
МОРФОЛОГИЯ

A. В. Смирнов, Н. Г. Паньшин, А. А. Слиецанс, Е. М. Ломкина

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и биофармации ФУВ,
кафедра патологической анатомии,
ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

РОЛЬ NO-СИСТЕМЫ В МОРФОГЕНЕЗЕ ЗАЖИВЛЕНИЯ КОЖНЫХ РАН ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

УДК 661.98+616.379-008.64-092.4:616-001.4-003.9

Проанализирована морфология раневого процесса у крыс с сахарным диабетом и моделированными плоскостными ранами на фоне блокады NO-системы. Показано влияние блокады конститутивной и индуцибельной NO-синтаз на морфогенез раневого процесса. (В чем это выразилось?) Определена роль NO-системы в механизмах заживления ран у крыс при экспериментальном сахарном диабете.

Ключевые слова: сахарный диабет, раны, оксид азота, аминоганидин, L-NAME.

A. V. Smirnov, N. G. Panshin, A. A. Slietsans, E. V. Lomkina

THE ROLE OF THE NO-SYSTEM IN THE MORPHOGENESIS OF SKIN WOUND HEALING IN DIABETES MELLITUS

The morphology of wound healing in rats with diabetes mellitus and simulated wounds induced by NO-system blockade was analyzed. The study demonstrated the effects of the blockade of constitutive and inducible NO-synthases on the histomorphological features of wound healing process. The role of NO-system in mechanisms of wound healing processes in rats with experimental diabetes was identified.

Key words: diabetes, wounds, nitric oxide, aminoguanidine, L-NAME.

Оксид азота играет ключевую роль в процессе заживления ран [7, 8]. Известны положительные эффекты на данный процесс не только эндогенного оксида азота, но и экзогенного (NO-содержащие газовые потоки [11], аппликация NO-доноров на область поражения – NO-высвобождающие полимеры, такие как поли-этил-энеимин-целлюлозо-NONO полимеры и поли-гидро-гели [6, 12]).

Оксид азота выполняет регулируемую роль во всех фазах раневого процесса [5, 8]. В стадии воспаления оксид азота регулирует процессы воспаления, иммуномодуляции и оксидации. Во время репарации влияет на процессы дифференциации фибробластов [5], коллагеновый синтез [4], повышает васкуляризацию тканей [5, 6], что, в свою очередь, ускоряет завершающую стадию эпителизации. Ряд авторов считает, что во всех этих фазах в области локализации раны клетки продуцируют NO, и эти процессы NO-зависимы [5, 7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

В настоящем исследовании показать роль NO-системы в процессе заживления ран крыс с сахарным диабетом путем блокады индуцибельной и эндотелиальной NOs.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 90 крысах-самцах Wistar, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» РАМН, (Московская обл.). Животные содержались в стандартных условиях вивария, согласно правилам GLP при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.396 и 51000.4-96), Международным рекомендациям по защите позвоночных животных (1997).

Животные были разделены на следующие группы: Рана – группа животных с моделированными ранами, которой вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме; Рана +

L-NAME, Рана + амингуанидин – группы животных с моделированными ранами, которым вводили L-NAME, амингуанидин; Рана + СД – группы крыс с экспериментальным сахарным диабетом и моделированными ранами, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме; Рана + СД + L-NAME, Рана + СД + амингуанидин – группы крыс с экспериментальным сахарным диабетом и моделированными ранами, которым вводили L-NAME, амингуанидин. Сахарный диабет вызывался введением стрептозотоцина (45 мг/кг, однократно, в/в). Через 72 часа производили количественное определение глюкозы в крови глюкозооксидазным методом на спектрофотометре (ПЭ-5400В, ЭКРОС). В дальнейший эксперимент отбирали животных с уровнем глюкозы крови 12 ммоль/л и выше.

После подтверждения развития сахарного диабета моделировались плоскостные раны у наркотизированных животных на предварительно депилированной коже спины, в межлопаточной области по специальному трафарету, скальпелем, путем иссечения кожи размером 20 × 30 мм [600 мм² по методике Л. И. Слуцкого (1969)]. В работе были использованы блокаторы NOs: N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) фирмы SIGMA-ALDRICH (блокатор eNOs), в дозе 25 мг/кг, амингуанидин фирмы SIGMA-ALDRICH (блокатор iNOs), в дозе 50 мг/кг, которые вводились в течение 14 дней внутрибрюшинно с целью заблокировать синтез, и выделение эндогенного оксида азота.

