

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Игрункова Александра Валерьевна

**Морфологическое обоснование эффективности воздействия NO-
содержащих газовых потоков и донора оксида азота ДНКЖ для
стимуляции раневого заживления**

14.03.02 - Патологическая анатомия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Шехтер Анатолий Борухович

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Оксид азота. Особенности синтеза в организме	14
1.2. Роль оксида азота в физиологии и использование в клинике:	15
механизмы регуляции на молекулярном и клеточном уровнях	15
1.2.1. Сердечно-сосудистая система.....	15
1.2.2. Дыхательная система.....	17
1.2.3. Почечная функция.....	20
1.2.4. Метаболизм.....	21
1.2.5. Мышцы.....	22
1.2.6. Нервная система	23
1.2.7. Желудочно-кишечный тракт.....	24
1.2.8. Онкология	25
1.3. NO и раневое заживление	27
1.3.1. Основные сведения о раневом заживлении	27
1.3.2. Роль NO в раневом процессе	29
1.4. Способы увеличения содержания оксида азота в биологических системах.....	35
1.4.1. Холодная плазма	35
1.4.2. Горячая плазма (аппарат Плазон)	37
1.5. Применение аппарата Плазон в терапии ран	41
1.5.1. Использование аппарата Плазон для лечения ран.....	41
1.5.2. Применение аппарата Плазон при лечении трофических язв и диабетической стопы.....	43
1.5.3. Использование аппарата Плазон у пациентов с термическими и химическими ожогами.....	44
1.5.4. NO-терапия рубцов аппаратом Плазон.....	45
1.6. Доноры оксида азота.....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
2.1. NO-содержащий газовый поток.....	52
2.2. Спреи с ДНКЖ.....	53
2.3. Особенности эксперимента на животных	55
2.3.1. Дизайн эксперимента.....	55

2.3.2. Моделирование сахарного диабета раствором стрептозотоцина	59
2.3.3. Оценка раневого заживления.....	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	65
3.1. Результаты пилотного эксперимента по определению наиболее эффективной дозы NO-СГП для стимуляции раневого заживления.....	65
3.1.1. Параметры NO-содержащего газового потока	65
3.1.2. Определение наиболее эффективных параметров NO-СГП для стимуляции раневого заживления	67
3.2. Результаты пилотного эксперимента по определению наиболее эффективной дозы аэрозоля с ДНКЖ для стимуляции раневого заживления ...	71
3.2.1. Характеристика спрея с ДНКЖ.....	71
3.2.2. Определение наиболее эффективной дозы ДНКЖ в спрее для стимуляции раневого заживления	72
3.3. Основной (долгосрочный) эксперимент по определению наиболее эффективного способа доставки оксида азота для стимуляции раневого заживления в условиях нормогликемии	77
3.4. Стимуляция раневого заживления в условиях стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета	108
ОБСУЖДЕНИЕ	135
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
ВЫВОДЫ	147
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	151

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Неэффективное лечение ран может приводить к сепсису, ампутации конечностей, развитию тяжелых рубцовых осложнений и даже смерти пациента. При этом в мире растет заболеваемость сахарным диабетом и другими заболеваниями, сопровождающимися вторичным иммунодефицитом, что актуализирует проблему хронических раневых процессов. В Соединенных Штатах Америки в 2009 году от хронических ран и язв пострадало 6,5 миллиона человек, что нанесло экономический урон в 25 миллиардов долларов [1].

Оксид азота (NO) – газовая молекула, которая образуется в организме при окислении терминального остатка гуанидина L-аргинина при участии NO-синтаз. Она обладает множеством функций, определяющих и регулирующих физиологические и патофизиологические процессы в живых организмах [2, 3].

В многочисленных исследованиях было показано, что при заживлении кожно-мышечных ран концентрация NO нарастает в первые часы после повреждения и достигает пика на 2 сутки [4, 5]. В фазу альтерации оксид азота участвует в образовании умеренного количества пероксинитрита, который оказывает выраженное бактерицидное действие, способствует снижению pH и привлечению в рану иммунных клеток [6]. При достижении физиологических концентраций NO, снижается экспрессия провоспалительных белков [2]. Посредством последовательной активации и ингибирования различных цитокинов (TGF- β 1, VEGF) и сигнальных путей (MAPK, цГМФ) в фазу пролиферации оксид азота регулирует ангиогенез и активность фибробластов в гранулирующей ране [7-9]. Достаточная концентрация оксида азота способствует синтезу коллагена, регуляции апоптоза при ремоделировании грануляционно-фиброзной ткани, пролиферации кератиноцитов [10, 11]. Снижение концентраций оксида азота приводит к нарушению описанных механизмов и замедлению заживления ран, поэтому применение экзогенного NO является перспективным и активно изучаемым направлением терапии раневых процессов [5, 12, 13].

В многочисленных работах было продемонстрировано, что в экссудате ран больных сахарным диабетом уровень NO значительно ниже, чем у пациентов с нормальным уровнем глюкозы крови [5, 14]. При гипергликемии нарушается хемотаксис и функциональная активность макрофагов, замедляется пролиферация и дифференцировка кератиноцитов. Снижение синтетической активности фибробластов проявляется низкой продуцирующей способностью коллагена и формированием дефективного внеклеточного матрикса, который характеризуется слабой устойчивостью к внешним повреждениям [5, 14, 15].

В настоящее время в медицине выделяется отдельное направление – NO-терапия, в которой используются плазменные аппараты, генерирующие NO: kINPen® MED (INP Greifswald/neoplas tools GmbH, Грайфсвальд, Германия), APPJ и PlasmaDerm® VU-2010 (CINOGY Technologies GmbH, Duderstadt, Германия), PlasmaCare® - Terraplasma Medical, Гархинг, Германия) SteriPlas (Adtec Ltd., Лондон, Великобритания), PlasmaJet® («Plasma Surgical Ltd.», США) для стимуляции регенерации [13, 16, 17]. Первым и наиболее изученным для воздействия на ткани является российский аппарат Плазон (ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана», Москва, Россия), который генерирует высокие концентрации оксида азота из атмосферного воздуха (до 5000 ppm) [18, 19]. Все аппараты обладают различными техническими характеристиками и параметрами воздействия, при том, что оптимальные параметры NO-терапии раневых процессов плазменными потоками не определены.

Также активно изучается возможность применения в клинике доноров NO, однако на сегодняшний день ни один из них не был зарегистрирован в качестве лекарственного средства для стимуляции заживления ран.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время существует 3 способа коррекции уровня NO в организме:

1) воздействие газовым потоком (производным плазмы), содержащим NO [20-23],

2) применение фармацевтических доноров оксида азота или модуляторов активности NO-синтаз [24-27].

3) использование физических индукторов эндогенного синтеза [28-30],

Физическим индуктором оксида азота является терагерцовое излучение на частоте 150,176-150,664 ГГц [30]. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о возможности использования данного вида излучения для коррекции нарушений газового и электролитного состава крови, коагуляционных нарушений при различных заболеваниях [28, 30, 31]. Однако данное направление изучается узким кругом специалистов, и пока отсутствуют свидетельства о стимуляции раневого заживления с помощью терагерцового излучения.

Использование доноров NO является одним из наиболее перспективных и активно развивающихся направлений применения оксида азота, что обусловлено большим многообразием химических соединений, возможностью модифицировать их свойства и включать в состав тканеинженерных конструкций [10, 25, 32-39]. Среди существующих доноров оксида азота выделяют экзогенные и эндогенные производные. Эндогенные доноры оксида азота представляют особый интерес среди существующих молекул, так как помимо непосредственного выделения оксида азота в ткани играют роль сигнальных молекул в регуляции регенерации и метаболизма в тканях [34].

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) – достаточно стабильные комплексы, обладающие собственной метаболической активностью, способные выступать в качестве «ловушки» свободных радикалов, регуляторов экспрессии генов, апоптоза и метаболизма железа [40-42]. В физиологических условиях они образуются из относительно низких концентраций эндогенного NO (около 25 нМ/мл) и являются самыми значительными внутриклеточными NO-производными [43]. Интеграция NO в ДНКЖ защищает его от окисления, обеспечивает транспорт и взаимодействие с различными мишенями [44]. В отличие от другого эндогенного донора, S-нитрозотиола, ДНКЖ способны самопроизвольно выделять оксид азота, что позволяет рассматривать возможность их применения в NO-терапии [44, 45].

Основными методами генерации плазмы являются плазменная струя, коронный разряд и диэлектрический барьерный разряд и плазменные струи атмосферного давления [20, 21]. Плазма состоит из многих активных компонентов, соотношением которых определяются ее свойства. Её благоприятное влияние на ткани обусловлено бактерицидным действием перекиси водорода и многочисленными эффектами оксида азота, которые заключаются в передаче клеточных сигналов, стимуляции ангиогенеза, активации иммунных клеток и пролиферации кератиноцитов [46-48]. В то же время, активные формы кислорода, которые присутствуют в качестве побочных продуктов потока, могут оказывать повреждающее действие посредством индукции окислительного стресса [13, 47]. Поэтому достижение оптимального состава плазмы является активно изучаемой проблемой, одним из направлений решения которой является разработка различных методов генерации. Аппарат Плазон генерирует плазму методом диэлектронного барьерного разряда, однако особенностью газового потока является значимое преобладание оксида азота над другими компонентами плазмы, что позволяет рассматривать его применение в NO-терапии [16, 49].

Несмотря на многообразие методов доставки оксида азота в ткани, наиболее эффективный для стимуляции раневого заживления не определен.

В процессе данного исследования был проведен поиск наиболее оптимальных параметров NO-содержащего газового потока (NO-СПП), генерируемого плазменно-химическим аппаратом «Плазон» для стимуляции раневого заживления. Впервые в мире была разработана лекарственная форма донора оксида - динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), оптимальная для местного применения. Было проведено исследование поиска наиболее оптимальной дозы ДНКЖ для стимуляции раневого заживления и морфологическое обоснование эффективности разработанного спрея. Далее был проведен эксперимент с контрольными точками 4, 7, 14, 21 дни после операции, по результатам которого NO-СПП был выбран наиболее оптимальным способом доставки оксида азота к поврежденным тканям для стимуляции регенерации.

Цель работы

Обосновать эффективность NO-терапии кожных ран с использованием воздушно-плазменных потоков и локальной терапии с помощью ДНКЖ (как доноров оксида азота) в условиях нормогликемии и экспериментального сахарного диабета.

Задачи исследования

1. Изучить эффект воздействия различных режимов NO-содержащего газового потока на раны для определения наиболее эффективных параметров для стимуляции регенерации.

2. Разработать местную форму доставки динитрозильных комплексов железа для лечения ран. Изучить эффект воздействия различных концентраций ДНКЖ на раны для определения наиболее эффективных доз для стимуляции раневого заживления.

3. Оценить и интенсивность воспаления и регенерации в ранах животных опытных и контрольных групп методами световой, фазово-контрастной, поляризационной и трансмиссионной электронной микроскопии.

4. Оценить влияние терапии оксидом азота на функциональную активность тучных клеток с помощью морфометрических методов.

5. Определить наиболее эффективный способ доставки оксида азота для терапии раневых процессов.

6. Изучить интенсивность экспрессии маркера клеток мезодермального происхождения – виментина в ранах в условиях нормогликемии и сахарного диабета с помощью иммуногистохимического метода.

7. Оценить экспрессию фермента, участвующего в синтезе оксида азота, – iNOS, а также экспрессию маркера миофибробластов – α -SMA и площадь α -SMA-положительных клеток в ранах животных в условиях нормогликемии и сахарного диабета с применением иммуногистохимического метода.

8. Определить экспрессию регуляторного белка NF- κ B в макрофагах и фибробластах ран животных в условиях нормогликемии и гипергликемии.

Научная новизна

В работе впервые:

1. Показано, что NO-терапия с применением аппарата «Плазон», а также донора оксида азота ДНКЖ является эффективным методом стимуляции раневого заживления в условиях нормогликемии и при экспериментальном сахарном диабете. NO-СГП снижает активность воспаления и усиливает регенерацию в ране эффективнее, чем ДНКЖ;

2. Определена оптимальная массовая доза NO при обработке асептических кожных ран NO-содержащим газовым потоком из аппарата Плазон. Она составляет 80 мг на 1 см² площади раны. Морфологически показано, что разработанный спрей, содержащий донор оксида азота ДНКЖ, способствует интенсивному росту грануляционной ткани в дозе 16,6 мкг/см² и подходит для местного применения в терапии ран;

3. С использованием трансмиссионной электронной микроскопии показано, что NO-терапия увеличивала количество зрелых фибробластов и активировала коллагеногенез в грануляционной ткани на неделю раньше, чем в контроле;

4. Продемонстрировано, что в течение первое недели раневого заживления в условиях нормогликемии и гипергликемии NO-СГП и ДНКЖ увеличивают экспрессию виментина в клетках раневого ложа, активность регуляторного белка NF- κ B в макрофагах, индекс экспрессии и площадь α -SMA-положительных клеток (маркера миофибробластов). NO-терапия уменьшает число миофибробластов на поздних сроках раневого заживления.

Научно-практическая значимость работы

Впервые в мире разработана лекарственная форма ДНКЖ для местного применения и проведены лабораторные испытания, доказывающие ее эффективность. Значимость работы заключается в определении новых задач, направленных на усовершенствование предложенного спрея и разработке показаний для его применения. Впервые проведено морфологическое обоснование более высокой эффективности применения NO-содержащего

газового потока для заживления асептических ран, чем использование донора оксида азота. Показано, что для стимуляции раневого заживления раствором ДНКЖ, необходимо пролонгировать курс лечения более чем на 4 суток. Полученные результаты важны для более широкого внедрения NO-терапии в клиническую практику. Даны практические рекомендации: для терапии неинфицированных кожных ран оптимально использовать NO-содержащий газовый поток, генерируемый аппаратом Плазон, с массовой дозой оксида азота 80 мг/см², при параметрах потока: температура 39 °С, скорость ~9 м/с, содержание оксида азота 1340 ppm, двуокиси азота 108 ppm; расход оксида азота ~2.3 мг/с, двуокиси азота ~0.2 мг/с. В случае недоступности коммерческого аппарата Плазон для стимуляции раневого заживления оптимально использовать спрей с ДНКЖ с дозой активного вещества 16,6 мкг/см².

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на динамической оценке морфологических характеристик ран крыс с нормогликемией и стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом после воздействия NO-содержащим газовым потоком и динитрозильными комплексами железа. Раны обрабатывали NO-содержащим газовым потоком или раствором ДНКЖ в течение 3-х дней после нанесения полнослойной кожной раны. Выбор режима NO-терапии определялся в пилотных экспериментах. Материал забирали на 4-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки и изготавливали гистологические препараты, которые изучали при помощи методов световой, фазово-контрастной, поляризационной и трансмиссионной электронной микроскопий, иммуногистохимии, методов морфометрии, автоматической сегментации изображений. Результаты обрабатывали и анализировали с использованием методов статистического анализа.

Связь диссертации с основными научными темами

Диссертация выполнялась в рамках государственного задания: «Морфологические аспекты репаративной регенерации: обоснование применения новых тканеинженерных конструкций для пластики полых органов, хрящевой и костной ткани, физико-химических методов регенерации тканей (лазерная

индукция, NO-терапия, фотодинамическая терапия), новых методов лечения ран и антифиброзной терапии» (ЕГИСУ НИОКТР АААА-А19-119121390049-8).

Результаты исследования были внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) при изучении образовательной программы «Введение в регенеративную медицину», читаемой студентам по направлению подготовки 31.05.01 Лечебное дело (Акт о внедрении результатов диссертации в учебный процесс, 10.02.2022).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Согласно данным комплексного морфологического исследования оптимальная доза NO при обработке асептических кожных ран NO-СГП из аппарата Плазон составляет 80 мг на 1 см² поврежденной области при параметрах потока в области воздействия на ткань: температура 39 °С, скорость ~9 м/с, содержание оксида азота 1340 ppm, двуокиси азота 108 ppm; расход оксида азота ~2.3 мг/с, двуокиси азота ~0.2 мг/с.

2. Спрей, содержащий донор оксида азота ДНКЖ в дозе 16,6 мкг/см², стимулирует рост и созревание грануляционной ткани на ранних сроках раневого заживления (4 суток) и подходит для местного применения в терапии ран.

3. Методами количественной макроскопической оценки, стандартной световой, фазово-контрастной, поляризационной, трансмиссионной электронной микроскопий, а также иммуногистохимического исследования показано, что применение экзогенного оксида азота способствует сокращению площади ран (усиливает экспрессию α -SMA миофибробластами) на 4-е и 7-е сутки, снижает воспалительные процессы и активность тучных клеток, увеличивает количество виментин-положительных клеток (фибробластов) в грануляционной ткани, усиливает макрофагальную реакцию (увеличивает экспрессию NF- κ B), ускоряет васкуляризацию, пролиферацию фибробластов (усиливает экспрессию NF- κ B), коллагеногенез и эпителизацию, ускоряет заживление кожных ран в условиях нормогликемии и сахарного диабета.

4. Обработка ран NO-СГП, генерируемым аппаратом Плазон, эффективнее снижает интенсивность воспаления и способствует регенерации, чем спрей с ДНКЖ и является более предпочтительным способом доставки NO к пораженным участкам.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов определяется использованием линейных лабораторных животных приобретенных в сертифицированном питомнике в количестве 223 особи, что является достаточным для получения достоверных результатов. Достоверность результатов подтверждается также применением известных морфологических и иммуногистохимических методов исследования с использованием сертифицированного научного оборудования, наборов антител и реактивов, строгим следованием исследовательским методикам. Анализ результатов проведен с применением современных методов количественной статистики и с применением сертифицированных пакетов программ.

Апробация диссертационной работы

Апробация диссертации состоялась на заседании Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) протокол №1 от 18.01.2022 г.

Материалы диссертации были доложены на международной конференции «TERMIS European Chapter Meeting 2019: Tissue Engineering Therapies: From Concept to Clinical Translation & Commercialisation» (Родос, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Медицинская Весна” – 2019 (Москва, 2019), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019). На международной конференции Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium 2020 (Мельбурн, 2020), IV Международной научной конференции «Наука будущего – наука молодых» (Москва 2021), 6-м Всемирном конгрессе «TERMIS 2021» (Маастрихт, Нидерланды).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования были внедрены в учебный процесс Института регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) при изучении образовательной программы «Введение в регенеративную медицину», читаемой студентам по направлению подготовки 31.05.01 Лечебное дело (Акт о внедрении результатов диссертации в учебный процесс, 10.02.2022).

Личный вклад автора

Научные результаты, обобщенные в научной работе Игрунковой А.В. получены ей самостоятельно в ходе работы в Институте регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Автором проводилось хирургическое моделирование полнослойных асептических кожных ран, стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. Автор самостоятельно проводила забор и вырезку материала, комплексное гистологическое и иммуногистохимическое исследования, трансмиссионную электронную микроскопию. Автором была проведена статистическая обработка полученных данных, интерпретация и анализ результатов комплекса морфологических исследований. Результаты проведенного исследования были представлены в 9 научных публикациях.

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе:

- Научных статей, отражающих основные результаты диссертации – 4 статьи, из них:
 - в журналах, включенных в международную базу Scopus – 4 статьи;
 - обзорных статей – 1.

Объем и структура работы

Диссертация построена по монографическому типу и изложена на 173 страницах машинописи, содержит 2 таблицы и 55 рисунков. Диссертация состоит из введения, глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 50 отечественных и 151 иностранных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Оксид азота. Особенности синтеза в организме

Оксид азота (NO) – газовая молекула, которая образуется в организме в результате реакции окисления терминального остатка гуанидина L-аргинина при участии NO-синтаз (NOS) и обладает множеством функций, определяющих и регулирующих физиологические и патофизиологические процессы в живых организмах [2].

В настоящее время известно, что NOS представлены тремя изоферментами, которые кодируются различными генами, имеют разную локализацию и участвуют в разнообразных физиологических и патологических процессах. Два изофермента – нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS) NO-синтазы являются конститутивными, они обеспечивают непрерывное образование низких концентраций NO через циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) в нейронах и эндотелиальных клетках сосудов соответственно [50, 51]. Индуцибельная NO-синтаза (iNOS) вырабатывается только в ответ на действие патогенов (например, липополисахарид) и провоспалительных цитокинов (интерферон, INF- α , фактор некроза опухоли и другие), которые генерируются нейтрофилами и макрофагами при повреждении [4, 9, 26]. При этом липополисахарид-опосредованная активация Toll-подобного рецептора приводит к повышению уровня оксида азота приблизительно в 10 раз больше, чем при активации iNOS цитокинами [52].

NO может оказывать прямые и опосредованные эффекты, что определяется концентрациями оксида азота в тканях. Физиологические механизмы действия NO осуществляются при низких (наномолярных) концентрациях и заключаются в непосредственной реакции с радикалами или с комплексами металлов, в основном содержащих железо. Таким образом оксид азота регулирует тонус сосудов и функции железосвязывающих белков [6, 53].

При низких концентрациях NO (<15 нМ/мл) активирует растворимую гуанилилциклазу и запускает каскад реакций через цГМФ-зависимый путь, что

проявляется сосудорасширяющим и ангиогенным эффектами. При повышении концентрации до 15-30 нМ/мл, NO способствует фосфорилированию протеинкиназ и каспазы 6, что обеспечивает защиту клеток от апоптоза [11]. В частности, при фосфорилировании проапоптотического белка Bad наступает его секвестрация, что предотвращает связывание с генами-мишенями в ядре и снижает частоту возникновения Bad-ассоциированного апоптоза [11, 54].

В концентрациях, превышающих 200 нМ/мл оксид азота индуцирует проапоптотические реакции, которые проявляются в антибактериальном и противоопухолевом эффектах [55, 56]. При повышенных концентрациях NO происходит фосфорилирование и активация p53, регулятора клеточного цикла, что ведет к прекращению пролиферации. Концентрации оксида азота, превышающие 1 мМ также сопряжены с апоптотическим эффектом за счет реакций нитрозирования [52].

1.2. Роль оксида азота в физиологии и использование в клинике: механизмы регуляции на молекулярном и клеточном уровнях

1.2.1. Сердечно-сосудистая система

Оксид азота, синтезированный eNOS эндотелиоцитов, оказывает положительное влияние на течение сердечно-сосудистых заболеваний [57]. Молекулярные механизмы этих благоприятных эффектов объясняются стимуляцией оксидом азота цитозольного фермента гуанилатциклазы, которая диффундирует в гладкомышечные клетки, стимулирует выработку цГМФ, активирует связанные протеинкиназы, что ведет к фосфорилированию калиевых и кальциевых каналов сарколеммы и опосредует расслабление гладкой мускулатуры, расширение сосудов и антиагрегантное действие [58]. Имеются

данные о способности NO ингибировать пролиферацию гладкомышечных клеток и замедлять ремоделирование сосудов [57].

В клинической практике уже давно используются предшественники оксида азота, такие как нитроглицерин и нитропруссид натрия для снижения артериального давления и лечения стенокардии. В настоящее время продолжается разработка лекарственных средств, содержащих донор оксида азота. Одним из них является препарат «Оксаком», действующим веществом которого является донор NO – динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) [59]. В экспериментах *In Vivo* «Оксаком» повышал сократимость и увеличивал продолжительность диастолы у крыс с хронической сердечной недостаточностью [60, 61]. Препарат уже успешно прошел две фазы клинических испытаний, в результате которых было показано, что в отличие от других доноров нитрооксида, гипотензивный эффект «Оксакома» продолжается значительно дольше и составляет от 8 до 10 часов [61, 62]. Эффекты оксида азота ослабляются при реакции NO с оксигемоглобином, в результате которой образуется метгемоглобин и нитрат, либо в реакции с дезоксигемоглобином. В то же время дезоксигемоглобин обладает нитритредуктазной активностью, которая наиболее активна при гипоксии, что приводит к образованию NO из нитратных (NO_3^-) и нитритных (NO_2^-) анионов и проявляется сосудорасширяющим эффектом [63].

Оксид азота является важным регулятором ангиогенеза. Также известно, что он предотвращает развитие воспалительной реакции в поврежденных стенках сосудов при облитерирующих поражениях артерий нижних конечностей [26, 64]. Этот эффект объясняется снижением адгезии лейкоцитов к эндотелию и активации системы обратной отрицательной связи в ответ на действие провоспалительных медиаторов, стимулирующих экспрессию iNOS макрофагами и синтез NO [65].

1.2.2. Дыхательная система

За рубежом оксид азота широко применяется ингаляторно для лечения синдрома легочной гипертензии и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у детей и взрослых. Dani C et al., 2017 продемонстрировали высокую эффективность ингаляционной терапии NO у недоношенных младенцев с персистирующей легочной гипертензией новорожденных. При этом ингаляторное применение NO (iNO) (20 ppm) в течение суток при ОРДС у доношенных новорожденных позволило значительно уменьшить продолжительность искусственной вентиляции легких и сократить сроки пребывания детей в стационаре [66]. В других работах также было показано значимое увеличение сатурации у новорожденных, уменьшение необходимости использования экстракорпоральной мембранной оксигенации, повышение показателей выживаемости [67-69]. Однако при бронхолегочной дисплазии применение оксида азота (5-20 ppm) в течение 7-24 дней не сопровождалось повышением выживаемости недоношенных младенцев, не уменьшало выраженности повреждения легких, не влияло на исход заболевания [68, 69]. Важно отметить, что ингаляции NO в первые дни жизни у детей с тяжелыми повреждениями легких повышают частоту кровоизлияний в головной мозг на 20%, эти данные были близки к статистически значимым.

Известно, что ингаляционное применение оксида азота в средней дозе 10 ppm у больных с тяжелым острым респираторным дистресс-синдромом способствует значительному временному улучшению оксигенации в течение первых суток, что связано с активным проникновением NO через альвеолярно-капиллярную мембрану при выраженном диффузном альвеолярном повреждении [70]. Оксид азота может накапливаться в мембранах и других липидных средах, в том числе в сурфактанте, поскольку его растворимость в липидах превышает растворимость в воде (36 мл/л при 37 °C, 760 мм рт.ст.) В экспериментах In Vitro было показано, что оксид азота способствует поддержанию поверхностного натяжения сурфактанта, так как снижает скорость перехода его крупных частиц в

мелкие и менее плотные везикулы. Данный эффект объясняется антиоксидантным действием оксида, которое проявляется в уменьшении выраженности молекулярных повреждений, вызванных пероксидными радикалами, токсичными промежуточными продуктами перекисного окисления липидов [71]. Однако в нескольких работах *In Vivo* наблюдали нарушение поверхностного натяжения сурфактанта, что объясняли связыванием его компонентов с железо-содержащими белками, модифицированными NO (особенно метгемоглобином), или пероксинитритом [72].

Таким образом, влияние оксида азота на метаболизм поверхностно-активных веществ пока однозначно не определено, хотя считается, что высокая эффективность ингаляторной терапии у новорожденных обусловлена отсутствием чувствительности незрелых легких к токсичным продуктам оксида азота.

Интересно отметить, что ингаляции газового потока оксида азота показали высокую эффективность во время вспышки атипичной пневмонии, вызванной коронавирусной инфекцией (SARS-CoV) в 2003 году. Лечение методом NO-индуцированной обратимой легочной гипертензии позволило скорректировать тяжелую гипоксию и сократить продолжительность респираторной поддержки у пациентов с тяжелым острым респираторным дистресс-синдромом. Газообразный NO доставлялся с помощью систем доставки INOvent (Datex-Ohmeda) в течение 3 дней с ежедневным снижением дозы от 30 ppm до 10 ppm к третьему дню терапии. В случае возобновления симптомов дыхательной недостаточности ингаляции NO в концентрации 10 ppm возобновляли. В результате уже после первого сеанса отмечалось снижение частоты дыхания и сердцебиения, SpO₂ с 93% до 99% ($p < 0,05$). Рентгенография грудной клетки показала уменьшение распространения или уменьшение плотности инфильтратов легких у 5 из 6 пациентов. Средняя продолжительность ингаляционной NO-терапии составила $4,3 \pm 1,7$ дней. В настоящее время в литературе ежемесячно увеличивается количество публикаций, свидетельствующих о благоприятном влиянии NO терапии на длительность и характер течения пневмонии, вызванной SARS-CoV2 (COVID-19), а также показатели смертности [73, 74].

Несмотря на доказанную эффективность ингаляционной NO терапии при синдроме легочной гипертензии различного генеза и ОРДС, продолжается дискуссия относительно безопасности данного метода терапии, о чем свидетельствуют противоречивые данные. Согласно проведенному мета-анализу, длительное применение оксида азота (более 7 дней), как при постепенно возрастающих концентрациях (от 1 ppm до 40 ppm), так и при фиксировано низких дозах (5 ppm), увеличивает риск развития острого почечного повреждения у пациентов с ОРДС [75]. Другой систематический обзор также выявил, что помимо временного улучшения оксигенации в первые сутки, повышенный риск возникновения острой почечной недостаточности у взрослых с ОРДС, которые получали оксид азота ингаляционно в средней дозе 10 ppm более 7 дней [76]. Однако, в метаанализе J Wang, 2021 было показано, что применение NO-терапии снижает риск развития острого почечного повреждения у пациентов с легочной гипертензией, которые перенесли кардиохирургические операции [77].

Ингаляционное применение NO является достаточно эффективным в отношении взрослых пациентов с синдромом легочной гипертензии. Исследование российских авторов, применявших iNO (40 ppm) в течение 5 ч в сутки курсом в 21 день, продемонстрировало значимое улучшение функционального статуса у больных, страдающих идиопатической легочной гипертензией с функциональным классом II-IV, для которых стандартная трехмесячная терапия оказалась неэффективной. На фоне ежедневных ингаляций оксида азота повышался функциональный класс, что сопровождалось снижением индекса одышки и систолического давления легочной артерии [78]. Схожие результаты были получены при исследовании пациентов с легочной гипертензией функционального класса III-IV и хронической сердечной недостаточностью, перенесших инфаркт миокарда левого желудочка. Совместно с базисным лечением больным проводили ежедневные 20-минутные сеансы NO-терапии с возрастающей концентрацией газа от 10 до 40 ppm с интервалом в 5 минут [79].

Рандомизированное двойное-слепое плацебо контролируемое исследование продемонстрировало, что ингаляторное применение оксида азота через аппарат

iNOpulse в дозе 30 мг/кг массы тела в течение 8 недель способствовало нарастанию сатурации, значительному увеличению физической активности и стабилизации этого показателя по сравнению с плацебо у пациентов с легочной гипертензией, ассоциированной с фиброзом легких. При этом авторы указывают об отсутствии побочных эффектов даже при применении доз 45 – 75 ppm [80].

Снижение среднего значения давления и сопротивления в легочной артерии, прирост сердечного индекса также наблюдали при одновременном применении оксигенотерапии с поддержанием сатурации на уровне $\geq 92\%$ и iNOpulse терапии в дозах от 30 до 125 мкг / кг/ час у пациентов с диффузным легочным фиброзом и саркоидозом [81].

Известно, что легочная гипертензия является важной причиной тяжелого течения заболевания и смертности у взрослых пациентов с пороками сердца, требующих хирургического вмешательства. Было доказано, что у больных с митральным стенозом и тяжелой легочной гипертензией через 24 и 48 часов iNO терапии (10 ppm) более значимо увеличивается сердечный индекс ($p < 0,0001$), снижается легочное сосудистое сопротивление ($p = 0,005$) по сравнению с пациентами, получающими кислород. Более того, пациенты в группе iNO требовали меньшего применения системных вазоактивных лекарств и имели более короткий период пребывания в реанимации [82].

Несмотря на продолжающиеся научные дискуссии о безопасности и целесообразности ингаляций оксида азота при различных заболеваниях, способности данного газа снижать давление в сосудах малого круга кровообращения и улучшать газообмен в легких все больше привлекают к себе интерес клиницистов и исследователей.

1.2.3. Почечная функция

Оксид азота синтезируется всеми видами NO-синтаз: eNOS в эндотелии сосудов, эпителии восходящей части петли Генле и собирательных трубочек

проток; nNOS в плотном пятне, эфферентных артериолах, капсуле Боумена, некоторых клетках корковой части петли Генле и собирательных трубочек. Экспрессия iNOS наблюдается в медуллярном отделе собирательных трубочек в норме и при воспалении. При ингибировании NOS наблюдается снижение общего почечного кровотока, давления интерстициальной жидкости, уменьшение объема мочи и экскреции натрия без значительного изменения скорости клубочковой фильтрации, фракционной экскреции натрия и воды, артериального давления или осмоляльности мочи. NO, синтезируемый в плотном пятне при участии nNOS, снижает чувствительность клеток к TGF, предотвращает сужение сосудов почек, задержку натрия и развитие артериальной гипертензии.

Ингибирующее действие NO на реабсорбцию натрия в проксимальных канальцах может быть связано со снижением функции Na^+ / H^+ канала и активности Na^+ , K^+ -АТФазы. В восходящей части петли Генле оксид азота снижает реабсорбцию натрия за счет ингибирования $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ (котранспортера) и уменьшения реабсорбции бикарбоната за счет снижения активности обмена Na^+ / H^+ .

NO ингибирует стимулированную вазопрессином осмотическую проницаемость воды в кортикальном отделе собирательных трубочек посредством активации цГМФ и ингибирования цАМФ, снижая транспорт мочевины во внутреннем медуллярном отделе [83].

1.2.4. Метаболизм

Оксид азота оказывает множество системных эффектов, регулируя метаболизм и чувствительность тканей к инсулину. Было показано, что NO, синтезированный eNOS, которая локализуется в клетках жировой и скелетной мышечной ткани, или полученный в результате метаболизма неорганического нитрата, стимулирует образование митохондрий, тем самым увеличивая окисление жиров в периферических тканях и снижая синтез липидов в печени. NO увеличивает транспорт инсулина и глюкозы к скелетным мышцам, регулирует

глюконеогенез, интенсифицирует гликолиз и в незначительной степени влияет на секрецию инсулина [84]. В двух независимых исследованиях Kashiwagi S. и Sansbury B. было показано, что высокие уровни eNOS предотвращают гиперинсулинемию, что свидетельствует о непосредственном участии в регуляции метаболизма глюкозы [85, 86]. Также было показано, что оксид азота подавляет фосфорилирование нуклеиновых кислот при их повреждении, предотвращая формирование двухцепочечных разрывов ДНК и апоптоза β -клеток поджелудочной железы. Интересно отметить, что данный эффект не наблюдался в макрофагах, фибробластах и гепатоцитах, что указывает на селективность данного механизма для β -клеток [87, 88].

Другие изоформы NOS, напротив, негативно влияют на метаболизм глюкозы. Так, активация nNOS в головном мозге ассоциирована с гиперфагией, а активация iNOS приводит к развитию инсулинорезистентности печени и скелетных мышц, способствует глюконеогенезу и оказывает выраженное влияние на опосредованную цитокинами секрецию инсулина [89]. Однако данные других исследований утверждают, что iNOS, посредством активации нескольких каскадов, увеличивает поглощение глюкозы периферическими тканями [84].

1.2.5. Мышцы

Extracellular superoxide dismutase (EcsOD) – единственный известный внеклеточный фермент, действие которого направлено на нейтрализацию избытка реактивных форм кислорода O_2^- . Он экспрессируется практически всеми типами клеток и активируется во внеклеточном пространстве путем частичного протеолиза. Благодаря активности EcsOD сохраняется биодоступность оксида азота в интима артерий, что важно для поддержания сосудистого тонуса и функциональной активности клеток эндотелия. Было показано, что NO усиливает экспрессию EcsOD и уменьшает выраженность катаболических процессов в скелетных мышцах, в том числе после длительных

физических нагрузок. Предполагается, что молекулярным механизмом, лежащим в основе защиты мышц от окислительного стресса, является NO-опосредованное усиление антиоксидантной защиты, поскольку парентеральное введение мышам липополисахарида для имитации сепсиса приводило к повышению уровня iNOS в атрофически измененных мышцах животных, в то время как в мышцах, в которых сохранялся гликоген, данного эффекта не наблюдалось [90].

В другом исследовании отмечали дозозависимое увеличение числа сателлитных клеток в ответ на введение донора оксида азота DETA-NO мышам, которые ранее в течение 8 недель получали глюкокортикоиды [91]. Также эксперименты по индукции сверхэкспрессии EcSOD подтвердили его эффективность в профилактике мышечной атрофии, индуцированной длительным приемом глюкокортикоидов, либо ишемией ввиду недостаточного развития коллатеральных сосудов [92].

1.2.6. Нервная система

NO играет важную роль как в центральной, так и в периферической нервной системе. Он участвует в антероградной и ретроградной передаче нервных импульсов, что, как полагают, служит важным механизмом обратной связи, лежащим в основе долговременной потенциации и обработке сигналов страха. Также известно, что при продолжительном нарушении синтеза NO через ингибирование эндотелиальной или нейрональной синтеза оксида азота, например, при табакокурении, происходит нарушение мозгового кровотока и метаболизма глюкозы в головном мозге, повышается продукция реактивных кислородных радикалов. В результате происходит не только снижение трофики и повреждение клеток головного мозга, но и подавление функции нитергических нервных волокон. Нарушение церебрального кровоснабжения потенцирует синтез амилоида β , при накоплении которого развивается клиническая картина болезни Альцгеймера [93].

Интересны работы, обсуждающие активность оксида азота при использовании методов традиционной китайской медицины для облегчения выраженности болевого синдрома у пациентов с костно-мышечными патологиями. Имеются данные, что в акупунктурных точках локализуется большее количество нервных волокон, кровеносных сосудов, волосяных фолликулов и потовых желез, а также более высокий уровень NO относительно других участков тела. Повышение уровня оксида азота при использовании акупунктурных техник связывают со стимуляцией экспрессии NO-синтазы, обладающей временным рецепторным потенциалом ваниллоида типа-1, который локализуется в субэпидермальных нервных волокнах и клетках соединительной ткани дермы [94, 95]. В результате ее активации происходит опосредованное оксидом азота расширение сосудов, увеличение местного кровотока, улучшение притока болеутоляющих или сенсibiliзирующих веществ, что приводит к облегчению боли [95, 96].

Также было показано, что концентрации нитратов, нитритов и цГМФ значительно выше в акупунктурных точках по сравнению с теми участками тела, где иглоукалывания не проводилось. При определении зависимости уровня оксида азота от способа стимулирующего воздействия было показано, что низкочастотная электрическая стимуляция и мануальная акупунктура с низкой стимулирующей силой и скоростью повышают концентрации NO в акупунктурных точках, в то время как при высокочастотной стимуляции наблюдается противоположный эффект [95, 96].

1.2.7. Желудочно-кишечный тракт

В умеренных количествах NO оказывает иммуномодулирующее действие, ингибируя секрецию IL-12 и IL-17 [97]. Также имеются данные, что индукция iNOS или пероральный прием нитритов уменьшает повреждение слизистой оболочки и улучшает регенерацию тканей при колите [98, 99]. При

патологических процессах ведущая роль в активации iNOS принадлежит белку-активатору-1, который опосредованно приводит к увеличению продукции арахидоновой кислоты. Увеличение транслокации ядерного фактора (NF)-κB в ядро клеток, посредством NO-опосредованного S-нитрозирования активирует циклооксигеназу 2, что приводит к реализации метаболического каскада и избыточному синтезу простагландина E₂, который является ведущим провоспалительным фактором при неспецифическом язвенном колите [97, 100].

Помимо этого, резко повышенные концентрации NO стимулируют секрецию ионов хлора эпителиоцитами толстой кишки, что приводит к диарее, которая является основным симптомом воспалительных заболеваний кишечника. Тем не менее, было показано, что нарушение высвобождения или пониженные концентрации NO ассоциированы с заболеваниями, связанными с нарушением моторики желудочно-кишечного тракта (ахалазия, болезнь Гиршпрунга, гипертрофический пилорический стеноз) [97].

1.2.8. Онкология

Было обнаружено, что экспрессия оксида азота iNOS раковых клеток способствует прогрессированию их злокачественности, тогда как оксид азота, синтезированный iNOS клеток иммунной системы, оказывает противоопухолевое и провоспалительное действие, что позволяет предположить значимость в прогрессировании заболевания не только концентрации NO в тканях, но и источника его синтеза. Описанная дихотомия эффектов существованием отрицательной обратной связи экспрессии iNOS от p53 и способность NO стабилизировать p53 посредством фосфорилирования ключевых сериновых/треониновых фрагментов и, таким образом, инициировать апоптоз. В случае неэффективности этой системы наблюдается резкое увеличение и пролонгация экспрессии iNOS во многих солидных опухолях [101]. В то же время

иммунные клетки стремятся синтезировать высокие концентрации NO для реализации генотоксического эффекта в опухолевых клетках [102].

Избыточная экспрессия iNOS присутствует более, чем у 50% пациентов со злокачественными новообразованиями и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для пациентов с раком молочной железы с отрицательным рецептором эстрогена, поджелудочной железы, желудка, печени и толстой кишки, глиомой и меланомой, что объясняется повышенным ангиогенным и метастатическим потенциалом у этих больных [103]. Индукция iNOS происходит непосредственно в клетках опухоли и их микроокружения при метаболических изменениях в опухоли, в условиях гипоксии, инфекции и воспаления. NO/цГМФ-зависимый механизм стимулирует переход макрофагов в противовоспалительный фенотип, ингибирует хемотаксис и активацию цитотоксических Т-клеток, что способствует «ускользанию» опухоли от иммунного ответа [102-104]. Интересны исследования, показавшие, что оксид азота может препятствовать репарации ДНК опухолевых клеток после радио- и химиотерапии, тем самым повышая эффективность противоопухолевого лечения. Рассматриваются несколько способов NO-терапии онкологических процессов:

- 1) непосредственная доставка оксида азота или его предшественников в ткани;
- 2) введение доноров NO в сочетании с химио- / радио- / иммунотерапией;
- 3) гибридизация доноров NO с газовыми трансмиттерами, такими как сероводород и монооксид углерода;
- 4) комбинированное использование ингибиторов iNOS и циклооксигеназы;
- 5) применение систем таргетной и/или пролонгированной доставки лекарств [52, 53].

Высокие уровни оксида азота могут приводить к дезаминированию и замене цитозина на тимин в цепях ДНК и ингибировать тиол-зависимые системы репарации, например, опосредованные алкилтрансферазой и белками цинковых пальцев. Некоторые виды иммунной терапии успешны ввиду ингибирования в опухолевых клетках NO-зависимых механизмов, стимуляции образования

макрофагов, ассоциированных с опухолью и метастазирования. Например, терапия IL2 / анти-CD40 активирует IFN- γ , который модулирует активность матриксных металлопротеиназ и NO-опосредованную миграцию опухолевых клеток [101, 105].

Основным компонентом иммунного ответа на проводимую противоопухолевую терапию является эффективное привлечение полиморфноядерных лейкоцитов. В начале 1990-х годов было обнаружено, что рекрутирование лейкоцитов через взаимодействие с эндотелиальными клетками aberrантной сосудистой сети отсутствует при раковых состояниях, что также может быть причиной иммунного ускользания. Позже было показано, что активация эндотелия напрямую регулируется местным внутриклеточным уровнем NO [101]. Лучевая терапия, в частности, γ -облучение в низких дозах при раке поджелудочной железы индуцирует выброс большого числа провоспалительных медиаторов, что приводит к активации эндотелия и привлечению цитотоксических Т-клеток [106].

1.3. NO и раневое заживление

1.3.1. Основные сведения о раневом заживлении

Процесс раневого заживления характеризуется четырьмя последовательными фазами: гемостаз (в течение нескольких часов после травмы), воспаление (1 – 3 дня), пролиферация (4 – 21 день) и ремоделирование (21 день – 1 год) [107, 108]. Нарушение регулирования любой из них приводит к нарушению процесса заживления, что может проявляться хроническими язвами или избыточным образованием рубцовой ткани [107, 109].

В первые секунды после повреждения обрывки коллагеновых волокон инициируют внутренние и внешние каскады свертывания крови. Происходит агрегация тромбоцитов и вазоконстрикция, что приводит к гипоксии и снижению

pH тканей; формируется сгусток, заполняющий дно раны. Дегрануляция тромбоцитов активирует систему комплемента, которая стимулирует выброс цитокинов и факторов роста (PDGF, TGF- β 1), экстравазацию нейтрофилов и их миграцию к очагу повреждения [107, 110-112]. Важную роль в хемотаксисе нейтрофилов играет рецептор хемокина CXCR2, так как опосредует их рекрутирование на ранней стадии заживления ран (до суток) посредством взаимодействия со множеством лигандов [113]. В исследовании J. Larouche было показано, что при отсутствии этого рецептора моноциты появляются в ране в более поздние сроки, снижается секреция IL-1 β , скорость миграции и пролиферации кератиноцитов [114].

В фазу воспаления продукты тканевого распада и патоген-ассоциированные молекулы стимулируют Toll-подобные рецепторы, индуцируя активацию внутриклеточных сигнальных путей, включая NF- κ B и mitogen-activated protein kinase (MAPK), которые инициируют экспрессию большого количества генов и биологически активных молекул, стимулирующих воспалительный ответ [107]. Важно отметить, что именно нейтрофилы на ранних стадиях раневого заживления начинают синтезировать фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ключевой регуляторный фактор ангиогенеза, который избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и моноцитов, увеличивает сосудистую проницаемость, что облегчает миграцию клеток эндотелия, индуцирует и стабилизирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и синтез NO [115]. В результате происходит вазодилатация и активация экспрессии протеаз, разрушающих связи между эндотелием и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток [65].

Хотя нейтрофилы необходимы для заживления ран, их постоянное присутствие ассоциировано с длительно незаживающими ранами, трудно поддающимися терапии [116]. Считается, что в неинфицированной ране нейтрофилы могут сохраняться не более 5 дней [108].

Примерно через 3 дня после повреждения в ране появляются моноциты, которые под действием провоспалительных цитокинов, интерферонов и

продуктов тканевого распада дифференцируются в макрофаги провоспалительного фенотипа M₁. Они осуществляют фагоцитоз микробов и погибших клеток, продуцируют IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , iNOS и хемокины для рекрутирования лейкоцитов. По мере уменьшения провоспалительных стимулов макрофаги переходят в репаративный фенотип M₂, и экспрессируют противовоспалительные медиаторы, например, антагонист IL-1R, IL-10, факторы роста, которые стимулируют пролиферацию фибробластов, синтез компонентов экстрацеллюлярного матрикса и ангиогенез. Этот переход M₁ – M₂ играет важную роль для разрешения воспаления и обеспечения репарации тканей [108, 112, 117].

В фазу пролиферации временный матрикс раны, представленный сгустком крови, образовавшимся во время гемостаза, заменяется грануляционной тканью, состоящей из фибробластов, гранулоцитов, макрофагов, кровеносных сосудов и пучков коллагеновых волокон. Фибробласты мигрируют в рану в ответ на присутствие тромбоцитарного фактора роста, трансформирующего фактора роста (TGF) - β и основного фактора роста фибробластов, которые продуцируются тромбоцитами и макрофагами [107, 110]. Они пролиферируют и продуцируют протеиназы для деструкции временного матрикса, а также компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, протеогликаны, гиалуроновую кислоту и т.д), образуя грануляционную ткань, которая заполняет раневой промежуток и обеспечивает основу для адгезии, миграции и дифференцировки клеток. Из разрушенной протеолитическими ферментами базальной пластинки сосудов эндотелиальные клетки под влиянием VEGF, PDGF и основного фактора роста фибробластов мигрируют к источнику ангиогенного стимула и пролиферируют, формируя новые капилляры [111, 117, 118].

