюдалось быстрое сокращение

раневой поверхности, не вследствие репарации, а в большей мере по причине контракции краев раны, и статистически значимых различий между всеми группами в этот обнаружено не было.

В последующие дни, в большей степени скорость сокращения ран наблюдалась в группе, получавшей блокатор iNOs — амингуанидин, затем в группе с ранами, получавшими физиологический раствор, в меньшей степени в группе Рана + L-NAME по сравнению с исходом 3-х сут. (табл.).

Анализируя данные, полученные при исследовании групп животных с сахарным диабетом, было выявлено существенное снижение скорости заживления ран. Так, в группе животных с экспериментальным СД, в которой не применялись блокаторы синтеза оксида азота, раневая поверхность сократилась на 89 % на 21-е сутки по сравнению с исходом данной группы. Блокада eNOs с помощью L-NAME приводила к значительному замедлению заживления ран, так практически не наблюдалось сокращения поверхности ран на 7-е сутки (только на 1,89 %), на 21-е сутки площадь сократилась только на 70 %. Более высокая скорость ранозаживления прослеживалась у группы животных с сахарным диабетом, получавшей амингуанидин, на 14-е сутки площадь ран была на 52 %, а на 21-е сутки — на 86 % меньше, что свидетельствует о том, что блокада iNOs ускоряет заживление ран, а блокада eNOs замедляет этот процесс как у интактных животных, так и у животных с экспериментальным СД (табл.).

Можно предположить, что разная скорость заживления в представленных группах обусловлена блокадой eNOs и, соответственно, уменьшением вазодилатации и ухудшением микроциркуляции в тканях, прилежащих к ране.

При проведении доплерографического исследования на животных с ранами были получены данные,

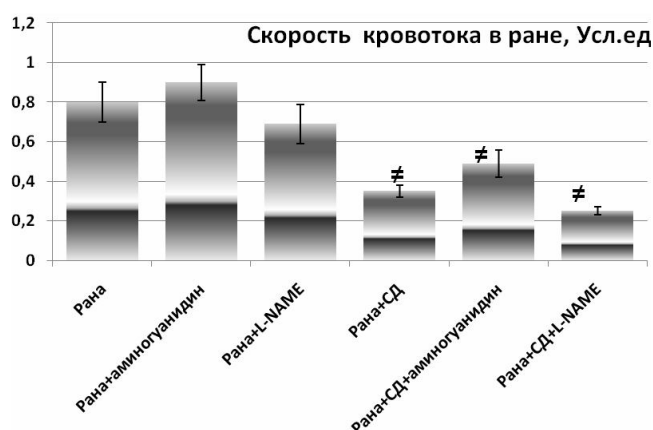
Влияние блокады эндотелиальной и индуцибельной NOs на течение заживления ран у животных с ранами на фоне СД и без СД

Группы животных	Динамика заживления ран, ($M \pm m$), в мм ² и %			
	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Рана	281,07 ± 11,89	220,34 ± 12,20 -21,6 %	98,12 ± 1,10 -65,09 %	18,4 ± 7,8 -93,45 %
Рана + Амингуанидин	280,90 ± 13,56	201,3 ± 13,4 -28,33 %	73,34 ± 12,10 -73,89 %	11,2 ± 6,4 -96,01 %
Рана + L-NAME	278,67 ± 6,78	236,23 ± 10,20 -15,22 %	114,23 ± 10,90 -59,0 %	28,70 ± 3,23 -89,7 %
Рана + СД	270,7 ± 15,6	240,6 ± 13,2 -11,1 %	150,4 ± 11,1* -44,4 %	53,3 ± 7,9** -80,3 %
Рана + СД + Амингуанидин	301,2 ± 17,8	234,1 ± 3,7 -22,2 %	145,2 ± 12,3* -51,7 %	40,4 ± 6,5** -86,5 %
Рана + СД + L-NAME	283,56 ± 13,46	278,2 ± 5,6* -1,89 %	198,2 ± 13,2** -32,2 %	81,6 ± 3,4** -71,2 %

Примечание. Рана + СД — группа животных с экспериментальным сахарным диабетом и моделированными ранами на фоне введения блокаторов NO-синтаз; Рана — группа животных с моделированными ранами на фоне введения блокаторов NO-синтаз.

*, ** Достоверно по отношению к группе Рана, Рана + Амингуанидин, Рана + L-NAME ($P \leq 0,05$); ($P \leq 0,01$); достоверность оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни.