Для морфологических исследований проводили забор материала на 7-, 14-, 21-е сутки (фрагменты кожи и подлежащих тканей), фиксировали 10%-м раствором нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) в течение 24 часов, с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов и изготовлением парафиновых блоков [7]. На ротормном микротоме изготавливали срезы толщиной 5–6 мкм. В дальнейшем для выявления общепатологических процессов производили окрашивание гематоксилином и эозином по общепринятой гистологической методике.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате морфологического исследования препаратов кожных ран крыс группы животных с моделированными ранами в исходном состоянии было обнаружено наличие линейной раневой поверхности кожи с некротизированными тканями, выраженный фиброзно-гнойный экссудат, состоящий из непрофильных лейкоцитов. В краях раны определяется непрофильная инфильтрация лейкоцитами. В дерме и подкожной жировой клетчатке определялась выраженная полиморфно-клеточная инфильтрация.

В группе крыс без сахарного диабета на 7-е сутки не было обнаружено значимых изменений раневой поверхности по сравнению

с исходным состоянием. Незначительно уменьшилась зона некроза. В дне раны определялись полнокровные сосуды, очаговые кровоизлияния. В краях раны обнаруживалась грануляционная ткань с фибробластами и гастоцитами. В эпидермисе отмечалась начинающаяся эпителизация. На 14-е сутки в данной группе не обнаружено выраженных признаков некроза, дистрофических изменений и экссудативного воспаления. Отмечалось незначительное разрастание грануляционной ткани с образованием новых кровеносных сосудов, коллагеновых волокон, а также почти полная эпителизация поверхности грануляционной ткани. На 21-е сутки полностью отсутствовали признаки некроза и воспаления. Обнаруживалась полная эпителизация раневой поверхности, образование волосных фолликулов и формирование мышечных трубочек в скелетной мышечной ткани.

У крыс без сахарного диабета, принимавших L-NAME, на 7-е сутки зона некроза оставалась прежней. Отмечалась более выраженная непрофильная инфильтрация лейкоцитами по сравнению с интактной группой. На 14-е сутки по сравнению с интактной группой оставались признаки некроза и экссудативного воспаления. Было менее выражено появление грануляционной ткани. На 21-е сутки раневая поверхность почти полностью покрылась толстым гипертрофированным эпидермисом, но без формирования волосных фолликулов и желез, отмечалась меньшая интенсивность фиброза.

У крыс без сахарного диабета, принимавших амингуанидин, на 7-е сутки морфологические изменения почти полностью соответствовали интактной группе. Однако в эпидермисе определялись хорошо выраженные участки разрастания и регенерации эпителия по краям раны, т. е. более выраженные процессы эпителизации по сравнению с группой животных, получавших L-NAME. На 14-е сутки в данной группе признаки некроза и экссудативного воспаления полностью отсутствовали. Отмечалось менее выраженное разрастание грануляционной ткани и активность ангиогенеза по сравнению с интактной группой. На 21-е сутки было обнаружено, что раневая поверхность кожи была полностью покрыта эпидермисом, отмечалось образование новых волосных фолликулов. Образовывалась фиброзная соединительная ткань с большим количеством фибробластов и гистиоцитов.

В группе животных с индуцированным сахарным диабетом на 7-е сутки обнаруживалась раневая поверхность с умеренно выраженным некрозом в виде детрита и струпа. Определялся выраженный гнойный экссудат, состоящий из непрофильных лейкоцитов. Формировалось незначительное количество грануляционной ткани, фибробластов и гистиоцитов. Отмечалось незначительное образование эпителиальных клеток на краях раны. На 14-е сутки

в данной группе животных уменьшалась выраженность некроза лейкоцитарной инфильтрации. В грануляционной ткани увеличивалось количество фибробластов и гистиоцитов. К 21-м суткам раневая поверхность с некротическими изменениями и воспалительной инфильтрацией сохранялась. Количество фибробластов оставалось на прежнем уровне. Отмечалось образование коллагеновых волокон и волосяных фолликулов.