1.3.2. Роль NO в раневом процессе

Оксид азота играет роль на всех этапах раневого заживления, его концентрация прогрессивно нарастает, начиная с первых часов после

повреждения тканей, и достигает пика на 2 сутки [4]. Основными эффектами данной молекулы являются бактерицидное действие, вазодилатация, способность к активации нейтрофилов и макрофагов, индукция пролиферации фибробластов, потенцирование коллагеногенеза, регуляторное действие на апоптоз при remodelировании грануляционно-фиброзной ткани, стимуляция пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, а также способность к инактивации свободных радикалов [5, 8-10, 12, 15, 119].

В первые минуты после повреждения ткани оксид азота, генерируемый eNOS, связывается с рецептором растворимой гуанилатциклазы, который посредством внутриклеточного мессенджера цГМФ активирует систему G-киназ Ca_2^+ -каналов эндоплазматического ретикулума, что приводит к снижению концентрации внутриклеточного кальция и предотвращает адгезию тромбоцитов к стенкам сосудов [2, 9, 15]. По мере накопления реактивных форм кислорода в очаге повреждения, в том числе при участии нейтрофильных никотинамид-адениндинуклеотид-фосфат-оксидаз, и пероксинитрита происходит разрушение eNOS. Процесс реализуется окислением комплексов цинк-цистеин, S-глутатионилированием остатков цистеина в редуктазном домене, фосфорилированием остатков тирозина Thr495/Tyr657, истощением тетрагидробиоптерина, а также ROS-опосредованным повышением уровня эндогенного ингибитора eNOS асимметричного диметиларгинина [2, 120]. Помимо этого, реактивные формы кислорода могут инактивировать цГМФ-опосредованный путь через окисление тиола, S-нитрогрупп или инициирования перестройки гемогруппы данных белков или через активацию цГМФ-деградирующих фосфодиэстераз [6, 121]. В результате происходит резкое уменьшение eNOS-опосредованной генерации NO, что проявляется в повышении агрегации тромбоцитов и тромбообразовании [122].

Также NO регулирует различные внутриклеточные сигнальные молекулы, включая MAPK, янус-киназу, NF- κ B и белок-активатор-1 через S-нитрозилирование и денитрозилирование остатков цистеина. Более того, известны как минимум четыре разных сайта, где NO может напрямую модулировать

активацию NF- κ B в клетках [123]. Предполагается, что именно посредством модификации структур ДНК NF- κ B небольшими концентрациями оксида азота, происходит стимуляция выработки макрофагами и моноцитами хемокинов для полиморфноядерных лейкоцитов, тогда как при высоких концентрациях NO ингибирует NF- κ B и тем самым уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов [124].

Показано, что при уровне NO выше 50 нМ/мл происходит ингибирование пролилгидроксилазы негемового железосодержащего белка путем нитрозилирования и стабилизация индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора-1 α , который может увеличивать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, стимулируя высвобождение VEGF и образование новых капилляров [3]. NO индуцирует синтез циклооксигеназы-2, повышает активность матриксной металлопротеиназы-9, которая разрушает компоненты внеклеточного матрикса, модулирует миграцию и прикрепление нейтрофилов к эндотелию, координирует рекрутирование лейкоцитов, а также ингибирует тканевой ингибитор металлопептидазы 1. В результате на ранних стадиях заживления NO способствует ускоренному очищению раны, а в стадию пролиферации, усиливает ангиогенез и ускоряет созревание грануляционной ткани [8, 10, 121].

При более высоких (микромольных) концентрациях, которые генерируются iNOS, оксид азота инициирует реакции с O₂ или супероксид-радикалом (O₂⁻), продуктами которых являются RNOS – лабильные молекулы, способные модифицировать более широкий спектр биомолекул, чем непосредственно NO, запуская механизмы оксидативного и нитрозативного стресса. По какому пути пойдет реакция в каждом конкретном случае определяется условиями окружающей среды и зависит от образовавшихся промежуточных соединений RNOS [6, 52].

Помимо этого активные формы кислорода и азота могут реагировать друг с другом с образованием пероксинитрита (ONOO⁻). Данное токсичное соединение вызывает окислительное повреждение ДНК и перекисное окисление липидов, а также способствует снижению Ph среды в очаге повреждения [113]. В то же время

такие условия способствуют дифференцировке моноцитов, прибывающих в очаг воспаления, в макрофаги [125]. В присутствии CO_2 Пероксинитрит может преобразовываться в другие биологически активные вещества. Например при избытке O_2^- он участвует в реакциях окисления и нитрозирования, при этом считается, что его прямое влияние на биологические процессы имеет ограниченное значение. Однако было показано, что оксид азота (IV) (NO_2), образующийся в результате этой реакции, может окислять, нитрировать и нитрозировать белки через оксид азота (III) (N_2O_3) [2, 9].

Высокие концентрации NO, генерируемые iNOS макрофагов, проявляют антибактериальную активность против широкого спектра грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*) и грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) бактерий, в том числе против метициллинрезистентных штаммов золотистого стафилококка [55, 126]. Благодаря этому бактериальная нагрузка снижается до уровня, на котором заживление ран происходит в сроки, не отличающиеся от сроков заживления неинфицированных ран [47, 126]. Антимикробное действие NO осуществляется через два основных механизма. Нитрозивные молекулы, такие как триоксид азота (N_2O_3), вызывают дезаминирование ДНК и S-нитрозирование тиолов на поверхности клеточных мембран и внутриклеточных белков, что приводит к изменению функций белков, блокаде синтеза ДНК, ингибированию РНКазы и в итоге индуцирует гибель бактериальных клеток [126, 127]. При нитрозировании (т.е. присоединении к белку N_2O_3) молекул ДНК наблюдается дезаминирование нуклеиновых кислот и переход гуанина (G) и цитозина (C) в аденин (A) и тимин (T), что приводит к разрывам ДНК цепей бактерий. Таким образом, реактивные соединения оксида азота, предшественники производных S-нитрозотиолов (RSNO), непосредственно модифицируют ДНК и опосредуют первичные и более высокие структурные изменения в белках, определяющих метаболизм и репарацию ДНК [127].

Помимо этого, NO проявляет дозозависимую антибактериальную активность против биопленок: вызывая разрежение биопленки при наномолярных

концентрациях и их полное уничтожение при микромолярных [55, 126, 128]. При микро-и наномолярных концентрациях оксид азота способен снижать жизнеспособность бактерий практически на 100% [126]. В геномах около 200 видов бактерий был обнаружен белок H-NOX, чувствительный к оксиду азота. При этом у факультативных анаэробов они кодируются рядом с генами, ответственными за циклические ГМФ-синтазы или цГМФ-фосфодиэстеразы – основные рецепторы связывания NO. Было показано, что повышение концентрации цГМФ инициирует образование бактериями биопленки, а снижение – ее разрушение. На основании этого была доказана теория, что NO связывается с H-NOX белками, снижая внутриклеточную циклическую передачу сигналов ГМФ и межклеточное взаимодействие бактерий, тем самым регулируя процесс образования биопленок [126, 127]. Более того, недавно был обнаружен еще один белок, NosP, который не является гомологом H-NOX, но также опосредует ингибирующее действие оксида азота на синтез биопленок [127].

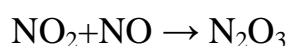
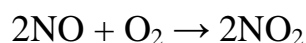
Важно отметить, что при высоких концентрациях NO нитрозирование потенцирует закрытие каналов рецептора глутамата, селективно связывающего N-метил-D-аспартат и предотвращает приток кальция в клетку. При взаимодействии N_2O_3 с рецептором трансферрина происходит деградация протеосом, а связывание с каспазами 3 и 8 влечет ингибирование данных ферментов, что обеспечивает защиту клеток макроорганизма от апоптоза [128].

Таким образом, несмотря на потенциальный вред от воздействия реактивных форм азота, RNS-опосредованные клеточные ответы указывают на наличие у макроорганизма систем биологической сигнализации, в том числе по принципу обратной связи, которые уменьшают воспалительную реакцию и способствует заживлению ран и восстановлению тканей.

Было показано, что iNOS-опосредованная продукция оксида азота в ответ на присутствие липополисахарида значительно снижалась по мере фагоцитирования апоптотических клеток макрофагами [129]. Эти данные подтверждают значение принципа обратной связи в регуляции синтеза NO по мере стихания фазы острого воспаления, однако также могут свидетельствовать о высокой патогенности

возбудителя, ввиду способности некоторых бактерии вызывать апоптоз моноцитов человека и тем самым снижать продукцию NO. Скорее всего, в стадию экссудации повышение устойчивости макрофагов, нейтрофилов и моноцитов крови человека к проапоптотическим сигналам NO или его производных осуществляется через цГМФ-зависимый механизм, активированный ранее физиологическими концентрациями NO. Однако, сверхфизиологическая концентрация оксида азота, генерированная iNOS в патологических условиях, наблюдаемая к концу вторых суток после повреждения тканей, инициирует апоптоз нейтрофилов через цГМФ-независимые механизмы и отражает переход процесса заживления от стадии воспаления к стадии пролиферации [117, 123]. Более того, высокий уровень NO фиксируется в непосредственной близости от макрофагов, однако так как данная молекула легко диффундирует, уже на расстоянии нескольких микрометров от источника синтеза NO, его концентрации значительно уменьшаются до значений, которые вызывают антиапоптотический эффект [11]. Происходит защита тканей, окружающих рану, от повреждения провоспалительными цитокинами.

Интересно отметить, что NO_2 и N_2O_3 , которые могут быть получены при избытке молекул NO над O_2^- в следующих реакциях:



могут индуцировать экспрессию гемоксидазы-1 и IL-8 в моноцитах, что может являться одним из механизмов противовоспалительных и пролиферативных свойств NO. В других исследованиях было показано, что реактивные формы азота активируют латентный TGF- β , тем самым подавляя воспаление, ассоциированное с активностью t-хелперов 1 [6, 9].

Недостаточно высокие концентрации эндогенного NO на ранних стадиях раневого заживления приводит к нарушению данных механизмов и замедлению заживления ран [15].

В многочисленных работах было продемонстрировано, что в экссудате ран больных сахарным диабетом уровень NO значительно ниже, чем у пациентов с

нормальным уровнем глюкозы крови, что объясняется угнетением функции eNOS в результате гликозилирования белков [130]. Вследствие этого нарушается хемотаксис и функциональная активность макрофагов, пролиферация и дифференцировка кератиноцитов. При недостаточной концентрации оксида азота в ране фибробласты имеют низкую синтетическую функцию, не продуцируют коллаген и формируют дефективный экстрацеллюлярный матрикс, который характеризуется низкой устойчивостью к внешним повреждениям [4, 5, 15]. Boykin J. предлагает использовать определение уровня NO в экссудате в качестве надежного прогностического маркера осложненного течения раневого заживления у пациентов с инфицированными ожоговыми ранами и длительно незаживающими ранами [131].

Таким образом, применение экзогенного оксида азота является перспективным и активно изучаемым направлением терапии раневых процессов.

1.4. Способы увеличения содержания оксида азота в биологических системах

1.4.1. Холодная плазма

В настоящее время существует 3 способа коррекции уровня NO в организме:

- 1) воздействие газовым потоком (производным плазмы), содержащим оксид азота [13, 23],
- 2) использование физических факторов-индукторов эндогенного синтеза оксида азота [132],
- 3) применение фармацевтических доноров оксида азота или модуляторов активности NO-синтаз [133, 134].

Физическим индуктором оксида азота является терагерцовое излучение. Терагерцовые волны имеют невысокую интенсивность излучения, при которой не происходит нагревания объектов воздействия, они не оказывают повреждающего действия на ткани, так как энергия фотона указанных лучей очень мала [132]. Терагерцовым диапазоном оксида азота являются частоты 150,176-150,664 ГГц [29]. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о возможности использования данного вида излучения для коррекции нарушений газового и электролитного состава крови, коагуляционных нарушений при различных заболеваниях [28, 30, 31, 135]. Однако данное направление изучается узким кругом специалистов, и пока отсутствуют свидетельства о стимуляции раневого заживления с помощью терагерцового излучения.

Более изученным способом лечения ран является плазменная терапия. Плазма состоит из многих активных компонентов, включая радикалы, ионы, электроны и фотоны, количеством и соотношением которых определяются ее свойства [136]. Её благоприятное влияние на ткани обусловлено бактерицидным действием перекиси водорода и многочисленными эффектами оксида азота, которые заключаются в передаче клеточных сигналов, стимуляции ангиогенеза, активации иммунных клеток и пролиферации кератиноцитов [16, 47]. В то же время, активные формы кислорода, которые присутствуют в качестве побочных продуктов потока, могут оказывать повреждающее действие посредством индукции окислительного стресса [137]. Поэтому достижение оптимального состава плазмы является активно изучаемой проблемой, одним из направлений решения которой является разработка различных методов генерации.

Плазма может быть «термической (горячей)» и «холодной». Горячая плазма почти полностью ионизирована, в то время как холодная плазма генерируется за счет электрического разряда на основе различных газов (воздух, аргон, гелий и др.) и ионизирована лишь частично [136]. На сегодняшний день существует множество техник генерации плазмы при атмосферном давлении, применение которых рассматривается в медицинских целях. Основными являются плазменная

струя, коронный разряд и диэлектрический барьерный разряд и плазменные струи атмосферного давления [20, 21, 48, 136].

До сих пор не существует общей стандартизации различных источников плазмы в отношении технических параметров, количественной оценки генерируемых свободных радикалов или излучения, что затрудняет проведение сравнительного анализа эффективности их применения. Тем не менее при проведении экспериментальных работ исследователи обращают внимание на следующие характеристики: температура, теплоемкость, УФ-облучение, эмиссия газов, ток утечки, способность к инаktivации микроорганизмов, цитотоксичность, возможность детекции продуктов потока в тканях [17, 21].

Стоит отметить, что потоки, полученные методом диэлектрического барьерного разряда, характеризуются большей направленностью, так как локализуются преимущественно в узком канале между двумя параллельными электродами и низким выходом энергии и, соответственно, мощностью, что оказывает слабое повреждающее действие на ткани в отличие от плазмы, полученной другими способами. В настоящее время плазменные аппараты, работающие по такому принципу, наиболее активно применяются в клинике. На 2021 год уже были зарегистрированы и прошли необходимую сертификацию следующие устройства: kINPen® MED (INP Greifswald / neoplas tools GmbH, Грайфсвальд, Германия), APPJ и PlasmaDerm® VU-2010 (CINOGY Technologies GmbH, Duderstadt, Германия), PlasmaCare® - Terraplasma Medical, Гархинг, Германия) SteriPlas (Adtec Ltd., Лондон, Великобритания), PlasmaJet® («Plasma Surgical Ltd.», США) [13, 17].

1.4.2. Горячая плазма (аппарат «Плазон»)

В конце прошлого века активно изучалось влияние высокотемпературных, а позже и низкотемпературных потоков плазмы на биологические ткани [138, 139]. В 1998 г. группой специалистов МГТУ им. Н.Э. Баумана и ММА им. И.М.

Сеченова был разработан «Скальпель-коагулятор-стимулятор воздушно-плазменный СКСВП/NO-01 «Плазон» («ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана», Москва, Россия), который из атмосферного воздуха образует воздушно-плазменный поток, обогащенный оксидом азота, позволяющий осуществлять локальное воздействие путем подведения необходимой концентрации NO к ране (Рисунок 1) [23].

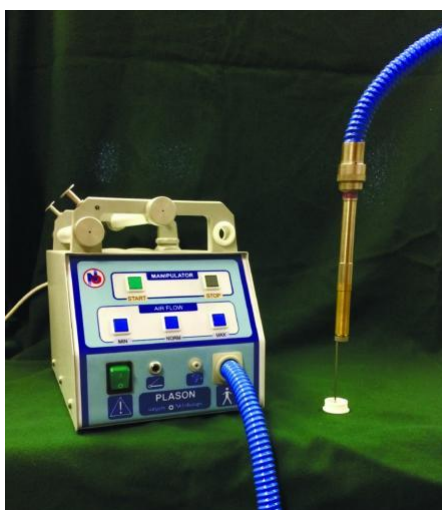


Рисунок 1 – Аппарат Плазон

С 2000 года аппарат поставляется в клиники, амбулатории и частным лицам. Ряд экспериментальных и клинических исследований, проведенных в период 1992-2018 гг., доказал эффективность терапии экзогенным NO у больных с трофическими язвами на фоне хронической венозной и артериальной недостаточности нижних конечностей [140, 141], а также при синдроме диабетической стопы и при гнойно-воспалительных заболеваниях мягких тканей, спортивных травмах, рубцовых изменениях [142-146]. Опыт использования аппарата Плазон в онкологии показал, что интраоперационная обработка в режиме коагуляции обеспечивает абластичность, уменьшает плазмо- и кровопотерю, в режиме терапии уменьшает воспаление, стимулирует заживление ран и не оказывает влияния на развитие местных рецидивов опухоли. При лечении

ранних лучевых осложнений применение NO-содержащего газового потока позволяло продолжать курс лучевой терапии у 88% больных, ускоряло приживание аутотрансплантатов после резекции опухолей и снижало послеоперационные осложнения [147, 148]. Также комбинированное действие воздушной плазмы и экзогенного NO позволило улучшить результаты лечения огнестрельных ран мягких тканей, минно-взрывных ранений и ран с гнойно-инфекционными осложнениями [149]. В работах по применению аппарата Плазон для профилактики инфицирования, уменьшения выраженности воспалительных изменений и стимуляции раневого заживления в гинекологии, офтальмологии, отоларингологии также была показана высокая эффективность проводимой терапии [150-154].

До недавнего времени Плазон был единственным аппаратом, генерирующим оксид азота из атмосферного воздуха. Установлено, что экзогенный NO диффундирует не только через раневую поверхность, но и через неповрежденные кожные покровы, слизистые оболочки и роговицу, что позволяет использовать его при глубоко расположенных поражениях, сосудистой патологии, при хронических воспалительных процессах [4]. Недавно было показано, что газовый поток с температурой 25°C исключает термическое поражение внутренних органов, слизистых и серозных оболочек, ускоряет доставку оксида азота к области и позволяет сократить время экспозиции. В результате расширяется области клинического применения метода NO-терапии аппаратом Плазон [18].

Генерация оксида азота в манипуляторе осуществляется плазмохимическим способом из атмосферного воздуха с использованием термической плазмы слаботочного стационарного дугового разряда постоянного тока. Такой разряд вследствие нагрева в нем воздуха до высоких температур (~3000-4000 К) позволяет получать высокие (до ~5000 ppm) концентрации оксида азота, которых в настоящее время при атмосферном давлении не удается достигать никакими другими типами электрических разрядов [155].

Основными элементами конструкции генератора NO являются коаксиально размещенные в цилиндрическом корпусе (внутренний диаметр 12 мм) принудительно охлаждаемые жидкостью, циркулирующей в замкнутой системе охлаждения аппарата, катод (диаметр 1 мм), стабилизирующий электрод и анод (внутренние диаметры 1.1 и 1.4 мм соответственно). При работе генератора между катодом и анодом горит слаботочная электрическая дуга постоянного тока (~2 А), стабилизированная каналом стабилизирующего электрода. Атмосферный воздух подается в генератор встроенным в аппарат компрессором с возможностью ступенчатого регулирования объемного расхода в диапазоне от 3.0 до 10.0 л/мин, проходит через электрическую дугу и, переходя в плазменное состояние, нагревается до высокой температуры, достаточной для реализации плазмохимической реакцией $N_2+O_2=2NO$. Полученный таким образом горячий NO-содержащий газовый поток через отверстие в аноде поступает в интегрированный с генератором охладитель, затем через выходной канал (диаметр 1.4 мм) формователя выводится в окружающее пространство в виде потока теплого воздуха, содержащего NO и NO₂, образующегося в результате неизбежного окисления в кислородсодержащей среде: $2NO+O_2=2NO_2$ [156].

Геометрические параметры охладителя рассчитаны таким образом, чтобы температура NO-СГП на выходе из канала формователя потока была на уровне 100-150°C. Такая температура необходима для предотвращения процесса полимеризации двуокиси азота, приводящего к образованию четырехокиси азота N₂O₄ – токсического вещества с резким неприятным запахом [157]. Схема плазмохимической генерации оксида азота и формирования NO-СГП реализованная в манипуляторе-генераторе, представлена на рисунке 2 [156].

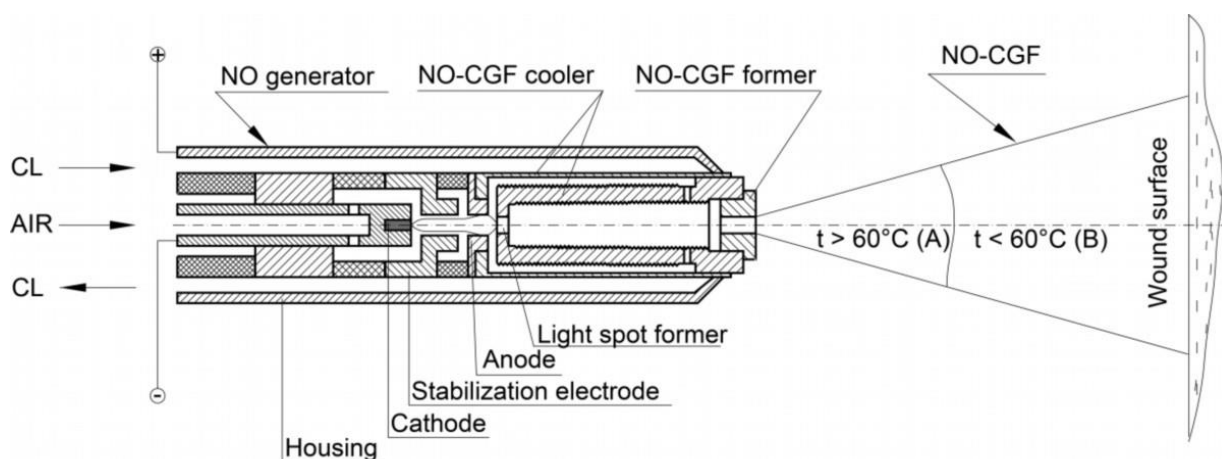


Рисунок 2 – Схема плазмохимической генерации оксида азота в аппарате Плазон. CL-охлаждающая жидкость [156]

1.5. Применение аппарата Плазон в терапии ран

1.5.1. Использование аппарата Плазон для лечения ран

Эффективность применения аппарата «Плазон» при лечении ран была доказана в многочисленных экспериментальных исследованиях, проводимых с использованием модели кожных ран крыс с 1998 года [16, 18, 19, 49, 146]. Было показано, что обработка ран NO-СГП достоверно уменьшала воспаление, ускоряла рост и созревание грануляционной ткани, эпителизацию, ускоряла сроки заживления ран. В клинических работах, проведенных до 2008 г. также неоднократно демонстрировался благоприятный эффект оксида азота, генерированного Плазоном [140, 147, 158-160]. Ларичев А.В. и др. (2011) представили результаты NO-терапии для профилактики раневой инфекции в модели восстановления грыжи. Инсуффляция NO проводилась в предоперационном и раннем послеоперационном периоде. В результате боль, синдромы интоксикации и местная воспалительная реакция были менее выражены и прекратились в течение 2-3 дней в основной группе. Асептика кожи

была достигнута в 92% случаев. В первый день после воздействия NO пролиферация эндотелиоцитов усилилась; к 3-му дню митотическая активность базальных клеток эпидермиса была максимальной. Эти показатели были выше, чем в контрольной группе [161].

Другое исследование описывает применение NO для венэктомии. Инсуффляцию оксида азота через перфорированный катетер проводили в раневой канал после удаления вены и в послеоперационном периоде. В результате пациенты основной группы отмечали меньшую болезненность и припухлость в послеоперационных ранах; рана зажила первичным натяжением на 2-3 дня раньше, чем в контрольной группе [149]. В Сеченовском университете (Москва, Россия) плазменные потоки в режиме коагуляции (SP-CPT, установка PlasmaJet) и NO-СГП в режиме терапии (Плазон) использовались для лечения хирургической инфекции мягких тканей после некрэктомии. В послеоперационном периоде проводились ежедневные сеансы NO-терапии. В результате время заживления обширных гнойных ран было на 6 дней быстрее в данной группе, чем в других [162]. Леднев П.В. и соавторы, 2017 использовали NO-СГП для профилактики и лечения поверхностной инфекции раны грудины у 7 пациентов с кардиохирургией. На последнем этапе операции выполняли паравулярное обдувание из манипулятора Плазона в режиме мягкой стерилизации в течение 2 минут. В послеоперационном периоде NO-терапию шва проводили на расстоянии 10-12 см от раны в течение 4 минут ежедневно. Среднее количество сеансов составило $5,9 \pm 1,1$. После удаления первичного шва раневую поверхность обрабатывали воздушно-плазменным потоком в режиме мягкой стерилизации в течение того же времени. Поверхность раны обрабатывали в режиме строгой стерилизации на расстоянии 5-7 см от манипулятора за 3 минуты до вторичного наложения швов. В результате грануляции были идентифицированы на $3,0 \pm 0,6$ дня после начала лечения, очищение раны и активный рост грануляционной ткани наблюдались на $5,9 \pm 0,7$ дня. Микробная контаминация отсутствовала на 5 сутки после начала лечения. Вторичные швы были наложены на $6,9 \pm 0,7$ дня [163].

1.5.2. Применение аппарата Плазон при лечении трофических язв и диабетической стопы

Клименко И.Г. (2009) сравнивала эффективность применения NO-терапии изолированно и в сочетании с ультразвуковой кавитацией при гнойных заболеваниях мягких тканей с преимущественной локализацией на нижних конечностях. После радикальной хирургической обработки гнойно-некротических очагов площадь ран составляла 1 – 30 см². В обеих опытных группах санация поверхности раны происходила значительно быстрее, а появление грануляций и эпителизация наступала в 1,3 раза раньше, чем в группе сравнения, что сокращало сроки стационарного лечения [164]. Совместное применение данных методов также показало высокую эффективность в стимуляции раневого заживления [165].

Ряд авторов приводят данные успешного применения NO-терапии у пациентов с различными формами синдрома диабетической стопы [143, 144, 166, 167]. Некротически измененные ткани удаляли в режиме коагуляции. После хирургического вмешательства больным проводили обработку газообразным NO. Купирование отека в области раневого дефекта у больных основной группы отмечалось к 5 суткам, в группе сравнения – к 7 суткам ($p < 0,001$), также отмечалось статистически достоверное уменьшение экссудации [144]. В опытной группе при цитологическом исследовании к 4 суткам резко снижалась бактериальная обсемененность, на 5-е сутки в мазках фиксировали единичные микроорганизмы, к 7-м суткам появлялись эпителиальные клетки, макрофаги и фибробласты. Очищение ран начиналось с 7 суток, формирование грануляций завершалось к 14 суткам. При традиционной терапии эти результаты достигались к 25 дню [143].

Больным с трофической язвой на фоне сахарного диабета после 2—3-кратных хирургических обработок язвенного дефекта проводили обработку газовым потоком в режиме щадящей коагуляции с последующей ежедневной

терапией оксида азота из аппарата Плазон. В результате, к 12-14-м суткам формировались условия для свободной аутодермопластики [166].

В работе Сандакова П.Я. и соавт. (2011) приводится описание лечения пациентов с сахарным диабетом и трофическими расстройствами на стопе (язвенными дефектами, флегмоной, остеомиелитом фаланг или головок плюсневых костей, гангреной пальцев или стопы). Раневые дефекты обрабатывали аппаратом Плазон в режиме деструкции в сочетании с хирургическим дебридментом. Далее проводили ежедневную NO-терапию, в случае подведения NO через дренаж терапия длилась 3 суток. Грануляции появлялись на 8—10-е сутки, закрытие язв аутоотрансплантантом, как правило, не требовалось, в отличие от группы сравнения, присоединения вторичной инфекции не отмечалось. Элиминация ниже критического уровня составила 40%, в группе сравнения —13,3% [167].

Таким образом, данная терапия улучшает микроциркуляцию в очаге хронической инфекции, ускоряет процессы грануляции обширных ран и дает возможность в сжатые сроки выполнить реконструктивно-восстановительное оперативное вмешательство.

1.5.3. Использование аппарата Плазон у пациентов с термическими и химическими ожогами

В течение 2-х суток после первичной хирургической обработки ожоговых поверхностей I–IIIa степени проводилась терапия оксидом азота в нормальном и максимальном режимах. С 3-го дня осуществляли стимуляцию регенерации с помощью NO-терапии, курс включал 5 – 10 сеансов. Во всех случаях после процедур отмечались уменьшение болей, быстрая редукция гиперемии и отеков, эпителизация в течение 10–12 дней и значительное снижение образования грубых и деформирующих рубцов [146].

1.5.4. NO-терапия рубцов аппаратом Плазон

Павлович В.А. продемонстрировала, что 19 пациентов с келоидными и гипертрофическими рубцами на лице и шее (с периодами формирования от 2 месяцев до 3 лет) отмечали уменьшение негативных субъективных ощущений в рубце уже через неделю после окончания курса NO-терапии (9-15 сеансов). Значительное уменьшение размеров рубца выявлено у 21 пациента. Применение Плазона качественно изменило структуру рубцов, в частности, снижалась интенсивность окраски, эластичность, плотность, форма рубцов. Частота рецидивов также значительно снижена по сравнению с традиционным лечением. NO-терапия увеличивала процент заживления ран первичным натяжением и снижала частоту недостаточности шва [145, 168].

Василец и др., (2015) использовали NO-терапию в течение 1-3 минут для консервативного лечения 26 пациентов до (10 сеансов) и после хирургического иссечения келоидов лица и шеи (3-5 сеансов). Концентрация NO в потоке газа была установлена на уровне 500 ppm. Обработка обеспечила статистически значимое уменьшение площади рубца и выпуклости, и приобрела более естественную окраску рубца. Исследователи заметили тенденцию к смягчению и расслаблению рубцовой ткани. Раны после рубцовых иссечений зажили у 95% пациентов. Долгосрочное наблюдение показало статистически значимое снижение частоты рецидивов роста келоидов у пациентов, получавших NO-терапию (5% рецидивов против 47% группе без NO-терапии) [146].

Таким образом, клинические данные свидетельствуют об эффективности применения аппарата Плазон в лечении раневых и гнойных процессов, при терапии травматических и рубцовых поражений, в том числе в пластической хирургии и в других областях медицины [145, 146, 158-160, 166-168]. Стоит также отметить широкие возможности комбинации использования NO-СПП с другими методами лечения, в том числе с иммунотерапией, ультразвуковой кавитацией, озонотерапией и различными фармацевтическими средствами [169-171]. Важным

фактором является также возможность работать на аппарате Плазон в двух режимах – коагуляции и NO-терапии.

1.6. Доноры оксида азота

Использование доноров NO является одним из наиболее перспективных и активно развивающихся направлений применения оксида азота, что обусловлено большим многообразием химических соединений, возможностью модифицировать их свойства и включать в состав тканеинженерных конструкций [24, 133, 172]. Среди существующих доноров оксида азота выделяют экзогенные и эндогенные производные.

Диазенийдиоляты (известные как "NONOates") – наиболее обширная группа синтетических доноров оксида азота, которые могут быть получены из аминсодержащих полимеров или при помощи метода деривации S-нитрозо-N-ацетилпенициллина [35]. Они состоят из диолятной группы $[N(O-)N=O]$ и нуклеофильного компонента, который может быть представлен амином или полиамином, связанными через атом азота [32].

NONOates самопроизвольно разрушаются в растворе при физиологических pH и температуре в течение нескольких секунд или нескольких суток, в зависимости от амина, с образованием до 2 моль NO, при этом скорость реакции зависит от структуры нуклеофильного фрагмента, а разрушение комплекса не катализируется тиолами или биологической тканью [33, 39]. Благодаря этим свойствам, данные соединения активно изучаются для стимуляции раневого заживления [34, 35, 172, 173], в том числе при сахарном диабете [174].

На сегодняшний день отсутствуют данные о том, какой из доноров NO является наиболее эффективным для стимуляции раневого заживления. В исследовании Majumder, S. et al, (2014) было показано, что NONOate со спермином в концентрации 10 μ M оказывают наиболее выраженное влияние на ангиогенез и не сопряжены с токсическими поражениями). Эти данные можно

также использовать применительно к раневому заживлению, о чем сообщают сами исследователи [133]. При обработке линейного дефекта шириной 1 мм в культуре клеток EAhy926, различными экзогенными NO донорами (10 мМ). При обработке линейного дефекта шириной 1 мм в культуре клеток EAhy926, различными экзогенными NO донорами (10 мМ) с последующей инкубацией в течение 2 часов наиболее выраженное сближение краев дефекта наблюдали в случае применения Prol-NONOate и MAHMA-NONOate ($p < 0,001$). Данный эффект был обусловлен активацией ими сигнального пути цГМФ в течение первых 30 минут и нитрозированием белков через 4 часа после обработки культур клеток, что фиксировали по увеличению общего уровня нитро-цистеиновых и нитротирозиновых белков ($p < 0,05$). Таким образом, было показано, что доноры NO с более коротким периодом полувыведения способствуют повышению проницаемости сосудов, миграции эндотелиальных клеток и образованию трубчатых структур в основном через цГМФ-зависимые пути, в то время как действие NO доноров с более длительным периодом полураспада (DETA, DPTA) не связано с нитрозированием белков, а опосредовано активацией пролиферации эндотелия через цГМФ-зависимый и независимый пути [133]. Chen et al., 2019 сравнили эффективность экзогенных доноров NO (Spermine NONOate и MAHMA NONOate) и эндогенного донора ДНКЖ в концентрациях 7,8 μM и доказали более выраженное влияние ДНКЖ на скорость пролиферации клеток культуры EAhy926 и скорость миграции клеток в scratch-тесте. В исследованиях *in vivo* на моделях односторонней ишемии задней конечности и полнослойной кожной раны у мышей с генетически детерминированным сахарным диабетом (db+/db+) было доказано, что при введении ДНКЖ в дозе 0,18 мг/кг в хвостовую вену плотность новообразованных сосудов и скорость сокращения площади раны была достоверно выше, чем при лечении животных инъекциями VEGF (0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [24].

Эндогенные доноры оксида азота представляют особый интерес среди существующих молекул, так как помимо непосредственного выделения оксида азота в ткани играют роль сигнальных молекул в регуляции регенерации и метаболизма в тканях. Одними из таких соединений являются S-нитрозотиолы,

которые представляют собой тиозиферы нитритов с общей структурой R-S-N=O. Образование S-нитрозотиолов происходит в результате реакции NO с тиолами в присутствии окислителей (перекиси водорода, кислорода, озона и др.) и является защитным механизмом от окисления диоксида азота до нитритов, которые оказывают повреждающее действие на ткани [174]. Следует отметить, что S-нитрозотиолы представляют собой соединения с собственной функциональной активностью, механизмы, которые высвобождают оксид азота из S-нитрозотиолов, также неясны. S-нитрозотиолы не выделяют самопроизвольно оксид азота, хотя при некоторых обстоятельствах они могут разлагаться или метаболизироваться с образованием оксида азота. Это различие имеет решающее значение для экспериментов, в которых S-нитрозотиолы используются в культуре клеток, в которых образование оксида азота часто предполагается, но не измеряется. Взаимодействуя с железом, S-нитрозотиолы превращаются в основной физиологический донор NO – динитрозильные комплексы железа, содержащие тиольные лиганды [40].

ДНКЖ – достаточно стабильные комплексы, обладающие собственной метаболической активностью. Они могут играть роль «ловушки» свободных радикалов, регуляторов экспрессии генов, апоптоза и метаболизма железа [42, 43].

В физиологических условиях ДНКЖ образуются из относительно низких концентраций эндогенно синтезируемого NO (около 25 нМ/мл) и являются самыми значительными внутриклеточными NO-производными. Интеграция NO в ДНКЖ защищает его от окисления, обеспечивает транспорт и взаимодействие с различными мишенями. Помимо этого, включение NO-молекул в ДНКЖ способствует его окислению до нитрозиниум-иона (NO⁺), которые заменяют протоны в тиольных группах различных тиолсодержащих соединений, что приводит к образованию соответствующих S-нитрозотиолов. Эта модификация тиоловых групп в белках значительно увеличивает реакционную способность этих групп, как с точки зрения их реакций в окислительно-восстановительных процессах, так и с точки зрения связывания с различными биологически активными агентами [45, 175]. Ванин А.Ф. предполагает, что образование ионов

нитрозония происходит преимущественно в результате реакции диспропорционирования, т.е. взаимного одноэлектронного окисления-восстановления, в исходе которой молекулы NO превращаются в катионы нитрозония (NO^+) и анионы нитроксила (NO^-): $2\text{NO} \leftrightarrow \text{NO}^+ + \text{NO}^-$ [176].

ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами могут быть донорами NO или NO^+ как при разложении, так и при установлении химического равновесия между комплексами и их компонентами. Как правило, при распаде комплексов, количество молекул газообразного NO и катионов нитрозония одинаково, однако в некоторых случаях NO^+ могут восстанавливаться до NO. Важно отдельно подчеркнуть роль тиолсодержащих лигандов в химических превращениях ДНКЖ, так как в их отсутствии катионы нитрозония подвергаются гидролизу и превращаются в нитрит-анионы при нейтральных значениях pH [42, 44].

Также ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, способны передавать NO на другую молекулу только в момент перестройки комплекса, которая может происходить при взаимодействии комплекса с более эффективными хелаторами железа, чем исходно входящие в его состав или при понижении pH среды. В результате распада ДНКЖ высвобождаются NO и NO^+ , которые при концентрации более 50 $\mu\text{M}/\text{мл}$ оказывают цитотоксическое действие. Ранее считалось, что данный эффект обусловлен образованием токсического соединения пероксинитрита в реакции NO с супероксидом или при S-нитрозировании белков [175]. Однако позже в экспериментах с дитиокарбонатом было показано, что данный эффект был обусловлен катионами нитрозония [176].

В случае конкуренции таких хелаторов, как цистеин и глутатион или фрагментов апоферментов аденилатциклазы и каспазы, то есть тех ферментов, на активность которых влияет на NO, передача NO-группы на мишень зависит от способности последней разрушить комплекс ДНКЖ. Этим может объясняться специфичность физиологического действия NO [40]. Данный механизм связывания NO с мишенью объясняет причину незначительного содержания нитрита в большинстве живых тканей в норме.

Однако проведенные исследования показали, что при воспалении концентрация NO_2^- и RNNO в крови значительно возрастает, в то время как содержание ДНКЖ пропорционально снижается, а общее количество нитро- и нитрозосоединений остается стабильным. Это позволило предположить, что при воспалении происходит активация лейкоцитов с последующим увеличением содержания в тканях активных форм кислорода, деструкцией ДНКЖ и высвобождением из комплексов оксида азота, а не синтез его *de novo*, как считалось ранее [41, 177]. При полном разрушении ДНКЖ, либо при его взаимодействии с активными формами кислорода, образуется нитрит. Сравнительные исследования содержания различных нитросоединений в норме и при воспалении подтвердили эту гипотезу [40, 41, 178].

В стимулированных макрофагах млекопитающих RAW-264,7 формирование ДНКЖ происходит синхронно с активацией iNOS и является показателем продукции NO. Хелаторы железа полностью ингибируют формирование ДНКЖ как при эндогенной продукции NO, так и при экзогенной обработке клеток NO. Связывание хелатируемого клеточного железа неизменно приводит к ингибированию NO и его донорами регуляторов экспрессии генов ДНК-репарационных процессов в бактериальной клетке [179].

Экзогенные низкомолекулярные ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, легко синтезируются химическим путем и могут быть представлены моноядерной (М-ДНКЖ) или биядерной формой (В-ДНКЖ), которая образуется в организме млекопитающих в результате связывания двух железо-динитрозильных $[\text{Fe}_2(\text{NO})_2]$ фрагментов ДНКЖ с мостиковыми тиоловыми атомами серы $[(\text{RS})_2\text{Fe}_2(\text{NO})_4]$. При этом происходит спаривание спинов атомов железа, что делает невозможным выявление В-ДНКЖ методом электронно-парамагнитного резонанса [180].

Опубликованные ранее работы свидетельствуют о благоприятном влиянии ДНКЖ на раневое заживление [24, 27, 181, 182]. Тем не менее, внутривенное введение препарата для лечения раневых процессов не является оправданным ввиду непредсказуемости побочных эффектов и сложно прогнозируемой кинетики, а описанный способ локальной доставки, заключающийся в

обкалывании дна раны не является оптимальным, так как способствует избыточной травматизации и гидратизации тканей ран.

Ввиду этого создание простой, доступной и удобной в использовании формы доставки ДНКЖ в течение многих лет составляло актуальную задачу на пути к использованию данного донора NO в клинической практике. Shekhter et al., 2015 синтезировали скаффолд на основе коллагена, содержащий 4 μ M ДНКЖ с глутатионовым лигандом, который способствовал более полной регенерации ран и полной эпителизации на 4 суток раньше по сравнению с самопроизвольно заживающей раной [27]. В этой работе описывается, что в эксперименте воспалительные изменения были выражены слабее, а грануляционная ткань быстрее созревала, чем в контроле.

Таким образом, оксид азота – молекула с широким спектром действия, эффекты которой зависят от ее локализации и концентрации и регулируются сложными молекулярными каскадами. Открытие комплексных эффектов оксида азота стало предпосылкой для создания такого направления, как NO-терапия.

На сегодняшний день существует несколько способов доставки оксида азота в раны, однако в нашей стране наиболее популярным является применение аппарата «Плазон». Тем не менее, несмотря на широкое использование этого аппарата, оптимальные параметры NO-СГП для стимуляции регенерации в асептической ране отсутствуют. Альтернативным способом доставки оксида азота в ткани является применение соединений-доноров. ДНКЖ – эндогенный донор оксида азота и ионов нитрозония; он является естественным депо NO в организме и может оказывать комплексные эффекты ввиду особенностей химического строения. Эффективность применения ДНКЖ для стимуляции регенерации ран ранее была показана, однако оптимальная доза не была определена. Отсутствие удобной формы доставки ДНКЖ также создает трудности при регистрации этого соединения в качестве лекарственного средства.

Поиск оптимальных способов доставки оксида азота в ткани, определение наиболее эффективных доз и параметров их применения являются актуальной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. NO-содержащий газовый поток

В исследованиях использовался серийный образец аппарата ПЛАЗОН заводской номер 450, произведенный ЦВТМ при МГТУ имени Н.Э. Баумана” (Москва, Россия) в январе 2019 года, и снабженный экспериментальным манипулятором. Аппарат разработан сотрудниками МГТУ им. Н.Э. Баумана Пекшевым А.В. и Вагаповым А.Б. Манипулятор является источником оксида азота и формирователем NO-содержащего газового потока и предназначен исключительно для проведения биологических и медицинских исследований.

Для измерений радиальных и осевых значений локальных параметров NO-СГП использовался газоанализатор OPTIMA 7 производства компании MRU GmbH (Obereisesheim, Germany), позволяющий измерять в газовом потоке его температуру T в диапазоне 0-65 °С (погрешность 1%), дифференциальное давление (скоростной напор) P в диапазоне ± 100 кПа (погрешность 1%), содержание оксида азота C_{NO} и двуокиси азота C_{NO_2} в диапазоне 0-5000 ppm и 0-1000 ppm соответственно с погрешностью измерения 5%. Измерения проводились при объемном расходе воздуха $G=6$ л/мин в каждом сечении потока при расстоянии от выходного канала манипулятора l в диапазоне от 20 мм до 120 мм с шагом 20 мм, а в радиальном направлении – при расстояниях от оси потока r в диапазоне от -30 мм до +30 (+R) мм с шагом 1 мм, т.к. вне диаметра потока 60 мм значение параметров P , C_{NO} и C_{NO_2} равны нулю. Скорость воздушного потока v рассчитывалась по измеренным значениям температуры потока t и дифференциального давления P по формуле (1).

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot P}{\rho_{air}(t)}} \quad (1)$$

где $\rho_{air}(t)$ - плотность воздуха при температуре газового потока t .

Массовый расход оксида азота \dot{m}_{NO} через каждое сечение NO-СГП, в котором проводились измерения его локальных параметров, определялся методом численного интегрирования (методом трапеций) согласно формуле (2).

$$\dot{m}_{NO} = \pi \int_{-R}^R q_{NO} \cdot r \cdot dr \quad (2),$$

где $q_{NO} = \rho_{NO}(t) \cdot C_{NO} \cdot v$ - плотность массового расхода оксида азота, а $\rho_{NO}(t)$ - плотность оксида азота при температуре газового потока t . Аналогично в соответствии с описанным выше алгоритмом по измеренным значениям C_{NO_2} определялся массовый расход двуокиси азота \dot{m}_{NO_2} .

2.2. Спреи с ДНКЖ

Газообразный NO получали реакцией ферросульфата (Fluka, Buchs, Швейцария) с нитритом натрия (Sigma, St. Louis, США) в 0,1 М HCl с последующей очисткой путем низкотемпературной сублимации в вакуумированной стеклянной системе. Б-ДНКЖ получали в реакции Fe^{2+} с глутатионом (Sigma, St. Louis, США) и газообразным NO при давлении 150 мм.рт.ст. при молярном соотношении Fe^{2+} : GSH 1: 3 в аппарате Тунберга, как описано в [182]. После растворения сульфата двухвалентного железа (0,5 мл) в дистиллированной воде и добавления раствора глутатиона (Sigma, St. Louis, США) в объеме 4,5 мл в 15 мМ HEPES буфер с pH 7,4 в верхнюю и нижнюю камеры аппарата Тунберга, из трубки откачивали воздух и добавляли газообразный NO. Растворы смешивали в аппарате в присутствии NO и встряхивали в течение 5 мин, после чего NO удаляли из аппарата.

Концентрацию Б-ДНКЖ определяли по количеству железа (5 мМ), использованного для синтеза комплексов. Также концентрацию полученного Б-ДНКЖ определяли оптическим методом по интенсивности характеристических полос поглощения при 310 и 360 нм с коэффициентами экстинкции, равными 4600 и 3700 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (в расчете на одного атома железа на динитрозильный фрагмент Б-ДНКЖ) [183]. Оптические измерения проводили на

спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu Europa GmbH, Германия) в плоской кварцевой кювете с оптическим путем 10 мм. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Растворы были приготовлены путем растворения лиофилизированного порошка ДНКЖ с глутатионом в стерильном PBS при комнатной температуре. Концентрации растворов составляли 0,00001 г/л, 0,00005 г/л, 0,0001 г/л, чтобы при однократном распылении доза ДНКЖ в ране животных, площадью 3 см², составляла 10, 50 и 100 мкг соответственно. Стабильность концентраций при распылении проверяли 10 раз. Таким образом, при орошении раны с расстояния 1 см от поверхности раны на 1 см² приходилось 3,33 мкг, 16,6 мкг, и 33,3 мкг активного вещества. Растворы известных концентраций разливали по 4-м пластиковым флаконам с распылителем объемом 50 мл (BX202005C, Ningbo Weixuan International Trading Co., Ltd) и хранили при -70° С до использования. Один образец спрея каждой концентрации ДНКЖ использовали для анализов *in vitro*, которые повторяли десятикратно.

Для оценки способности к распылению растворы ДНКЖ окрашивали метиленовым синим. Флаконы с распылителями закрепляли на штативе под углом 45° на расстоянии 10 см от бумаги. Каждое 4-е распыление направляли на бумагу, после чего оценивали максимальный (D_{max}) и минимальный (D_{min}) диаметры полученного рисунка для расчета коэффициента овальности (овальности) по следующей формуле: Овальность = D_{max} / D_{min}. Эксперимент повторяли 5 раз для всех концентраций спрея. Используя тефлоновое кольцо с фиксированным внутренним диаметром 19,5 мм и окрашенные спреи с ДНКЖ, были определены оптимальное расстояние и угол для распыления всей дозы на область раны.