свидетельствующие о влиянии вводимых блокаторов (индуцибельной и конститутивной синтаз) на скорость кровотока в ране. В группе Рана + амингуанидин скорость кровотока была на 12,5 % выше, а в группе Рана + L-NAME на 13,75 % ниже, чем в группе Рана без применения блокаторов. В группах с сахарным диабетом наблюдалась аналогичная динамика: скорость кровотока в ране была меньше в группе Рана + СД на 56,12 %, в группе Рана + СД + Амингуанидин на 45,6 %, в группе Рана + СД + L-NAME на 73,76 %, чем скорость кровотока в соответствующих контрольных группах без сахарного диабета (Рана, Рана + амингуанидин, Рана + L-NAME соответственно) (рис.).



Рана + СД — группа животных с экспериментальным сахарным диабетом и моделированными ранами на фоне введения блокаторов NO-синтаз; Рана — группа животных с моделированными ранами на фоне введения блокаторов NO-синтаз.

*, **Достоверно по отношению к группе Рана, Рана + Амингуанидин, Рана + L-NAME ($P \leq 0,05$); ($P \leq 0,01$); достоверность оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни.

Рис. Скорость кровотока в ране

Полученные нами экспериментальные данные о влиянии NO на скорость локальной микроциркуляции в ране согласуются с данными ряда авторов [7, 8]. Известно, что у больных сахарным диабетом и инсулинорезистентностью есть нарушения в функционировании NO-системы, соответственно снижена эндотелий-зависимая вазодилатация. По мнению авторов, это может быть обусловлено уменьшением чувствительности эндотелия к инсулину, подавляющим влиянием свободных жирных кислот, свободных радикалов, гликированных продуктов на активность eNOs [8]. В результате этого при сахарном диабете наблюдается нарушение тканевого кровообращения в участке поражения, ведущее к ацидозу, гипоксии, метаболической интоксикации в ране [1]. Соответственно при блокаде eNOs и снижении синтеза и выделения оксида азота эндотелиального происхождения, ответственного в норме за обеспечение локальной вазодилатации и антитромботического действия, наблю-

дается снижение уровня кровотока в ране, а также скорости сокращения раневой поверхности, соответственно наблюдается удлинение времени и отрицательная динамика ранозаживления [10].

Полученные нами данные о более высоких показателях локального кровотока в ране, а также скорости сокращения раневой поверхности под влиянием амингуанидина, возможно, связаны с меньшей тяжестью развившегося сахарного диабета, что обусловлено блокадой iNO-синтазы и соответственно блокадой гиперпродукции пероксинитрита, очевидно оказывающего цитотоксическое действие на стенки сосудистого эндотелия и усугубляющего воспалительный процесс в ране.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные могут способствовать пониманию роли NO-системы в патогенезе раневого процесса у больных сахарным диабетом. Рассмотренная экспериментальная модель диабетических ран с использованием специфических блокаторов синтаз оксида азота позволяет изучать в дальнейшем на ее основе перспективные соединения, использующиеся для лечения ран при сахарном диабете по механизму модулирующего влияния на NO-систему.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прошин А. В. // Вестн. Новг. гос. ун-та. Сер.: Медицинские науки. — 2010. — № 59. — С. 63—66.
2. Спасов А. А., Сысеев Б. Б., Митрофанова И. Ю. и др. // Вестник ВолГМУ. — 2012. — Т. 3, № 43. — С. 18—20.
3. Тюренков И. Н., Воронков А. В., Петрова Е. В. и др. — 2011. — Т. 10, № 4. — С. 87—90.
4. Austin J. C. // The J. Urol. — 2004. — Vol. 171. — P. 1948.
5. Estrada C., Gomez C., Martin C., Moncada S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1992. — Vol. 186 (1). — P. 475—482.
6. Isenberg J. S., Ridnour L. A., Espey M. G., et al. // Microsurgery. — 2005. — Vol. 25 (5). — P. 442—451.
7. Jamshidzadeh A., Azarpira N. // Journal of Pharmaceutical Sciences. — 2011. — Vol. 7 (1). — P. 43—48.
8. Masha S. Dinatale, S. Allasia, et al. // Curr. Pharm. Biotechnol. — 2011 — Vol. 12 (9) — P. 1354—1363.
9. Nussler A. K., Billiar T. R. // Br. J. Chem. — 2003. — Vol. 54. — P. 171—178.
10. Radomski W. W., Palmer R. M. J., Moncada S. // Br. J. Pharmacol. — 2007. — Vol. 92. — P. 639—646.

Контактная информация

Слиеца́нс Анна Альбертовна — к. фарм. н., научный сотрудник лаборатории сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: anna_slietsans@list.ru