У крыс с сахарным диабетом, принимавших L-NAME, на 7-е сутки обнаруживалась раневая поверхность с выраженным некрозом и лейкоцитарной инфильтрацией. Отмечалось формирование грануляционной ткани. Появлялись участки разрастания и регенерации эпителия по краям раны, однако менее выраженное по сравнению с интактной группой. На 14-е сутки у животных сохранялась раневая поверхность с некрозом и лейкоцитарной инфильтрацией. Количество грануляций оставалось прежним. Незначительно увеличилась по объему эпителизация краев раны. На 21-е сутки обнаружено наличие раневой поверхности кожи в виде струпа, под которым имеется небольшое количество воспалительного экссудата и небольшая зона некротизированной ткани. Отмечалось резкое увеличение объема грануляционной ткани по сравнению с диабетическими животными, не принимавших препараты. Обнаруживалось появление коллагеновых волокон. У некоторых животных появлялось умеренное венозное полнокровие и очаговые кровоизлияния в дерме.

У крыс с сахарным диабетом, принимавших аминоксидин, на 7-е сутки был менее выражен некроз и лейкоцитарная инфильтрация на раневой поверхности по сравнению с диабетическими животными, принимавших L-NAME. Отмечалось формирование грануляционной ткани с фибробластами и гистиоцитами. По краям раны определялись разрастания эпителиальных клеток, но менее выраженное по сравнению с интактной группой. На 14-е сутки у животных сохранялась раневая поверхность с небольшими участками некротизированных тканей в виде детрита. Грануляционная ткань хорошо выражена со значительным количеством фибробластов и гистиоцитов. Воспаление практически отсутствует. В эпидермисе имеются участки разрастания и регенерации эпителия по краям раны, а также усиленный ангиогенез. На 21-е сутки у животных сохранялась небольшая раневая поверхность с наличием серозного экссудата. Воспаление практически отсутствовало. Отмечалось резкое увеличение объема грануляционной ткани по сравнению с диабетическими животными, не принимавших препараты. В большей степени были выражены процессы эпителизации раны и формирование коллагеновых волокон по сравнению с группой диабетических животных, принимавших L-NAME.

Сахарный диабет замедляет заживление ран, которые приобретают длительный, рецидивирующий характер [2]. Кроме того, наблюдается значительное замедление и нарушение созревания грануляционной ткани, ее нагноение, снижение численной плотности сосудов. По литературным данным при изучении заживления ран у лабораторных животных с диабетом обнаружено снижение числа полиморфноядерных лейкоцитов, увеличение отека, снижение количества фибробластов, коллагенового синтеза, прочности ран, а также уменьшение образования грануляционной ткани [1, 2]. Анализ проведенных нами морфологических исследований также свидетельствует о снижении скорости репарации ран в группе с сахарным диабетом. Полученные нами результаты о процессе заживления ран при сахарном диабете согласуются с данными многих авторов. Данные процессы объяснимы метаболическими и обменными нарушениями, сопровождаемыми сахарный диабет, снижением тканевого кровообращения, развитием местной гипоксии, ацидоза тканей, микробной контаминации [2, 13].

В свою очередь, система оксида азота играет важную роль в процессе репарации ран [6, 7, 8]. Так, в своих исследованиях мы наблюдали более медленное заживление ран у групп, получавших блокатор eNOs L-NAME. Возможно, это объяснимо тем, что NO эндотелиального происхождения в норме обеспечивает адекватную вазодилатацию сосудов [9], обладает антиагрегационным действием [15] и вследствие этого улучшает микроциркуляцию и трофику тканей в ране и прилегающей области. Положительная роль NO, продуцируемого eNOs, на процессы ранозаживления может быть также связана с его функциональным влиянием на активацию ангиогенеза, модуляцию цитокинового каскада, клеточную пролиферацию [5]. NO действует как хемотаксический фактор на фибробласты и активирует фиброплазию, проявляет антимикробную активность за счет активации фагоцитоза, тормозит развитие радикальных окислительных реакций в первой фазе ранозаживления [5, 17]. В фазе пролиферации NO принимает участие в синтезе и сборке молекул коллагена [4].

При регенерации соединительной ткани основными клетками, обеспечивающими создание структурной основы для формирования тканей, являются фибробласты. Зрелые фибробласты – самые активные в функциональном отношении, выполняют регуляторную, синтетическую функции при remodelировании тканей [1]. NO стимулирует миграцию фибробластов и макрофагов, повышает васкуляризацию, коллагеновую регенерацию и эпителизацию [5]. Таким образом, блокада eNOs L-NAME вызывает более выраженные патологические процессы в ране, длительную репарацию и отрицательную динамику ранозаживления.