Для оценки стабильности дозировки в единичном распыляемом объеме растворы распыляли на чашку Петри диаметром 5 см под углом 45° с расстояния 10 см. Затем дозу сушили и взвешивали. Эксперимент повторяли 10 раз [184].

Оценка деградации раствора с массовой долей ДНКЖ 100 мкг в *in vitro* условиях проводилась с помощью Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, США) на длине волны 310 нм при 37°С [185].

2.3. Особенности эксперимента на животных

2.3.1. Дизайн эксперимента

Содержание животных. В исследовании были использованы крысы Вистар (Филиал «Андреевка» ФГБУН "НЦБМТ" ФМБА России). Животные содержались в стандартных условиях Центрального вивария «ФГАОУ ВО Минздрава РФ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет)» в соответствии с ГОСТ №33215-2014 от 09 ноября 2015 г, «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными, правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

В качестве подстилки использовали мелкую стружку из экологически чистой древесины лиственных пород (ТУ 5313-001-1897639-92). Крысы имели свободный доступ к корму и воде. В состав корма в дополнение к стандартному гранулированному корму для грызунов (комбикорм полнорационный экструдированный для лабораторных животных – мышей, крыс, хомяков; стандарт РООС ПР98 В01220, удостоверение о качестве от 10.07.08), входили сырая морковь, капуста, отварное мясо. Световой день составлял 12 часов (с 7:00 до 19:00). Освещенность в светлый период цикла составляла 70-90 лкс. Температура в помещении постоянного содержания была 22°C.

Все манипуляции с животными проводили с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными, руководствуясь принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (ETS 123, Страсбург, 1986) и директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/EU, Страсбург, 2010). На проведение эксперимента было получено разрешение локального этического комитета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (протокол № 15-19 от 25.11.2019).

Расчет выборки. Расчет выборки для независимых групп проводился в онлайн-калькуляторе *clincalc* на основании данных о средних значениях и стандартных отклонениях толщины слоя грануляционной ткани в ранах животных контрольных и экспериментальных групп на 4-е сутки, которые были получены в результате пилотных экспериментов. Мощность исследования была определена как 80%, уровень достоверности составлял 99% ($\alpha=0,01$) для исследований раневого заживления на модели полнослойной кожной раны в условиях нормогликемии и 95% ($\alpha=0,05$) для экспериментов на модели полнослойной кожной раны в условиях стрептозотоцин индуцированного сахарного диабета. В результате, для получения статистически достоверных результатов в основных экспериментах было необходимо по 5 животных в каждой группе.

Операции на животных. В качестве экспериментальной модели была использована полнослойная плоская кожная рана. Животным проводили анестезию путем внутримышечного введения раствора ZOLETIL 100 (VIRBAC, Франция) в дозе 6 мг активного ингредиента на 1 кг массы тела животного. В межлопаточном пространстве иссекали круг диаметром 8–10 мм глубиной до собственной фасции. Тефлоновое муфтовое кольцо с внутренним диаметром 19,5 мм, имплантировали в образовавшийся дефект, после чего наружный диаметр кольца закрывали перфорированной полиэтиленовой пленкой для предотвращения высыхания, внешнего загрязнения и сокращения раны (Рисунок 3). Раны всех животных были стандартной площади размером 3 см².

Обработка кожных ран. Экспериментальная работа включала в себя 2 основных направления: определение эффективности применения NO-содержащих газовых потоков и ДНКЖ с глутатионовым лигандом на раневое заживление в условиях нормогликемии и в условиях сахарного диабета, индуцированного стрептозотоцином. Общее количество животных, использованных в экспериментальной работе, составило 223 особи (по 24 в каждом пилотном эксперименте, 100 в эксперименте по определению наиболее эффективного способа доставки оксида азота в условиях нормогликемии и 75 в эксперименте по

определению наиболее эффективного способа доставки оксида азота при сахарном диабете).



Рисунок 3 – Модель кожной раны

С целью определения оптимальных параметров NO-терапии для стимуляции регенерации, были проведены пилотные эксперименты с использованием нескольких режимов NO-содержащего газового потока и доз ДНКЖ с контрольной точкой 4 суток. В каждом из них было 24 животных, которые были поровну распределены на 4 группы: 3 экспериментальные и 1 контрольная.

На 1, 2, 3 дни после операции, животным вводили раствор ZOLETIL 100 (VIRBAC, Франция) в дозе 3 мг активного ингредиента на 1 кг массы тела животного с целью седации, с поверхности кольца удаляли защитную пленку, оценивали состояние ран по признакам воспаления: отек, гиперемия, экссудация, инфильтрация окружающих тканей и проводили обработку дна ран.

В пилотном эксперименте с NO-содержащими газовыми потоками, поверхности ран животных экспериментальных групп обдували NO-СГП

круговыми движениями на расстоянии 80 мм от выходного канала манипулятора в течение 60, 120, 360 секунд. В качестве контроля использовали поток теплого атмосферного воздуха.

В серии экспериментов с ДНКЖ в контрольной группе на дно ран распыляли дистиллированную воду, в экспериментальных группах – размороженный раствор, содержащий соответственно 10, 50 и 100 мкг ДНКЖ. После каждой процедуры раны снова закрывали перфорированной полиэтиленовой пленкой. На 4-й день после нанесения раны животным удаляли тefлоновое кольцо и оставляли раны для самопроизвольного заживания. Подробный план экспериментальной работы наглядно представлен на рисунке 4.

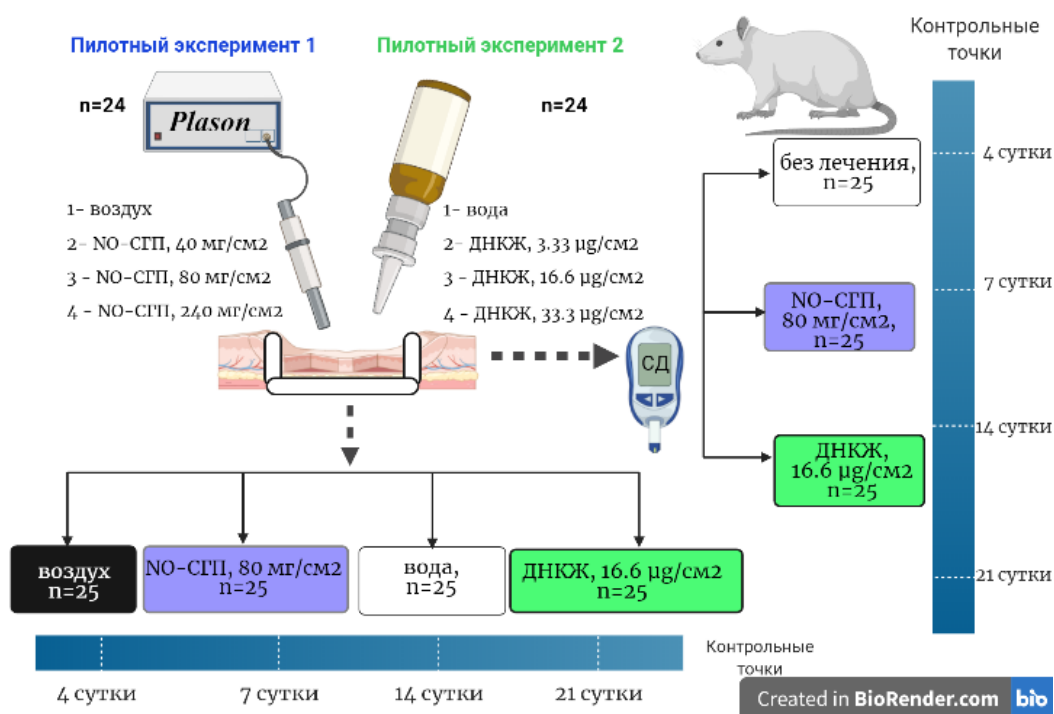


Рисунок 4 – Схема эксперимента

Вторым шагом, после определения оптимальных параметров NO-терапии, было сформировано 2 группы: животные с нормогликемией (группа 1) и со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом (группа 2). В первой группе

было 4 подгруппы: контрольная 1 (воздух), экспериментальная 1 (NO-СГП с оптимальными параметрами), контрольная 2 (вода) и экспериментальная 2 (размороженный раствор ДНКЖ в оптимальной дозе). Во второй группе было 3 подгруппы, контрольная (без лечения), экспериментальная 1 (NO-СГП с оптимальными параметрами) и экспериментальная 2 (раствор ДНКЖ в оптимальной дозе). Каждая из указанных подгрупп включала 5 животных. Контрольные точки были определены как 4, 7, 14, 21 сутки.

2.3.2. Моделирование сахарного диабета раствором стрептозотоцина

Технология приготовления. Порошок стрептозотоцина в расчете 0,006 г на 100 г животного (Sigma-Aldrich, США), растворяли в свежеприготовленном натриевом цитратном буфере с pH 4,2. Для приготовления раствора цитратного буфера с pH 4,2 смешивали 10,2 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты (Sigma-Aldrich, США) (0,4 г моногидрата лимонной кислоты, растворенные в 20 мл дистиллированной воды) и 9 мл 0,1 М раствора тринатриевой соли лимонной кислоты (Sigma-Aldrich, США) (содержит 0,5г дигидрата тринатриевой соли, растворенные в 20 мл дистиллированной воды). pH получившегося раствора проверяли pH-метром (HI HI 2210-02, Hanna Instruments, Италия) [184, 186].

Экспериментальная модель. Свежеприготовленный раствор стрептозотоцина вводили животным интраперитонеально после 24-часового голодания. Предварительно всем крысам проводили анестезию путем внутримышечной инъекции раствора ZOLETIL 100 (VIRBAC, Франция) в дозе 4 мг активного ингредиента на 1 кг массы тела животного [184, 187]. Уровень глюкозы в капиллярной крови из передней лапы каждого животного определяли глюкометром Accu-Chek Active (Roche Diagnostics, Швейцария) каждые 2 дня, начиная со 2 суток после моделирования сахарного диабета.

Биохимический анализ крови. Образцы капиллярной крови животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом в объеме 2 мл, забирали из

передней лапы в исходной точке, на 4-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки после операции и центрифугировали в аппарате DLAB DM0412 (Dixion, Россия) в течение 30 секунд при скорости 600 об/мин. Фракционированные образцы помещали в биохимический экспресс-анализатор Dri Chem NX500 i (Fujifilm, Япония) и добавляли слайды для определения альбумина, глюкозы, креатинина, мочевины, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) (FUJI DRI-CHEM SLIDE, Япония).

2.3.3. Оценка раневого заживления

Определение площади ран. На 7-е, 14-е, 21-е сутки от начала эксперимента раны животных, обводили по контуру перманентным маркером на полиэтиленовой плотной пленке. Далее к образцам прикладывали стандартную линейку и переводили их в цифровой вид. Измерение площади ран проводилось в микрометрах с использованием программы Leica Application Suite, version 4.9.0 (Build 129, Швейцария), полученные значения пересчитывались в см², используя линейный масштабный отрезок.

Изготовление мазков. На 3-и и 4-е сутки после операции раневой экссудат забирали шприцом и наносили на предварительно обезжиренное и прокаленное в пламени горелки предметное стекло и равномерно распределяли его по поверхности при помощи другого подготовленного предметного стекла. После этого стекла помещали в ламинарный шкаф для просушки.

Анализ мазков. Мазки окрашивали по Романовскому-Гимзе («БиоВитрум», Россия). Подсчет количества нейтрофилов и макрофагов в мазках производили с использованием микроскопа LEICA DM4000 B LED (Leica Microsystems, Германия) в 10 полях зрения при увеличении 400х.

Гистологический анализ. Животных выводили из эксперимента в сроки, обозначенные в планах соответствующих экспериментов (4-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки), ткани раны забирали для последующего гистологического исследования.

Биологический материал фиксировали в нейтральном 10 процентном формалине и заливали парафином. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия), пикросириусом красным («БиоВитрум», Россия), толуидиновым синим («БиоВитрум», Россия) и по Маллори («БиоВитрум», Россия). Полученные микроскопические препараты исследовали с использованием универсального микроскопа LEICA DM4000 В LED (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой видеокамерой LEICA DFC7000 Т (Leica Microsystems, Германия). Была проведена стандартная световая и фазово-контрастная микроскопия. Срезы, окрашенные пикросириусом красным, исследовали в режиме поляризационной микроскопии.

Морфометрический анализ гистологических препаратов. Проводился полуколичественный (балльный анализ) и количественный анализ полученных гистологических препаратов. В каждом срезе оценивались признаки воспаления (экссудация, наличие бактериальных колоний, воспалительная инфильтрация, нарушения микроциркуляции) и регенерации (неоангиогенез, пролиферация фибробластов, объем и зрелость грануляционной ткани) по 5-балльной шкале (0 – отсутствие, 4 – максимальная степень выраженности). Выраженность фиброзной ткани оценивалась по данной шкале, начиная с 7-х суток.

Измерение толщины фибринозно-лейкоцитарного слоя и слоя грануляционной ткани проводили в 5 произвольных точках каждого препарата с использованием Leica Application Suite, version 4.9.0 (Build 129, Switzerland).

Оценку активности тучных клеток производили в основных экспериментах по сравнению эффективности применения NO-СГП и ДНКЖ на сроках 4-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки. Для этого срезы окрашивали толуидиновым синим и подсчитывали клетки в 10 полях зрения при увеличении 400х. Для определения функциональной активности тучных клеток использовали формулу (3).

$$X = ((T0 \times 0) + (T1 \times 1) + (T2 \times 2) + (T3 \times 3)) / n \quad (3),$$

где X – индекс функциональной активности, T0 – клетки с отдельно различимыми гранулами и не полностью замаскированным ядром, T1 – тучные клетки с единичными гранулами внутри и рассеянными гранулами вокруг клетки,

T2 – клетки с отчетливым ядром, хорошо различимыми гранулами внутри и вокруг клетки, T3 – опустошенные тучные клетки с единичными гранулами внутри и рассеянными гранулами вокруг, n-общее число клеток [188].

Иммуногистохимическое исследование. При иммуногистохимическом исследовании (ИГХ) использовали набор антител (Таблица 1).

Таблица 1 – Антитела, используемые для иммуногистохимического исследования

Название	Разведение	Производитель, артикул
α -SMA	1:400	ab 5694, Abcam, Великобритания
Виментин	1:400	Ab 92547, Abcam, Великобритания
NF- κ B	1:200	ab 16502, Abcam, Великобритания
iNOS	1:200	PA1-036, Invitrogen, США

Виментин определялся в качестве маркера клеток мезенхимального происхождения в ране, α -гладкомышечный актин (α -SMA) – маркера миофибробластов. Также изучалась экспрессия фермента, участвующего в синтезе оксида азота в ране – iNOS и регулирующего белка NF- κ B. Образцы тканей для ИГХ исследований фиксировали в 10%-ном забуференном формалине (pH - 7,2) и заливали парафином. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм наносили на полилизинные стекла, проводили по батарее спиртов и ксилолов, троекратно помещали в PBS-буфер на 5 минут. Затем срезы переносили в раствор 5% раствор Trilogy 20x (Cell Marque) и помещали в термостат на 30 минут при температуре 80°C. Далее стекла промывали в PBS-буфере в течение 5 минут и переносили их в 3% раствор перекиси водорода на 30 минут. Далее на срезы двукратно наносили 150 мкл PBST на 5 минут. Остатки раствора удаляли путем стряхивания, на стекла наносили 150 μ л раствора UltraVision Protein Block (PBQ160415, ThermoFisher Scientific, США) на 15 минут, после чего добавляли первичные антитела в разведениях, представленные в таблице и оставляли срезы на ночь при температуре 4°C. На следующий день стекла троекратно промывали 150 μ л

раствора PBST и добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (31464, ThermoFisher Scientific, США), которые оставляли на 30 минут. Далее срезы снова троератно промывали 150 μ л раствора PBST и наносили на них диаминобензидин (34002, ThermoFisher Scientific, США) разведенный в пероксидажном буфере (34062, ThermoFisher Scientific, США) на 1 минуту. На заключительном этапе препараты докрашивали гематоксилином (Биовитрум, Россия) в течение 1 минуты, промывали в дистиллированной воде 5 минут, проводили через спирт 96° (3 ёмкости по 5 минут), ксилол (3 ёмкости по 5 минут), заключали в полистирол под покровные стёкла.

Результаты оценивали в 5 полях зрения каждого препарата на увеличении $\times 400$ по формуле 4:

$$\text{ИЭ} = (\text{Положительные клетки} / \text{Общее количество клеток}) \times \text{ИМ}, \quad (4)$$

где ИЭ – индекс экспрессии маркера, и ИМ – интенсивность метки.

Интенсивность метки (ИМ) оценивали полуколичественным методом: при негативной («0» - нет реакции), слабopозитивной («1» – бледно-коричневое окрашивание в единичных клетках), умеренной («2» – коричневое окрашивание менее, чем в 50% клеток) и выраженной («3» – темно-коричневое окрашивание более, чем в 50% клеток) реакции.

Оценка экспрессии iNOS и NF- κ B проводилась отдельно в макрофагах и фибробластах. Известно, что роль NF- κ B зависит от локализации этого маркера в клетке [189]. Поэтому активность этого маркера (A) рассчитывали по формуле (5):

$$A = X1/X2, \quad (5)$$

где X1 – индекс экспрессии маркера в ядре, X2 – индекс экспрессии маркера в цитоплазме.

Для оценки содержания виментина и α -SMA в клетках проводилась сегментация положительно окрашенных клеток на изображениях участков грануляционной ткани, сделанных при 400-кратном увеличении. Для этого применяли программу ilastik (версия 1.3.3), использующую машинное обучение, в которой проводили ручную маркировку пикселей по следующим классам: положительно окрашенные клетки (клетки, содержащие в ядре и/или цитоплазме

коричневые гранулы), другие (клетки, окрашенные гематоксилином и эозином) и фоновое окрашивание (в основном белые пиксели или межклеточный матрикс).

Трансмиссионная электронная микроскопия. Биологический материал фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом (Pan Real, Испания) в смеси с 2% формальдегидом (MP Biomedicals, Франция) на 0,1 М PBS (Amresco, США; pH 7,2-7,4) в течение 18-20 часов при +4 °С. Затем обрабатывали 1%-ной OsO₄ в течение 2 часов, контрастировали 70%-ным спиртом в смеси с 2% уранилацетатом в течение ночи, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, потом заливали в смесь эпоксидных смол (Эпон 812, Fluka, Германия). Для ориентировки материала изготавливали полутонкие срезы (толщиной 1-2 мкм) на пиромикротоме (ЛКВ, Швеция), окрашивали 1%-ным водным раствором метиленового синего. Для электронно-микроскопического исследования выбирали участки грануляционной ткани. Ультратонкие поперечные срезы дополнительно контрастировали 2%-м уранилацетатом (на 70% спирте) (10-15 минут), а затем лимоннокислым свинцом по Рейнольдсу (15 мин) и просматривали на микроскопах JEM-100B или JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 8000x, 15000x и 25000x.

Статистический анализ. Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием стандартного пакета программы GraphPad Prism, версия 8.00 для Windows (GraphPad Software, Inc). Для определения распределения полученных данных использовался Shapiro-Wilk's тест. В пилотных экспериментах межгрупповые различия нормально распределенных данных анализировали с применением однофакторного ANOVA теста с поправкой Tukey. Для анализа данных балльной оценки использовали тест Kruskal-Wallis с поправкой Dunn. В основной серии экспериментов межгрупповые различия анализировали с применением двухфакторного ANOVA теста с поправкой Tukey. Результаты статистической обработки данных были представлены в виде столбчатых диаграмм с указанием среднего арифметического и стандартного отклонения для количественных данных или медианы с 95% доверительным интервалом.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Результаты пилотного эксперимента по определению наиболее эффективной дозы NO-СГП для стимуляции раневого заживления

3.1.1. Параметры NO-содержащего газового потока

Рисунок 5 иллюстрирует результаты экспериментального расчета физико-химических параметров NO-содержащего газового потока, генерируемого манипулятором аппарата «Плазон» (температура, скорость, содержание оксида азота и диоксида азота, массовый расход NO и NO₂) в зависимости от расстояния от выходного канала формователя потока до ткани. Эти данные позволяют определить, что пригодная для обработки тканей область NO-содержащего газового потока находится на расстоянии более 40 мм от выходного канала манипулятора.

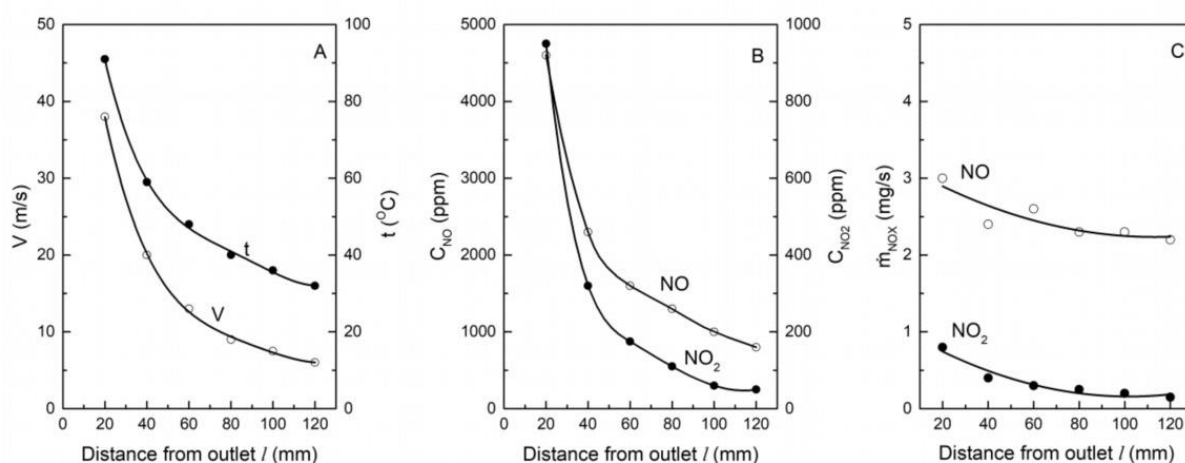


Рисунок 5 – Распределение скорости и температуры (справа), концентраций (в центре) и массовой дозы оксида и диоксида азота (слева) в зависимости от расстояния от манипулятора до объекта (ось ординат) [157]

Для экспериментов было выбрано расстояние от манипулятора до раневой поверхности 80 мм, поскольку на этом расстоянии осевые значения физико-химических параметров были близки к значениям параметров NO-СГП, использованным в одном из ранее проведенных исследований [150]. При этом NO-СГП характеризовался следующими параметрами: $t=39^{\circ}\text{C}$, $v=9$ м/сек, $C_{\text{NO}}=1340$ ppm, $C_{\text{NO}_2}=108$ ppm, расход NO 2.3 мг/сек, NO_2 – 0.2 мг/сек.

Радиальное распределение физико-химических параметров NO-СГП на расстоянии 80 мм от выходного канала манипулятора до ткани раны с внутренним диаметром 19.5 мм показано на рисунке 6.

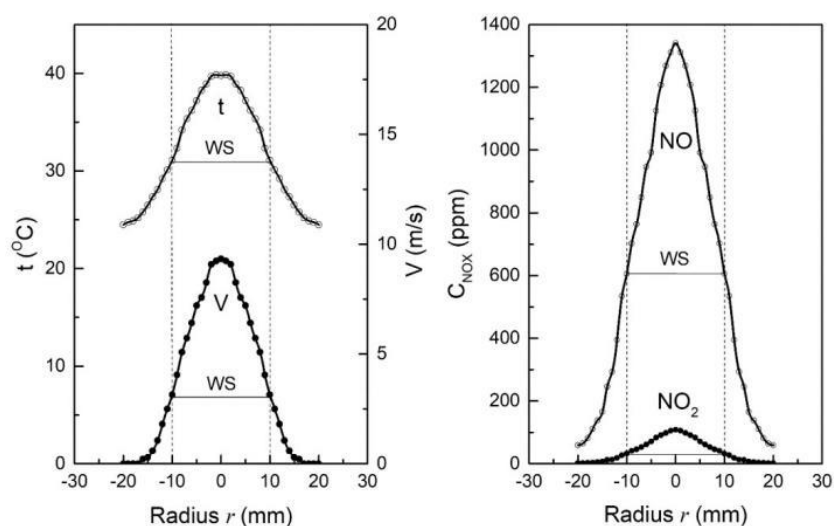


Рисунок 6 – Радиальное распределение физико-химических параметров NO-СГП в зоне воздействия на экспериментальную рану, $l = 80$ мм, WS - поверхность раны [157]

Массовый расход оксида азота на поверхности раны внутри тефлонового кольца определялся значениями локальных параметров NO-СГП как $\dot{m}_{\text{NO}} = \pi \int_{-10}^{10} \rho_{\text{NO}}(t) \cdot C_{\text{NO}} \cdot v \cdot r \cdot dr$ и составлял $\dot{m}_{\text{NO}}=2.0$ мг/сек.

На основании полного и детального экспериментально-расчетного исследования физико-химических параметров NO-СГП, было продемонстрировано, что с расстояния 80 мм в области воздействия на ткань

поток характеризуется следующими осевыми параметрами: температура 39 °С, скорость ~9 м/с, содержание оксида азота 1340 ppm, двуокиси азота 108 ppm; расход оксида азота в потоке ~2.3 мг/с, двуокиси азота ~0.2 мг/с.

Таким образом, в зависимости от времени экспозиции массовая доза оксида азота, доставляемого в рану, была различной, что отражено в таблице 2.

Таблица 2 – Массовая доза оксида азота в экспериментальных группах пилотного эксперимента

Группа	Массовая доза оксида азота, подведенная	
	Ко всей ране (мг)	К 1 см ² раны (мг/см ²)
Контроль (воздух)	0	0
Группа 1 (60 сек)	120	40
Группа 2 (120 сек)	240	80
Группа 3 (360 сек)	720	240

3.1.2. Определение наиболее эффективных параметров NO-СГП для стимуляции раневого заживления

Макроскопическое описание. На следующий день после операции общее состояние животных было удовлетворительным. В области раны определялся незначительный отек. Дно раны с гладкой блестящей поверхностью было покрыто небольшим количеством серозного экссудата. В последующие дни у животных контрольной группы сохранялся перифокальный отек, слой фибрина становился толще, особенно по краям. В полости кольца находился серозный экссудат объемом 0,4-0,7 мл.

К 4-м суткам в контрольной группе и группе 60 секунд на дне раны обнаруживалось умеренное количество мутного экссудата и рыхлые наложения фибрина. У животных, раны которых обрабатывали в течение 120 и 360 секунд, наблюдалось высыхание и гиперемия дна раны, уплотнение слоя фибрина по краям раневого дефекта.

Гистологическое исследование. В контрольной группе, в отличие от экспериментальных, дно ран было покрыто более толстым слоем фибрина с признаками бактериальной контаминации. Воспалительная инфильтрация была умеренной и определялась преимущественно в глубоких слоях раны, в сосудах наблюдались стаз и сладж эритроцитов, диапедезные кровоизлияния. Грануляционная ткань была представлена островками хаотично расположенных незрелых фибробластов с немногочисленными капиллярами. При фазово-контрастной микроскопии выявлялась сеть тонких волокон, в основном фибриновых. При поляризационной микроскопии анизотропия практически не определялась (Рисунок 7).

В группе, где длительность обдувания NO-СГП была 60 секунд, фибринозно-лейкоцитарный слой был тоньше, чем в контроле. В очагах незрелой грануляционной ткани определялся отек, увеличенное количество макрофагов и лимфоцитов, слабая пролиферация фибробластов. Коллагеновые волокна были тонкие, что отмечалось при фазово-контрастной микроскопии. При поляризационной микроскопии только часть этих волокон были анизотропны (незрелые коллагеновые волокна) (Рисунок 7).

Толщина слоя грануляционной ткани была максимальной в группе, где раны обдували NO-СГП в течение 120 секунд. Ткань состояла из интенсивно пролиферирующих, продольно ориентированных фибробластов и новообразованных полнокровных капилляров. Она активно прорастала подкожно-жировую клетчатку.

При фазово-контрастной микроскопии выявлялись различные по зрелости участки грануляционной ткани. В одних – грануляционная ткань была относительно зрелая, она содержала параллельно и продольно расположенные коллагеновые волокна под фибринозно-лейкоцитарным слоем. При поляризационной микроскопии в этом участке преобладала анизотропия красного цвета (коллаген I типа) с небольшими участками волокон, окрашенных в желтый цвет (Рисунок 7). В других, менее зрелых, участках, очаги грануляционной ткани характеризовались многочисленными хаотично расположенными коллагеновыми

волокнами, при поляризационной микроскопии количество волокон красного и зелено-желтого цвета (коллаген III типа) было примерно одинаково.

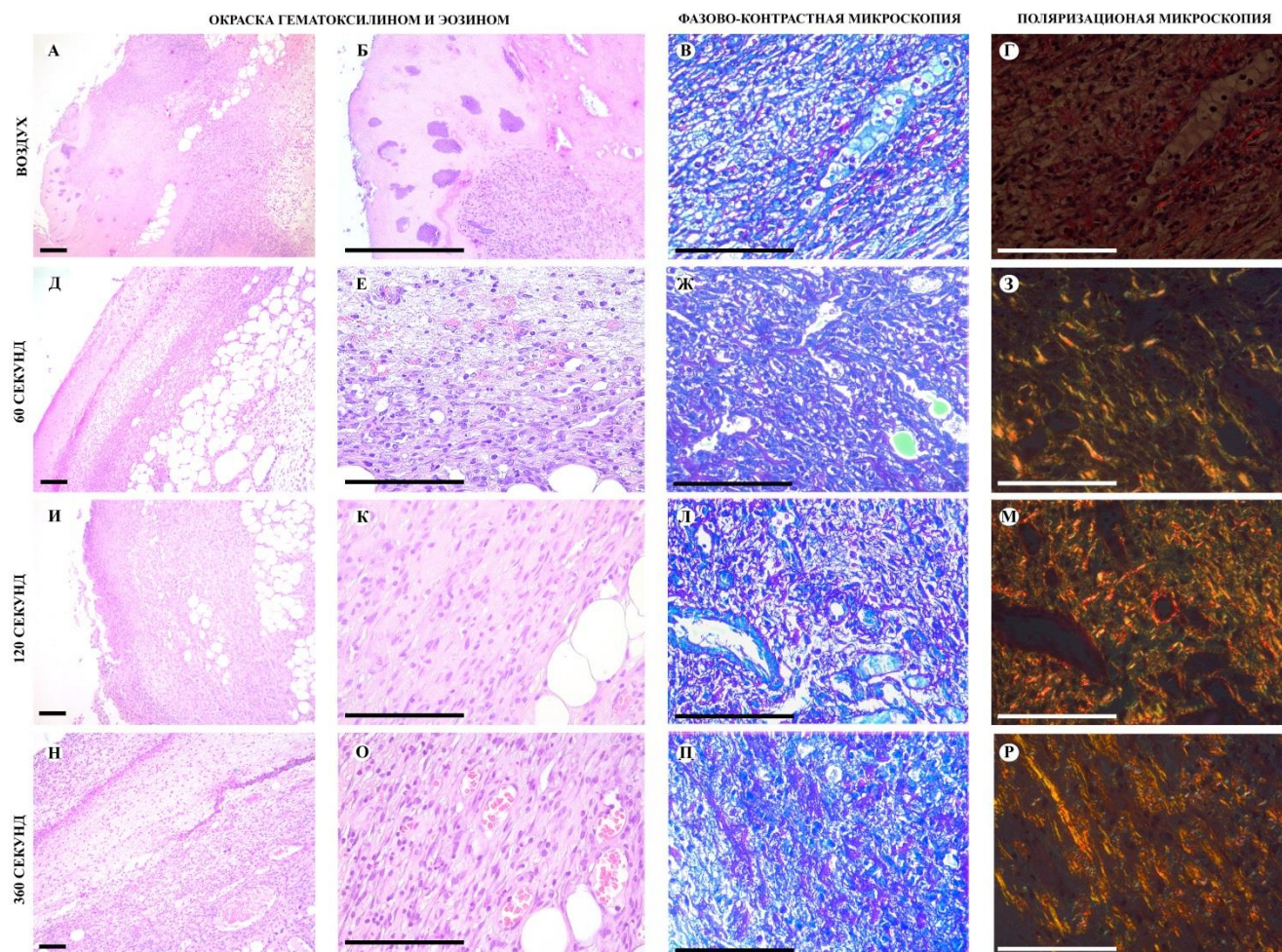


Рисунок 7 – Световая, фазово-контрастная, поляризационная микроскопия дна ран. Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, В, Д, Е, И, К, Л, Н, О, П) и пикросириусом красным (Г, З, М, Р). Увеличение $\times 100$ (А, Д, И, Н), увеличение $\times 400$ (Б, В, Г, Е, Ж, З, К, Л, М, О, П, Р). А – толстый фибринозно-лейкоцитарный слой; Б – колонии бактерий в фибрине; В – волокна фибрина в грануляционной ткани; Г – анизотропия коллагена отсутствует; Д – тонкий слой грануляционной ткани; Е – незрелая грануляционная ткань; Ж – волокна коллагена среди фибрина; З – анизотропия коллагена зеленого и желтого цвета; И – толстый слой грануляционной ткани; К – умеренно зрелая грануляционная ткань; Л – коллагеновые волокна в грануляционной ткани; М – анизотропия коллагена; Н – грануляционная ткань под слоем экссудата; О – лимфо-макрофагальная инфильтрация грануляционной ткани; П – параллельно ориентированные волокна коллагена; Р – анизотропия коллагена красного и желтого цвета

В группе, где экспозиция NO составляла 360 секунд, к 4-м суткам воспалительные изменения были выражены умеренно и характеризовались, главным образом, лейкоцитарным валом, отграничивающим слой экссудата от подлежащего слоя грануляционной ткани. Фибробласты имели веретеновидную форму и располагались параллельно поверхности раны, что свидетельствует о созревании грануляционной ткани. При фазово-контрастной микроскопии в ткани определялось большое количество плотно прилежащих друг к другу коллагеновых волокон. При поляризационной микроскопии преобладала анизотропия красного цвета (Рисунок 7).

Статистический анализ. Статистически значимые различия в интенсивности воспаления (экссудация, бактериальная контаминация, воспалительная инфильтрация, микроциркуляторные нарушения) наблюдались при сравнении контрольной группы с 3-й (120 сек) ($p < 0,05$) и 4-й (360 сек) ($p < 0,01$) экспериментальными группами. Максимальная интенсивность регенерации (ангиогенез, пролиферация фибробластов, рост и созревание грануляционной ткани) была достигнута при дозе 360 секунд, она была достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). При воздействии NO-СГП в течение 60 секунд отмечалась минимальная толщина слоя грануляционной ткани, однако экспозиция длительностью 120 секунд способствовала значительному увеличению её объема ($p < 0,01$) (Рисунок 8).

Результаты исследования показали, что в ранах площадью 3 см² при времени воздействия NO-СГП 60 секунд к ране поступает 120 мг оксида азота (Таблица 2), при этом интенсивность воспалительных процессов статистически не отличается от контроля, что свидетельствует о пороговом характере NO-терапии.

Достоверные показатели раневого заживления (снижение воспалительных и усиление регенеративных процессов) отмечались при длительности воздействия 120 и 360 секунд (интегральные массовые дозы оксида азота 240 мг и 720 мг, удельные массовые дозы NO на единицу площади раны 80 мг/см² и 240 мг/см² соответственно). При этих дозах уже на 4 сутки после операции идет активный процесс пролиферации фибробластов и формирования грануляционной ткани.

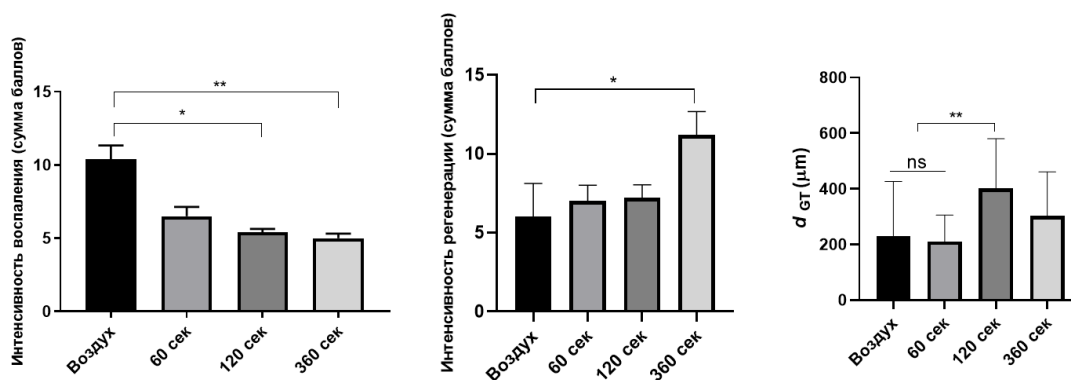


Рисунок 8 – Морфометрия тканей раны, тест Kruskal-Wallis (левый и средний графики), однофакторный анализ ANOVA (справа), 95% ДИ. ns – нет различий, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ [157]

Таким образом, данные пилотного эксперимента позволяют рассчитать основные параметры продолжительности воздействия NO-СГП на пораженные ткани. При поражениях кожных покровов оптимальным является применения NO-СГП из расчета 120 секунд на 1 см² поврежденной области (80 мг/см²). Полученные данные необходимы для более глубокого понимания метода NO-терапии и дальнейшего совершенствования техники для ее реализации.

3.2. Результаты пилотного эксперимента по определению наиболее эффективной дозы аэрозоля с ДНКЖ для стимуляции раневого заживления

3.2.1. Характеристика спрея с ДНКЖ

Средний коэффициент овальности спрея составлял $1,03 \pm 0,05$; он не различался между растворами ДНКЖ разной концентрации (Рисунок 9, слева). Таким образом, все испытанные концентрации имели хорошую способность к распылению. Дозировка ДНКЖ в единичном распыляемом объеме была стабильной и составляла в среднем $0,1 \pm 0,043$ мкг. Используя тефлоновое кольцо с

фиксированным внутренним диаметром 19,5 мм и растворы ДНКЖ, окрашенные метиленовым синим, было определено, что оптимальное расстояние для распыления всей дозы на область раны составляет 1 см при угле распыления 45°.

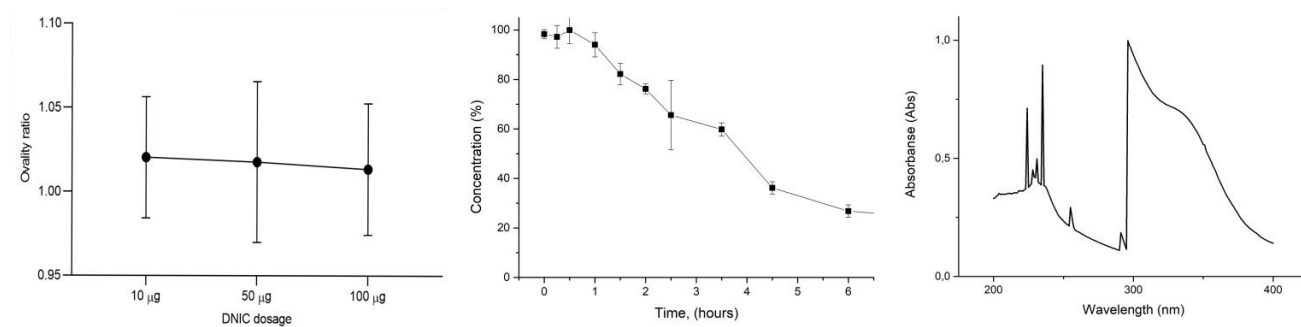


Рисунок 9 – Индекс овальности (слева), деградация ДНКЖ в 37°C, (в центре), спектр раствора через 6 часов (справа). PBS – фосфатно-натриевый буфер [184]

Спектрофотометрический анализ указывает на линейную деградацию раствора ДНКЖ до 30% от исходной концентрации за 5 часов с отложенным стартом процесса деградации на 30 минут (Рисунок 9, центральный). Ввиду того, что при комнатной температуре концентрация раствора уменьшалась почти в 2 раза в течение 2,5 часов, для поддержания стабильности ДНКЖ свежеприготовленные растворы различных концентраций были разделены на 4 аликвоты по 50 мл и заморожены до использования [184].

ДНКЖ полностью распадались за 6 часов (при pH=7,0), после чего прибор регистрировал сигнал от оставшихся соединений нитритов (Рисунок 9, справа).

3.2.2. Определение наиболее эффективной дозы ДНКЖ в спрее для стимуляции раневого заживления

Макроскопическое изучение. На следующий день после операции состояние всех животных было удовлетворительным. Дно ран было розового цвета, с блестящей, гладкой поверхностью и умеренным отеком, покрыто незначительным

количеством трансудата. На 2-й день после операции у половины животных контрольной группы дно раны было гиперемировано и покрыто умеренным количеством фибрина, который был наиболее выражен по краям раны. У другой половины и в экспериментальных группах раны характеризовались гладкой, слегка гиперемированной поверхностью с незначительным количеством фибрина по периферии, в части случаев отмечался незначительный прозрачный экссудат без запаха. На третий день после операции у 5 из 6 животных контрольной группы дно раны было диффузно покрыто толстым слоем фибрина, определялся мутный экссудат в объеме до 0,03 мл. Только в одном случае рана характеризовалась гладкой, блестящей поверхностью с небольшим количеством серозного экссудата. В 2-й экспериментальной группе (10 мкг) в 3 из 6 случаев на дне раны выявлялся серозный экссудат, у других животных поверхность раны была гиперемирована, а по краям определялись незначительные рыхлые наложения фибрина. В 3-й группе (50 мкг) поверхность дна ран имела практически такие же характеристики, как на 2-е сутки. В группе 4 (100 мкг) рыхлые, обильные наложения фибрина отмечались у половины животных только по периферии раны, экссудат не имел цвета и запаха, у другой половины дно раны было умеренно гиперемированным с блестящей поверхностью.

На 4-й день после операции в контрольной группе не отмечалось динамики макроскопических изменений. Во 2-й группе (10 мкг) большинство ран было покрыто тонкой пленкой из рыхлого фибрина и небольшим количеством мутноватого экссудата без запаха. В 3-й экспериментальной группе (50 мкг) большинство ран имели чистое, блестящее дно, покрытое незначительным количеством серозного экссудата. В 4-й группе (100 мкг) фибриновая пленка определялась у 4 из 6 животных, при этом в 2 случаях она полностью покрывала дно раны. Только в 2 наблюдениях раны имели гладкое, блестящее дно.

Гистологическое изучение. В контрольной группе раны практически всех животных имели признаки бактериальной контаминации, фибринозно-лейкоцитарный слой был относительно толстый и плотный. Грануляционная ткань характеризовалась крайне низкой степенью зрелости, в 3 из 6 случаев она

присутствовала только в виде отдельных островков, при этом фибриновые волокна значительно преобладали над коллагеновыми, что подтверждалось фазово-контрастной микроскопией. При поляризационной микроскопии анизотропия практически отсутствовала, только отдельные тонкие волокна поляризовались в зеленом свете (коллаген типа III) (Рисунок 10).

Во 2-й экспериментальной группе (10 мкг) толстый слой экссудата имел такие же характеристики, как в контрольной группе. Грануляционная ткань состояла из активно пролиферирующих, хаотично расположенных фибробластов и новообразованных капилляров. При фазово-контрастной микроскопии отмечалось более высокое по сравнению с контролем содержание новообразованных волокон коллагена в глубоких слоях грануляционной ткани. При поляризационной микроскопии, волокна обладали анизотропией не только зеленого, но и красного цвета (Рисунок 10).

В группе, где доза ДНКЖ была 50 мкг, фибринозно-лейкоцитарный слой был значительно тоньше, чем в предыдущих группах. Он состоял из рыхлой сети волокон фибрина, в нем определялись единичные микробные колонии в половине случаев, умеренная лейкоцитарная инфильтрация. Воспалительные изменения и признаки микроваскулярных нарушений были выражены в меньшей степени, чем в группе контроля, где отмечалась диффузная лимфо-макрофагальная инфильтрация, лейкостаз, продуктивный васкулит, участки кровоизлияний, стаз и сладж в отдельных капиллярах. Грануляционная ткань была представлена вертикально ориентированными сосудами, продольно расположенными веретеновидными фибробластами, новообразованными коллагеновыми волокнами. При фазово-контрастной микроскопии в поверхностных слоях грануляционной ткани определялись тонкие, новообразованные коллагеновые волокна, постепенно замещающие сеть фибрина, в более глубоких слоях они преобладали и принимали параллельную ориентацию. Достаточно высокая степень зрелости этих волокон подтверждается анизотропией красного цвета при поляризационной микроскопии (Рисунок 10).

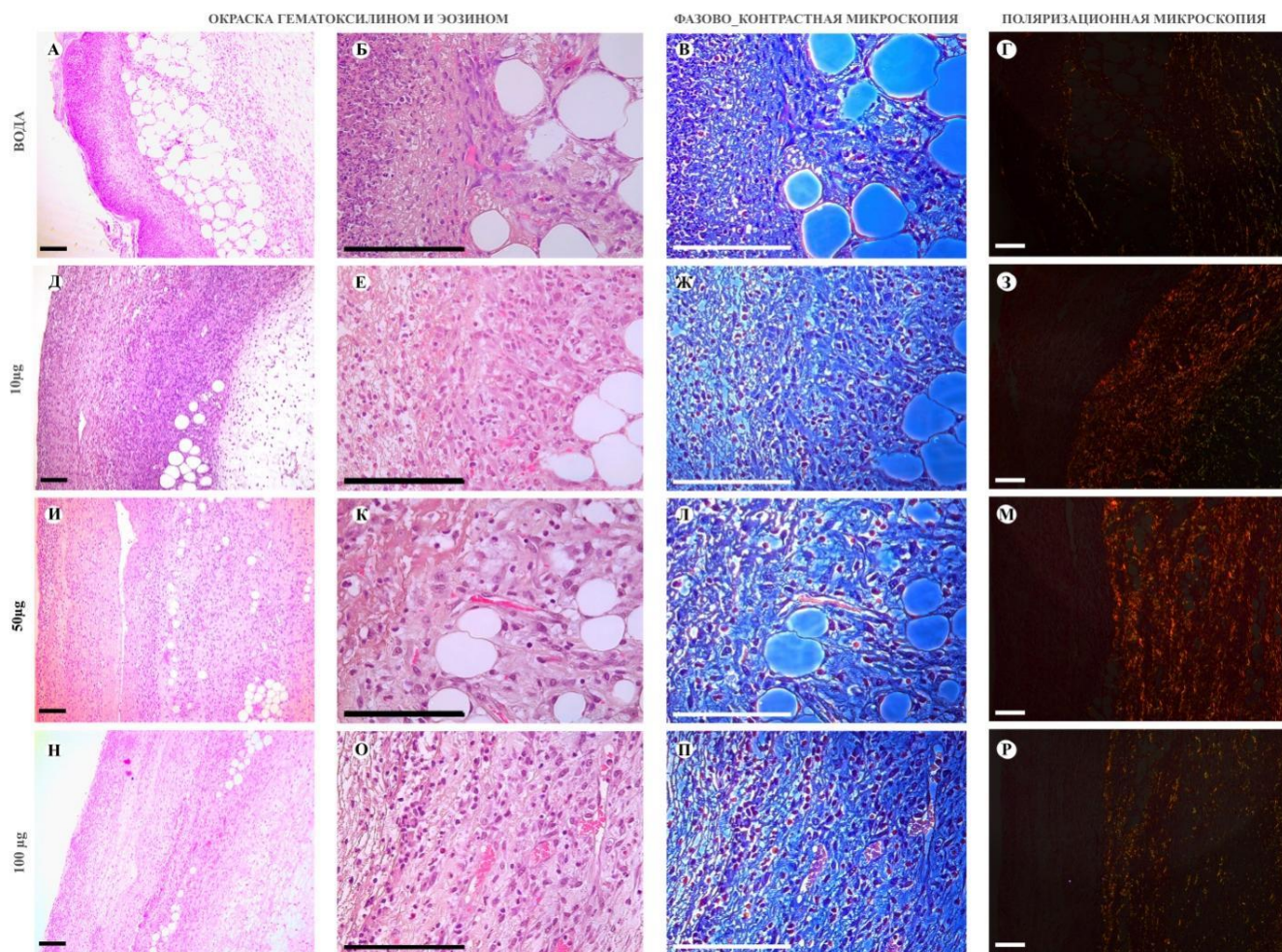


Рисунок 10 – Световая, фазово-контрастная, поляризационная микроскопия дна ран. Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, В, Д, Е, И, К, Л, Н, О, П) и пикросириусом красным (Г, З, М, Р). Увеличение $\times 100$ (А, Г, Д, З, И, М, Н, Р), увеличение $\times 400$ (Б, В, Г, Е, Ж, З, К, Л, О, П). А – толстый слой фибрина, островки грануляционной ткани; Б – крайне незрелая грануляционная ткань; В – волокна коллагена среди волокон фибрина; Г – анизотропия коллагена практически отсутствует; Д – толстый слой фибрина; Е – незрелая грануляционная ткань; Ж – отложение волокон коллагена вдоль подкожно-жировой клетчатки; З – слабая анизотропия коллагена; И – толстый слой грануляционной ткани; К – вертикально-ориентированные капилляры в грануляционной ткани; Л – преобладание коллагеновых волокон; М – анизотропия коллаген красного и оранжевого цвета; Н – грануляционная ткань под слоем фибрина; О – лимфо-макрофагальная инфильтрация умеренно зрелой грануляционной ткани; П – тонкие волокна коллагена; Р – анизотропия единичных коллагеновых волокон

В 4-й группе (100 μg) слой грануляционной ткани был значительно толще, чем в группе контроля. Он состоял из активно пролиферирующих фибробластов и полнокровных капилляров. Фазово-контрастная микроскопия выявила

преобладание тонких волокон коллагена в 4-й группе (100 мкг), которые при поляризационной микроскопии обладали анизотропией в зеленом и желтом свете, что свидетельствует об их низкой зрелости (Рисунок 10).

Статистический анализ. При морфометрическом исследовании толщина слоя грануляционной ткани в среднем была на 108% выше во 2-й экспериментальной группе (10 мкг), на 140% - в 3-й экспериментальной группе (50 мкг) и на 112% выше в 4-й экспериментальной группе (100 мкг), чем в контроле ($p < 0,01$) (Рисунок 11).

Воспалительные изменения (экссудация, контаминация, воспалительная инфильтрация, микроциркуляторные нарушения) во всех экспериментальных группах были менее выражены, чем в контроле, в группе, где применялся аэрозоль с 50 мкг ДНКЖ, они были статистически значимыми ($p < 0,05$). Процессы регенерации (активности ангиогенеза, пролиферация фибробластов, объем и зрелость грануляционной ткани) также протекали более активно в группах, где использовался ДНКЖ-содержащий спрей, при этом статистически достоверные отличия с контролем наблюдали в группе 3 (50 мкг) ($p < 0,05$) [184].

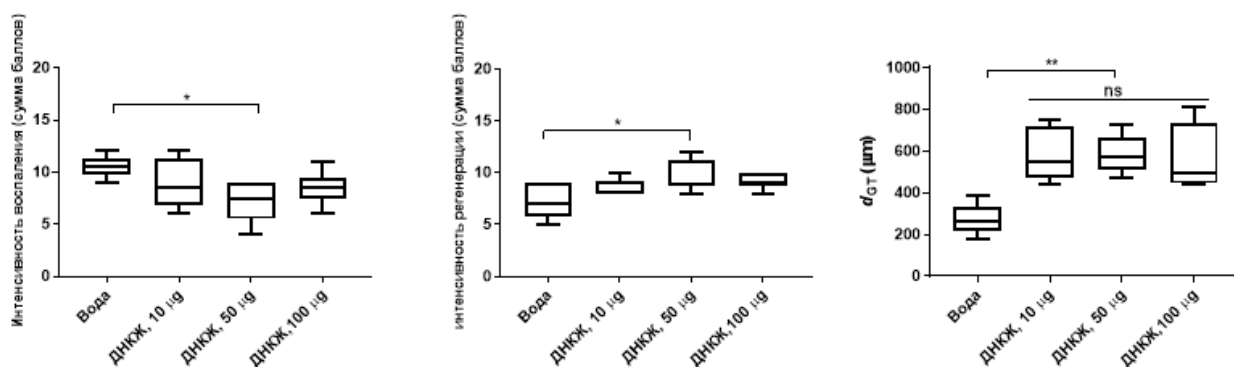


Рисунок 11 – Морфометрия тканей раны, тесты Kruskal-Wallis (левый и средний графики) и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (правый график), 95% ДИ. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; ns - нет различий

Полученные результаты комплексного гистологического исследования свидетельствуют о благоприятном влиянии спрея с ДНКЖ на заживление ран. При этом, доза ДНКЖ 10 мкг, по-видимому, влияла исключительно на пролиферацию клеток и толщину грануляционной ткани, но не была достаточной для реализации противовоспалительного действия и активации синтетической функции фибробластов. Аэрозоль с 50 мкг ДНКЖ обладал наибольшей эффективностью, так как статистически достоверно уменьшал выраженность воспалительных изменений, способствовал росту и созреванию грануляционной ткани, что является важным этапом на пути полной регенерации кожи. Доза ДНКЖ 100 мкг являлась избыточной, так как в меньшей мере влияла на толщину и степень зрелости грануляционной ткани и увеличивала активность воспаления по сравнению с дозой 50 мкг, что объясняется патологическим усилением окислительных процессов в тканях ран и замедлением миграции и пролиферации фибробластов, а также ангиогенеза.

3.3. Основной (долгосрочный) эксперимент по определению наиболее эффективного способа доставки оксида азота для стимуляции раневого заживления в условиях нормогликемии

Макроскопическое описание ран животных в условиях нормогликемии на сроках 4 - 21 суток. На 4-е сутки в группах, где раны обрабатывали воздухом и водой, дно было покрыто относительно толстым слоем рыхлого фибрина и мутноватого экссудата. У животных, раны которых обдували NO-СГП, дно ран было сухим и блестящим, в 3 случаях наблюдения отмечались небольшие скопления фибрина по периферии раны. После обработки ДНКЖ раны животных характеризовались чистым, блестящим дном, в 2 случаях оно было покрыто тонким слоем прозрачного экссудата (Рисунок 12).

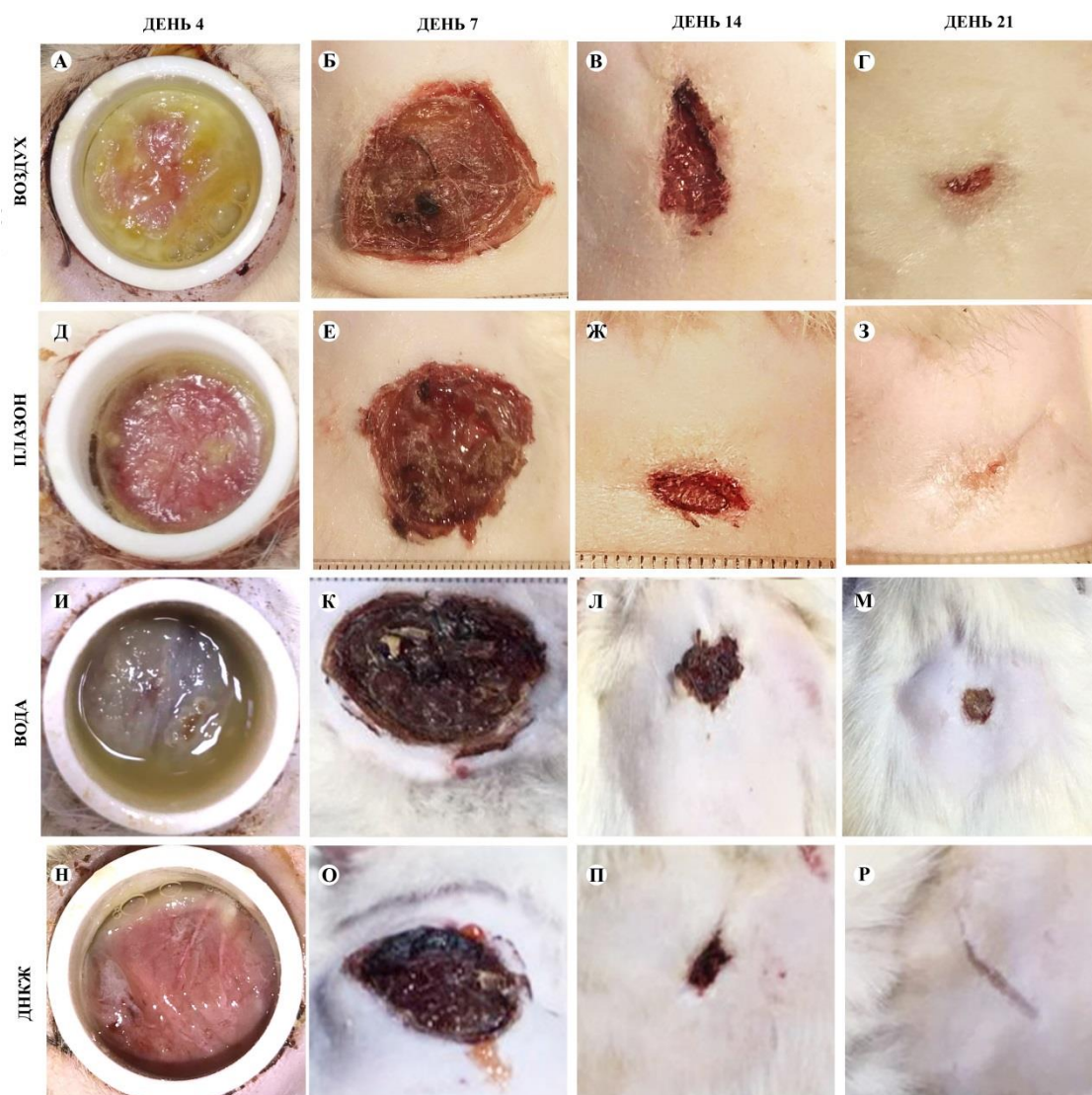


Рисунок 12 – Дно ран животных в условиях нормогликемии на 4-е (А, Б, В, Д), 7-е (Д, Е, Ж, З), 14-е (И, К, Л, М), 21-е (Н, О, П, Р) сутки. А – толстый слой экссудата; Б – первичный струп; В – чистая, эпителизирующаяся рана, Г – выраженная краевая эпителизация; Д – отложения фибрина по периферии раны; Е – тонкий струп; Ж – контракция, эпителизация раны; З – полная эпителизация; И – слой фибрина и экссудата; К – уплотненные края раны вокруг струпа; Л – рана неправильной формы; М – округлый раневой дефект; Н – небольшие отложения фибрина; О – неплотно прилегающий струп, экссудация; П – чистая рана, Р – линейный рубец

На 7-е сутки раны всех животных были покрыты плотным струпом красноватого цвета с шероховатой поверхностью, плотно связанным с подлежащими тканями. На 9-е сутки струп отсутствовал у 5 из 6 животных в

группе, где применяли ДНКЖ, у 4 из 6 животных, в группе, где использовали NO-СПП, в контрольных группах такой результат наблюдался только к 11-м суткам.

На 14-е сутки в экспериментальных группах наблюдалась выраженная эпителизация и сокращение размеров ран до $0,5 (\pm 0,213) \text{ см}^2$. Дно ран животных контрольных групп было чистым (Рисунок 12). Только в одном из случаев, где раны обрабатывали водой, оно было покрыто струпом, неплотно прикрепленным к раневой поверхности, окружающие ткани были отечны и гиперемированы, при пальпации из-под струпа выделялся густой гной желто-зеленого цвета.

К 21-м суткам в группе, где применялся NO-СПП, 5 из 6 ран были полностью эпителизированы. Несмотря на достаточно большую площадь, раны у животных из контрольной группы 2 (вода) имели гладкое дно. В группах, где использовали поток теплого воздуха и спрей с ДНКЖ полная эпителизация отмечалась у 2 животных (Рисунок 12).

Согласно данным статистического анализа, к 7-м суткам наименьшая площадь ран отмечалась в группах Плазон и ДНКЖ. Она была достоверно ниже, чем в группе, в которой раны обрабатывали водой ($p < 0,001$, $p < 0,01$, соответственно) или воздухом ($p < 0,01$) (Рисунок 13).

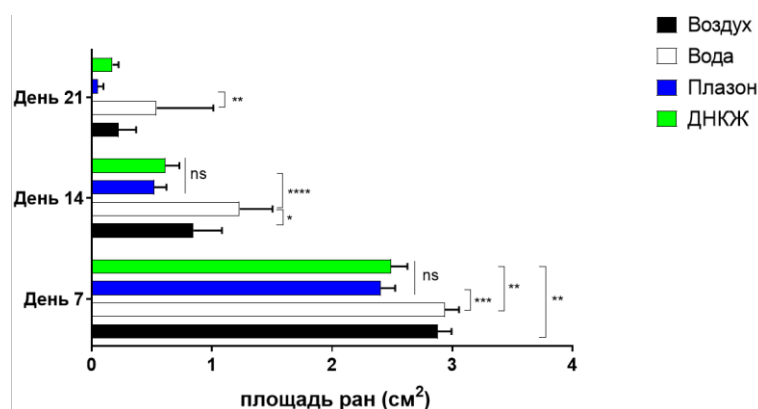


Рисунок 13 – Морфометрическая оценка скорости контракции ран в условиях нормогликемии, двуфакторный анализ ANOVA; ns- нет различий, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

На 14-е сутки площадь ран животных экспериментальных групп не имела статистически значимых различий с контрольной группой 1 (воздух), но были значительно меньше, чем в контрольной группе 2 (вода) ($p < 0,0001$). К 21-м суткам площадь ран в экспериментальной группе 1 (NO-СГП), была меньше по сравнению с группой, где раны обрабатывали дистиллированной водой ($p < 0,01$).

Цитологическое исследование мазков-отпечатков ран животных в условиях нормогликемии. При анализе мазков, сделанных на 3-и сутки после операции, наименьшее количество нейтрофилов наблюдалось в группе, где раны обдували NO. Оно было на 64% меньше, чем в группе, в которой раны обрабатывали водой. На следующий день не отмечалось значительного изменения числа нейтрофилов, однако были выявлены статистически значимые различия между экспериментальной группой 1 (Плазон) и группами, в которых раны орошали раствором ДНКЖ и водой ($p < 0,001$) (Рисунок 14).

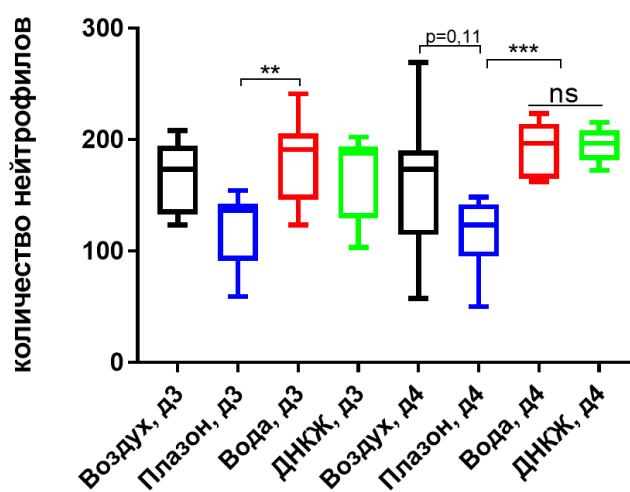


Рисунок 14 – Анализ количества нейтрофилов в ранах животных в условиях нормогликемии, двухфакторный анализ ANOVA, ns- нет различий, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Гистологическое исследование тканей ран животных в условиях нормогликемии на сроках 4-х, 7-х, 14-х, 21-х суток. Изменения в тканях ран на 4-е

сутки соответствовали характеристикам, полученным в ходе пилотных экспериментов.

На 7-е сутки наибольшая толщина фибринозно-лейкоцитарного слоя определялась в контрольной группе, в которой раны обдували потоком теплого воздуха. У части животных этой группы, а также другой контрольной группы, где раны орошали дистиллированной водой, в этом слое определялось достаточно большое количество микробных колоний. В экспериментальных группах к этому сроку фибринозно-лейкоцитарный слой так же был достаточно толстым, однако в группе, где использовали NO-СГП, признаки контаминации выявлялись только в одном случае. Применение спрея с ДНКЖ практически не влияло на бактериальную контаминацию, при этом снижало выраженность воспалительной инфильтрации и микроциркуляторных нарушений по сравнению с другими группами.

В группе, где раны обдували потоком теплого воздуха, слой незрелой грануляционной ткани был представлен пролиферирующими фибробластами, слабо выраженной диффузной лимфо-макрофагальной инфильтрацией и множеством полнокровных микрососудов, часть из которых имела признаки продуктивного эндо- и панваскулита (Рисунок 15, Рисунок 16). При фазово-контрастной микроскопии определялись тонкие коллагеновые волокна, ориентированные параллельно друг другу (Рисунок 16). В половине наблюдений в группе, где применяли NO-СГП, грануляционная ткань созревала: фибробласты приобретали веретенообразную форму, коллагеновые волокна располагались параллельно и продольно, что хорошо видно при фазово-контрастной микроскопии (Рисунок 15, Рисунок 16). В отдельных участках определялись вертикально ориентированные капилляры. При окраске по Маллори объем коллагеновых волокон в этой группе был значительно больше, чем в группе, в которой раны обдували воздухом. При поляризационной микроскопии в этой группе анизотропия волокон красного цвета определялась преимущественно в глубоких слоях раны (Рисунок 15).

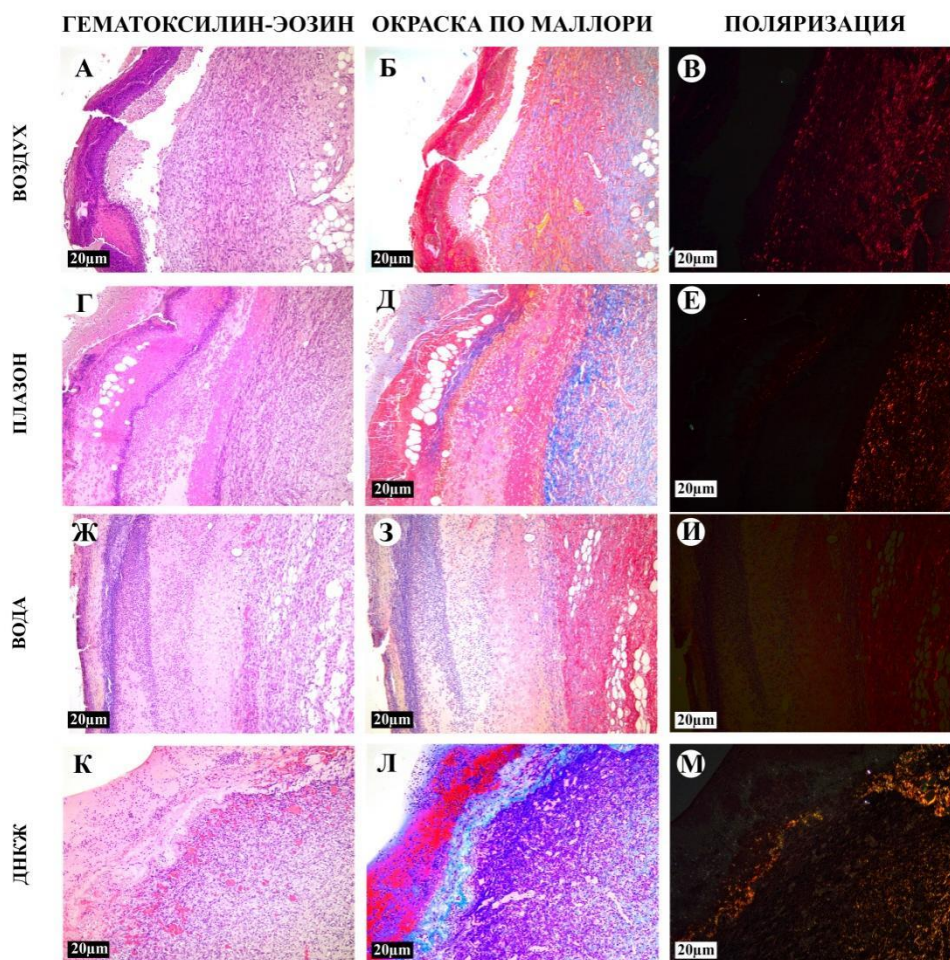


Рисунок 15 – Световая и поляризационная микроскопия дна ран в условиях нормогликемии на 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Г, Ж, К), по Маллори (Б, Д, З, Л) и пикросириусом красным (В, Е, И, М). Увеличение x100.

А – толстый слой фибрина, под ним незрелая грануляционная ткань; Б – коллагеновые волокна вдоль слоя подкожно-жировой клетчатки; В – волокна коллагена с анизотропией красного цвета в глубоких слоях раны; Г – зрелая грануляционная ткань под толстым слоем фибрина; Д – высокое содержание коллагеновых волокон (синие) в грануляционной ткани; Е – фрагменты зрелых коллагеновых волокон; Ж – выраженный слой экссудата, грануляционная ткань прорастает подкожно-жировую клетчатку; З – единичные коллагеновые волокна (синие) среди фибрина; И – анизотропия коллагена отсутствует; К – толстый слой грануляционной ткани с многочисленными сосудами; Л – высокая клеточность слоя грануляционной ткани, между клетками волокна коллагена; М – тонкие волокна с анизотропией зеленого и желтого цвета

В группе, где раны обрабатывали водой, в 4 из 6 случаев, ангиогенез практически отсутствовал, пролиферация фибробластов была умеренной, что характерно для крайне незрелой грануляционной ткани (Рисунок 15). Ткань была

диффузно инфильтрирована полиморфно-ядерными лейкоцитами, лимфоцитами, макрофагами, немногочисленными плазматическими клетками. В глубоких слоях отмечалось полнокровие сосудов, признаки сладжа и лейкостаза. Стенки сосудов были инфильтрированы нейтрофилами и утолщены за счет плазматического пропитывания, отмечалась пролиферация эндотелия. У половины животных выявлялся лимфостаз. В других случаях параллельно ориентированные веретеновидные фибробласты выстраивались вдоль волокон фибрина, постепенно замещая их тонкими волокнами коллагена. Фазово-контрастная микроскопия выявляла преобладание фибриновых волокон с зернистой структурой (Рисунок 16). При окраске по Маллори определялся крайне тонкий слой коллагеновых волокон, окрашенных в темно-синий цвет. При поляризационной микроскопии анизотропия практически отсутствовала (Рисунок 15).

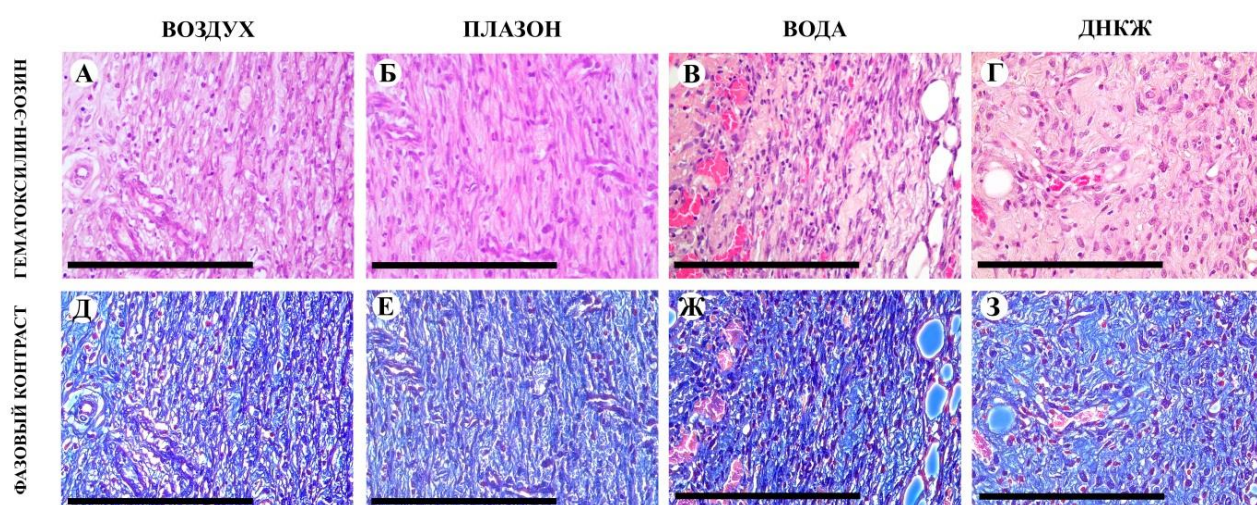


Рисунок 16 – Световая (А, Б, В, Г) и фазово-контрастная (Д, Е, Ж, З) микроскопия дна ран в условиях нормогликемии на 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$. А – диффузная лимфо-макрофагальная инфильтрация, васкулит микрососудов грануляционной ткани; Б – зрелая грануляционная ткань; В – веретеновидные фибробласты, неоангиогенез; Г – пролиферация фибробластов, вертикально-ориентированный капилляр; Д – тонкие коллагеновые волокна среди волокон фибрина; Е – параллельно ориентированные коллагеновые волокна; Ж – преобладание фибриновых волокон с зернистой структурой; З – волокна коллагена, расположенные преимущественно периваскулярно

В группе, в которой применяли спрей с ДНКЖ, грануляционная ткань характеризовалась умеренным объемом, но достаточно высокой степенью зрелости. В ней определялась выраженная лимфо-макрофагальная инфильтрация, многочисленные полнокровные капилляры, в 2 из 6 случаев они принимали вертикальную ориентацию. Фибробласты располагались параллельно друг другу, они активно пролиферировали и синтезировали коллагеновые волокна, что подтверждается при окраске по Маллори и при фазово-контрастной микроскопии (Рисунок 15, Рисунок 16). Поляризационная микроскопия выявляла многочисленные тонкие волокна с анизотропией зеленого и желтого цвета, что подтверждает высокое содержание новообразованного коллагена в тканях (Рисунок 15).

Через 14 дней после операции в контрольных группах (воздух и вода), фибринозно-лейкоцитарный слой был выражен умеренно, он был четко отграничен от подлежащих тканей лейкоцитарным валом, содержал обширные участки скопления эритроцитов. Эпителизация выявлялась только по краям раны. В экспериментальных группах поверхность раны была полностью эпителизирована высокодифференцированным эпителием у 3 из 6 животных из группы, где применяли NO-СГП и у 2 из 6 животных из группы, где раны обрабатывали раствором ДНКЖ. У других в центральной части она была покрыта тонким фибринозно-лейкоцитарным слоем, а по периферии дифференцированным эпителием.

Грануляционная ткань была относительно зрелая у всех животных, раны которых обдували воздухом и NO-СГП. В контрольной группе 1 (воздух) отмечалась диффузная инфильтрация лимфоцитами и макрофагами, признаки продуктивного эндо- и панваскулита. Фиброзирование было выражено только в глубоких слоях раны, в то время как в экспериментальной группе (NO-СГП) участки фиброзирования, представленные разнонаправленными толстыми пучками коллагеновых волокон и умеренным числом фибробластов выявлялись в центральных отделах раны, а по периферии уже определялась зрелая рубцовая ткань. При окраске по Маллори коллагеновые волокна окрашивались в темно

синий цвет, при фазово-контрастной микроскопии они характеризовались выраженной фибриллярной структурой, а при поляризационной микроскопии анизотропией красного цвета (Рисунок 17, Рисунок 18).

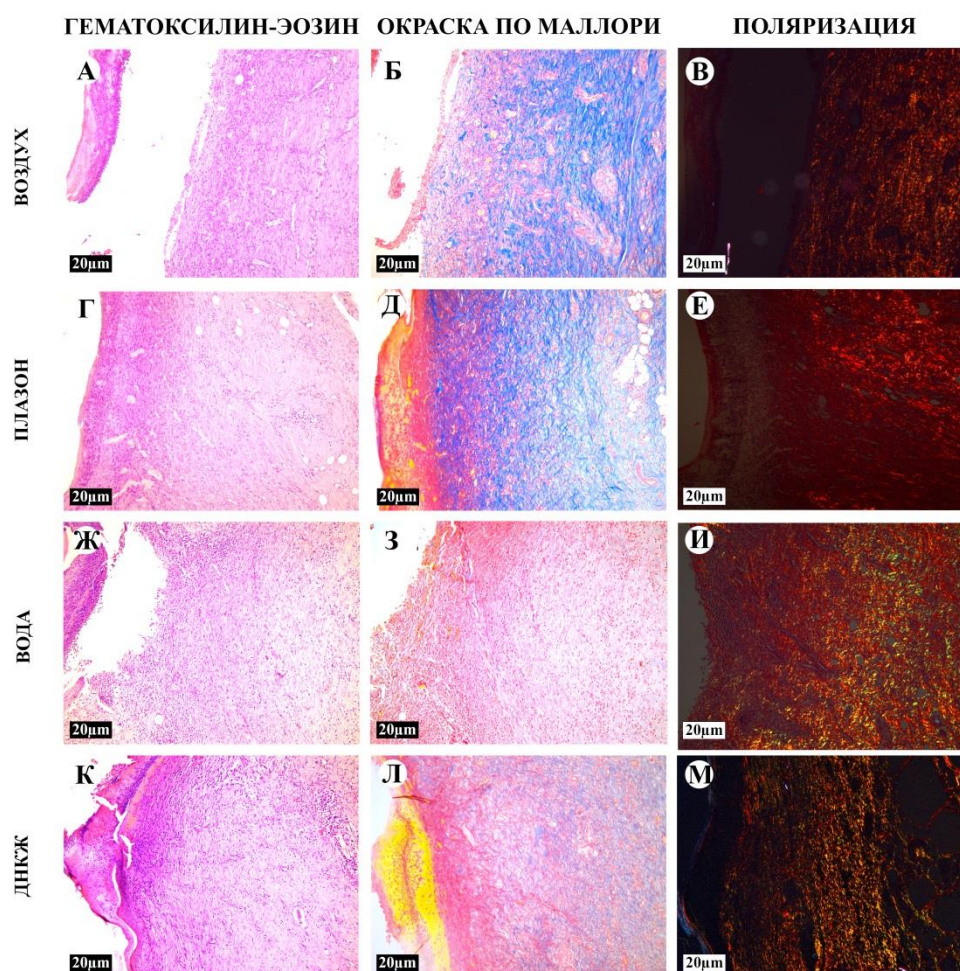


Рисунок 17 – Световая и поляризационная микроскопия дна ран в условиях нормогликемии на 14-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Г, Ж, К). Маллори (Б, Д, З, Л) и пикросириусом красным (В, Е, И, М). Увеличение x100. А – фиброзированная грануляционная ткань; Б – толстые пучки коллагена (синий цвет); В – анизотропия волокон коллагена красного цвета; Г – рубцовая ткань в глубоких слоях раны; Д – высокое содержание толстых волокон коллагена; Е – анизотропия зрелых коллагеновых волокон; Ж – зрелая грануляционная ткань; З – диффузно расположенные волокна коллагена; И – преобладание анизотропии зеленого и желтого цвета; К – частично фиброзированная грануляционная ткань; Л – высокое содержание коллагеновых волокон в глубоких слоях раны; М – анизотропия созревающих волокон коллагена

Наименьшие объем и зрелость грануляционной ткани были в контрольной группе 2 (вода) (Рисунок 17). Воспалительная инфильтрация и представленные очаговые кровоизлияния определялись у 2 животных из 6 (Рисунок 18). Содержание коллагена было низким, что видно при окраске по Маллори (Рисунок 17). Коллаген характеризовался низкой степенью зрелости. При фазово-контрастной микроскопии он имел вид тонких волоконцев, а при поляризационной микроскопии характеризовался анизотропией желтого и зеленого цвета (Рисунок 17, Рисунок 18).

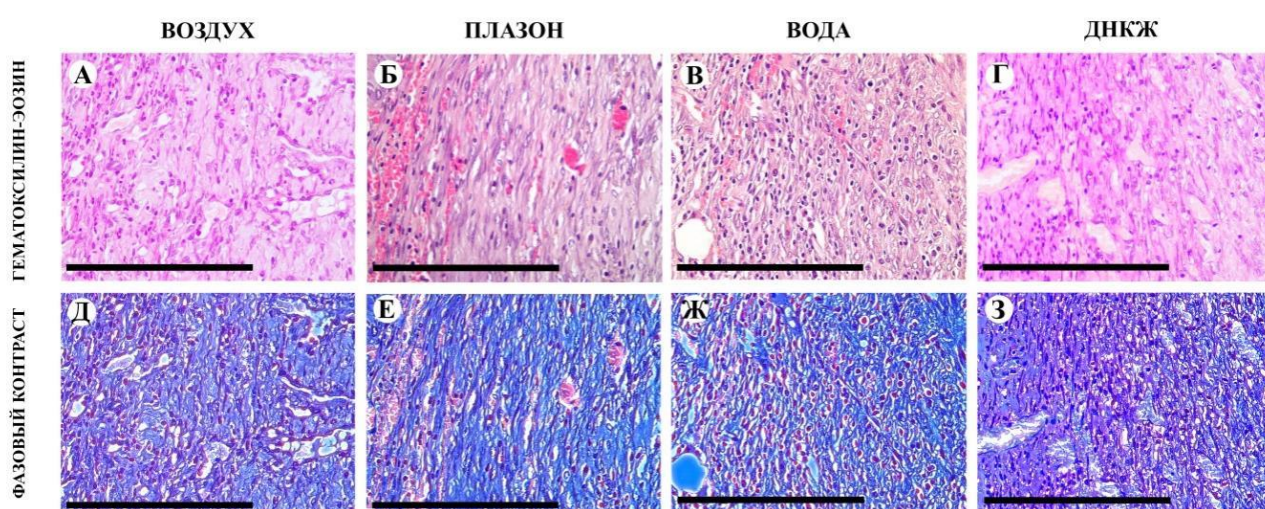


Рисунок 18 – Световая и фазово-контрастная микроскопия дна ран в условиях нормогликемии на 14-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400. А – зрелая грануляционная ткань; Б – фиброзированная грануляционная ткань; В – выраженная лимфо-макрофагальная инфильтрация грануляционной ткани; Г – зрелая грануляционная ткань с признаками фиброзирования; Д – толстые волокна коллагена в глубоких слоях грануляционной ткани; Е – фиброзированные пучки коллагена; Ж – тонкие коллагеновые волокна; З – параллельно ориентированные волокна коллагена

В группе, где применяли ДНКЖ, грануляционная ткань имела достаточно большой объем, она состояла из параллельно ориентированных фибробластов, синтезирующих коллагеновые волокна и капилляров, часть которых располагалась перпендикулярно поверхности раны, однако фиброзирование было выражено меньше, чем в другой экспериментальной группе (Рисунок 17, Рисунок

18). При поляризационной микроскопии на периферии раны преобладала анизотропия красного цвета, в центральной части – выраженная анизотропия желто-оранжевого и зеленого цвета, что свидетельствует о созревании коллагеновых волокон (Рисунок 17). При фазово-контрастной микроскопии в глубоких слоях раны волокна коллагена были толще, чем в верхних (Рисунок 18).

На 21-е сутки в контрольных группах (воздух и вода) дно ран было покрыто слоем фибрина, определялась интенсивная эпителизация, однако ни в одном случае раны не затягивались полностью. В экспериментальных группах (НО-СГП и ДНКЖ) раны 5 из 6 животных были полностью эпителизированы (Рисунок 19).

В контрольной группе 1 (воздух) в ранах наблюдалось высокое содержание клеток и многочисленные коллагеновые волокна с упорядоченной ориентацией, что хорошо видно при окраске по Маллори и фазово-контрастной микроскопии (Рисунок 19, Рисунок 20). При поляризационной микроскопии отмечалась анизотропия оранжевого цвета (Рисунок 19).

В группе, где использовали НО-СГП, в одном случае наблюдалась полная регенерация, в остальных она отмечалась только по периферии, в то время как центральная часть раны была представлена фиброзирующей грануляционной тканью с большим количеством новообразованных капилляров (Рисунок 19, Рисунок 20). При фазово-контрастной микроскопии коллагеновые волокна были представлены толстыми, плотными пучками (Рисунок 20).

В экспериментальной группе 2 (ДНКЖ) в центре раны определялся эпителизированный рубец, по периферии – регенерация дермы (Рисунок 19). В глубоких отделах центральной части ран сохранялась фиброзированная грануляционная ткань, что также хорошо видно при фазово-контрастной микроскопии (Рисунок 20). При поляризационной микроскопии ран животных экспериментальных групп (НО-СГП, ДНКЖ) волокна дермы характеризовались выраженной анизотропией красного цвета, в небольших участках оставшейся грануляционной ткани анизотропия была крайне слабой (Рисунок 19).

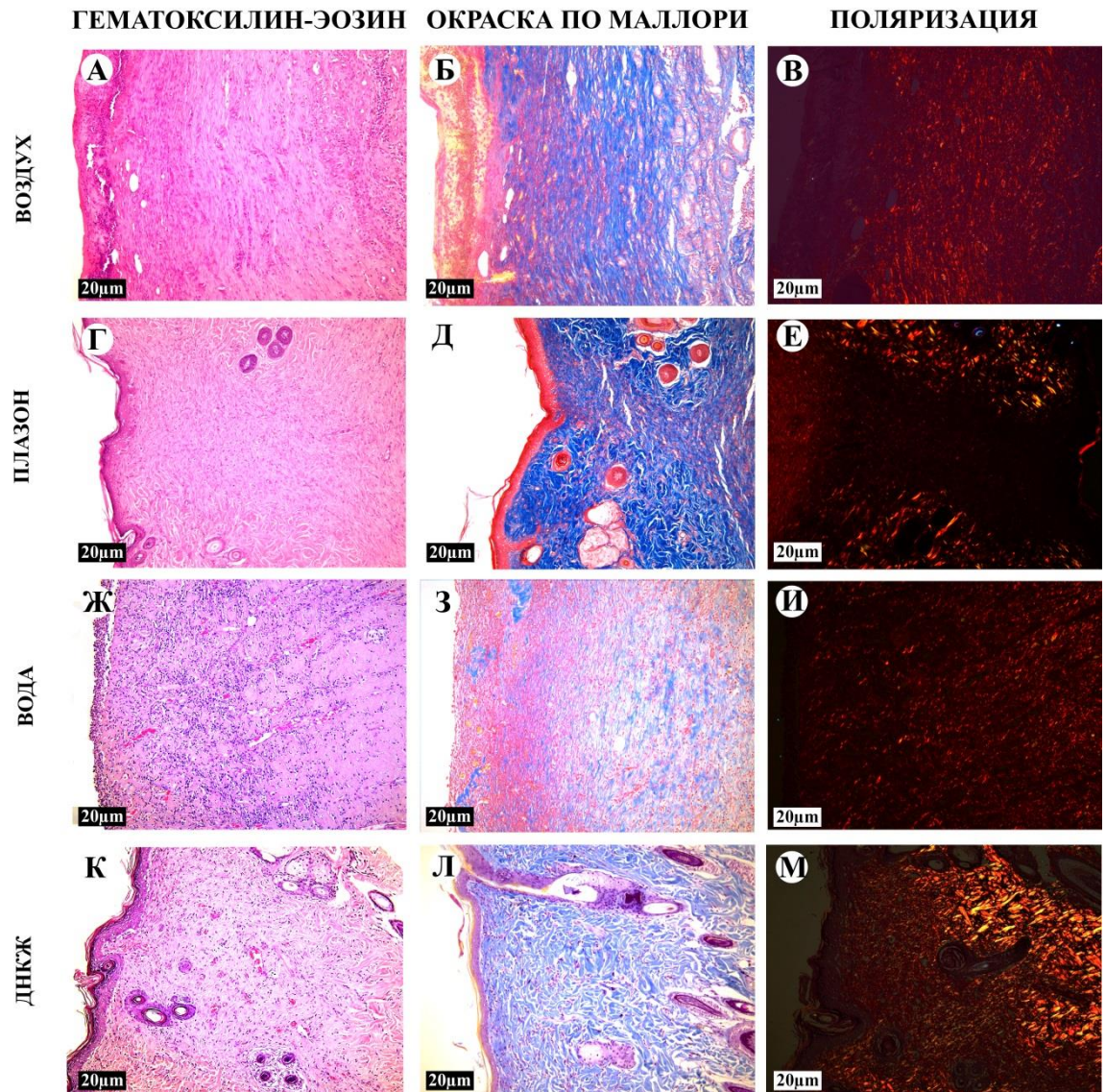


Рисунок 19 – Световая и поляризационная микроскопия дна ран в условиях нормогликемии на 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Г, Ж, К), по Маллори (Б, Д, З, Л) и пикросириусом красным (В, Е, И, М). Увеличение $\times 100$. А – фибрированная грануляционная ткань под струпом; Б – параллельные толстые волокна коллагена; В – анизотропия зрелых коллагеновых волокон; Г – фиброзирующая грануляционная ткань под слоем эпителия (в центре); Д – в центре коллагеновые волокна упорядочены, по периферии – располагаются хаотично; Е – анизотропия волокон дермы; Ж – зрелая, фиброзирующая грануляционная ткань; З – пучки коллагена преимущественно в глубоких слоях раны; И – слабая анизотропия коллагеновых волокон; К – эпителизированный рубец (в центре), дерма с придатками (по периферии); Л – коллагеновые волокна дермы; М – выраженная анизотропия волокон коллагена

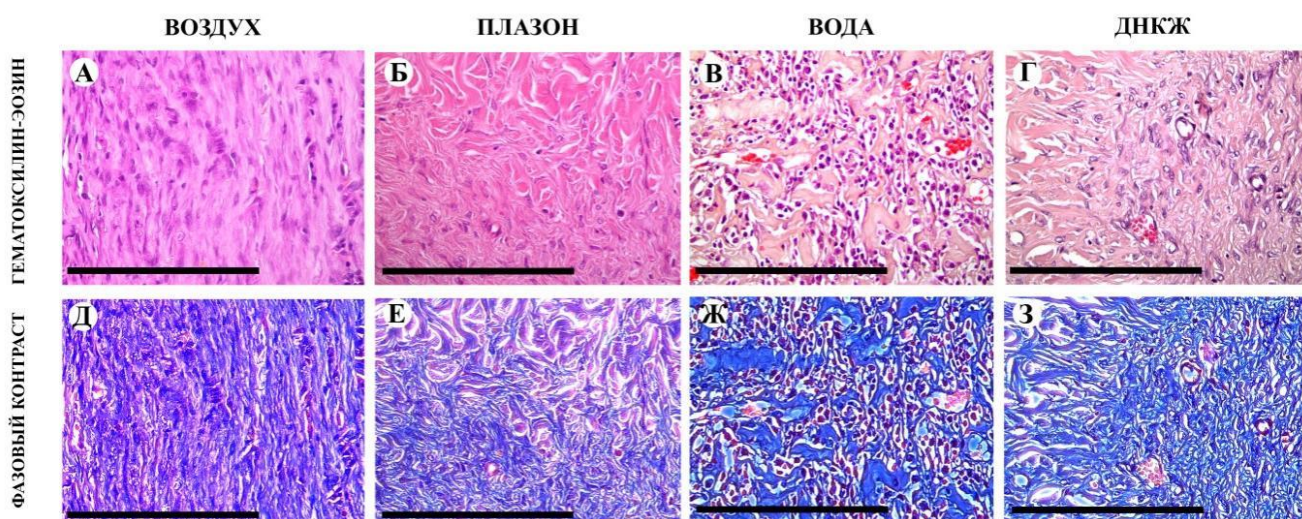


Рисунок 20 – Световая (А, Б, В, Г) и фазово-контрастная (Д, Е, Ж, З) микроскопия дна ран в условиях нормогликемии на 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$. А – фибрированная грануляционная ткань; Б – волокна дермы (сверху), фибрированная грануляционная ткань (снизу); В – лимфо-макрофагальная инфильтрация фибрированной грануляционной ткани; Г – незрелая рубцовая ткань (слева), фибрированная грануляционная ткань (справа); Д – упорядоченные волокна коллагена; Е – хаотично ориентированные коллагеновые пучки; Ж – отдельные пучки толстых волокон коллагена; З – толстые пучки и волокна коллагена

Таким образом, на всех сроках наблюдения интенсивность воспаления была максимальной в контрольной группе 2 (вода). В экспериментальной группе 1 (NO-СГП) признаки воспаления прогрессивно снижались, а выраженность признаков регенерации и фибрирования, толщина слоя грануляционной ткани статистически значимо нарастали в течение всего периода раневого заживления начиная с 7-го дня после операции (Рисунок 21).

Применение ДНКЖ слабо влияло на воспалительные изменения в ранах, что согласуется с данными анализа мазков. Тем не менее, спрей с ДНКЖ способствовал резкому приросту объема и зрелости грануляционной ткани на 4-е сутки после операции. В более поздние сроки толщина слоя грануляционной ткани в этой группе практически не менялась, а созревание и фибрирование происходили менее активно, чем в экспериментальной группе 1 (NO-СГП).

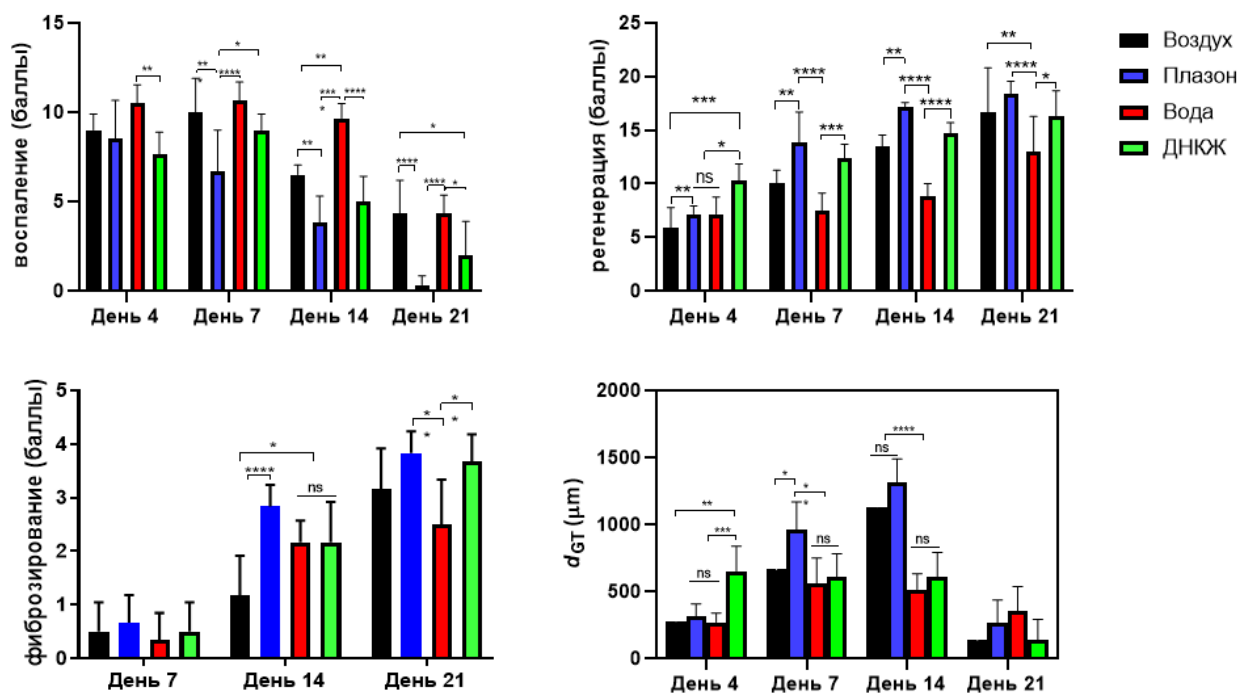


Рисунок 21 – Морфометрическая оценка воспаления, регенерации, фиброзирования, толщины грануляционной ткани в ранах в условиях нормогликемии, двухфакторный анализ ANOVA. d_{GT} – толщина слоя грануляционной ткани, ns- нет различий, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

Изучение активности тучных клеток в условиях нормогликемии. В группе, где раны обрабатывали дистиллированной водой, тучные клетки располагались как в грануляционной ткани, так и в подкожно-жировой клетчатке. В экспериментальной группе (ДНКЖ 50 μg) определялось большое число тучных клеток, однако они преимущественно локализовались в подкожно-жировой клетчатке. При этом в большинстве из них ядро не визуализировалось ввиду высокой плотности гранул, а их функциональная активность на 4-е сутки была достоверно ниже, чем в группах контроля ($p < 0.001$) (Рисунок 22).