Известна роль активации индуцибельной iNOs в процессе заживления ран [16]. Оксид азота, продуцируемый в большом количестве при наличии воспалительного процесса, в том числе и при наличии диабетических ран, связываясь со свободными радикалами кислорода, превращается в цитотоксичный пероксинитрит (ONOO⁻). Пероксинитрит анион (ONOO⁻) подавляет активность митохондриальных ферментов, вызывает повреждение клеточных и других белков (ДНК, РНК др.) и вызывает энергетическую дестабилизацию, мутации и гибель клетки. Следствием таких модификаций является ингибирование ферментов дыхательной цепи, цикла Кребса, синтеза ДНК, усиление окислительного стресса и окисления липидов [10, 14], что приводит к еще более выраженным сосудистым нарушениям и ухудшает заживление диабетических ран. Аминогуанидин является блокатором NOs, в большей степени индуцибельной изоформы ферменты (iNOs). На различных экспериментальных моделях на животных аминогуанидин уменьшает тяжесть протекания болезни при развитии воспаления, септическом шоке, повышает выживаемость при введении эндотоксинов [16]. При блокаде iNOs снижается интенсивность продукции пероксинитрита, оказываемого цитотоксическое действие. Соответственно, в наших исследованиях мы наблюдали не только укорочение времени репарации кожных ран, но и более положительную динамику ранозаживления в группах животных, получавших аминогуанидин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сахарный диабет сопровождается удлинением времени репарации кожных ран, снижением скорости ранозаживления по сравнению с группой животных без экспериментального сахарного диабета.

Блокатор eNOs L-NAME вызывает утяжеление процесса репарации кожных ран крыс с сахарным диабетом, наличие интенсивных признаков повреждения кожи и имеющих патологических процессов, которые носят более

выраженный характер по сравнению с группой контроля с сахарным диабетом.

Применение аминогуанидина (блокатора iNOs) в группе животных с сахарным диабетом приводило к появлению более ранних сроков репаративных процессов, более положительной динамике ранозаживления по сравнению с группой с сахарным диабетом без применения блокаторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Н. Т., Глухов А. Л., Остроушко А. П. // Вестник эксперим. и клинич. хирургии. – 2012. – Т. V, № 3. – С. 601–608.
2. Прошин А. В. // Вестник Новг. гос. ун-та. Сер.: Медицинские науки. – 2010. – № 59. – С. 63–66.
3. Саркисов Д. С., Перов Ю. Я. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
4. Abramson S. B. // J. Arthritis Res. – 2008. – Vol. 10. – P. 159–172.
5. Akram Jamshidzadeh, Near Azarpira // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2011. – № 7 (1). – P. 43–48.
6. Amadeu T. P., Amedea B. S., Deoliveira M. G. // J. Surg. Res. – 2007. – Vol. 10. – P. 5.
7. Bernatchez S. F., Menon V., Stoffel J., et al. // Wound Repair Regen. – 2013. – Vol. 21 (3). – P. 410–417.
8. Boykin J. V. // J. Wound Ostomy Continence Nurs. – 2010. – Vol. 37 (1). – P. 25–34.
9. Cacanyiova S., Dovinova I., Kristek F. // Physiol Pharmacol. – 2013. – Vol. 64. – P. 241–247.
10. Fermor B., Gurumurthy A., Diekman B. O. // Osteoarthritis Cartilage. – 2010. – Vol. 18. – P. 1167–1173.
11. Ferrari C. K., Eduardo Luzia Franca E. L., Honorio-Franca A. C. // J. Applied Biomedicine. – 2009. – Vol. 7. – P. 163–173.
12. Jen M. C., Serrano M. C., Lith R., et al. // Advanced Functional Materials. – 2012. – Vol. 22. – P. 239–260.
13. Masha, S. Dinatale, S. Allasia, V. Martin. // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2011. – Vol. 12 (9). – P. 1354–1363.
14. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. // Physiol. Rev. – 2009. – Vol. 87. – P. 315–324.
15. Radomski W. W., Palmer R. M. J., Moncada S. // Br. J. Pharmacol. – 2009. – Vol. 92. – P. 639–646.
16. Rigamonti E., Touvier T., Clementi E., et al. // The J. Immunol. – 2013. – Vol. 190 (4). – P. 1767–1777.
17. Weller R. B. // J. Invest. Dermatol. – 2009. – Vol. 129 (10). – P. 2335–2337.