На всех сроках наблюдения секреторная активность тучных клеток в этой группе оставалась примерно на одинаковом уровне, в то время как в группе, где раны обдували потоком теплого воздуха, к 14-м суткам она была ниже на 34,5% ($p < 0,05$). К 21-м суткам индекс активности был минимальным в группе, где раны

обрабатывали NO-СГП, он был на 43,5% ниже по сравнению с группой 3 (вода) и на 39,5% относительно группы 4 (ДНКЖ 50 $\mu\text{г}$) ($p < 0,05$, $p < 0,01$ соответственно).

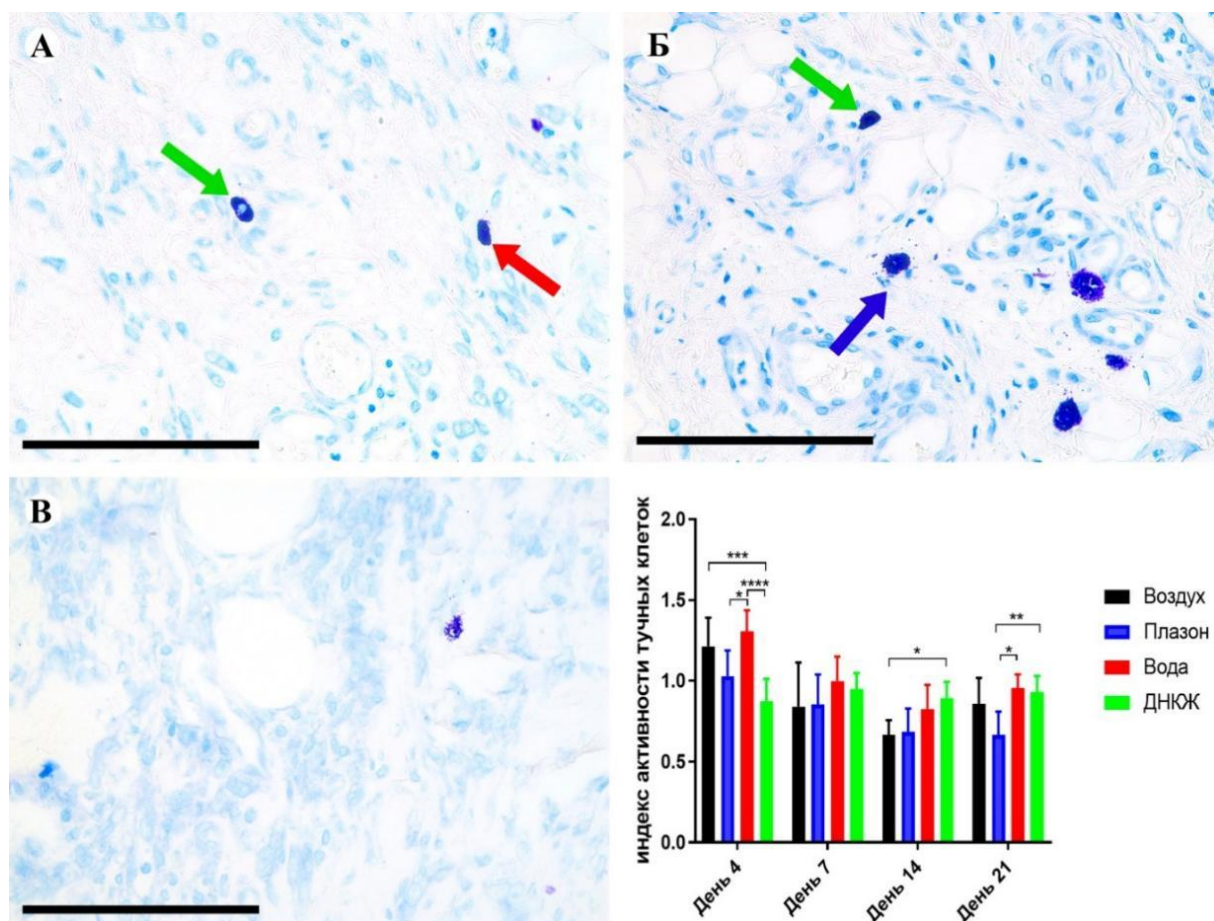


Рисунок 22 – Морфология (А-В) и индекс активности тучных клеток (Г). Красная стрелка – клетка с минимальной активностью (Т1), зеленая стрелка – клетка со слабой активностью (Т2), синяя стрелка – клетки с умеренной активностью (Т3). В – клетка с высокой активностью (Т4). Окраска толуидиновым синим. Увеличение $\times 400$

Поскольку основная роль тучных клеток заключается в усилении локального рекрутирования нейтрофилов, что может приводить к избыточному повреждению тканей, снижение их активности на ранних сроках раневого заживления может благоприятно влиять на течение воспаления [112].

Трансмиссионная электронная микроскопия тканей ран в условиях нормогликемии. На 3-й день после операции в группе, в которой раны обдували воздухом и орошали водой, отмечалось высокое содержание нейтрофилов с

выраженными сегментированными ядрами, плотной цитоплазмой и немногочисленными фагосомами. Также в большом количестве определялись макрофаги с фестончатыми ядрами, многочисленными плотными гранулами в цитоплазме (лизосомы) и длинными выростами цитолеммы. Межклеточное вещество было представлено в основном развлокненными коллагеновыми волокнами (по-видимому, предсуществующими операции), часть из них не имела характерной исчерченности, что свидетельствует об их деструкции (Рисунок 23).

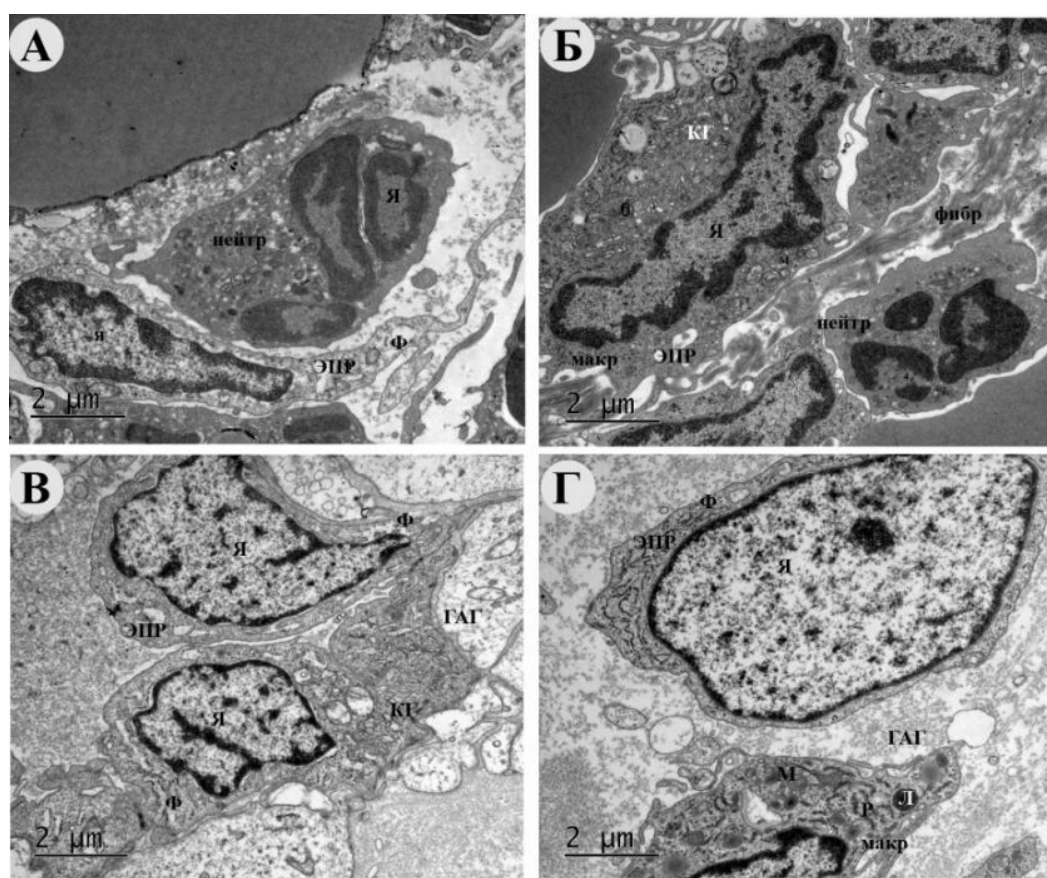


Рисунок 23 – Трансмиссионная электронная микроскопия дна ран животных контрольных групп (воздух (А), вода (Б)) и экспериментальных групп (Плазон (В), ДНКЖ (Г)) на 3-и сутки. Увеличение $\times 15000$. Нейтр – нейтрофил, ф – фибробласт, макр – макрофаг, Я – ядро, М – митохондрия, КГ – комплекс Гольджи, Л – лизосома, Р – рибосома, ГАГ – гликозамингликаны, фибр – фибрин.

На 7-е сутки во всех группах увеличивалось количество фибробластов, но в группах, в которых раны не обрабатывали NO, они имели менее развитый

гранулярный ЭПР (синтетическую активность), чем фибробласты экспериментальных групп. В межклеточном матриксе в контрольных группах преобладали волокна фибрина и протеогликанов, новообразованных волокон коллагена в группе, где раны обдували воздухом, было больше, чем в группе, в которой раны орошали водой. В экспериментальных группах в межклеточном веществе преобладали волокна коллагена, которые организовались в пучки, определялись новообразованные капилляры. ГЭР и комплекс Гольджи в зрелых фибробластах были хорошо развиты (Рисунок 24).

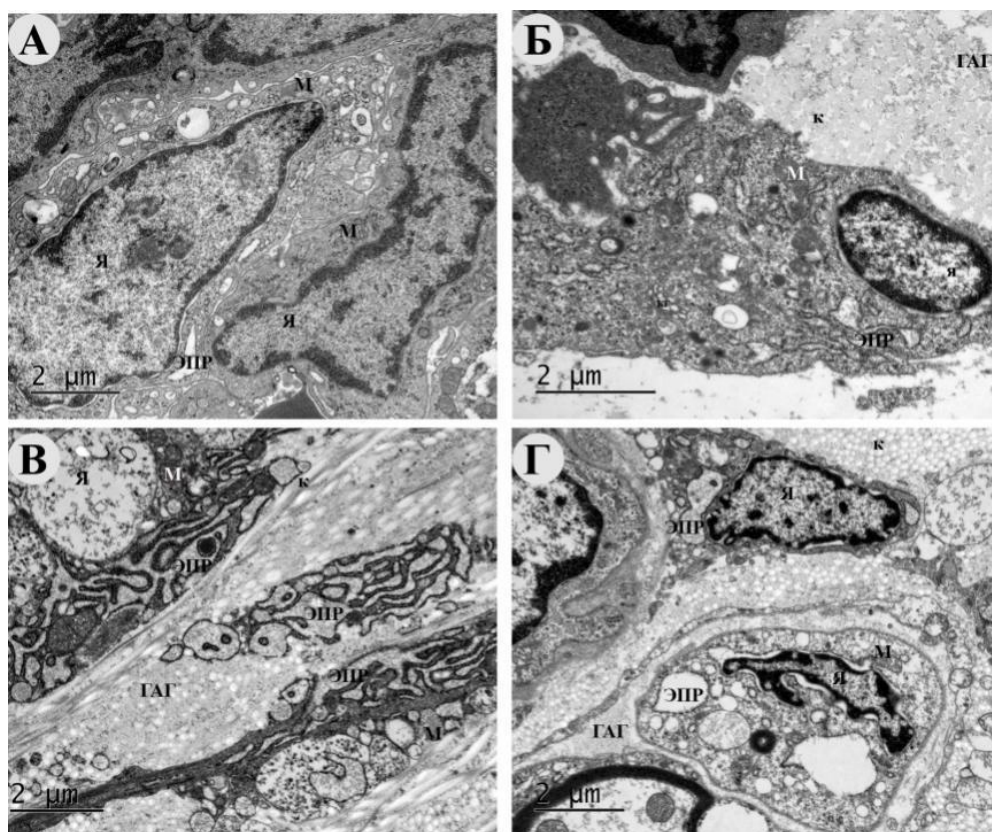


Рисунок 24 – Трансмиссионная электронная микроскопия дна ран животных контрольных (воздух (А), вода (Б)) и экспериментальных групп (Плазон (В), ДНКЖ (Г)) на 7-е сутки. Увеличение $\times 15000$. Я – ядро, М – митохондрия, ГАГ – гликозамингликаны, к – коллаген

К 14-м суткам в экспериментальной группе в грануляционной ткани определялось большее количество фибробластов, чем в контроле. В то время, как

фибробласты в контрольных группах, имели признаки низкой зрелости (светлую цитоплазму, небольшое количество органелл и слабо развитый эндоплазматический ретикулум, фибробласты экспериментальных групп характеризовались высокой синтетической активностью: они имели крупные митохондрии, расширенные цистерны ГЭР, окруженные рибосомами и полисомами. В группах, в которых раны не лечили NO, в межклеточном веществе преобладали гликозамингликаны, а волокна коллагена имели низкую плотность. В экспериментальных группах фибробласты располагались среди плотных пучков коллагеновых волокон (Рисунок 25).

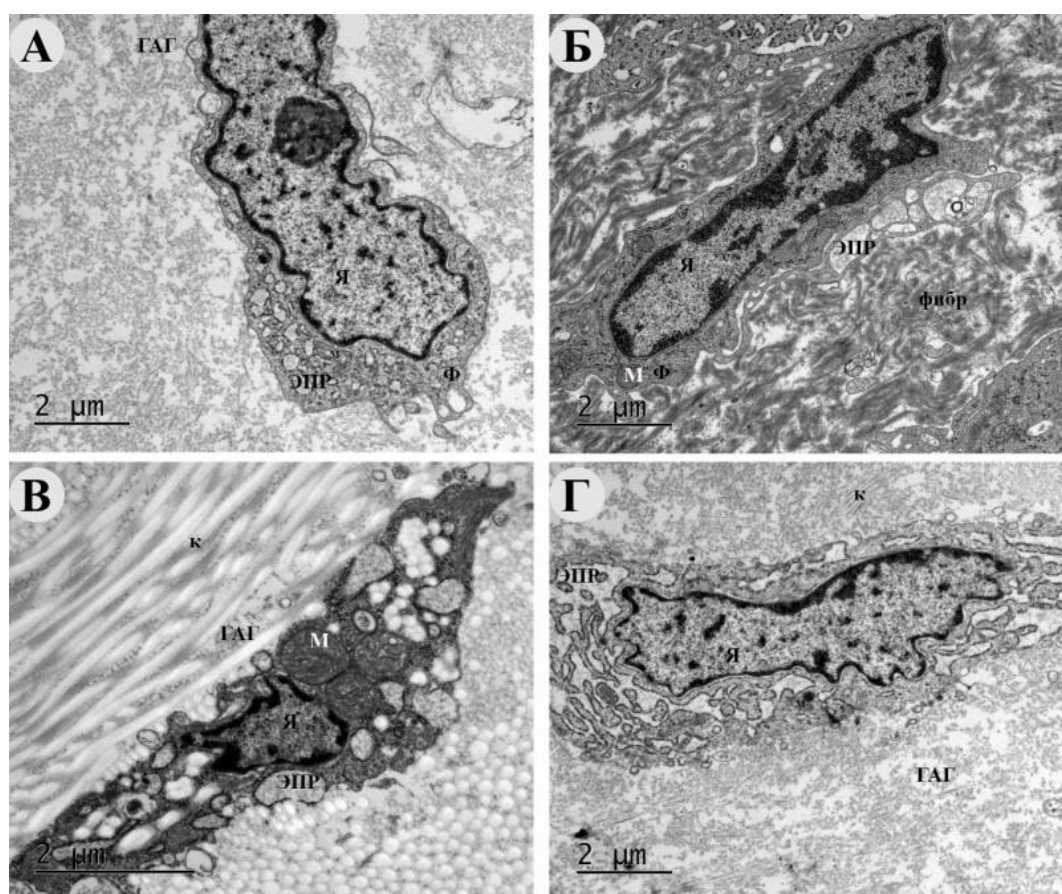


Рисунок 25 – Трансмиссионная электронная микроскопия дна ран животных контрольных (воздух (А), вода (Б)) и экспериментальных групп (Плазон (В), ДНКЖ (Г)) на 14-е сутки. Увеличение $\times 15000$. Ф – фибробласт, Я – ядро, М – митохондрия, ГАГ – гликозамингликаны, фибр – фибрин, к – коллаген

Иммунногистохимическое исследование. На 4-е сутки в группе, где раны обдували воздухом, виментин-положительные клетки в основном локализовались среди волокон фибрина. Они имели высокий уровень экспрессии данного маркера, однако занимали небольшую площадь. В группе, в которой раны обрабатывали NO-СГП, параллельно ориентированные фибробласты, располагались вдоль расширенных и резко полнокровных капилляров и активно экспрессировали виментин. В другой контрольной группе (вода) в грануляционной ткани выявлялось большое количество веретеновидных фибробластов, однако экспрессия виментина отмечалась преимущественно в периваскулярно расположенных клетках-перипитах. В группе, где дно ран орошали раствором ДНКЖ, отмечался наибольший объем грануляционной ткани, характеризующийся высокой клеточностью (Рисунок 26).

На 7-е сутки экспрессия виментина присутствовала во всех фибробластах, поэтому количество позитивных клеток в грануляционной ткани зависело от её объема и зрелости. Таким образом, наибольшая плотность положительных клеток выявлялась в обеих опытных группах и группе, в которой раны обдували потоком воздуха, что наглядно представлено на изображениях, обработанных в программе автоматической сегментации, где клетки, экспрессирующие виментин, образуют единый слой красного цвета (Рисунок 26).

На 14-е сутки площадь виментин-положительных клеток была наибольшей в группе, где раны обдували воздухом. Клетки располагались параллельно и достаточно плотно прилежали друг к другу. В обеих экспериментальных группах фибробласты интенсивно экспрессировали виментин, однако занимали меньшую площадь, чем в предыдущей группе, поскольку к этому сроку их количество в грануляционной ткани снижалось и нарастало содержание коллагеновых волокон; в группе, в которой раны орошали водой, число виментин-положительных клеток оставалось практически таким же, как на более раннем сроке (Рисунок 27).

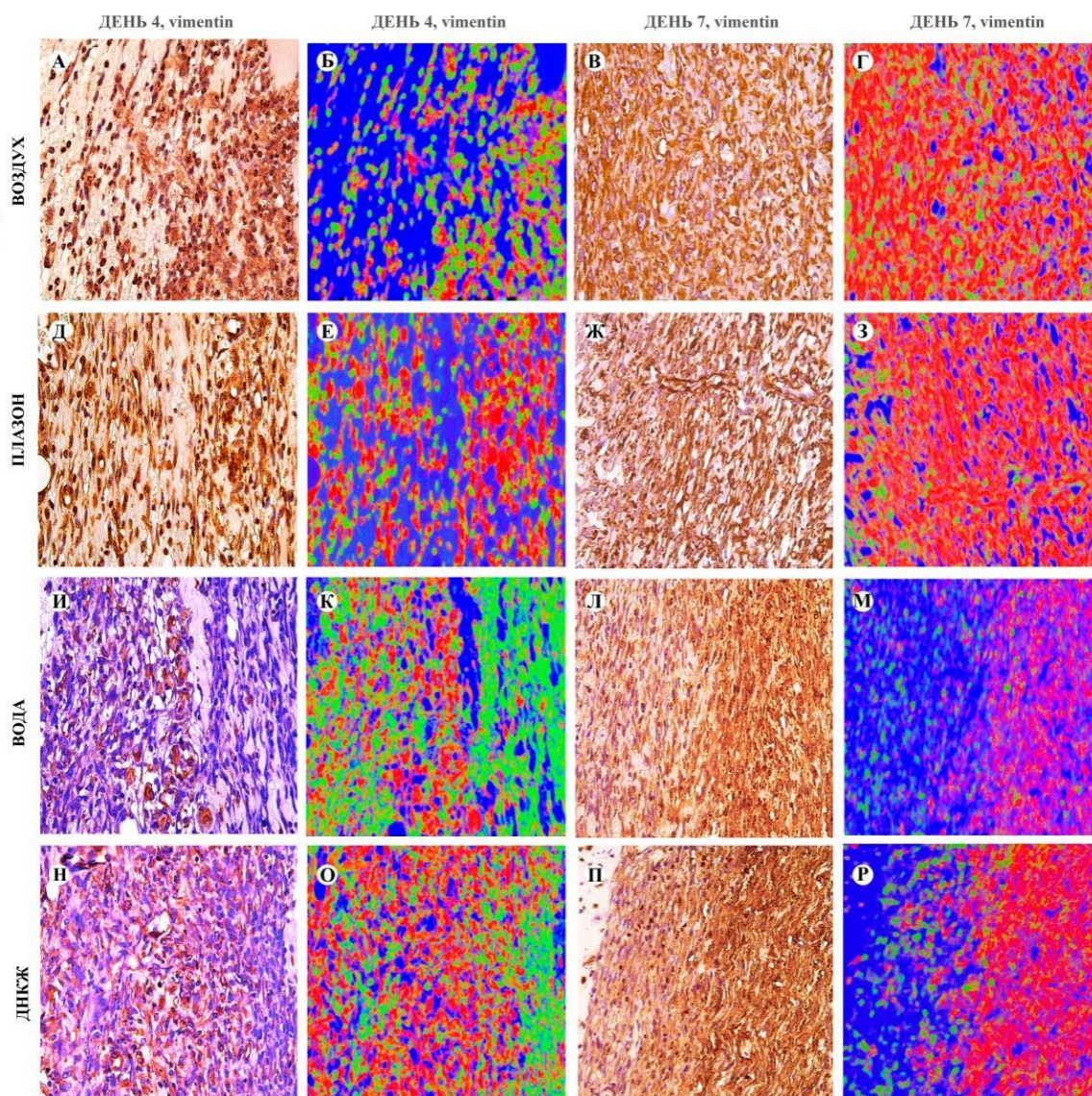


Рисунок 26 – Экспрессия виментина и распределение виментин-положительных клеток в ранах в условиях нормогликемии на 4-е (А, Б, Д, Е, И, К, Н, О) и 7-е сутки (В, Г, Ж, З, Л, М, П, Р), х400. Красный – виментин-положительные клетки, зеленый – виментин-негативные клетки, синий – фон. А – интенсивная экспрессия в глубоких слоях грануляционной ткани; Б – преобладание виментин-негативных клеток (зеленые); В – диффузная, интенсивная экспрессия виментина; Е – положительно окрашенные клетки занимают почти всю площадь; Д – диффузная экспрессия; Е – положительно окрашенные веретеновидные клетки; Ж – экспрессия виментина фибробластами и перицитами; З – толстый слой виментин-положительных клеток; И – периваскулярная экспрессия виментина; К – немногочисленные положительно окрашенные клетки; Л – умеренная экспрессия в глубоких слоях грануляционной ткани; М – виментин-положительные клетки в глубоких слоях грануляционной ткани; Н – умеренная, диффузная экспрессия виментина; О – диффузно расположенные положительно окрашенные клетки; П – интенсивное окрашивание веретеновидных клеток; Р – толстый слой положительно окрашенных клеток

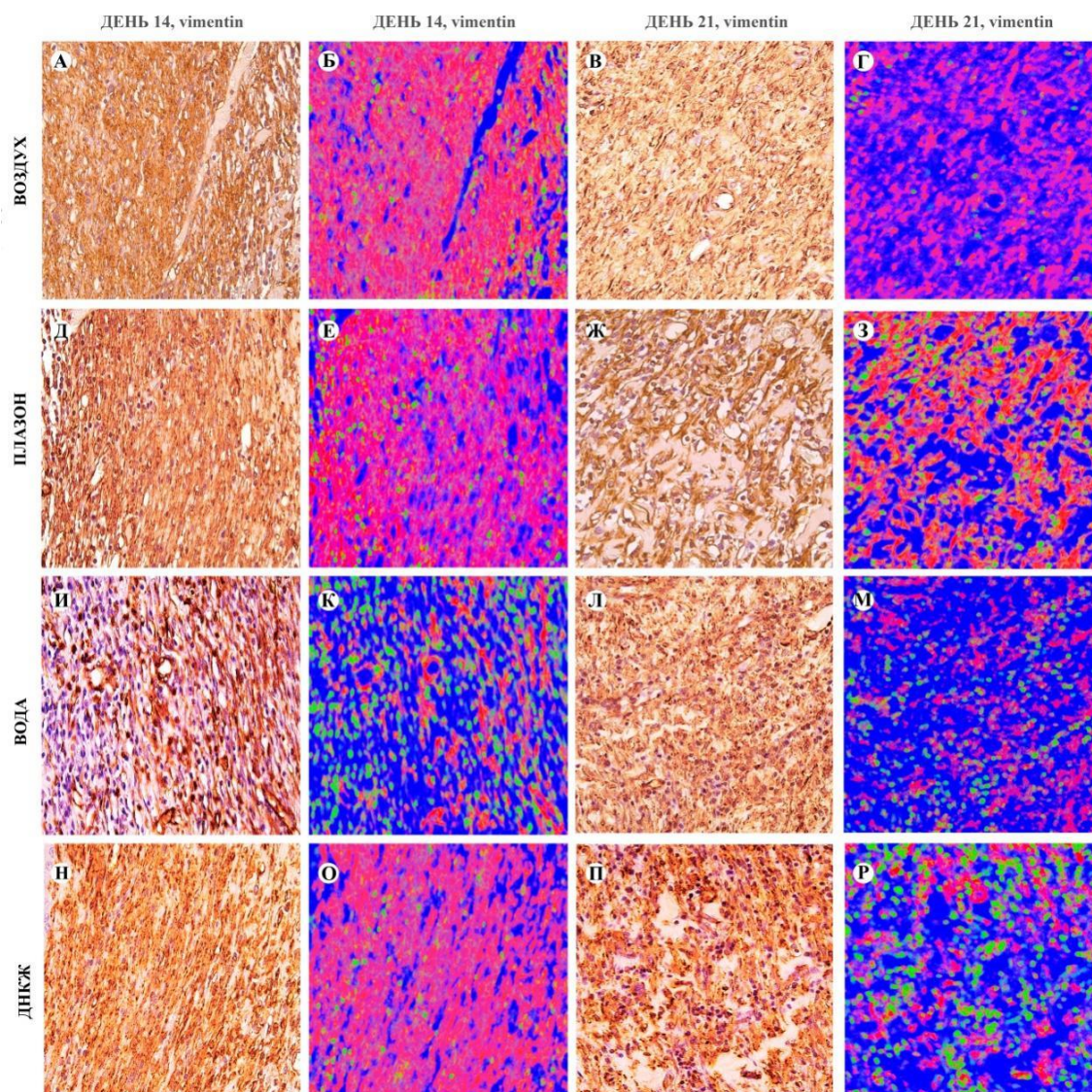


Рисунок 27 – Экспрессия виментина и распределение виментин-положительных клеток в ранах в условиях нормогликемии на 14-е (А, Б, Д, Е, И, К, Н, О) и 21-е сутки (В, Г, Ж, З, Л, М, П, Р), увеличение $\times 400$. Красный – виментин-положительные клетки, зеленый – виментин-негативные клетки, синий – фон. А – диффузная, интенсивная экспрессия; Б – плотный слой виментин-положительных клеток; В – слабая интенсивность окрашивания; Г – диффузно расположенные положительно окрашенные клетки; Д – интенсивная экспрессия в веретеновидных клетках; Е – единый слой положительно окрашенных клеток; Ж – слабая экспрессия в перицитах и фибробластах; З – диффузно расположенные положительно окрашенные клетки; И – умеренная экспрессия виментина веретеновидными клетками и перицитами; К – единичные положительно окрашенные клетки; Л – экспрессия виментина преимущественно в перицитах; М – небольшие участки положительно окрашенных клеток; Н – диффузная, интенсивная экспрессия веретеновидными клетками; О – плотный слой положительно окрашенных клеток; П – виментин-положительные клетки между пучками коллагена; Р – низкое содержание положительно окрашенных клеток

На 21-е сутки все фибробласты были экспрессировали виментин, но их число в грануляционной ткани сокращалось по мере ее созревания и ремоделирования во всех группах наблюдения, кроме контрольной группы 2 (вода) (Рисунок 27). В этой группе продолжалась фаза пролиферации и количество виментин-положительных клеток, увеличивалось по сравнению с более ранними сроками.

При статистическом анализе было доказано, что к 4-м суткам раневого заживления в группе, в которой использовали раствор ДНКЖ, число виментин-положительных клеток было достоверно выше, чем в группе, где раны орошали водой ($p < 0,01$). На 7-е сутки в группах, в которых раны обдували NO-СГП и воздухом средняя площадь клеток, экспрессирующих виментин, составляла 65,5% ($\pm 7,55$) и 63,25% ($\pm 8,75$) соответственно, что было почти в полтора раза выше, чем в экспериментальной группе 2 (ДНКЖ) ($p = 0,001$) и почти в 2 раза выше, чем в контрольной группе 2 (вода) ($p = 0,0001$). К 21-м суткам в основных группах число положительных клеток было значительно меньше, чем в контрольных, однако статистически значимых различий получено не было (Рисунок 28).

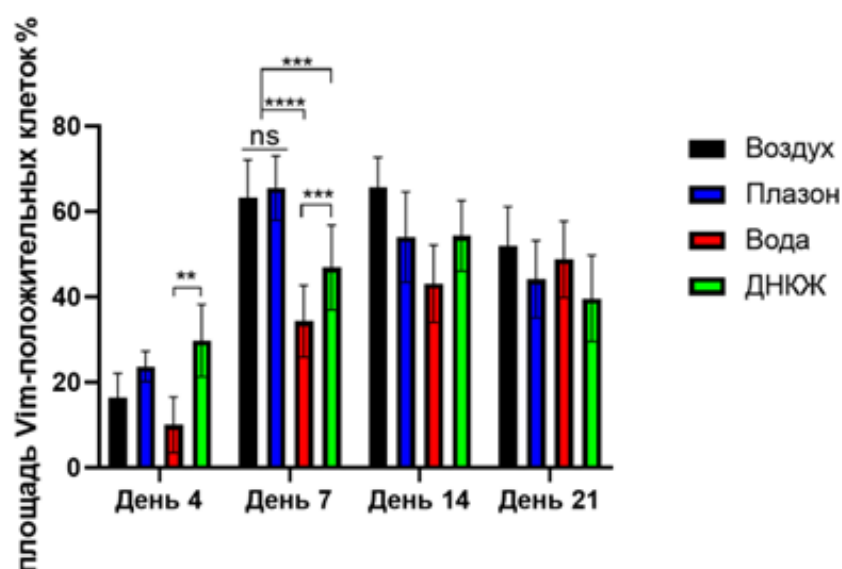


Рисунок 28 – Площадь виментин-положительных клеток в ранах в условиях нормогликемии, двухфакторный анализ ANOVA, ns- нет различий, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

NO-терапия способствует усилению стадии пролиферации за счет увеличения клеток, экспрессирующих виментин – основной маркер фибробластов, в течение первой недели раневого заживления; при этом на 4-е сутки этот эффект более выражен при обработке ран ДНКЖ. В то же использование ДНКЖ и NO-СГП приводило к уменьшению площади виментин-положительных клеток, начиная с 14-х суток после операции, что ассоциировано со снижением риска заживления с образованием рубцовой ткани [189, 190].

На 4-е сутки наиболее выраженная экспрессия α -SMA отмечалась в перицитах. На изображениях, обработанных в программе автоматической сегментации, можно проследить ход новообразованных капилляров. При этом, в отличие от других групп, в группе, где раны орошали раствором ДНКЖ, α -SMA-положительные клетки также определялись среди волокон фибрина (Рисунок 29).

На 7-е сутки, преимущественно в глубоких слоях грануляционной ткани, отмечалось скопление веретеновидных клеток с цитоплазматической экспрессией α -SMA, при цифровой обработке они окрашивались в красный цвет. Также видны α -SMA-негативные клетки (зеленые участки) (Рисунок 29).

Поскольку α -SMA является маркером миофибробластов – клеток, которые на ранних сроках важны для контракции раны, их высокое содержание благоприятно влияет на сокращение размеров ран [191]. Это соотносится с ранее приведенными данными, согласно которым достоверно значимое уменьшение площади ран в экспериментальных группах по сравнению с контрольными происходит на сроке 7 суток (Рисунок 13).

На 14-е сутки во всех группах большинство клеток грануляционной ткани экспрессировали α -SMA и располагались вдоль волокон коллагена. На изображениях в цифровой обработке видно, что они располагались настолько близко друг к другу, что образовывали единый слой (Рисунок 30).

К 21-м суткам наибольшая плотность окрашенных клеток наблюдалась в глубоких слоях грануляционной ткани, в то время как в поверхностных преобладали волокна коллагена и негативные по данному маркеру клетки (Рисунок 30).

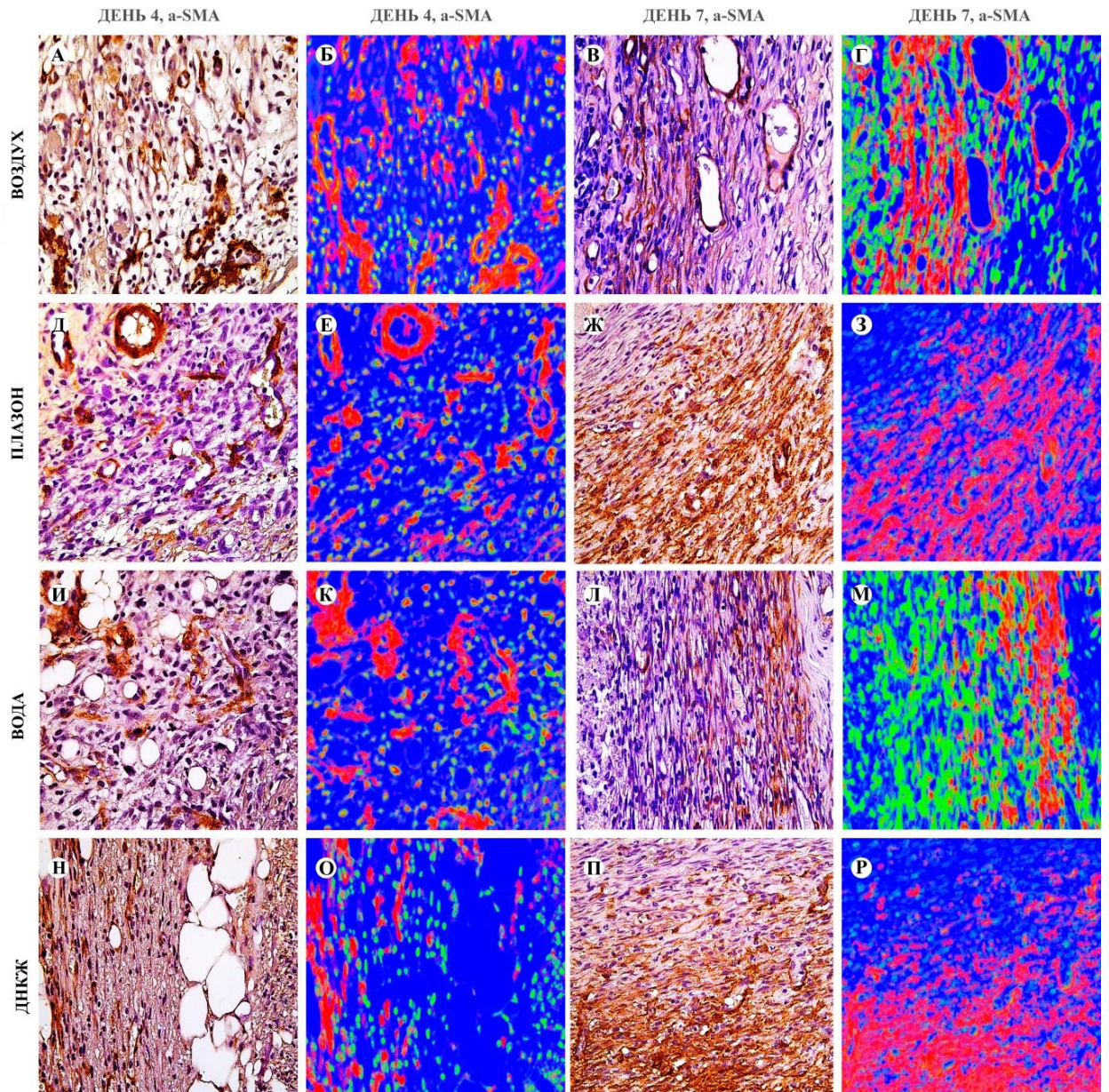


Рисунок 29 – Экспрессия α -SMA и распределение α -SMA-положительных клеток в ранах в условиях нормогликемии на 4-е (А, Б, Д, Е, И, К, Н, О) и 7-е сутки (В, Г, Ж, З, Л, М, П, Р), увеличение $\times 400$. Красный – α -SMA-положительные клетки, зеленый – α -SMA-негативные клетки, синий – фон. А – экспрессия α -SMA перицитами и веретеновидными клетками; Б – α -SMA-положительные участки; В – экспрессия α -SMA веретеновидными клетками; Г – тонкий слой α -SMA-положительных клеток; Д – экспрессия α -SMA преимущественно перицитами; Е – диффузная экспрессия α -SMA; Ж – интенсивная экспрессия веретеновидными клетками; З – толстый слой α -SMA положительных клеток; И – экспрессия α -SMA перицитами; К – сосуды окрашены в красный цвет; Л – экспрессия α -SMA клетками глубоких слоев раны; М – тонкий слой α -SMA-положительных клеток; Н – умеренная экспрессия α -SMA; О – единичные α -SMA-положительные клетки; П – интенсивная экспрессия клетками глубоких слоев раны; Р – положительно окрашенные клетки в глубоких слоях раны

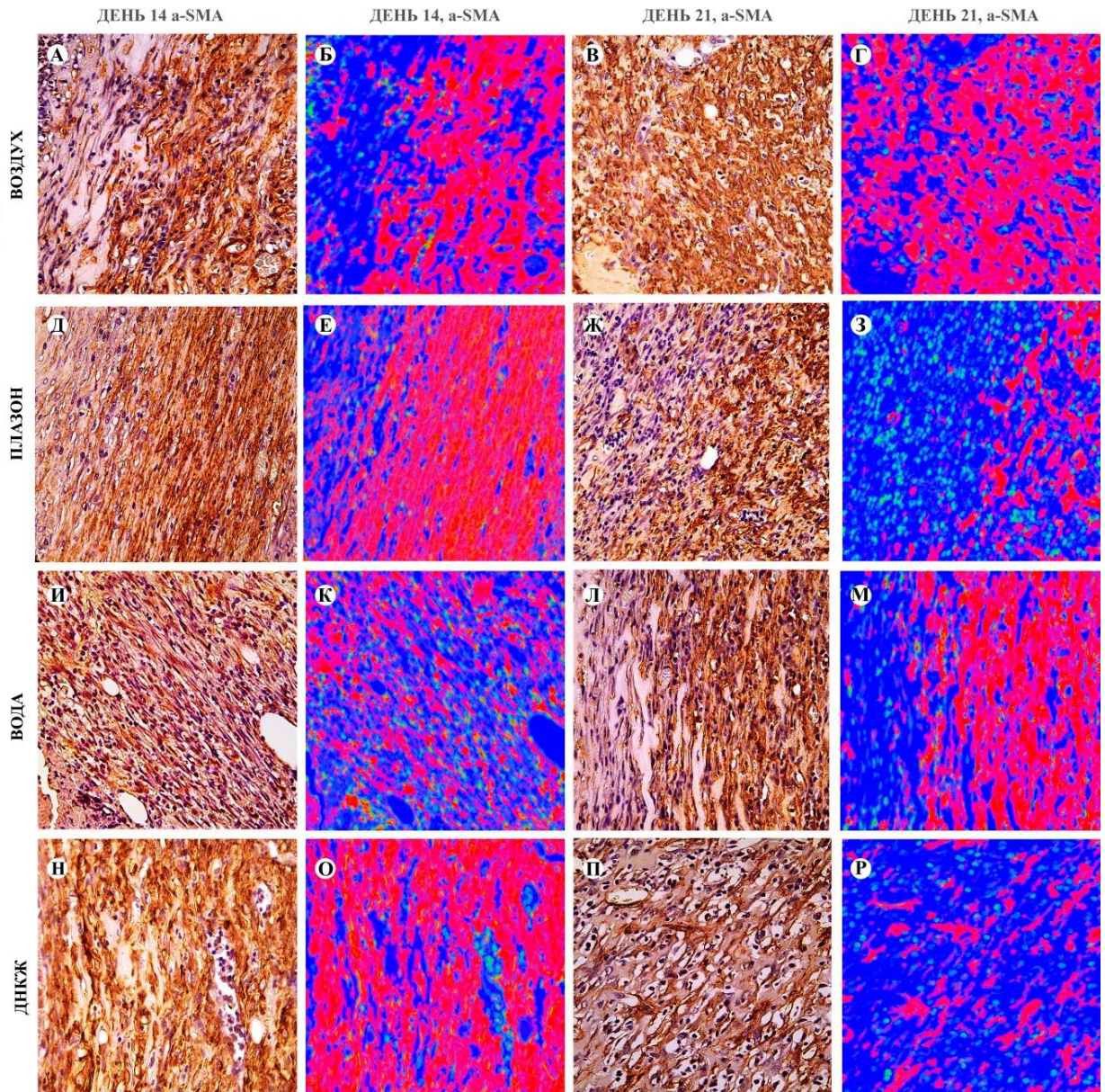


Рисунок 30 – Экспрессия α -SMA и распределение α -SMA-положительных клеток в ранах в условиях нормогликемии на 14-е (А, Б, Д, Е, И, К, Н, О) и 21-е сутки (В, Г, Ж, З, Л, М, П, Р), увеличение $\times 400$. Красный – α -SMA-положительные клетки, зеленый – α -SMA-негативные клетки, синий – фон. А – экспрессия в глубоких слоях раны; Б – толстый слой α -SMA-положительных клеток; В – выраженная экспрессия α -SMA; Г – диффузное расположение α -SMA-положительных клеток; Д – экспрессия веретеновидными клетками; Е – толстый слой α -SMA-положительных клеток; Ж – экспрессия перицитами и веретеновидными клетками; З – экспрессия α -SMA преимущественно перицитами; И – умеренная экспрессия; К – диффузно расположенные α -SMA-положительные клетки; Л – экспрессия веретеновидными клетками; М – α -SMA-положительные клетки в глубоких слоях раны; Н – диффузная экспрессия; О – слой α -SMA-положительных клеток; П – α -SMA-экспрессирующие клетки между пучков коллагена; Р – α -SMA-положительные участки

При статистическом анализе было выявлено, что на 4-е сутки в экспериментальной группе 2 (ДНКЖ) индекс экспрессии α -SMA был ниже, чем в группах, где раны обдували NO-СГП или воздухом ($p < 0,05$). На 7-е сутки в группах, где использовали NO-терапию, площадь α -SMA-положительных клеток была намного больше, чем в группах, в которых раны обрабатывали водой ($p < 0,0001$) или воздухом ($p < 0,001$). При оценке индекса экспрессии, наименьший показатель определялся в группе, где раны орошали водой (ср. значение $0,43 \pm 2,8$); он был ниже, чем в экспериментальных группах 1 (Плазон) и 2 (ДНКЖ) на 53% ($p < 0,001$) и 43% ($p < 0,05$) соответственно. На 14-е сутки различия в уровне индекса экспрессии были получены между группами, где раны обрабатывали ДНКЖ и водой ($1,5 \pm 0,6$ против $1,18 \pm 0,31$; $p < 0,05$). При этом площадь α -SMA-положительных клеток во контрольной группе 2 (вода) была на 23% ниже, чем в группе, в которой раны обдували NO-СГП ($p < 0,01$) и на 19%, чем в группе, в которой применяли ДНКЖ ($p < 0,05$). К 21-м суткам в группах контроля количество α -SMA-положительных клеток продолжало медленно увеличиваться, а в экспериментальных снижаться ($p < 0,05$). В экспериментальной группе 2 (ДНКЖ) индекс экспрессии α -SMA был на 66,5% и 37% ниже, чем в контрольных группах 1 (воздух) ($p < 0,001$) и 2 (вода) ($p < 0,05$) соответственно (Рисунок 31).

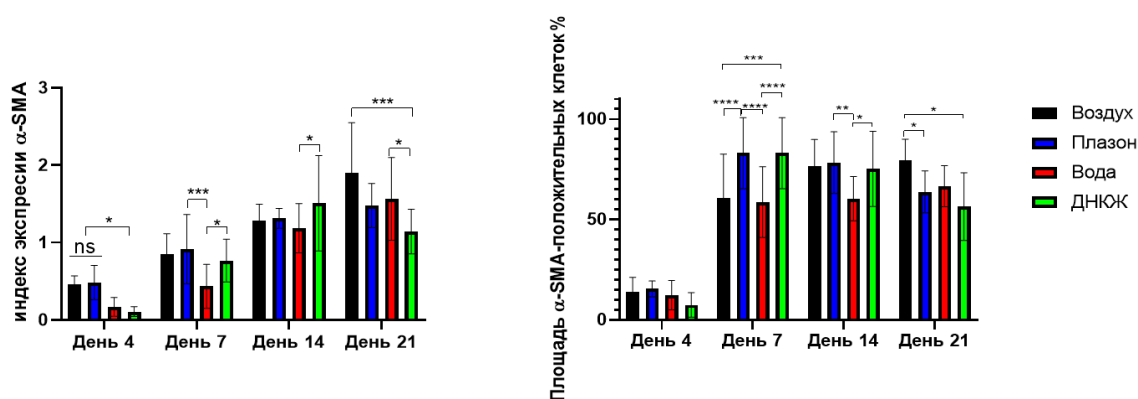


Рисунок 31 – Индекс экспрессии α -SMA и площадь α -SMA-положительных клеток в ранах в условиях нормогликемии, двухфакторный анализ ANOVA, ns- нет различий, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

При нормальных условиях на поздних сроках раневого заживления количество миофибробластов сильно снижается, что предотвращает чрезмерное сокращение краев раны и образование рубцов [191, 192]. На рисунке 11 видно, что у животных, для лечения ран которых использовали методы NO-терапии, к 21-м суткам удавалось достичь эпителизации раневого дефекта и заживления линейным рубцом без признаков контракции.

Таким образом, использование NO-СГП и ДНКЖ позволяет ускорять сокращение площади ран на ранних сроках раневого заживления (7 суток) за счет стимуляции дифференцировки миофибробластов и предотвращает рубцовую деформацию тканей на поздних сроках (21-е сутки) ввиду снижения числа и активности этих клеток.

Фактор транскрипции NF-κB – ключевой регулятор воспалительного ответа. Он играет важную роль в иммунной защите, в других исследованиях была продемонстрирована важность его активации для реэпителизации ран [189]. Также сигнальный путь NF-κB участвует в таких процессах, как регуляция и контроль клеточной пролиферации, апоптоза и клеточного цикла, что подчеркивает его значимость для раневого заживления [193, 194]. Он находится в цитоплазме клеток в неактивной форме и активируется под влиянием различных факторов в числе которых ультрафиолетовое излучение, активные радикалы, NO и другие [189]. В результате происходит его высвобождение из связанного состояния и транслокация в ядро клетки, что стимулирует транскрипцию [189, 193, 194]. Таким образом, показатель активности NF-κB представлен как отношение индекса ядерной экспрессии к цитоплазматической.

На 4-е сутки NF-κB в макрофагах была достаточно выраженной. При этом в экспериментальных группах она была интенсивнее в ядре, в то время как в контрольных – в цитоплазме. Данный маркер также экспрессировался в фибробластах. В контрольных группах хаотично расположенные, незрелые фибробласты грануляционной ткани имели слабую положительную экспрессию NF-κB в цитоплазме. В экспериментальных группах (NO-СГП, ДНКЖ) ядерная экспрессия была намного интенсивнее, чем цитоплазматическая (Рисунок 32).

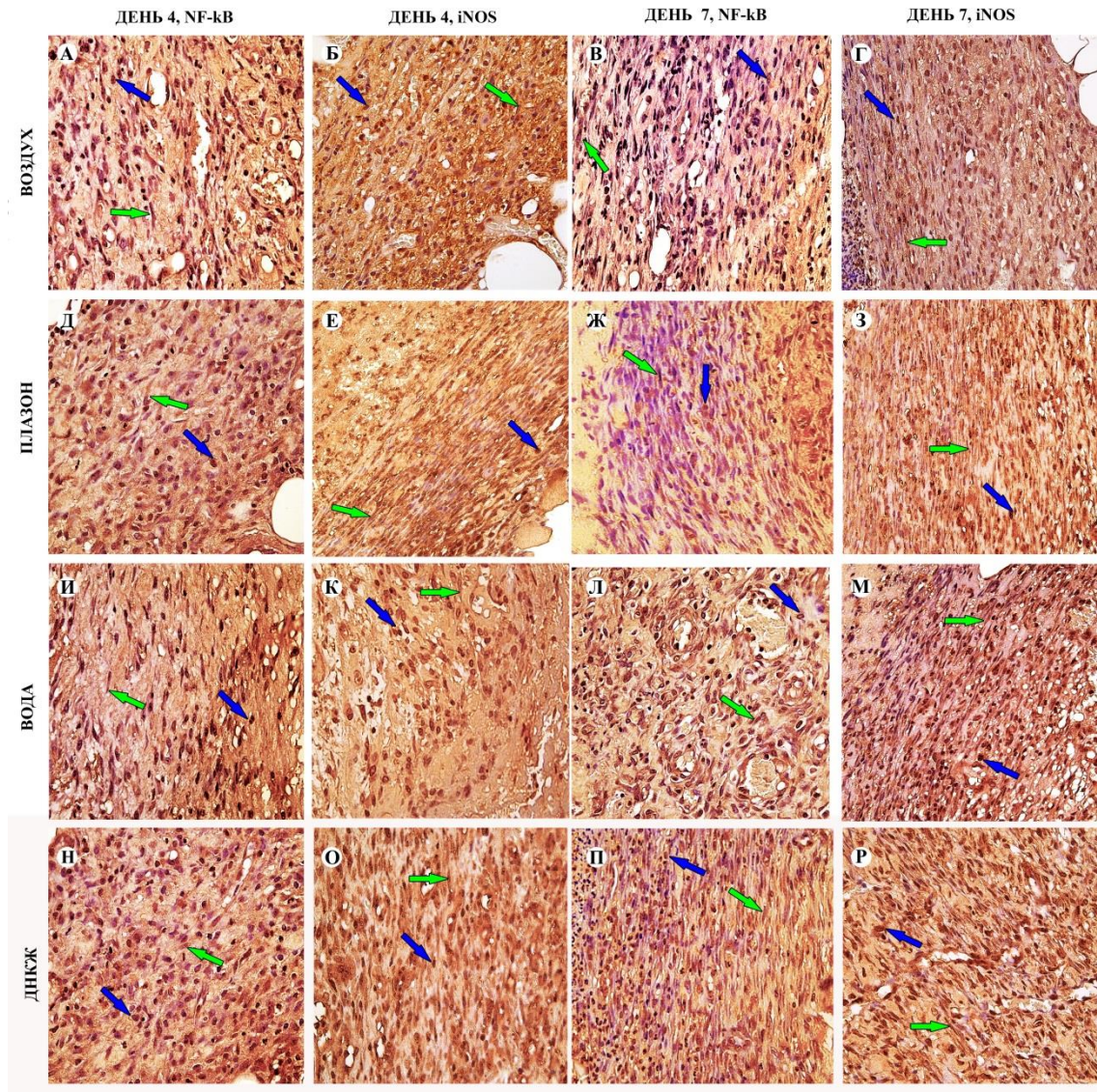


Рисунок 32 – Экспрессия NF-κβ (А, В, Д, Ж, И, Л, Н, П) и iNOS (Б, Г, Е, З, К, М, О, Р) в ранах в условиях нормогликемии на 4-е и 7-е сутки, увеличение x400. Зеленая стрелка – фибробласт, синяя – макрофаг. А – немногочисленные NF-κβ-положительные клетки; Б – экспрессия iNOS преимущественно в глубоких слоях раны; В – умеренно выраженная экспрессия iNOS; Г – NF-κβ-положительные макрофаги и единичные фибробласты; Д – умеренная экспрессия макрофагами и фибробластами; Е – iNOS-положительные клетки в глубоких слоях раны; Ж – NF-κβ-положительные макрофаги малочисленные фибробласты; З – интенсивная, диффузная экспрессия; И – умеренная экспрессия NF-κβ; К – немногочисленные фибробласты и макрофаги, экспрессирующие iNOS; Л – NF-κβ-положительные фибробласты; М – диффузная экспрессия iNOS; Н – слабая экспрессия NF-κβ макрофагами; О – интенсивная экспрессия iNOS фибробластами; П – выраженная экспрессия NF-κβ макрофагами; Р – экспрессия iNOS эндотелием, макрофагами, веретеновидными клетками

На 7-е сутки в экспериментальных группах макрофагальная инфильтрация снизилась относительно более раннего срока наблюдения и групп контроля, однако клетки продолжали активно экспрессировать NF-κB. В группах, в которых раны обрабатывали NO-СГП и раствором ДНКЖ, к 7-м суткам грануляционная ткань характеризовалась достаточно высокой степенью зрелости, при этом экспрессия NF-κB отмечалась преимущественно в фибробластах глубоких слоев раны и была более выражена в цитоплазме клеток, в то время как в контрольных группах преобладала ядерная экспрессия данного белка (Рисунок 32).

При статистическом анализе на 4-е сутки в группе, в которой раны обрабатывали ДНКЖ, индекс активности NF-κB в макрофагах был на 42% выше, чем в группе, где раны обдували воздухом ($p < 0,0001$) и на 27% выше, чем в группе, в которой дефекты орошали водой ($p < 0,01$). Применение NO-СГП также способствовало увеличению экспрессии этого маркера по сравнению с контрольной группой 1 (воздух) ($p < 0,05$). NO-терапия способствовала увеличению индекса активности NF-κB в фибробластах. На данном сроке этот показатель был достоверно выше, чем в обеих группах контроля ($p < 0,0001$).

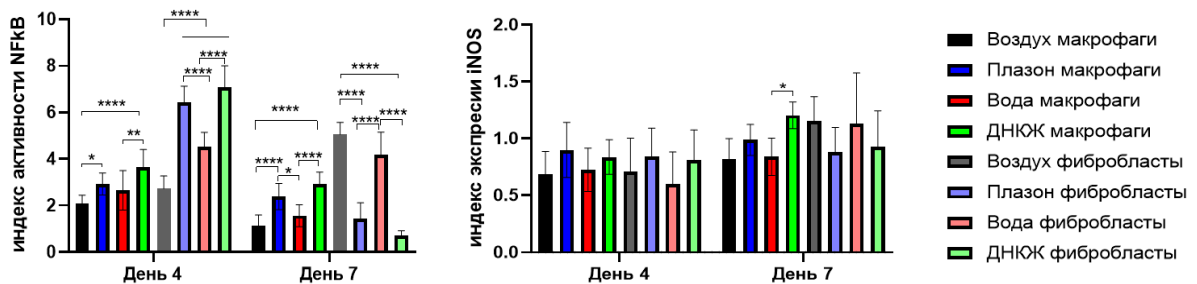


Рисунок 33 – Индекс активности NF-κB и индекс активности iNOS в ранах в условиях нормогликемии, двухфакторный анализ ANOVA, ns- нет различий, *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

На 7-е сутки отличия в индексе активности NF-κB в макрофагах, обнаруженные на 4-е сутки раневого заживления стали более выраженными и

достоверными. При анализе данного показателя в фибробластах наблюдалась картина, противоположная полученной на более раннем сроке: активность NF-κB была достоверно выше в группах контроля (воздух и вода), чем в группах, в которых применяли экзогенный NO ($p < 0,0001$), что связано, по-видимому, с более быстрой дифференцировкой клеток (Рисунок 33).

Индукцибельная синтаза оксида азота является необходимым ферментом для синтеза NO и важным фактором для нормального коллагеногенеза во время заживления ран. Поскольку известно, что активированный димер NF-κB связывается с 5'-фланкирующей областью промотора iNOS и индуцирует образование этого фермента, было проведено сравнение уровней активности NF-κB и iNOS.

На 4-е сутки раневого заживления практически во всех макрофагах изучаемых групп отмечалась интенсивная экспрессия iNOS. В ранах животных, которые обрабатывали водой, данный белок выявлялся преимущественно в фибробластах участков низкой зрелости грануляционной ткани, в других группах он определялся в фибробластах глубоких слоев ран (Рисунок 32). Статистически достоверных различий в индексе экспрессии на данном сроке получено не было.

На 7-е сутки, несмотря на то, что в группе, где использовали раствор ДНКЖ, количество макрофагов было меньше, чем в контрольной группе 2 (вода), практически все макрофаги активно экспрессировали iNOS и индекс экспрессии был выше на 30% ($p < 0,05$) (Рисунок 33). В то же время во всех группах отмечались многочисленные, диффузно расположенные iNOS –положительные фибробласты. В контрольных группах (воздух, вода) клетки окрашивались интенсивнее, чем в группах, в которых применяли NO- терапию, что повлияло на показатель индекса экспрессии (Рисунок 32). Тем не менее, статистически значимых различий получено не было.

На протяжении десятилетий индукцибельная синтаза оксида азота считалась одним из основных ферментов, роль которого заключается в образовании активных радикалов, которые негативно влияют на выживаемость клеток. Однако более поздние исследования выявили, что помимо необратимого повреждения

клеточных органелл, мембран, белков и ДНК, при низких или умеренных концентрациях эти соединения активируют внутриклеточные сигнальные пути, стимулируя выработку факторов, участвующих в росте и пролиферации клеток [124, 194]. Таким образом, повышение экспрессии iNOS в макрофагах ран животных экспериментальных групп на ранних сроках раневого заживления может оказывать благоприятный эффект на активность воспаления и элиминацию микробов и разрушенных тканевых элементов. Повышение индекса экспрессии iNOS в фибробластах на 7-е сутки важно для стимуляции коллагеногенеза в регенерирующей ране.

В результате проведенного комплексного гистологического исследования было доказано, что терапия NO-терапия эффективно стимулирует раневое заживление посредством активации пролиферации фибробластов и миофибробластов, модуляции пути NF- κ B на ранних сроках раневого заживления. При этом применение NO-СГП способствует ускорению контракции краев раны и ее эпителизации, достоверно снижает активность воспалительного процесса, прогрессивно ускоряет рост и созревание грануляционной ткани. В то время как использование ДНКЖ снижает активность тучных клеток и активнее влияет на интенсивный рост и созревание грануляционной ткани в первые сутки раневого заживления.

В результате проведенного комплексного гистологического исследования было доказано, что терапия NO-терапия эффективно стимулирует раневое заживление посредством активации пролиферации фибробластов и миофибробластов, модуляции пути NF- κ B на ранних сроках раневого заживления. При этом применение NO-СГП способствует ускорению контракции краев раны и ее эпителизации, достоверно снижает активность воспалительного процесса, прогрессивно ускоряет рост и созревание грануляционной ткани. В то время как использование ДНКЖ снижает активность тучных клеток и активнее влияет на интенсивный рост и созревание грануляционной ткани в первые сутки раневого заживления.

3.4. Стимуляция раневого заживления в условиях стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета

Макроскопическое описание ран. На следующие сутки после операции раны всех животных были чистыми с гладким, блестящим дном.

На вторые сутки у 3 из 5 животных контрольной группы (без лечения) по краям ран отмечалось скопление рыхлого фибрина, во всех случаях наблюдения дно было покрыто тонким слоем прозрачного экссудата. У 2 из 5 крыс, раны которых орошали раствором ДНКЖ, к данному сроку по периферии дефекта обнаруживали тонкий слой фибрина, у других дно было блестящим и гладким. В группе, в которой использовали NO-СГП, раны характеризовались чистой и блестящей поверхностью.

На 3-и и 4-е сутки в группе контроля в 100% случаев отмечали выпадение фибрина, у 3 животных он полностью покрывал дно раны. В экспериментальной группе 1 (Плазон) в 2 случаях на дне ран наблюдали небольшое количество прозрачного экссудата и тонкий слой фибрина по краям ран. В экспериментальной группе 2 (ДНКЖ) на 3-й день после операции динамика макроскопических изменений отсутствовала, на 4-й день – у 4 из 5 животных определялась слабая экссудация и гиперемия дна ран (Рисунок 34), у половины из них сохранялись фибриновые наложения по периферии дефекта.

На 7-е сутки дно ран всех животных было покрыто струпом, плотно связанным с подлежащими тканями. При этом в контрольной группе площадь и форма раны не изменились по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, в то время как в обеих экспериментальных группах она уменьшилась, раны всех животных приобретали неправильную форму (Рисунок 34).

На 14-е сутки в группах, в которых применяли NO-терапию, отмечали краевую эпителизацию, в то время как в контроле уменьшение размера ран происходило в основном за счет контракции (Рисунок 34). У животных экспериментальных групп площадь дефектов была более, чем на 25% ниже, чем у крыс, которым не проводили лечения ($p < 0.01$) (Рисунок 35).

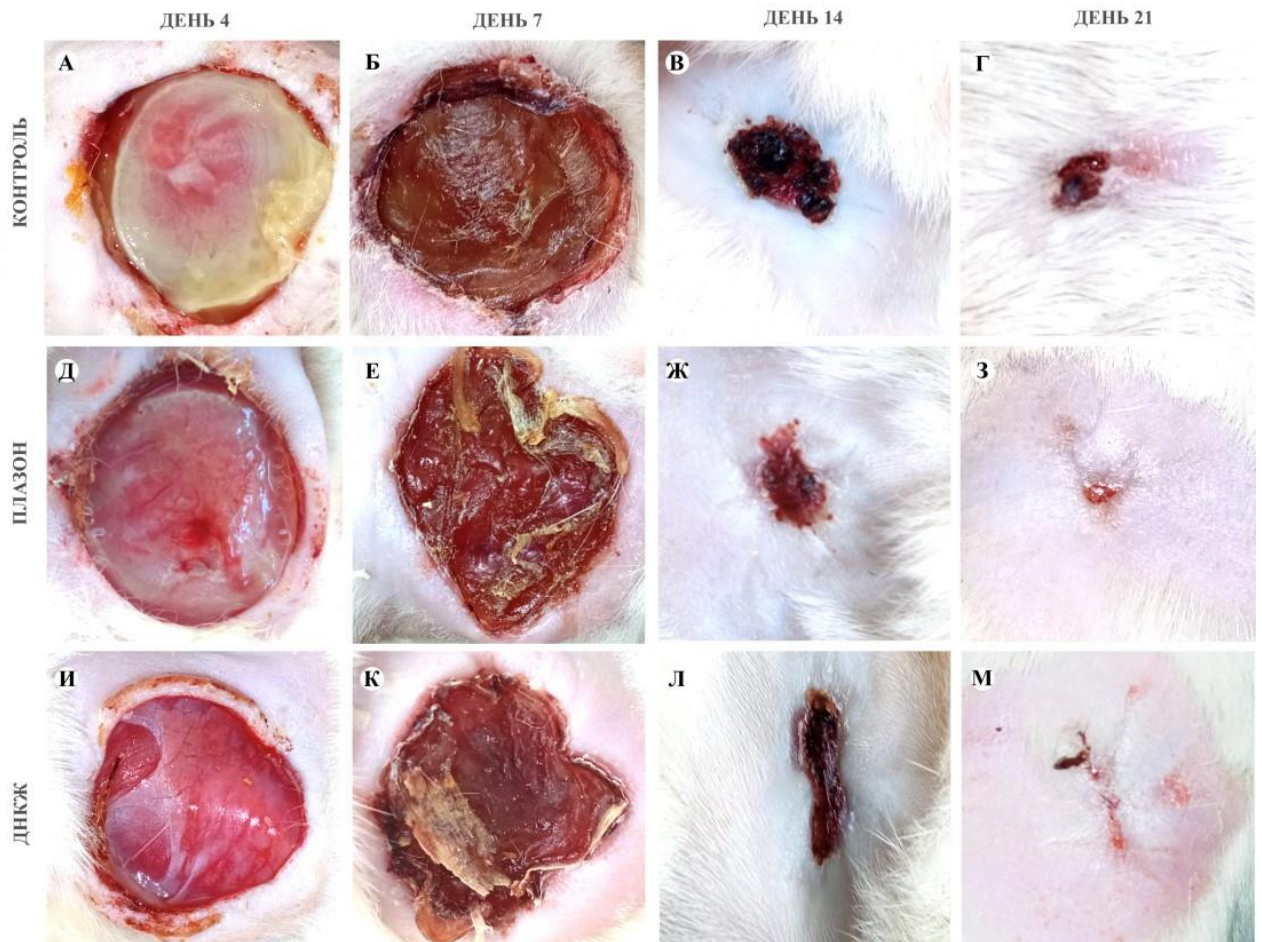


Рисунок 34 – Макроскопическая картина дна ран животных с сахарным диабетом на 4-е (А, Б, В), 7-е (Г, Д, Е), 14-е (Ж, З, И), 21-е (К, Л, М) сутки. А – отложения фибрина по периферии раны; Б – плотный струп; В – струп покрывает дно раны; Г – краевая эпителизация, открытый раневой дефект; Д – тонкая сеть фибрина; Е – дефект неправильной формы покрыт струпом; Ж – выраженная контракция раны, краевая эпителизация; З – почти полная эпителизация; И – чистое раневое дно; К – плотный струп с фрагментом опилок; Л – линейный раневой дефект; М – контракция и почти полная эпителизация раны

К 21-м сутки в контрольной группе средний размер раны составлял $0,86 \pm 0,32$ см, на этом сроке отмечалось появление эпителизации. Наиболее выраженное сокращение площади ран наблюдали в группе, в которой раны обдували NO-СГП. У 3 из 5 животных размер дефекта не превышал $0,3 \text{ см}^2$, вокруг них наблюдалась выраженная эпителизация (Рисунок 34). В другой экспериментальной группе у 2 животных раны оставались достаточно

обширными, в то время как у 2 других наблюдалось почти полное смыкание краев дефектов (Рисунок 34).

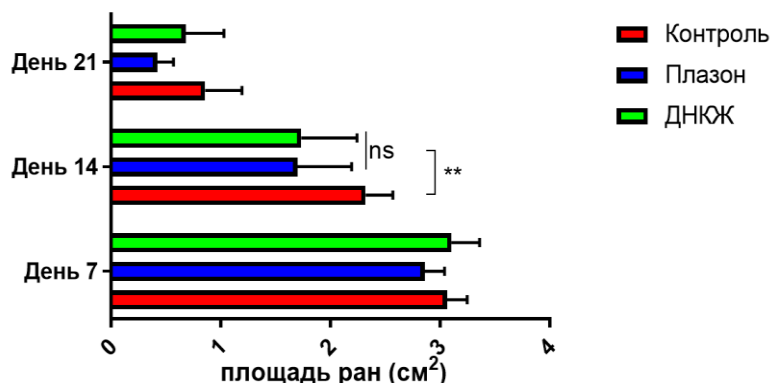


Рисунок 35 – Морфометрическая оценка скорости контракции ран животных с сахарным диабетом, двухфакторный анализ ANOVA; ns- нет различий, ** - $p < 0,01$

Достоверное уменьшение площади дефектов в экспериментальных группах по сравнению с животными, оставленными без лечения, наблюдалось только на 14-е сутки после операции. NO-терапия способствовала сокращению размеров ран более, чем на 25% ($p < 0.01$) (Рисунок 35).

При комплексном биохимическом анализе образцов венозной крови в контрольные точки 4, 7, 14, 21 сутки средние значения основных показателей между группами не отличались. Уровень глюкозы на всех сроках составлял $14 \pm 4,1$ ммоль/л, мочевины – $4,85 \pm 1,7$ ммоль/л, креатинина – $16 \pm 2,6$ μ моль/л, альбумина – $58 \pm 4,6$ г/л, АЛТ – $15 \pm 1,7$ Ед/л, АСТ – $16 \pm 3,2$ Ед/л.

Цитологическое исследование мазков-отпечатков. При анализе мазков на 3- и 4-е сутки максимальное число нейтрофилов наблюдалось в группе, в которой животные не получали лечения. Количество полиморфно-ядерных лейкоцитов в этой группе было на 24,5% выше, чем в группе, где раны обдували NO-СГП ($p < 0,001$). На 4-е сутки разница между данными группами составляла уже 30% ($p < 0,001$) (Рисунок 36). Важно отметить, что за указанный период в обеих

экспериментальных группах число нейтрофилов имело тенденцию к снижению, в то время как в контрольной группе их количество нарастало, что можно расценивать как прогрессирование воспаления.

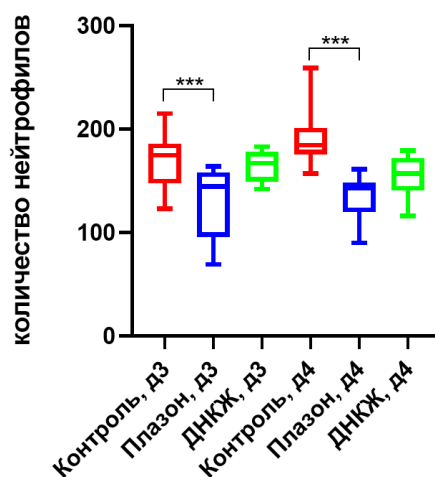


Рисунок 36 - Анализ количества нейтрофилов в ранах животных с сахарным диабетом, двухфакторный анализ ANOVA, *** - $p < 0,001$

Гистологическое исследование тканей ран животных с сахарным диабетом на сроках 4-х, 7-х, 14-х, 21-х суток. На 4-е сутки в контрольной группе (без лечения) фибринозно-лейкоцитарный слой был значительно толще, чем в группах сравнения. В верхних слоях он был плотный, в 3 из 5 случаев наблюдения в нем выявлялись колонии микроорганизмов. В более глубоких слоях фибрин представлял собой рыхлую сеть, инфильтрированную макрофагами и нейтрофилами (Рисунок 37). В группе, в которой раны обдували потоком NO-СП, бактериальная контаминация определялась у 2 животных, в группе, где раны орошали раствором ДНКЖ, микробные колонии отсутствовали, однако воспалительные изменения были достаточно выражены: в одном случае определялся микроабсцесс, в другом – участки с некротическими изменениями в мышечной ткани. В контрольной группе у большинства животных ($n=3$) грануляционная ткань полностью отсутствовала. У других она была представлена небольшими очагами в подкожно-жировой клетчатке, и несколькими слоями

немногочисленных хаотично расположенных фибробластов, окружающими мышечные волокна. Капилляры были немногочисленны и полнокровны, в их просветах выявлялись иммунные клетки. Просветы отдельных сосудов были обтурированы тромботическими массами. В ткани определялись диапедезные кровоизлияния и диффузная воспалительная инфильтрация. Фазово-контрастная микроскопия выявляла преобладание фибриновых волокон и обрывки волокон с выраженной фибриллярной структурой (коллагеновые) (Рисунок 38). При окраске пикро-маллори в глубоких слоях раны окрашенных в красный цвет коллагеновых волокон было достаточно много, однако при поляризационной микроскопии они давали анизотропию красного цвета, что указывает на то, что они являются обрывками собственной фасции (Рисунок 37, Рисунок 38). В группе, в которой раны обдували NO-СГП, в большинстве случаев (n=3) грануляционная ткань была представлена 2-3 слоями незрелых, пролиферирующих фибробластов и активно прорастала подлежащую жировую и мышечную ткань в виде тонких септ (Рисунок 37). В 2 случаях она формировала единый слой и содержала многочисленные новообразованные капилляры, что указывало на начало ее созревания. При фазово-контрастной микроскопии в ранах преобладали фибриновые волокна, однако при окраске пикро-маллори выявлялись немногочисленные, новообразованные волокна коллагена (Рисунок 38). При поляризационной микроскопии они давали слабую анизотропию (Рисунок 37, Рисунок 38).

Несмотря на выраженные воспалительные изменения в экспериментальной группе 2 (ДНКЖ), у абсолютного большинства животных (n=4) грануляционная ткань была представлена единым слоем, активно прорастающим подлежащие ткани (Рисунок 37). Он характеризовался высоким содержанием фибробластов с многочисленными митозами и полнокровными капиллярами (Рисунок 38). При фазово-контрастной микроскопии коллагеновых волокон было больше, чем в других группах, что также подтверждалось при окраске пикро-маллори. При поляризационной микроскопии часть волокон имела анизотропию желтого и зеленого цвета, в других анизотропия отсутствовала (Рисунок 37, Рисунок 38).

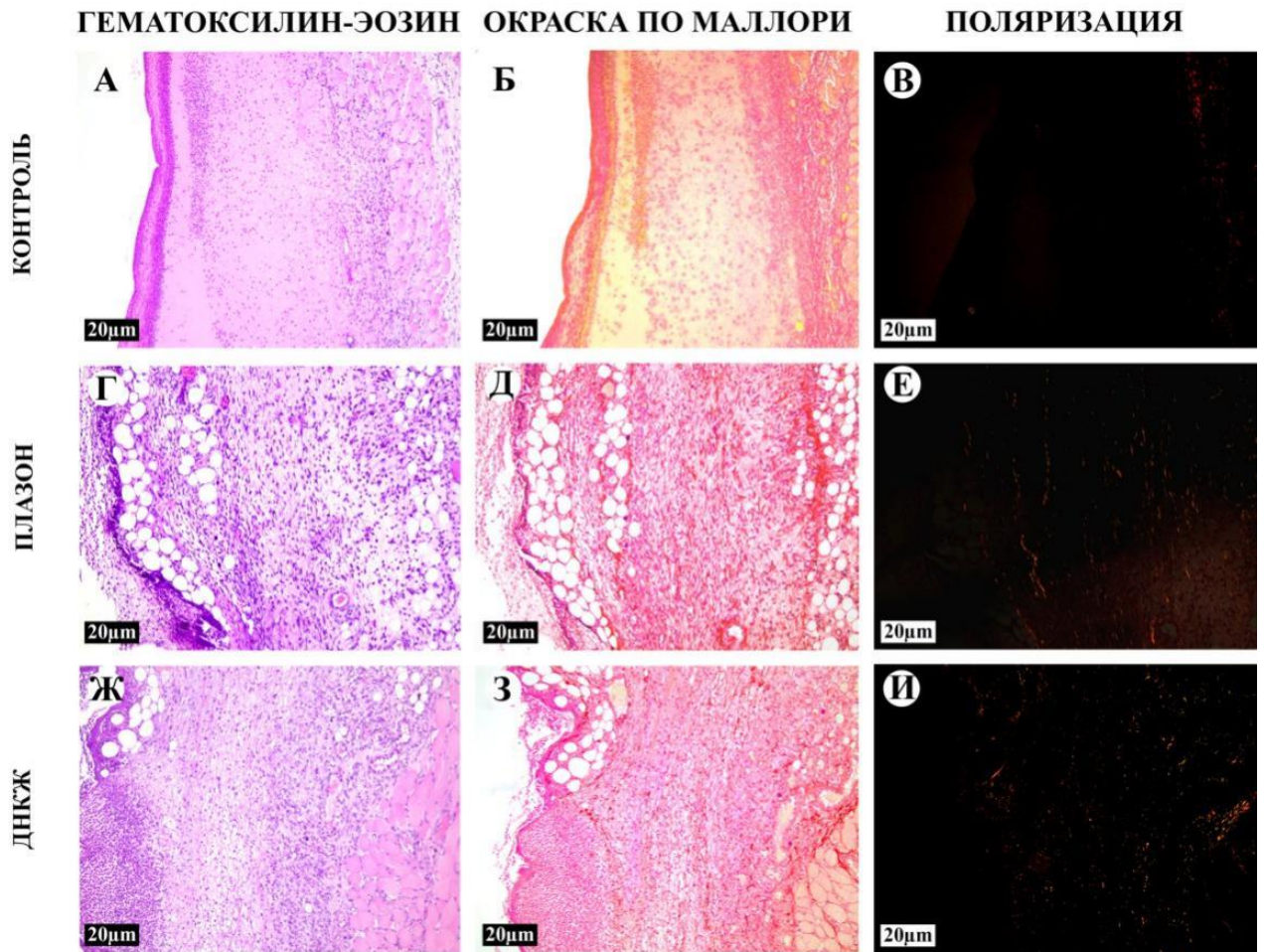


Рисунок 37 – Световая и поляризационная микроскопия дна ран животных с сахарным диабетом на 4-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Г, Ж), пикро-маллори (Б, Д, З) и пикросириусом красным с поляризацией (В, Е, И).

Увеличение $\times 100$. А – толстый слой экссудата, под ним тонкий слой фибробластов; Б – волокна коллагена в собственной фасции; В – анизотропия коллагеновых волокон отсутствует; Г – грануляционная ткань активно прорастает подкожно-жировую клетчатку; Д – тонкие прослойки коллагеновых волокон кирпичного цвета; Е – анизотропия единичных коллагеновых волокон; Ж – толстый слой грануляционной ткани; З – тонкие волокна коллагена в грануляционной ткани; И – слабая анизотропия коллагеновых волокон

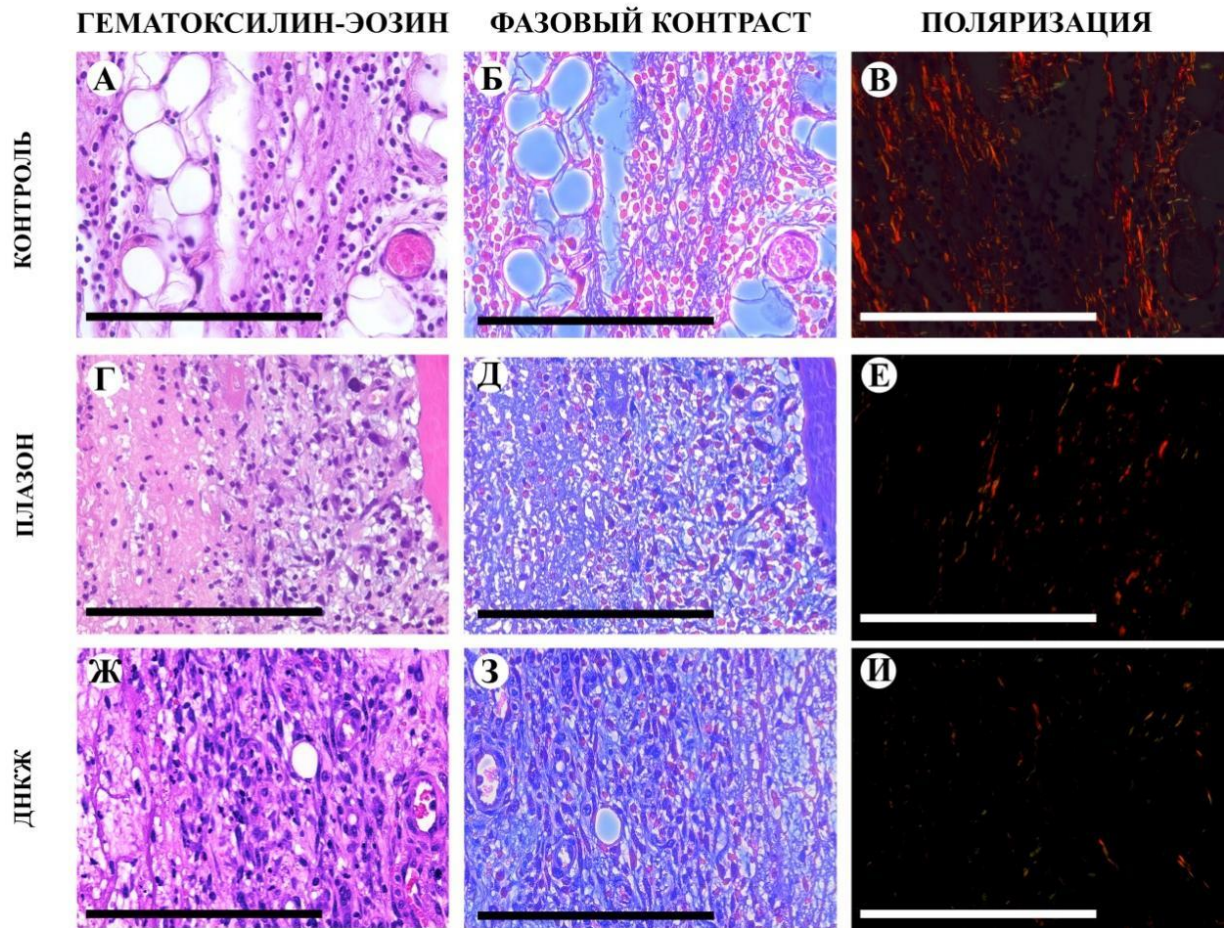


Рисунок 38 – Световая, фазово-контрастная и поляризационная микроскопия дна ран животных с сахарным диабетом на 4-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, Г, Д, Ж, З) и пикросириусом красным с поляризацией (В, Е, И). Увеличение $\times 400$. А – единичные фибробласты, лимфомакрофагальная инфильтрация; Б – волокна фибрина с зернистой структурой; В – анизотропия коллагеновых волокон – фрагментов собственной фасции; Г – слой хаотично расположенных незрелых фибробластов; Д – преобладание в ткани фибриновых волокон; Е – анизотропия волокон коллагена красного цвета; Ж – параллельно ориентированные фибробласты и капилляры; З – прослойки тонких волокон коллагена среди волокон фибрина; И – анизотропия волокон желтого и зеленого цвета

На 7-е сутки фибринозно-лейкоцитарный слой имел наибольшую толщину в экспериментальных группах. Он был четко ограничен от подлежащих тканей валом нейтрофилов, при этом у всех животных края раны были эпителизированы умеренно дифференцированным эпителием, чего не наблюдалось в группе, в которой раны были оставлены без лечения. В этой группе слой грануляционной ткани полностью отсутствовал у 2 из 5 животных, подкожно-жировая клетчатка

была обильно инфильтрированной полиморфно-ядерными лейкоцитами, в ней присутствовали немногочисленные полнокровные капилляры, очаги олеогранулем (Рисунок 39). У других животных грануляционная ткань имела низкую степень зрелости, она состояла из хаотично ориентированных фибробластов, капилляров и немногочисленных коллагеновых волокон, которые определялись при фазово-контрастной микроскопии (Рисунок 40).

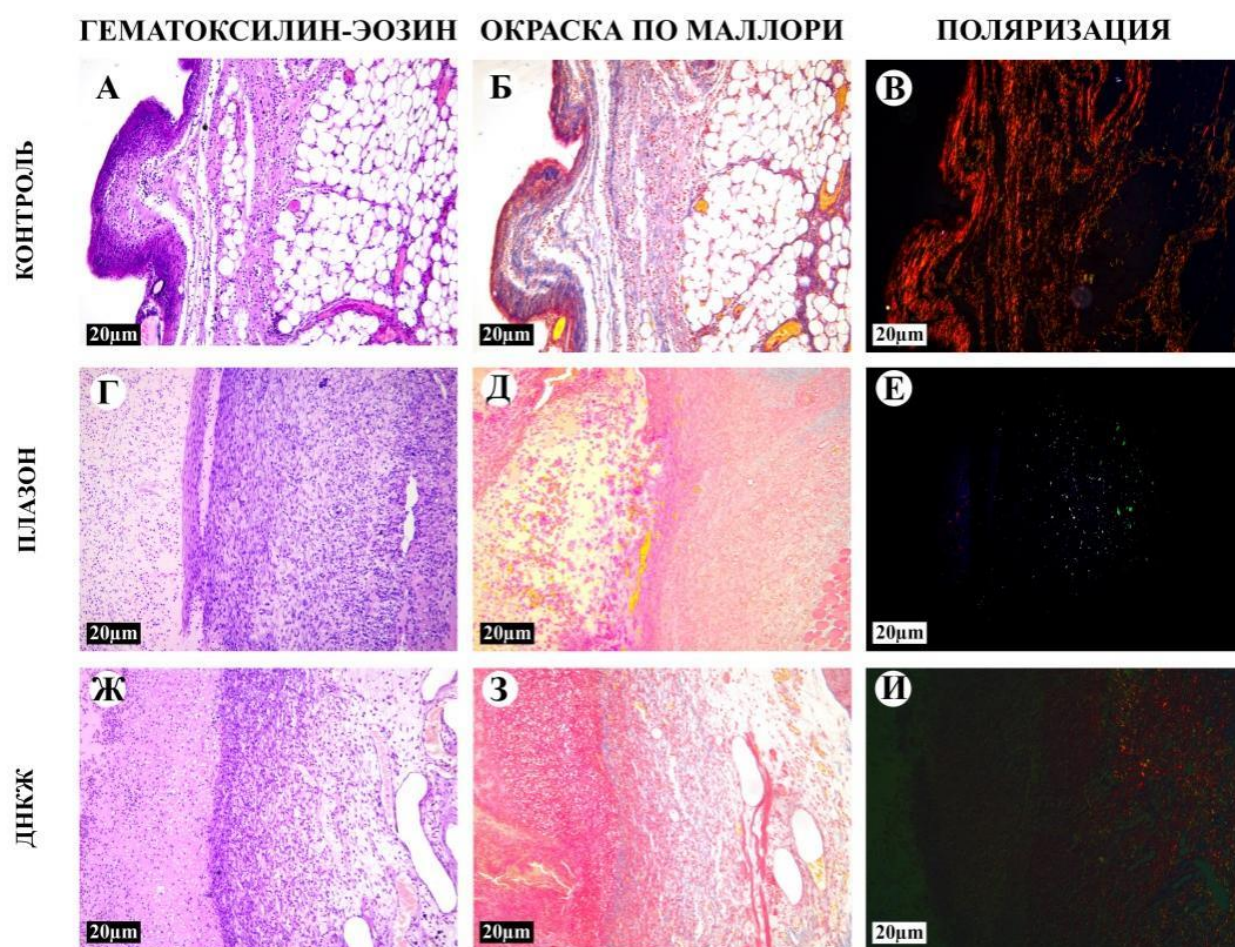


Рисунок 39 – Световая и поляризационная микроскопия дна ран животных с сахарным диабетом на 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Г, Ж), пикро-маллори (Б, Д, З) и пикросириусом красным с поляризацией (В, Е, И).

Увеличение $\times 100$. А – тонкий слой фибробластов над подкожно-жировой клетчаткой; Б – единичные коллагеновые волокна; В – анизотропия коллагеновых волокон, предшествующих операции; Г – толстый слой грануляционной ткани; Д – отдельные коллагеновые волокна среди волокон фибрина; И – слабая анизотропия коллагена зеленого цвета; Ж – умеренно зрелая грануляционная ткань; З – тонкие волокна коллагена голубого цвета; И – слабая анизотропия коллагена желтого и оранжевого цвета

В группах сравнения воспалительная инфильтрация была выражена слабее и состояла преимущественно из макрофагов. В экспериментальной группе 1 (Плазон) грануляционная ткань у большинства животных (n=4) имела достаточно большой объем и была представлена параллельно ориентированными фибробластами и многочисленными капиллярами (Рисунок 39). В глубоких слоях сосуды располагались перпендикулярно поверхности раны, коллагеновые волокна образовывали толстые, разнонаправленные пучки (Рисунок 40).

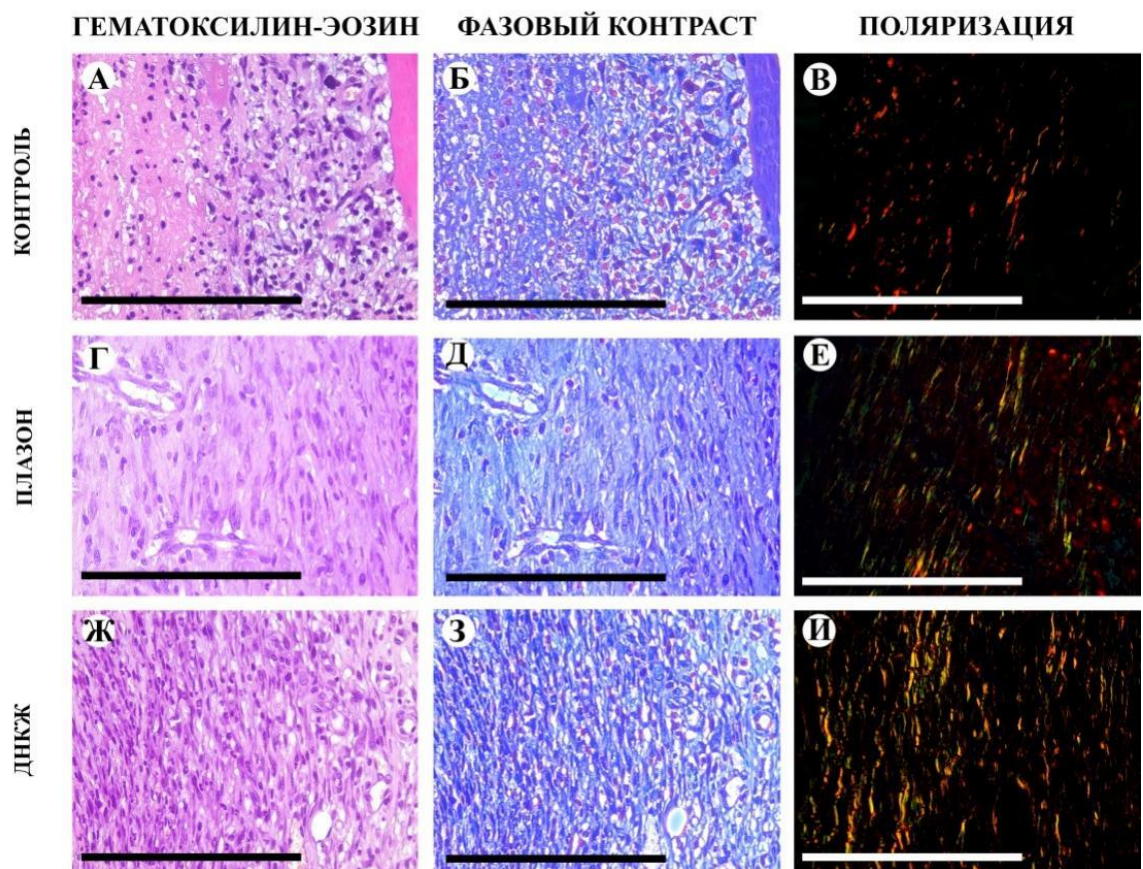


Рисунок 40 – Световая, фазово-контрастная и поляризационная микроскопия дна ран животных с сахарным диабетом на 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, Г, Д, Ж, З) и пикросириусом красным с поляризацией (В, Е, И). Увеличение x400. А – незрелая грануляционная ткань в глубоких слоях раны; Б – преобладание волокон фибрина; В – анизотропия фрагментов коллагеновых волокон; Г – зрелая грануляционная; Д – упорядоченные волокна коллагена; Е – волокна коллагена с анизотропией желтого и зеленого цвета; Ж – фибробласты в грануляционной ткани; З – продольно ориентированные волокна коллагена; И – созревающие волокна коллагена

Во второй экспериментальной группе (ДНКЖ) такая картина наблюдалась у 3 животных: грануляционная ткань прорастала подкожно-жировую клетчатку и пучки мышц, в ней было большое количество полнокровных сосудов и продольно ориентированных веретеновидных фибробластов. При фазово-контрастной микроскопии и окраске пикро-Маллори в группах, в которых применяли NO-терапию, определялись обрывки коллагеновых волокон среди преобладающих волокон фибрина (Рисунок 39, Рисунок 40), в то время как в контроле выявлялись преимущественно волокна фибрина с зернистой структурой (Рисунок 39). При поляризационной микроскопии в контрольной группе определялись толстые пучки с выраженной анизотропией красного цвета, что указывает на зрелость коллагена, который сохранился в ране после операции (Рисунок 39, Рисунок 40). В группе, в которой применяли NO-СГП, волокна имели анизотропию зеленого и желтого цвета, что свидетельствует о коллагеногенезе, в группе, в которой раны обрабатывали раствором ДНКЖ, они обладали слабой анизотропией красного цвета (Рисунок 39, Рисунок 40).

На 14-е сутки после операции у животных всех групп дно ран в центре было покрыто тонким слоем фибрина, по периферии отмечалась эпителизация, которая имела наибольшую выраженность в группе, в которой раны обдували NO-СГП. В контрольной группе отмечалась диффузная инфильтрация нейтрофилами и макрофагами, единичными тучными клетками, некоторые из них имели признаки дегрануляции. Стенки артериол были утолщены, пропитаны эозинофильной массой, слой грануляционной ткани был тонкий и отечный, он прорастал подкожно-жировую клетчатку и состоял из 2-3 слоев вытянутых фибробластов, синтезирующих немногочисленные тонкие волокна коллагена, что подтверждалось фазово-контрастной микроскопией и при окраске пикро-маллори (Рисунок 41, Рисунок 42). В экспериментальных группах воспалительная инфильтрация сохранялась у большинства животных, однако она имела умеренную выраженность.

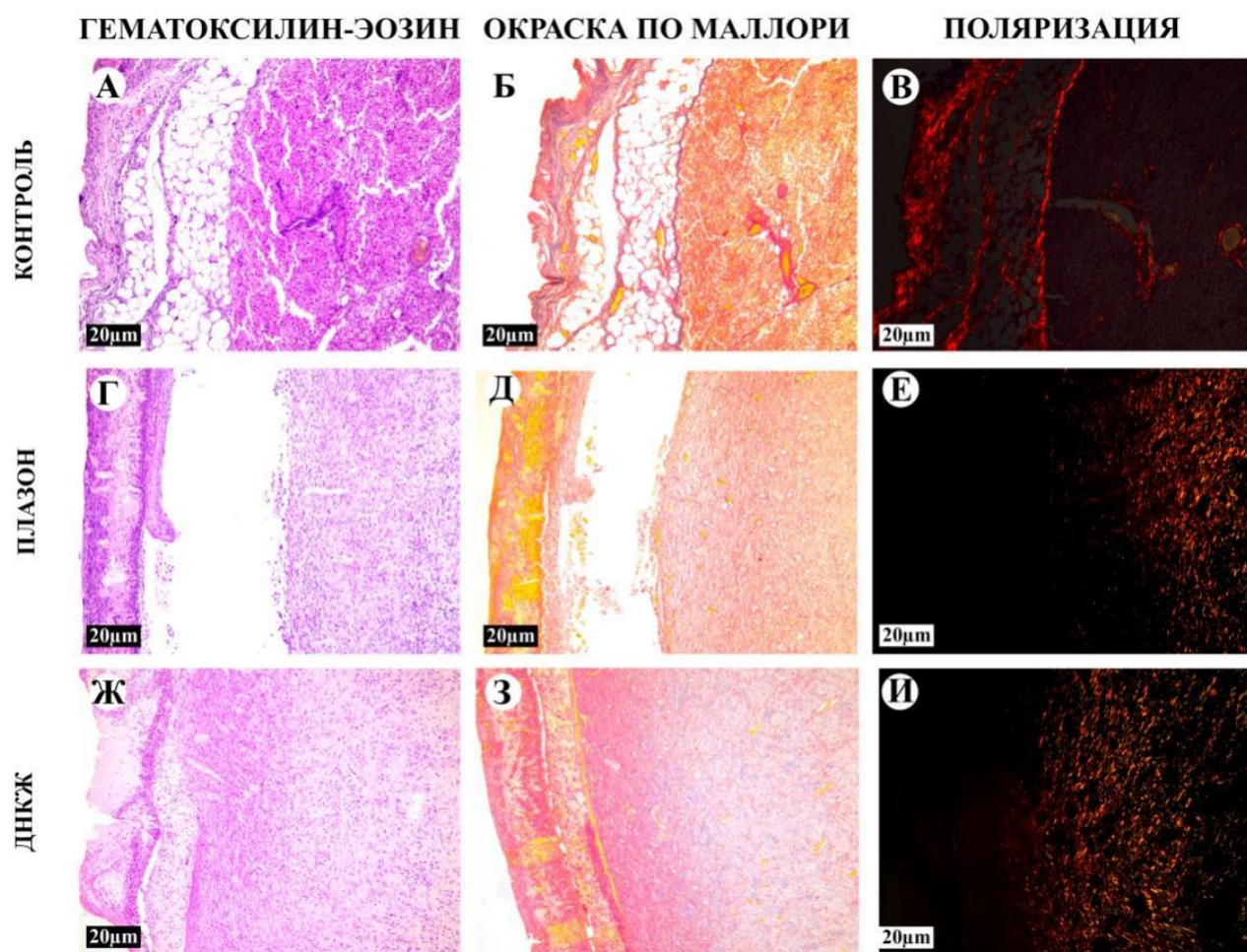


Рисунок 41 – Световая и поляризационная микроскопия дна ран животных с сахарным диабетом на 14-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Г, Ж), пикро-маллори (Б, Д, З) и пикросириусом красным с поляризацией (В, Е, И). Увеличение $\times 100$. А – грануляционная ткань практически отсутствует, в глубоких слоях – олеогранулема; Б – единичные волокна коллагена кирпичного цвета; В – анизотропия фрагментов собственной фасции; Г – зрелая грануляционная ткань; Д – пучки коллагеновых волокон окрашены в красно-оранжевый цвет; З – анизотропия зрелого коллагена; Ж – грануляционная ткань с признаками фиброзирования; З – плотный слой коллагеновых волокон; И – анизотропия коллагена глубоких слоев раны

Грануляционная ткань в экспериментальных группах состояла из многочисленных фибробластов, полнокровных капилляров, упорядоченных и достаточно толстых коллагеновых волокон (Рисунок 41). У животных, раны которых обрабатывали раствором ДНКЖ, в глубоких слоях определялась рубцовая ткань, состоящая из толстых пучков коллагеновых волокон и немногочисленных клеток между ними, при этом отмечалось запустевание

сосудов (Рисунок 42). В двух случаях наблюдения в группе, в которой использовали аппарат Плазон, дно раны практически полностью занимала зрелая фиброзная ткань с немногочисленными сосудами и веретеновидными фибробластами.

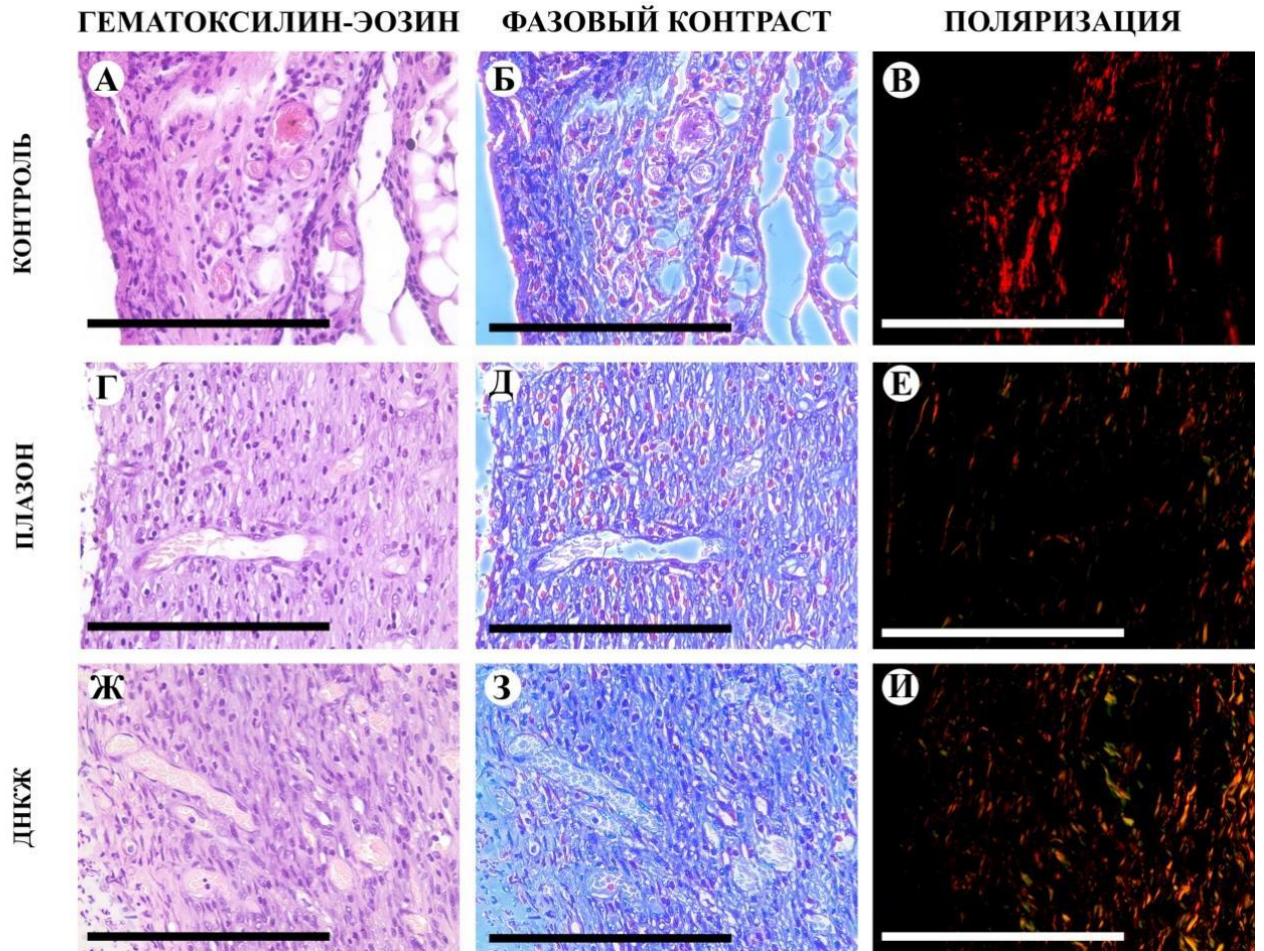


Рисунок 42 – Световая, фазово-контрастная и поляризационная микроскопия дна ран животных с сахарным диабетом на 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, Г, Д, Ж, З) и пикросириусом красным с поляризацией (В, Е, И). Увеличение $\times 400$. А – островки незрелой грануляционной ткани; Б – тонкие волокна коллагена; В – анизотропия коллагеновых волокон, предшествующих операции; Г – зрелая грануляционная ткань с вертикально ориентированными капиллярами; Д – волокна коллагена с фибриллярной структурой; Е – единичные коллагеновые волокна с анизотропией красного цвета; Ж – зрелая грануляционная ткань; З – параллельно ориентированные пучки коллагена; И – анизотропия коллагена, преимущественно в глубоких слоях раны

При окраске пикро-маллори в ткани определялись упорядоченные пучки коллагеновых волокон (Рисунок 41). При фазово-контрастной микроскопии у них отмечалась хорошо выраженная фибриллярная структура (Рисунок 42). В группе контроля поляризационная микроскопия выявляла остатки собственной фасции (обрывки толстых, зрелых коллагеновых волокон с анизотропией красного цвета), в то время как в экспериментальных группах в большей степени определялись тонкие, незрелые волокна оранжевого и желтого цвета (Рисунок 41, Рисунок 42).

На 21-е сутки полная эпителизация отмечалась у одного животного из группы контроля и группы, в которой применяли ДНКЖ. У животных, раны которых обдували NO-СГП, она выявлялась в 2 случаях, у других раневая поверхность была покрыта плотным слоем фибрина без признаков контаминации. Периферические участки были представлены дермой, в центре дефекта у большинства животных контрольной группы грануляционная ткань содержала многочисленные полнокровные капилляры, многочисленные фибробласты, диффузную лимфо-макрофагальную инфильтрацию. Коллагеновые волокна были тонкими, при поляризационной микроскопии они характеризовались анизотропией желтого и зеленого цвета (Рисунок 43, Рисунок 44). При окраске по Маллори волокна коллагена окрашивались в синий цвет. В группе, где раны обдували NO-СГП, центральный участок раны со средней протяженностью 305,5 μm ($\pm 30,45 \mu\text{m}$) был представлен фиброзированными коллагеновыми волокнами, единичными запустевшими вертикально ориентированными капиллярами и веретеновидными фибробластами (Рисунок 43).

В другой экспериментальной группе центральная часть дна раны была представлена умеренно зрелой грануляционной тканью с многочисленными веретеновидными фибробластами и пучками коллагеновых волокон (Рисунок 43, Рисунок 44). Отмечалась умеренная диффузная лимфо-макрофагальная инфильтрация глубоких слоев раны ($n=3$), а в некоторых случаях всей толщи раны ($n=2$). При окраске пикросириусом коллагеновые волокна приобретали кирпичный цвет, при окраске по Маллори – темно-синий (Рисунок 43). Фазово-контрастная микроскопия выявляла толстые пучки коллагена во всех группах

наблюдения (Рисунок 44). В группах, в которых применяли терапию оксидом азота поляризационная микроскопия выявляла длинные, толстые пучки зрелых волокон коллагена с анизотропией ярко-красного цвета (Рисунок 43, Рисунок 44).

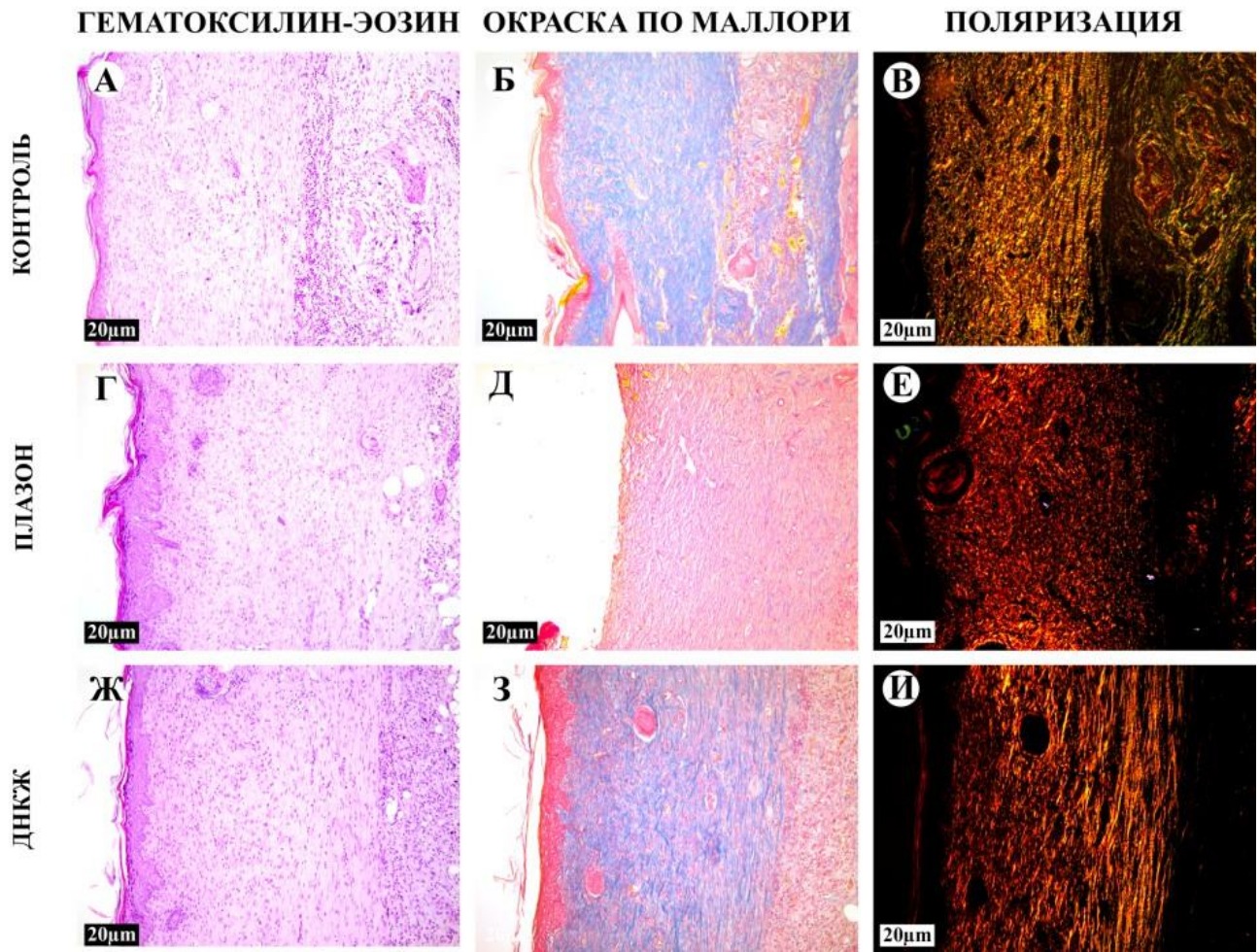


Рисунок 43 – Световая и поляризационная микроскопия дна ран животных с сахарным диабетом на 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Г, Ж), пикро-маллори (Б, Д, З) и пикросириусом красным (В, Е, И). Увеличение $\times 100$. А – фиброзированная грануляционная ткань с воспалительной инфильтрацией; Б – многочисленные толстые коллагеновые волокна; В – анизотропия коллагена желтого цвета; Г – эпителизированный незрелый рубец; Д – плотный слой коллагеновых волокон; Е – выраженная анизотропия коллагена красного цвета; Ж – полная эпителизация; фиброзированная грануляционная ткань; З – толстые пучки коллагена, зачатки кожных придатков; И – толстые волокна коллагена в глубоких слоях раны

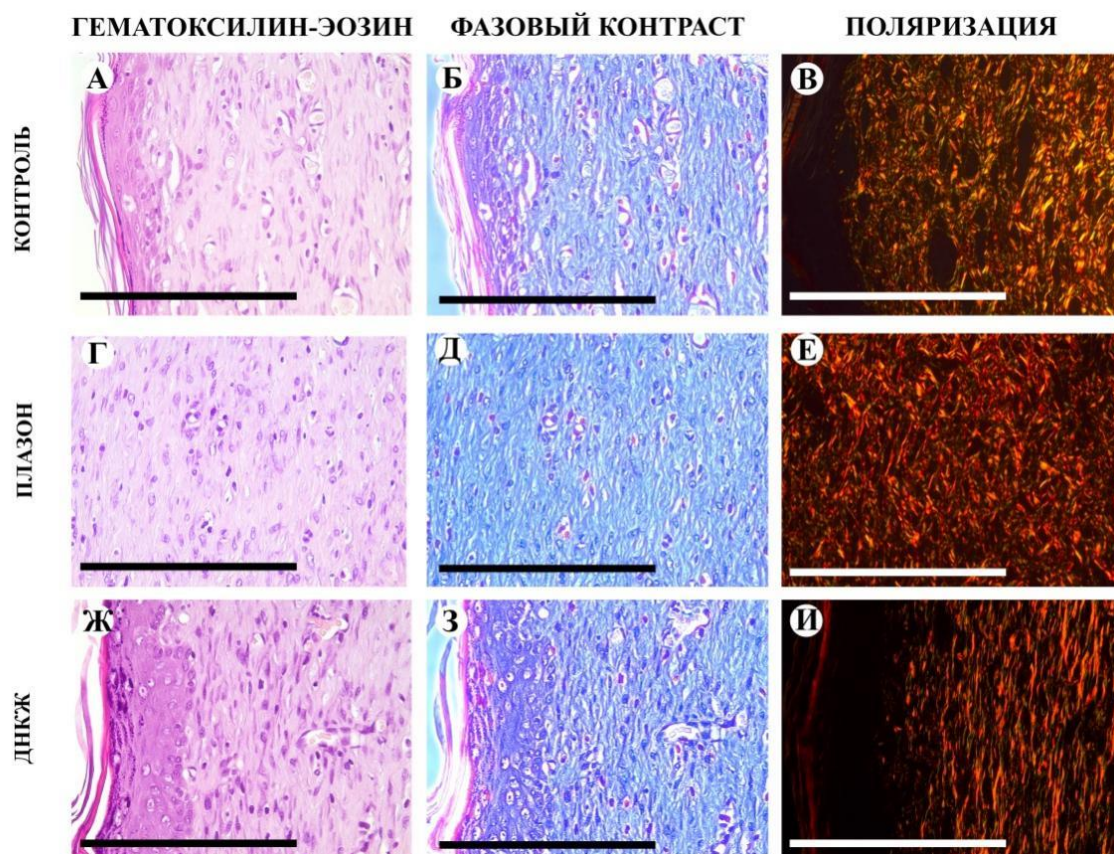


Рисунок 44 – Световая, фазово-контрастная и поляризационная микроскопия дна ран животных с сахарным диабетом на 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, Г, Д, Ж, З) и пикросириусом красным (В, Е, И).

Увеличение $\times 400$. А – многочисленные капилляры в фиброзированной грануляционной ткани; Б – волокна коллагена с фибриллярной структурой; В – анизотропия коллагена желтого и зеленого цвета; Г – незрелая рубцовая ткань; Д – упорядоченные коллагеновые волокна; Е – выраженная анизотропия коллагена оранжевого и красного цвета; Ж – фиброзированная грануляционная ткань; З – параллельно ориентированные коллагеновые волокна; И – анизотропия кератина и волокон коллагена

При статистическом анализе на 4-е сутки процессы регенерации протекали значительно активнее в экспериментальной группе 1 (НО-СГП), чем в группе контроля ($p < 0,0001$). При этом наибольший объем грануляционной ткани определялся в экспериментальной группе 2 (ДНКЖ), этот слой был в 4,8 раза толще, чем в группе, в которой раны были оставлены без лечения ($p = 0,056$).

На 7-е сутки применение НО-терапии способствовало достоверному уменьшению интенсивности воспалительной реакции, а также значительно

ускоряло рост и созревание грануляционной ткани относительно значений, полученных у животных без лечения ($p < 0,05$; $p < 0,001$ соответственно). При этом в группе, в которой использовали NO-СГП, показатель фиброзирование был в 2 раза выше, а толщина грануляционной ткани почти в 4 раза больше, чем в контроле ($p < 0,05$ и $p < 0,0001$ соответственно).

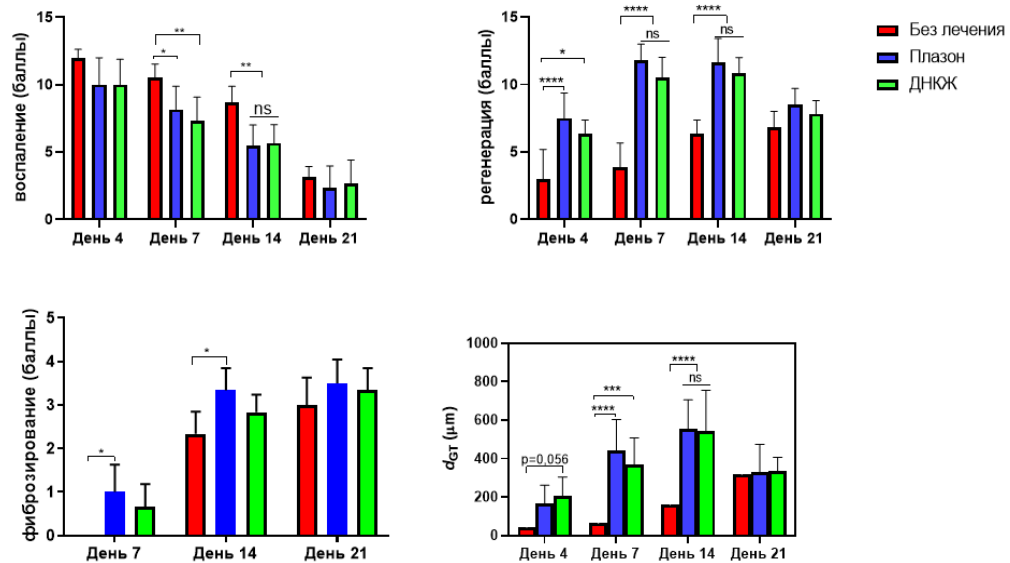


Рисунок 45 – Морфометрическая оценка воспаления, регенерации, фиброзирование, толщины грануляционной ткани в ранах животных с сахарным диабетом, двухфакторный анализ ANOVA. d_{GT} – толщина слоя грануляционной ткани, ns- нет различий, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

К 14-м суткам NO-терапия более чем на 36% снижала признаки воспаления в ранах по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Грануляционная ткань в экспериментальных группах характеризовалась умеренной зрелостью, ее толщина более, чем втрое превышала данный показатель в группе контроля ($p < 0,0001$) (Рисунок 43). В этих группах признаки регенерации более, чем в 1,5 раза выше, у животных без специфического лечения ($p < 0,0001$). Самый высокий показатель фиброзирование наблюдался в группе, в которой использовали аппарат Плазон; он был на 30% выше, чем в контроле. На 21-е сутки статистически значимых различий между группами получено не было (Рисунок 45).

Изучение активности тучных клеток в ранах крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. На 4-е сутки в группах, в которых раны были оставлены без лечения или обработаны NO-СГП, в подкожно-жировой клетчатке и в глубоких слоях раны выявлялось большое количество тучных клеток. Большинство из них имели четко выраженное ядро, окруженное многочисленными базофильными гранулами, однако некоторые были в дегранулированном состоянии. В экспериментальной группе 2 (ДНКЖ) тучные клетки характеризовались небольшими размерами и высокой плотностью гранул в цитоплазме. Они локализовались как в собственной фасции, так и в новообразованной грануляционной ткани. На этом сроке отдельные участки скопления гранул из разрушенных клеток определялись только в глубоких слоях раны, в то время как к 7 суткам их количество увеличивалось. На 14-е сутки в контрольной и экспериментальной группе 1 (Плазон) отмечалось появление тучных клеток в грануляционной ткани, в основном их морфология соответствовала описанной ранее. К 21-м суткам в группах, в которых использовали NO-терапию, отмечалось уменьшение числа тучных клеток, в том числе дегранулирующих, в то время как в контрольной их количество возрастало, особенно в подкожно-жировой клетчатке, что иллюстрируется увеличением индекса функциональной активности на 30% ($p < 0,05$) (Рисунок 46).

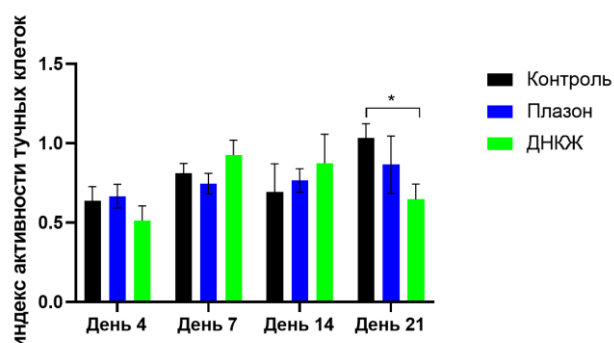


Рисунок 46 – Индекс активности тучных клеток ран животных с сахарным диабетом, двухфакторный анализ ANOVA, * - $p < 0,05$

Иммунногистохимическое исследование ран крыс с сахарным диабетом. На 4-е сутки в группе, где раны были оставлены без лечения, виментин-положительные клетки в основном локализовались среди волокон фибрина и разрушенного коллагена. Ткань была выражено инфильтрирована нейтрофилами и макрофагами. В экспериментальных группах количество положительных клеток было больше, они, преимущественно локализовались в глубоких слоях раны или вдоль подкожно-жировой клетчатки. На изображениях, обработанных в программе автоматической сегментации, в контрольной группе большинство клеток было виментин-негативными и окрашивались в зеленый цвет. В экспериментальных группах в грануляционной ткани было большое количество сосудов, клетки которых экспрессируют виментин, поэтому при цифровом анализе изображений определялись достаточно обширные области ярко-красного цвета, представленные капиллярами и периваскулярными скоплениями фибробластов (Рисунок 47).

На 7-е сутки в контрольной группе в 2 случаях наблюдения к данному сроку грануляционная ткань еще не образовалась, а в остальных, несмотря на то, что выявлялись участки параллельно ориентированных фибробластов, клетки располагались достаточно рыхло практически все фибробласты экспрессировали виментин. В группах, в которых применяли NO-терапию, клетки имели вытянутую форму, они плотно прилежали друг к другу. При цифровой обработке изображений виментин-положительные клетки занимали значительно большую площадь, чем в контроле (Рисунок 47).

На 14-е сутки количество клеток, экспрессирующих виментин, в группе, где раны были оставлены без лечения, практически не изменилось. В экспериментальной группе 1 (Плазон) отмечалось фиброзирование грануляционной ткани и снижение числа клеточных элементов, однако в другой экспериментальной группе (ДНКЖ) такой тенденции не наблюдалось. При цифровом анализе изображений видно, что в контрольной группе клетки воспалительного инфильтрата, окрашенные в зеленый цвет, преобладали над виментин-положительными клетками красного цвета. В группе, в которой

использовали NO-СГП, площадь виментин-положительных клеток значительно уменьшилась по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, в отличие от группы, в которой применяли раствор ДНКЖ (Рисунок 48).

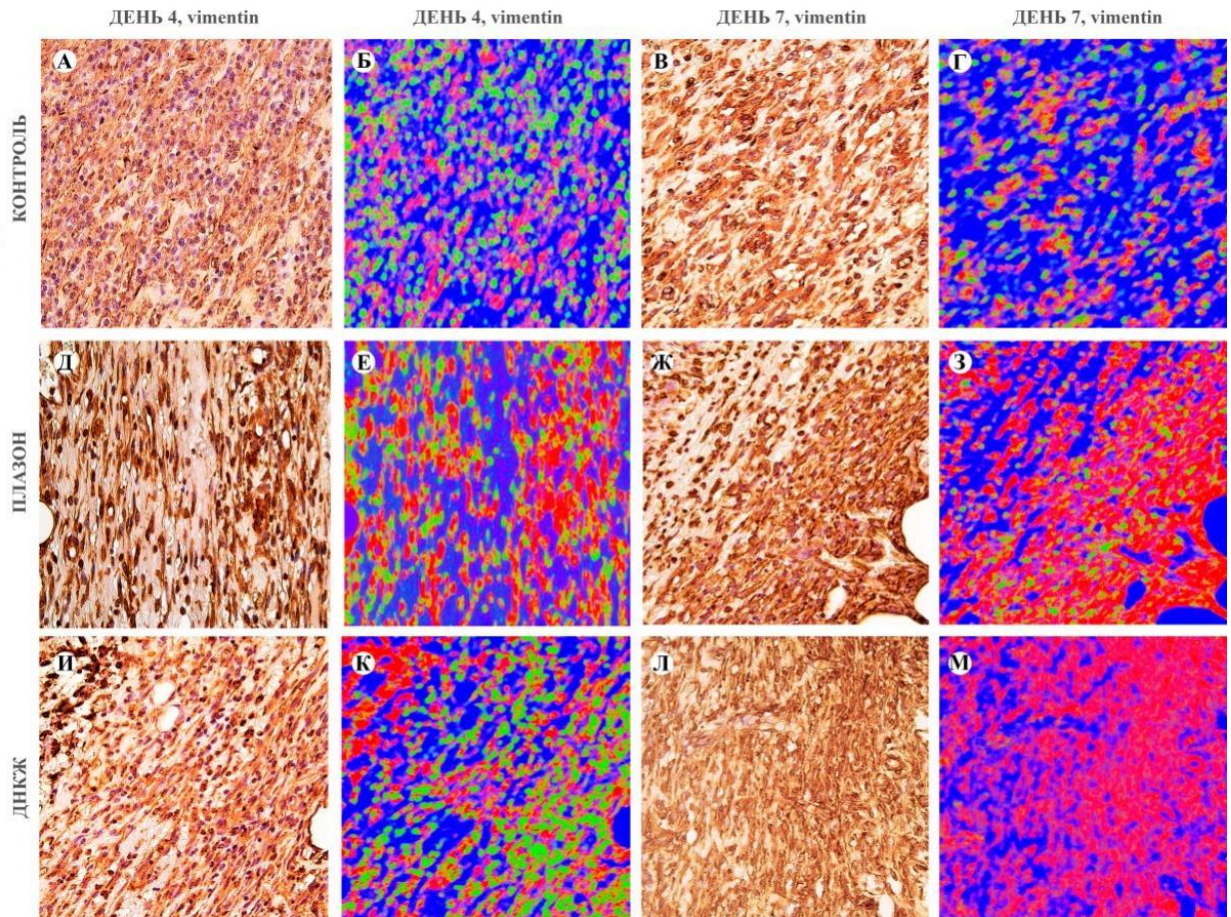


Рисунок 47 – Экспрессия виментина и распределение виментин-положительных клеток в ранах животных с сахарным диабетом на 4-е (А, Б, Д, Е, И, К, Н, О) и 7-е сутки (В, Г, Ж, З, Л, М, П, Р), х400. А – слабая экспрессия виментина веретеновидными клетками; Б – преобладание виментин-негативных клеток; В – веретеновидные виментин-экспрессирующие клетки; Г – диффузно расположенные виментин-положительные клетки; Д – интенсивная экспрессия виментина; Е – параллельно ориентированные положительно окрашенные клетки; Ж – выраженная экспрессия в глубоких слоях раны; З – плотный слой положительно окрашенных клеток; И – положительно окрашенные веретеновидные клетки; К – виментин-положительные клетки среди виментин-негативных; Л – диффузная экспрессия виментина; М – единый слой положительно окрашенных клеток

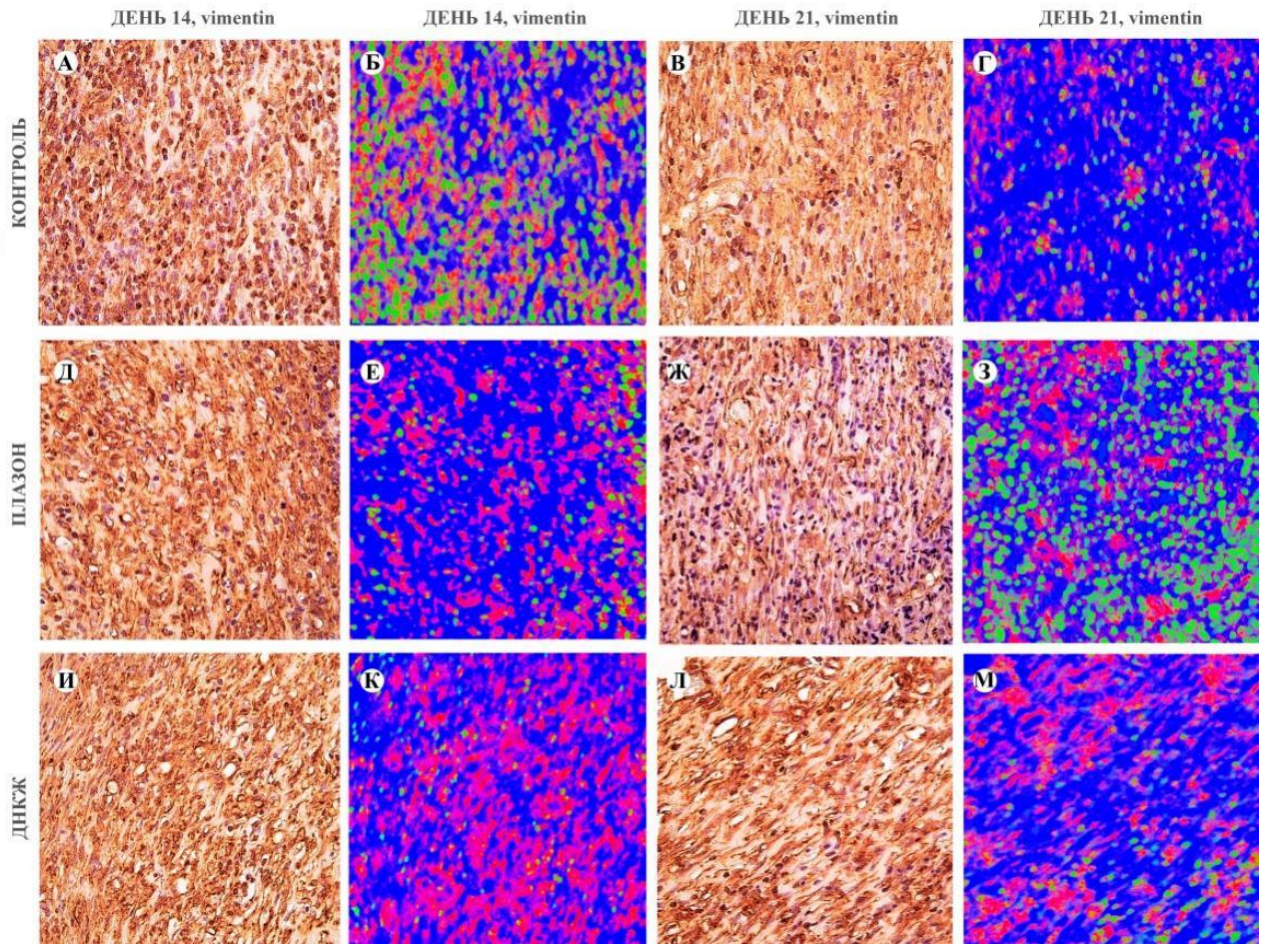


Рисунок 48 – Экспрессия виментина и распределение виментин-положительных клеток в ранах животных с сахарным диабетом на 14-е (А, Б, Д, Е, И, К, Н, О) и 21-е сутки (В, Г, Ж, З, Л, М, П, Р), х400. А – умеренная экспрессия виментина; Б – диффузное расположение виментин-положительных клеток; В – цитоплазматическая экспрессия виментина; Г – контуры сосудов, веретеновидные клетки; Д – выраженная экспрессия веретеновидными клетками; Е – параллельно ориентированные виментин-положительные клетки; Ж – слабая экспрессия виментина; З – преобладание негативно окрашенных клеток; И – интенсивная экспрессия виментина; К – слой виментин-положительных клеток; Л – экспрессия веретеновидными клетками; М – участки виментин-положительных клеток

К 21-м суткам во всех группах наблюдалось накопление коллагеновых волокон и уменьшение числа виментин-положительных клеток. В полностью эпителизированных ранах единичные виментин-положительные клетки встречались, преимущественно, в поверхностных слоях. В контрольной группе у большинства животных (n=3) отмечалась воспалительная инфильтрация, и снижение количества клеток, экспрессирующих виментин. У животных

экспериментальных групп, раны которых были не полностью эпителизованы, фибробласты располагались между волокнами коллагена. При цифровой обработке изображений видно, что в группе контроля клетки в основном имеют округлую форму, а в группах, в которых применяли терапию NO – вытянутую. Также хорошо визуализируются округлые структуры красного цвета, что соответствует поперечным срезам капилляров с виментин-положительными клетками в стенке (Рисунок 48).

При статистическом анализе на 4-е сутки раневого заживления отмечалась тенденция по увеличению площади виментин-положительных клеток в экспериментальных группах по сравнению с контрольной, однако достоверно значимых различий получено не было. На 7-е сутки в группах, в которых применяли NO-терапию, клетки, экспрессирующие виментин, занимали более чем на 30 % большую площадь, чем в контроле ($p < 0.001$). К 14-м суткам в экспериментальной группе 2 (ДНКЖ) виментин активно экспрессировался веретеновидными фибробластами, в среднем клетки занимали более 50% площади, что было почти на 60% больше, чем в группе контроля ($p < 0.001$) (Рисунок 49). К 21-м суткам во всех группах положительно окрашенные клетки занимали до 20% площади изображений.

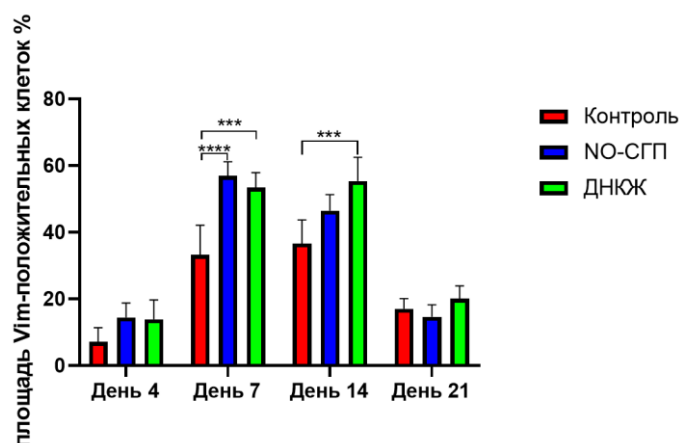


Рисунок 49 – Площадь виментин-положительных клеток в ранах животных с сахарным диабетом, двухфакторный анализ ANOVA, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

При исследовании экспрессии α -SMA на 4 сутки, положительные клетки присутствовали в основном в стенках сосудов, что хорошо видно на изображениях, обработанных в программе автоматической сегментации. В экспериментальных группах единичные клетки также определялись вдоль слоя подкожно-жировой клетчатки и среди фибриновых волокон (Рисунок 50).

На 7-е сутки у животных контрольной группы, у которых к данному сроку формировалась грануляционная ткань, большинство α -SMA-положительных клеток присутствовало в стенках сосудов, в то время как в самой ткани преобладали клетки воспалительного инфильтрата. В экспериментальных группах экспрессия α -SMA отмечалась в веретеновидных фибробластах глубоких слоев раны. На изображениях, полученных при цифровой обработке, видны продольно ориентированные клетки и контуры капилляров красного цвета, а также негативно окрашенные клетки зеленого цвета (Рисунок 50). При этом отмечалось в ранах животных, которые обрабатывали раствором ДНКЖ, выявлялось незначительное преобладание площади положительных клеток, однако статистически достоверных различий получено не было.

На 14-е сутки наиболее выраженная экспрессия α -SMA, определялась в группе контроля. Этот белок выявлялся в стенках поперечно ориентированных капилляров и миофибробластах глубоких слоев раны, в которых уже отмечались признаки фиброзирования. В группах, в которых применяли терапию оксидом азота, сосуды располагались преимущественно вертикально, периваскулярно и среди пучков коллагеновых волокон определялись α -SMA-положительные клетки. При цифровой обработке изображений клетки с положительной экспрессией окрашивались в красный цвет (Рисунок 51).

К 21-м суткам количество клеток, экспрессирующих α -SMA снижалось во всех группах наблюдения, они были минимально представлены у животных с полностью эпителизированными раневыми дефектами. Тем не менее в контрольной группе, особенно у животных, у которых сохранялись признаки воспаления ($n=3$) большинство клеток веретеновидной формы были α -SMA-положительными. В группе, в которой применяли аппарат Плазон, экспрессия

данного маркера была умеренной, она определялась в основном в верхних слоях раны. У животных, раны которых орошали раствором ДНКЖ, клетки достаточно слабо экспрессировали α -SMA и определялись преимущественно в глубоких слоях фибризированной грануляционной ткани (Рисунок 51).

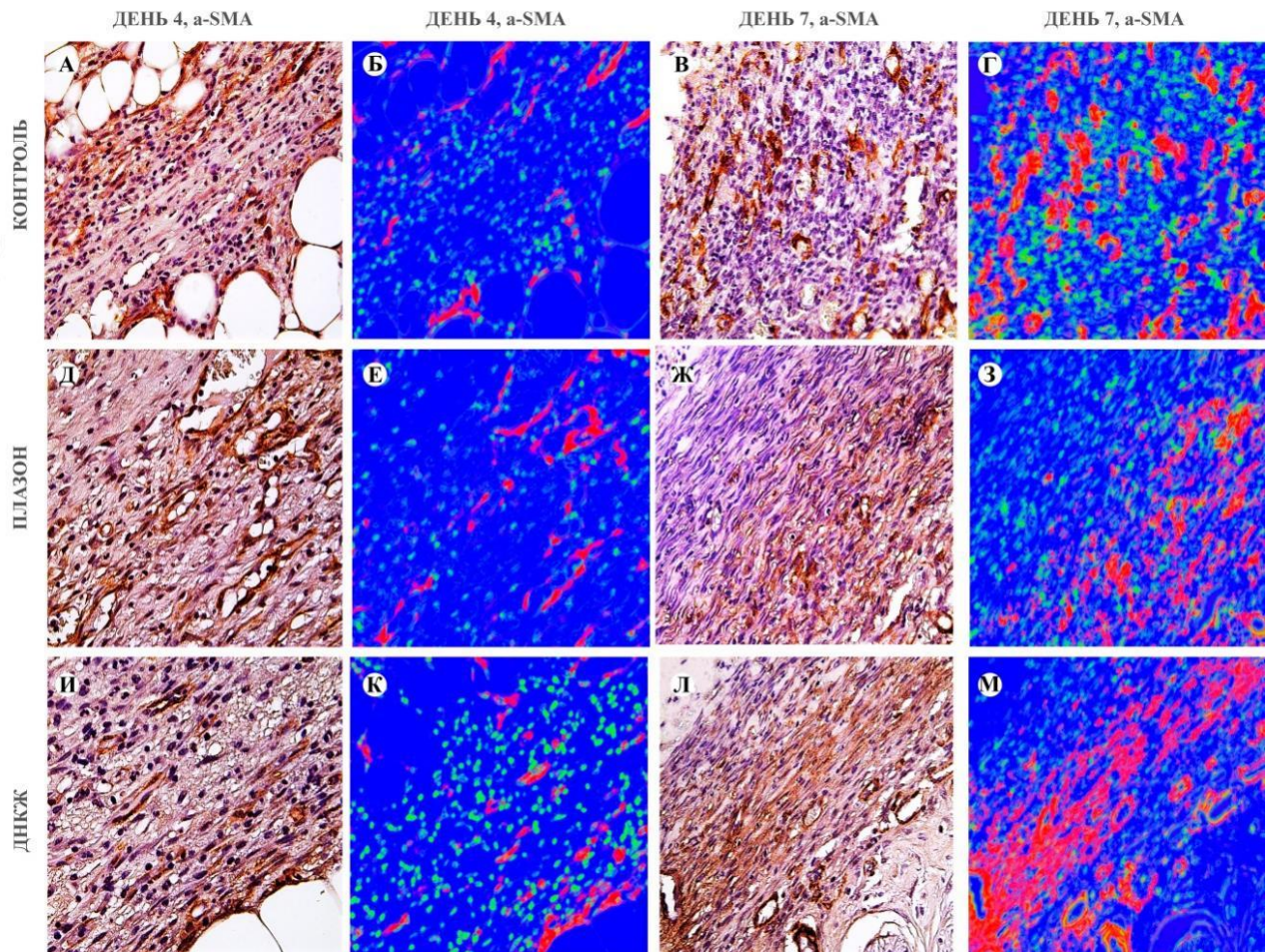


Рисунок 50 – Экспрессия α -SMA и распределение α -SMA-положительных клеток в ранах животных с сахарным диабетом на 4-е (А, Б, Д, Е, И, К, Н, О) и 7-е сутки (В, Г, Ж, З, Л, М, П, Р). Увеличение $\times 400$. А – положительно окрашенные клетки вдоль жировой клетчатки; Б – преобладание α -SMA-негативных клеток; В – α -SMA-положительные клетки сосудов; Г – положительно окрашенные клетки сосудов; Д – экспрессия α -SMA в сосудах; Е – контуры сосудов; Ж – умеренная экспрессия в глубоких слоях раны; З – контуры сосудов и положительно-окрашенные веретеновидные клетки; И – экспрессия α -SMA веретеновидными клетками; К – экспрессия α -SMA единичными клетками; Л – α -SMA - положительные клетки в грануляционной ткани; М – слой положительно окрашенных клеток

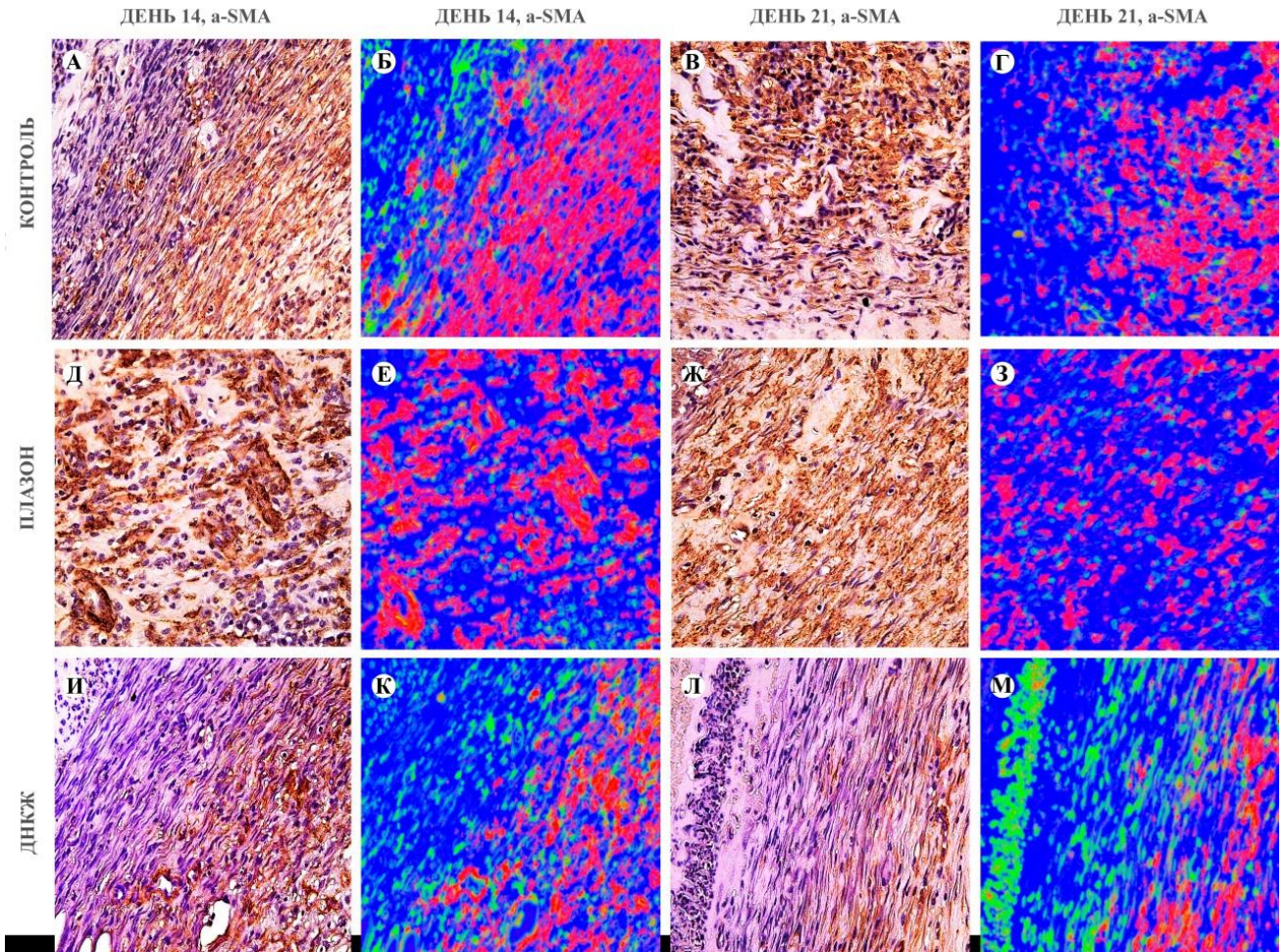


Рисунок 51 – Экспрессия α -SMA и распределение α -SMA-положительных клеток в ранах животных с сахарным диабетом на 14-е (А, Б, Д, Е, И, К, Н, О) и 21-е сутки (В, Г, Ж, З, Л, М, П, Р). Увеличение $\times 400$. А – цитоплазматическая экспрессия α -SMA веретеновидными клетками; Б – толстый слой α -SMA-положительных клеток; В – участок скопления α -SMA-положительных клеток; Г – фокус α -SMA-положительных клеток; Д – экспрессия α -SMA перицитами и отдельными веретеновидными клетками; Е – контуры сосудов; Ж – умеренная, диффузная экспрессия; З – диффузное расположение положительно окрашенных клеток; И – экспрессия клетками глубокого слоя раны; К – толстый слой α -SMA-положительных клеток; Л – экспрессия в цитоплазме веретеновидных клеток; М – тонкий слой положительно окрашенных клеток

По данным статистического анализа индекс экспрессии в этой группе был в 2 раза ниже, чем в контрольной ($p < 0.001$) и почти в 1,5 раза ниже, чем в экспериментальной группе 1 (Плазон) ($p < 0.01$) (Рисунок 52).

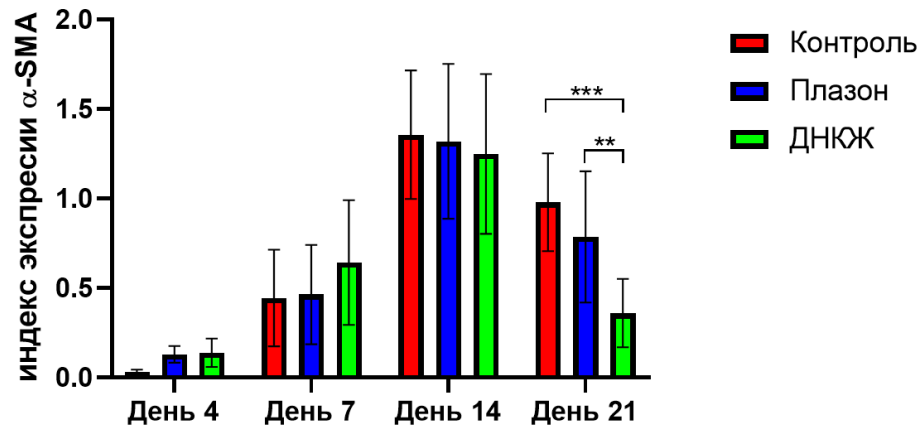


Рисунок 52 – Индекс экспрессии α -SMA в ранах животных с сахарным диабетом, двухфакторный анализ ANOVA, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

На 4-е сутки в контрольной группе определялась выраженная макрофагальная инфильтрация, при этом экспрессия NF- κ B присутствовала в основном в цитоплазме, в то время как в экспериментальных группах она преобладала в ядрах клеток. В группах, в которых применяли терапию оксидом азота, количество фибробластов было больше, чем в группе, в которой раны были оставлены без лечения, при этом большинство клеток положительно реагировало с антителами к NF- κ B (Рисунок 53).

На 7-е сутки в контрольной группе большинство макрофагов не экспрессировало NF- κ B. В экспериментальных группах отмечалась достаточно выраженная экспрессия этого белка, причем у животных, раны которых орошали раствором ДНКЖ, она была более выражена в ядре. В фибробластах NF- κ B в основном экспрессировался в глубоких слоях раны. В контроле этот белок выявлялся в отдельных фибробластах, в то время как в группе, в которой раны обдували NO-СГП, число положительных клеток было значительно больше, при этом NF- κ B экспрессировался преимущественно в цитоплазме. В другой экспериментальной группе (ДНКЖ) данный маркер чаще определялся в ядре веретеновидных и параллельно ориентированных фибробластов (Рисунок 53).

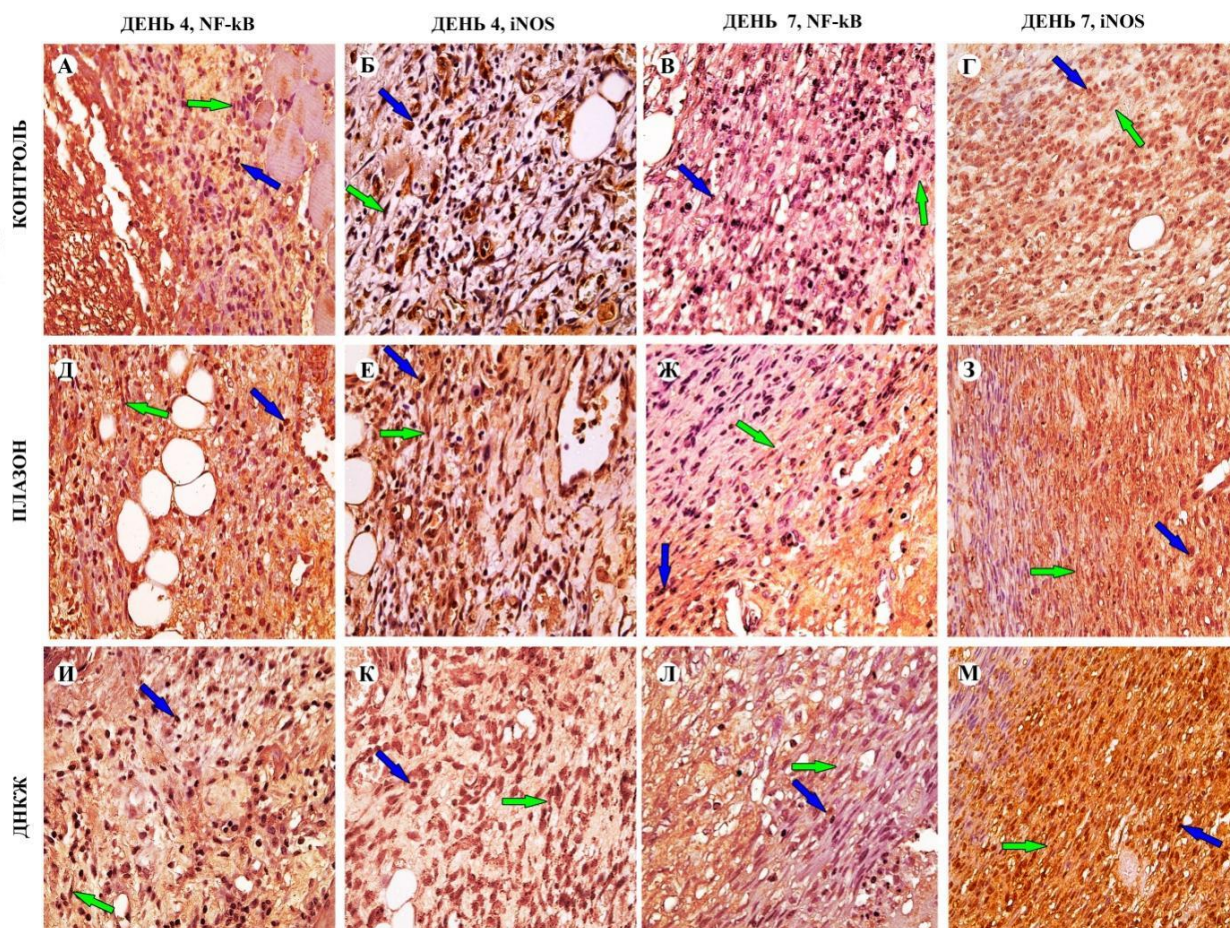


Рисунок 53 – Экспрессия NF-κ β (А, В, Д, Ж, И, Л, Н, П) и iNOS (Б, Г, Е, З, К, М, О, Р) в ранах животных с сахарным диабетом на 4-е и 7-е сутки, $\times 400$. Зеленая стрелка – фибробласт, синяя – макрофаг. А – ложно-положительное окрашивание фибрина, единичные NF-κ β -положительные клетки; Б – диффузная экспрессия iNOS клетками незрелой грануляционной ткани; В – экспрессия NF-κ β отдельными клетками; Г – iNOS-положительные фибробласты и макрофаги; Д – немногочисленные NF-κ β -положительные клетки среди фибрина; Е – умеренно выраженная экспрессия в фибробластах и макрофагах; Ж – единичные положительно окрашенные клетки; З – слой iNOS-положительных клеток; И – положительно окрашенные клетки в участке незрелой грануляционной ткани; К – умеренная экспрессия iNOS; Л – диффузная экспрессия NF-κ β макрофагами и фибробластами; М – интенсивная экспрессия iNOS макрофагами и фибробластами

На 4-е сутки индуцибельная синтаза оксида азота экспрессировалась в цитоплазме эндотелиоцитов и макрофагов всех групп. В контроле iNOS-положительные макрофаги выявлялись в основном периваскулярно или среди волокон фибрина. В группе, в которой раны лечили NO-СГП, они располагались

диффузно, при этом количество экспрессирующих клеток было выше, чем в предыдущей группе. В группе, в которой раны обрабатывали раствором ДНКЖ, клетки окрашивались более ярко и индекс экспрессии в них был незначительно выше, чем в других группах. В контрольной группе на данном сроке у 2 животных грануляционная ткань не выявлялась, у других в ней определялись немногочисленные фибробласты, в цитоплазме которых отмечалась умеренная экспрессия iNOS (Рисунок 53). В группах сравнения содержание фибробластов в ткани было намного больше, они интенсивно экспрессировали iNOS, особенно в участках с более высокой зрелостью грануляционной ткани.

На 7-е сутки в макрофагах контрольной группы экспрессия индуцибельной NO синтазы практически не изменилась по сравнению с более ранним сроком. В экспериментальных группах данный белок выявлялся в большинстве клеток, при этом в группе, в которой применяли ДНКЖ, интенсивность окрашивания была максимальной. iNOS-положительные фибробласты определялись преимущественно в глубоких слоях раны и участках высокой зрелости грануляционной ткани. Наиболее интенсивно окрашенные клетки выявлялись в группах, в которых животные получали NO-терапию (Рисунок 53).

На 4-е сутки в ранах животных, которых лечили NO-терапией, общее число макрофагов было меньше, однако ввиду того, что экспрессия была больше выражена в ядрах клеток, индекс активности NF-κB был почти на 60% выше, чем в контроле ($p < 0,0001$). Индекс активности данного маркера в фибробластах был максимально выражен в группе, где раны обдували NO-СГП. Он был на 70% выше, чем в группе контроля ($p < 0,0001$) и на 44% выше, чем в группе, в которой использовали ДНКЖ ($p < 0,001$). На 7-е сутки индекс активности NF-κB в макрофагах животных, раны которых орошали раствором ДНКЖ, был намного выше, чем в группах сравнения ($p < 0,0001$). В экспериментальной группе 1 (NO-СГП) он превышал показатели контроля почти на 35 % ($p < 0,05$). При этом уровень воспаления в группах, в которых применяли NO-терапию был достоверно ниже, чем в контроле ($p < 0,05$) (Рисунок 43). Индекс активности данного белка в

фибробластах ран животных экспериментальной группы 2 (ДНКЖ) превышал показатели других групп в 3 раза ($p < 0,0001$) (Рисунок 54).

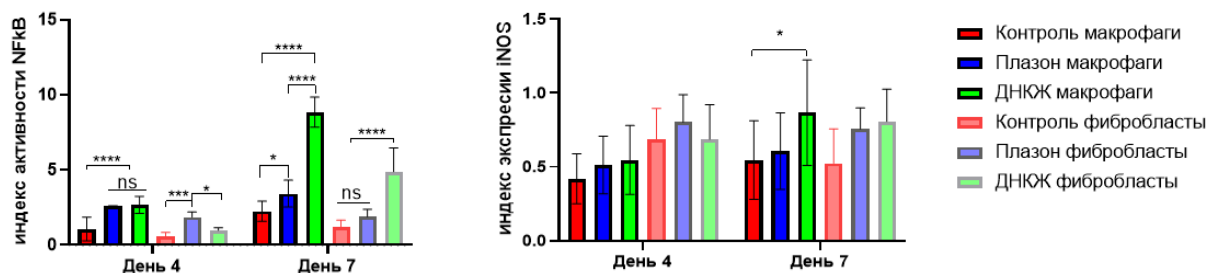


Рисунок 54 – Индекс активности NF-κB и индекс активности iNOS в ранах животных с сахарным диабетом, двухфакторный анализ ANOVA, ns- нет различий, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$

Различия экспрессии iNOS не были получены ни в макрофагах, ни в фибробластах на 4-е сутки раневого заживления. Однако на 7-е сутки в группе, в которой применяли ДНКЖ индекс экспрессии данного маркера в макрофагах был на 22% выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). На этом сроке фибробласты ран животных экспериментальных групп также активно экспрессировали этот белок, однако статистически значимых различий с группой контроля получено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение Нобелевской Премии по медицине и физиологии за открытие молекулы оксида азота (Furchgott R.F., Ignarro L.J., Murad F.) в 1998 году запустило множество исследований, направленных на изучение химической структуры и свойств NO и его соединений, а также их биологических эффектов. По всему миру стали появляться работы, целью которых была разработка методов лечения различных патологий с использованием оксида азота и его доноров, а также способов доставки NO в ткани [23, 196].

Увеличение интереса к NO-терапии связано с универсальностью регуляторных функций оксида азота в норме и при патологии [2, 9]. На ранних стадиях раневого заживления при взаимодействии с супероксидом часть NO превращается в пероксинитрит, продукты разложения которого способствуют снижению рН ран, усилению воспалительной реакции, реализации бактерицидного действия [6, 52, 121]. Также про-окислительные молекулы и непосредственно оксид азота могут подавлять экспрессию белка-ингибитора I κ B, что проявляется в модификации структуры NF- κ B и индукции его перемещения из цитоплазмы в ядро клетки [189, 195]. В результате происходит активация сигнального пути NF- κ B, который играет роль во многих физиологических и патологических процессах, в том числе в синтезе про-воспалительных цитокинов и стимуляции синтеза ДНК в S-фазе клеточного цикла [189].

В нашем исследовании в течение первой недели раневого заживления мы наблюдали активацию данного белка в макрофагах ран животных, получавших NO-терапию. При морфологическом анализе в этих группах интенсивность воспаления была достоверно ниже, чем в контрольных, что можно объяснить участием NF- κ B в увеличении фагоцитирующей функции лейкоцитов [197]. Важно отметить, что в группе, в которой животные с сахарным диабетом не получали специфического лечения, воспаление было более выражено, чем в контрольных группах животных с нормогликемией, однако применение экзогенного оксида азота позволило достичь сходных показателей интенсивности воспаления у животных с гипер- и нормогликемией на всех сроках наблюдения. Повышение активности NF- κ B в фибробластах ран, которые лечили экзогенным оксидом азота, может опосредовать стимуляцию пролиферации этих клеток [198].

Также имеются данные о том, что активированный димер NF- κ B напрямую индуцирует образование iNOS – фермента, который участвует в синтезе эндогенного оксида азота в ране в ответ на повреждение и участвует в модуляции воспалительного ответа [124]. Несмотря на провоспалительную роль iNOS, было показано, что ингибирование данного фермента значительно снижает синтез коллагена, что компенсируется при лечении ран экзогенным оксидом азота [199,

200]. По мере увеличения концентраций NO, в том числе благодаря iNOS, происходит прекращение модуляции NF-κB, снижение продукции провоспалительных цитокинов, активация системы антиоксидантной защиты [6].

Продукты окисления оксида азота, в частности избыток нитрит-анионов, в условиях ацидоза активирует регуляторную систему метаболизма оксида азота и синтез его эндогенного донора – ДНКЖ [42, 121]. Интересно, что в нашем исследовании достоверные различия в экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота отмечались только в макрофагах на 7 сутки раневого заживления в группах, в которых раны орошали раствором ДНКЖ и водой, причем как в условиях нормогликемии, так и при сахарном диабете. При этом четкой взаимосвязи между повышением данного показателя и степенью воспаления в этих группах не выявлялось.

По мере снижения концентраций, NO связывается с гемовым центром фермента гуанилатциклазы в сосудах и запускает цГМФ-зависимый каскад, стимулируя пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез [22, 24]. Также оксид азота важный регулятор синтетической активности фибробластов, что является необходимым условием для раневого заживления [42]. В наших исследованиях в группах, в которых раны обрабатывали NO-СГП и ДНКЖ, были обнаружены значительная интенсификация пролиферации фибробластов, неоангиогенеза. При трансмиссионной электронной микроскопии на 7 сутки раневого заживления в условиях нормогликемии в этих группах наблюдали признаки высокой синтетической активности фибробластов и коллагеногенез.

Виментин – основной маркер фибробластов, который регулирует заживление ран, влияя на дифференцировку кератиноцитов, пролиферацию фибробластов и синтез коллагена посредством активации TGF-β; в то же время персистенция виментин-положительных клеток на поздних сроках раневого заживления ассоциирована с образованием рубцов [190]. Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о стимулирующем эффекте NO-терапии на деление фибробластов. При этом как в условиях нормогликемии, так и при сахарном диабете максимальное количество виментин-положительных клеток

определялось на 7-е сутки в группе, в которой раны обдували NO-СГП. К 21-м суткам в контрольных группах число виментин-положительных клеток снижалось менее активно, чем в экспериментальных, что позволяет сделать вывод о важной роли NO в регуляции программы снижения рубцевания при заживлении ран.

Известно, что тучные клеток усиливают локальное рекрутирование нейтрофилов, что способствует ускорению фазы альтерации или приводит к избыточному повреждению тканей, поэтому в данном исследовании, помимо оценки основных гистологических признаков регенерации и воспаления мы обратили внимание на характер функциональной активности тучных клеток [125].

В результате было выявлено уменьшение степени их дегрануляции под влиянием NO-терапии в условиях нормогликемии, что сочеталось с уменьшением выраженности микроциркуляторных нарушений и экссудации в тканях ран, обработанных экзогенным оксидом азота (Рисунок 55).

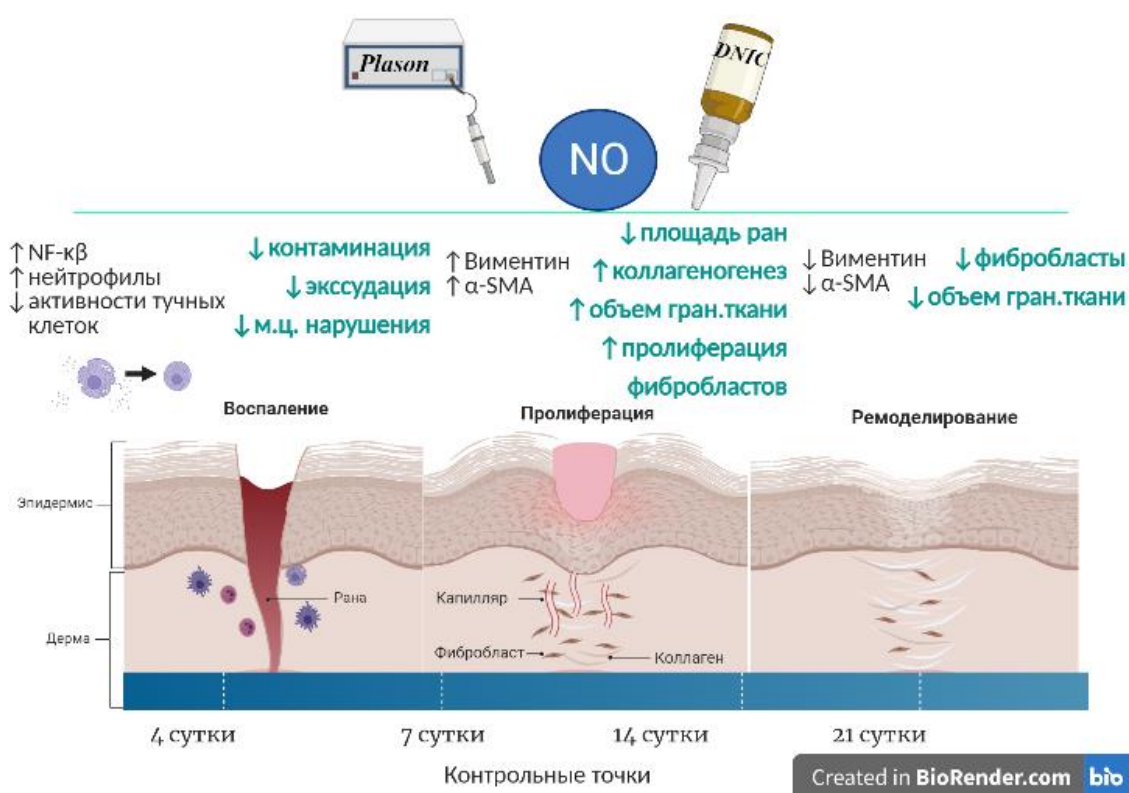


Рисунок 55 – Схема влияния NO на раневое заживление

Важно отметить, что терапия экзогенным оксидом азота у животных с гипергликемией позволяла снизить уровень воспаления до сопоставимого со значениями, полученными у животных экспериментальных групп с нормогликемией. Как было показано выше, данный эффект моделируется активностью регуляторного белка NF- κ B.

Влияние NO на регенерацию в условиях сахарного диабета было менее выраженным, чем у животных с нормальным уровнем глюкозы: статистически значимое уменьшение площади ран происходило только на 14-е сутки (против 7-х в условиях нормогликемии). Под действием проводимой терапии объем и зрелость грануляционной ткани нарастали значительно активнее, чем у некоторых животных, оставленных без лечения, у которых даже на 7-е сутки отсутствовала грануляционная ткань, однако в условиях нормогликемии эти процессы протекали намного интенсивнее.

По данным иммуногистохимического исследования площадь миофибробластов (α -SMA-положительных клеток) у животных с гипергликемией была в 4 раза ниже на 4-е сутки, почти в 2 раза ниже на 7-е, и достигала максимальных значений, близких к данным экспериментальных групп с нормогликемией только к 14-м суткам. Тем не менее, в течение второй недели раневого заживления площадь виментин-положительных клеток была почти одинаковой у животных экспериментальных групп с сахарным диабетом и нормальным уровнем глюкозы, что позволяет сделать вывод о выраженном стимулирующем эффекте оксида азота на пролиферацию.

Таким образом, в условиях гипергликемии применение NO-СГП и донора оксида азота – ДНКЖ в одинаковой степени способствовали ускорению раневого заживления за счет снижения выраженности воспаления и активации роста и созревания грануляционной ткани, что позволяет использовать оба метода для терапии раневых процессов у больных с сахарным диабетом.

NO-терапия, основанная на воздействии на область патологии NO-СГП, генерируемого и формируемого плазмо-химическим аппаратом Плазон из атмосферного воздуха, используется в практической медицине с 2000 года. Эта

терапия эффективно применяется при лечении длительно не заживающих ран, трофических язв, гнойно-воспалительных процессов, ожогов, язвенных процессов в слизистой оболочке, перитонита, спортивных и бытовых травм, артритов. Метод применяется также в офтальмологии, оториноларингологии, гинекологии, дерматологии [23, 140, 141, 146, 148, 149, 158, 159].

Опыт многолетнего использования аппарата Плазон в клинической и амбулаторной практике показывает, что параметры NO-терапии в разных лечебных учреждениях отличаются. Это связано не только с различием патологий, которые являются мишенями NO-терапии, и с размерами тканевых повреждений, но и с недостаточной унификацией конкретных методик. Очевидно, что важнейшим параметром NO-терапии является массовое количество оксида азота, подведенного к области патологии в процессе лечения, которое зависит от расхода NO, обеспечиваемого манипулятором аппарата, и временем воздействия на ткань (экспозиции). До настоящего времени отсутствовали исследования эффективности NO-терапии в зависимости от массовой дозы оксида азота, поступившего к очагу поражения.

Для исследования нами была выбрана экспериментальная модель кожной раны у крыс, так как раневое заживление лежит в основе большинства патологий, при лечении которых используется NO-терапия. Результаты исследования показали, что в ранах площадью 3 см² достоверные показатели раневого заживления (снижение воспалительных и усиление регенеративных процессов) отмечались при продолжительности воздействия 120 и 360 секунд (интегральные массовые дозы оксида азота 240 мг и 720 мг, удельные массовые дозы NO на единицу площади раны 80 мг/см² и 240 мг/см² соответственно). При этих дозах уже на 4 сутки после операции идет активный процесс пролиферации фибробластов и формирования грануляционной ткани. Выявляется также преимущественное наличие зрелых волокон коллагена I типа, т.е. переход воспалительной фазы заживления раны к репаративной фазе, что подтверждается результатами поляризационной микроскопии.

Полученные экспериментальные данные позволяют рассчитать основные параметры продолжительности воздействия NO-СГП на пораженные ткани. При обширных поражениях (трофические язвы, диабетическая стопа, абсцессы и др.) целесообразно использовать экспозицию 120 секунд на 1 см² области патологии (80 мг/см²).

Опубликованные ранее работы свидетельствуют о благоприятном влиянии ДНКЖ на раневое заживление [24, 27, 42, 181, 182, 201]. Тем не менее, внутривенное введение препарата для лечения раневых процессов не является оправданным ввиду непредсказуемости побочных эффектов и сложно прогнозируемой фармакокинетики [24]. Описанный способ локальной доставки через обкалывание дна раны способствует избыточной травматизации и гидратизации тканей ран [180, 201]. Таким образом, разработанный в данном исследовании спрей имеет потенциал стать эффективным способом применения ДНКЖ для лечения ран в клинической практике.

Создание простой, доступной и удобной в использовании формы доставки ДНКЖ в течение многих лет составляло актуальную задачу. Shekhter et al., 2015 синтезировали скаффолд на основе коллагена, содержащий 4 мМ ДНКЖ с глутатионовым лигандом, который способствовал более полной регенерации ран и полной эпителиализации на 4 суток раньше по сравнению с самопроизвольно заживающей раной [27]. При этом воспалительные изменения были выражены слабее, а грануляционная ткань быстрее созревала, чем в контроле. Тем не менее, прорегенеративный эффект ДНКЖ был ограничен быстрым высвобождением из имплантируемой конструкции.

Полученные нами результаты комплексного гистологического исследования свидетельствуют о стимулирующем влиянии спрея с ДНКЖ с глутатионовым лигандом на заживление ран. При этом, доза ДНКЖ 10 мкг, по-видимому, влияла исключительно на пролиферацию клеток и толщину грануляционной ткани, но не была достаточной для реализации противовоспалительного действия и активации синтетической функции фибробластов. Аэрозоль с 50 мкг (16,6 мкг/см²) ДНКЖ обладал наибольшей эффективностью, так как статистически достоверно

уменьшал выраженность воспалительных изменений, способствовал росту и созреванию грануляционной ткани на 4-е сутки раневого заживления, что является важным этапом на пути полной регенерации кожи. В то же время доза ДНКЖ 100 мкг являлась избыточной, так как в меньшей мере влияла на толщину и степень зрелости грануляционной ткани и увеличивала активность воспаления по сравнению с дозой 50 мкг, что объясняется патологическим усилением окислительных процессов в тканях ран и замедлением миграции и пролиферации фибробластов, а также ангиогенеза.

Тем не менее, в ходе долгосрочного (до полного заживления) эксперимента, орошение ран раствором ДНКЖ в течение 3-х дней после операции не позволило достичь эффекта, который был получен при обдувании ран NO-СГП, что в будущем ставит задачу определить оптимальный курс терапии раневых процессов раствором с ДНКЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время синтезировано множество доноров оксида азота и разработаны плазменные установки, генерирующие воздушные потоки с высоким содержанием NO, однако исследования по сравнению эффективности данных методов отсутствуют. В данном исследовании была морфологически обоснована эффективность методов NO-терапии для стимуляции раневого заживления, а также определены дозы оксида азота и оптимальный способ его доставки к участку повреждения.

На модели полнослойной кожной раны в условиях нормогликемии была определена оптимальная массовая доза оксида азота в газовом потоке, генерированном аппаратом Плазон. В эксперименте поток имел стандартные характеристики: температура 39 °С, скорость ~9 м/с, содержание оксида азота 1340 ppm, двуокиси азота 108 ppm; расход оксида азота ~2.3 мг/с, двуокиси азота ~0.2 мг/с. При фиксированном расстоянии до поверхности раны 80 мм время обдувания было вариативным параметром, что позволило вычислить массовую дозу оксида азота в потоке. В ходе краткосрочного эксперимента (4 суток) было показано, что при содержании NO выше 40 мг/см² происходит уменьшение интенсивности воспаления, при дозе 80 мг/см² отмечается дозозависимый эффект на рост грануляционной ткани, а при дозе 240 мг/см² происходит ее активное созревание. Таким образом, массовая доза оксида азота 80 мг/см² была определена как наиболее оптимальная для стимуляции раневого заживления.

В данном исследовании впервые был разработан спрей с донором оксида азота – ДНКЖ и изучены особенности регенерации ран при различных дозах ДНКЖ с глутатионовым лигандом. Было показано, что при комнатной температуре концентрация ДНКЖ остается стабильной в течение часа и снижается вдвое в течение 2,5 часов, что создает необходимость хранить готовый раствор в замороженном состоянии. В ходе морфологического исследования мы продемонстрировали, что применение донора NO резко ускоряет рост грануляционной ткани и имеет дозозависимый эффект на интенсивность

воспаления и зрелость грануляционной ткани. Таким образом, впервые было показано, что доза $16,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ является наиболее оптимальной для стимуляции раневого заживления.

В долгосрочном эксперименте в условиях нормогликемии оба способа доставки оксида азота продемонстрировали благоприятное влияние на созревание грануляционной ткани, при этом использование ДНКЖ было крайне эффективным на сроке 4 суток, однако за счет более выраженных про-регенеративных эффектов на поздних сроках, применение NO-СГП было определено как более эффективный способ стимуляции заживления ран. При обдувании ран из аппарата Плазон как в условиях нормогликемии, так и на модели сахарного диабета, отмечалось выраженное прогрессивное снижение воспалительных изменений, пролиферация фибробластов, ангиогенез, интенсивное нарастание толщины слоя грануляционной ткани на сроке 7 и 14 суток, степени ее фиброзирования и эпителизации раны. Также был сделан вывод о необходимости пролонгации курса применения ДНКЖ для стимуляции раневого заживления.

При изучении активности тучных клеток было показано, что в условиях нормогликемии NO-терапия уменьшает дегрануляцию и тем самым обуславливает снижение интенсивности воспаления в ранах на сроке 4 суток. При этом при сахарном диабете достоверного влияния на активность тучных клеток выявлено не было.

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что в ранах животных, обработанных экзогенным оксидом азота, в более ранние сроки среди клеток инфильтрата появляются макрофаги, фибробласты имеют расширенные цистерны ГЭР, а в межклеточном веществе, помимо разрушенных волокон коллагена, выявляются скопления гликозамингликанов, среди которых в более поздние сроки определяются тонкие поперечно-исчерченные волокна коллагена, что свидетельствует об ускорении раневого заживления.

Иммуногистохимическое исследование с антителами к виментину подтвердило данные морфологического исследования: NO-терапия способствует

усилению стадии пролиферации за счет увеличения мезенхимальных клеток в ране в течение первой недели раневого заживления в условиях нормогликемии и сахарного диабета. При оценке реакции с антителами к маркеру миофибробластов – α -SMA применялся анализ индекса экспрессии, который представлял собой произведение процента положительных клеток на степень интенсивности окрашивания, а также метод автоматической сегментации изображений, который позволял рассчитать, какой процент площади занимают α -SMA-положительные клетки. В результате в условиях нормогликемии индекс экспрессии и площадь положительно окрашенных клеток были максимальными в течение второй недели эксперимента в группах, в которых применяли NO-терапию. Поскольку миофибробласты играют важную роль для контракции раны, их высокое содержание положительно соотносится с полученными данными о более быстром уменьшении площади ран в экспериментальных группах по сравнению с контрольными на сроках 7 и 14 суток.

У животных с сахарным диабетом в течение эксперимента индекс экспрессии данного маркера был примерно одинаковым во всех опытных группах, тем не менее, на 21 сутки площадь α -SMA-положительных клеток значительно уменьшалась в группе, в которой раны обрабатывали раствором ДНКЖ. Снижение индекса экспрессии и количество клеток, реагирующих с антителами к α -SMA, на этом сроке также наблюдалось у животных с нормогликемией, раны которых лечили ДНКЖ. Таким образом, применение донора оксида азота ДНКЖ с меньшей вероятностью может вызвать образование рубцов на поздних сроках раневого заживления.

При исследовании активности NF- κ B на 4-е и 7-е сутки раневого заживления была выявлена повышенная экспрессия в макрофагах ран животных, которых лечили экзогенным NO. Данный белок способствовал интенсификации раневого очищения и обуславливал бактерицидный эффект, вследствие чего в группах, в которых применяли NO-терапию, выявлялась менее выраженная воспалительная инфильтрация, более тонкий фибринозно-лейкоцитарный слой, реже обнаруживались признаки контаминации. Активность данного белка в

фибробластах в условиях нормогликемии была выражена на 4-е сутки в группе, в которой применяли ДНКЖ, а в условиях гипергликемии – в группе, в которой использовали Плазон. Именно в этих группах на данном сроке отмечалась наиболее интенсивная регенерация.

Резюме

Применение NO-терапии ускоряет сокращение площади ран, рост грануляционной ткани, способствует более быстрому очищению ран и снижению выраженности признаков воспаления. Для достижения этих эффектов важно использовать правильную дозу экзогенного оксида азота, которая зависит от многих параметров, в том числе и от способа доставки. Для терапии неинфицированных ран, в том числе в условиях сахарного диабета, оптимальная массовая доза NO в газовом потоке, генерированном Плазоном, составляет 80 мг/см²; эти данные позволят оптимизировать режим использования данного аппарата для лечения раневых процессов. Разработка новой, простой в получении, лекарственной формы ДНКЖ для местного применения позволит более легко и широко использовать этот донор оксида азота. Настоящее исследование показало, что оптимальная доза ДНКЖ для стимуляции раневого заживления составляет 16,6 мкг, однако, по-видимому, для достижения наибольшей эффективности, потребуется увеличение курса лечения данным препаратом.

ВЫВОДЫ

1. При морфологическом исследовании установлено, что оптимальная массовая доза NO при обработке асептических кожных ран NO-содержащим газовым потоком из аппарата Плазон составляет 80 мг на 1см² поврежденной области при параметрах потока в области воздействия на ткань: температура 39 °С, скорость ~9 м/с, содержание оксида азота 1340 ppm, двуокиси азота 108 ppm; расход оксида азота ~2.3 мг/с, двуокиси азота ~0.2 мг/с.

2. Разработанный спрей, содержащий донор оксида азота ДНКЖ, способствует интенсивному росту грануляционной ткани в дозе 16,6 µg/см² и эффективен для местного применения в терапии ран.

3. В условиях нормогликемии и при сахарном диабете по данным стандартной световой, фазово-контрастной, поляризационной, трансмиссионной электронной микроскопий и иммуногистохимии, NO-терапия способствует ускорению раневого процесса, сокращая длительность заживления на неделю, по сравнению с контролем (без лечения). Она снижает активность воспаления в ране, ускоряет пролиферацию фибробластов, ангиогенез, рост и скорость созревания грануляционной ткани, продукцию коллагена, обеспечивает более быстрое сокращение площади ран и эпителизацию их поверхности. NO-СГП эффективнее влияет на заживление ран, чем ДНКЖ.

4. NO-терапия обеспечивает снижение функциональной активности тучных клеток на 4-е сутки раневого заживления в условиях нормогликемии и практически не влияет на нее в условиях гипергликемии.

5. NO-терапия с применением аппарата «Плазон» или донора оксида азота – динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) является эффективным методом стимуляции раневого заживления в условиях нормогликемии и при экспериментальном сахарном диабете. Применение NO-СГП в большей степени способствует ускорению раневого заживления в условиях нормогликемии, чем ДНКЖ.

6. ДНКЖ способствует увеличению виментин-положительных фибробластов на 4-е и 7-е сутки раневого заживления в условиях нормогликемии; на 7-е и 14-е сутки в условиях гипергликемии. NO-СГП увеличивает экспрессию виментина на 7-е сутки.

7. NO-терапия способствует увеличению индекса экспрессии и площади α -SMA-положительных клеток (миофибробластов) в ранах на 7-е и 14-е сутки раневого заживления в условиях нормогликемии. Применение ДНКЖ достоверно увеличивает экспрессию iNOS на 7-е сутки, обеспечивает статистически значимое снижение индекса экспрессии α -SMA-положительных клеток в ранах к 21-м суткам в условиях нормогликемии и гипергликемии.

8. NO-терапия способствуют повышению активности NF- κ B в макрофагах (индикатор раневого очищения) на 4-е и 7-е сутки раневого заживления. На 4-е сутки ДНКЖ наиболее значимо повышает активность NF- κ B в фибробластах (стимуляция пролиферации) в условиях гипергликемии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для терапии неинфицированных ран оптимально использовать NO-содержащий газовый поток, генерируемый аппаратом Плазон, с массовой дозой оксида азота 80 мг/см^2 при параметрах потока: температура $39 \text{ }^\circ\text{C}$, скорость $\sim 9 \text{ м/с}$, содержание оксида азота 1340 ppm , двуокиси азота 108 ppm ; расход оксида азота в потоке находится на уровне $\sim 2.3 \text{ мг/с}$, двуокиси азота $\sim 0.2 \text{ мг/с}$.

2. Разработанный спрей с ДНКЖ является оптимальным способом местной NO-терапии ран. Для стимуляции раневого заживления раствором ДНКЖ оптимальная доза активного вещества составляет $16,6 \text{ }\mu\text{г/см}^2$.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ОРДС – острый респираторный дистресс синдром

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

α -SMA – Alpha-smooth muscle actin, α -гладкомышечный актин

EcSOD – Extracellular superoxide dismutase, внеклеточная супероксиддисмутаза

eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота

iNO – ингаляторное применение оксида азота

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

MAPK – mitogen-activated protein kinase

NO – оксид азота

NO⁺ – ионы нитрозония

NONOate – диазенийдиолат

nNOS – нейрональная синтаза оксида азота

NO-CГП – оксид азота содержащий газовый поток

NF- κ B – нуклеарный фактор κ B

ONOO⁻ - пероксинитрит

TGF- β трансформирующий фактор роста β

PDGF – тромбоцитарный фактора роста

RSNO – S-нитрозотиол

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nussbaum, S.R. An economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds / S. R. Nussbaum, M.J. Carter, C.E. Fife, J. DaVanzo, R. Haught, M. Nusgart et al // *Value in Health*. – 2018. – Vol. 21(1). – P. 27-32.
2. Thomas, D.D. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling / D.D. Thomas, L.A. Ridnour, J.S. Isenberg, W. Flores-Santana, C.H. Switzer, S. Donzelli et al // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2008. – Vol. 45(1). – P. 18-31.
3. Carpenter, A.W. Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications / A.W. Carpenter, M.H. Schoenfisch // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – Vol. 41(10). – P. 3742-3752.
4. Schäffer, M.R. Nitric oxide metabolism in wounds / M.R. Schäffer, U. Tantry, R.A. van Wesep, A. Barbul // *Journal of Surgical Research*. – 1997. – Vol. 71(1). – P. 25-31.
5. Malone-Povolny, M.J. Nitric oxide therapy for diabetic wound healing / M.J. Malone-Povolny, S.E. Maloney, M.H. Schoenfisch // *Advanced healthcare materials*. – 2019. – Vol. 8(12). – P. 1801210.
6. Kobayashi, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation // *Journal of leukocyte biology*. – 2010. – Vol. 88(6). – P. 1157-1162.
7. Gürdöl, F. Collagen synthesis, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in diabetic subjects undergoing hyperbaric oxygen therapy / F. Gürdöl, M. Cimsit, Y. Öner-Iyidoğan, H. Koçak, S. Sengun et al // *Physiological research*. – 2010. – Vol. 59(3). – P. 423-429.
8. Ziche, M. Nitric oxide and angiogenesis / M. Ziche, L. Morbidelli // *Journal of neuro-oncology*. – 2000. – Vol. 50(1). – P. 139-148.
9. Schwentker, A. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? / A. Schwentker, Y. Vodovotz, R. Weller, T.R. Billiar // *Nitric oxide*. – 2002. – Vol. 7(1). – P. 1-10.
10. Han, G. Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition / G. Han, L.N. Nguyen, C.

Macherla, Y. Chi, J.M. Friedman, J.D. Nosanchuk et al // *The American journal of pathology*. – 2012. – Vol. 180(4). – P. 1465-1473.

11. Shaw, C.A. Cyclic GMP protects human macrophages against peroxynitrite-induced apoptosis / C.A. Shaw, D.J. Webb, A.G. Rossi, I.L. Megson // *Journal of Inflammation*. – 2009. – Vol. 6(1). – P. 1-10.

12. Schulz, G. Wound healing and nitric oxide production: too little or too much may impair healing and cause chronic wounds / G. Schulz, J. Stechmiller // *Book Wound healing and nitric oxide production: too little or too much may impair healing and cause chronic wounds* / EditorSage Publications Sage CA: Thousand Oaks, CA, 2006.

13. Kletschkus, K. Review of innovative physical therapy methods: Introduction to the principles of cold physical plasma / K. Kletschkus, L. Haralambiev, A. Mustea, S. Bekeschus, M.B. Stope // *In vivo*. – 2020. – Vol. 34(6). – P. 3103-3107.

14. Afzali, H. The Role of Nitric Oxide Donors in Wound Healing in Diabetes Mellitus / H. Afzali, R. Norouzirad, M. Khaksari // *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. – 2019. – Vol. 21(1). – P. 46-57.

15. Witte, M.B. Role of nitric oxide in wound repair / M.B. Witte, A. Barbul // *The American Journal of Surgery*. – 2002. – Vol. 183(4). – C. 406-412.

16. Fridman, G. Applied plasma medicine / G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A.B. Shekhter, V.N. Vasilets, A. Fridman // *Plasma processes and polymers*. – 2008. – Vol. 5(6). – P. 503-533.

17. Bernhardt, T. Plasma medicine: Applications of cold atmospheric pressure plasma in dermatology / T. Bernhardt, M.L. Semmler, M. Schäfer, S. Bekeschus, S. Emmert, L. Boeckmann // *Oxidative medicine and cellular longevity*. – 2019. – Vol. 2019.

18. Shekhter, A.B. Physicochemical parameters of NO-containing gas flow affect wound healing therapy. An experimental study / A.B. Shekhter, A.V. Pekshev, A.B. Vagapov, V.I. Telpukhov, P.V. Panyushkin, T.G. Rudenko et al // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – Vol. 128. – P. 193-201.

19. Pekshev, A.V. Study of plasma-chemical NO-containing gas flow for treatment of wounds and inflammatory processes / A.V. Pekshev, A.B. Shekhter, A.B. Vagapov, N.A. Sharapov, A.F. Vanin // *Nitric Oxide*. – 2018. – Vol. 73. – P. 74-80.

20. Walsh, J.L. Contrasting characteristics of linear-field and cross-field atmospheric plasma jets / J.L.Walsh, M.G. Kong // *Applied Physics Letters*. – 2008. – Vol. 93(11). – P. 111501.
21. Kong, M.G. Plasma medicine: an introductory review / M.G. Kong, G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T. Shimizu, J. Van Dijk, J. Zimmermann // *New Journal of Physics*. – 2009. – Vol. 11(11). – P. 115012.
22. Duchesne, C. Cold atmospheric plasma modulates endothelial nitric oxide synthase signalling and enhances burn wound neovascularisation / C. Duchesne, S. Banzet, J.J. Lataillade, A. Rousseau, N. Frescaline // *The Journal of pathology*. – 2019. – Vol. 249(3). – P. 368-380.
23. Шехтер, А. Экспериментально-клиническое обоснование плазмодинамической терапии ран оксидом азота / А. Шехтер, Р. Кабисов, А. Пекшев, Н. Козлов, Ю. Перов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 1998. – Т. 126(8). – С. 210-215.
24. Chen, Y.J. Activation of angiogenesis and wound healing in diabetic mice using NO-delivery dinitrosyl iron complexes / Y.J. Chen, S.C. Wu, H.C. Wang, T.H. Wu, S.S.F. Yuan, T.T. Lu et al // *Molecular pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 16(10). – P. 4241-4251.
25. Pinto, R.V. Emerging Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide Releasing Carriers for Skin Wound Healing Therapy / R.V. Pinto, S. Carvalho, F. Antunes, J. Pires, M. L. Pinto // *ChemMedChem*. – 2022. – Vol. 17(1). – P. e202100429.
26. Falconer, D. Nitric oxide donors for peripheral artery disease / D. Falconer, N. Papageorgiou, K. Salem, W.Y., A. Lim Katsargyris, E. Avgerinos // *Current opinion in pharmacology*. – 2018. – Vol. 39. – P. 77-85.
27. Shekhter, A.B. Dinitrosyl iron complexes with glutathione incorporated into a collagen matrix as a base for the design of drugs accelerating skin wound healing / A.B. Shekhter, T.G. Rudenko, L.P. Istranov, A.E. Guller, R.R. Borodulin, A.F. Vanin // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – Vol. 78. – P. 8-18.
28. Киричук, В. Влияние электромагнитных волн на частотах оксида азота на микроциркуляцию в сосудах головного мозга в условиях острой

экспериментальной ишемии / В. Киричук, А. Иванов, М. Сахань // *Фундаментальные исследования*. – 2014.(7;4). – С. 719-722.

29. Паршина, С. Влияние электромагнитного излучения терагерцового диапазона на частотах молекулярного спектра оксида азота на коагуляционный гемостаз у пациентов с различными формами стенокардии / С. Паршина, В. Киричук, Т. Головачева, Т. Афанасьева, В. Тупикин, А. Креницкий и др // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2006. – Т. 5(4). – С. 70-74.

30. Лукин, С. Комплексная коррекция патофизиологических нарушений у ортопедотравматологических больных с применением электромагнитных волн терагерцового диапазона на частотах излучения оксида азота / С. Лукин, Ю. Солдатов, М. Стогов // *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. – 2018. – Т. 95(6). – С. 58-66.

31. Киричук, В.Ф. Изменение активности гликопротеидных рецепторов эритроцитов у белых крыс в состоянии стресса и их коррекция терагерцовыми волнами на частоте оксида азота / В.Ф. Киричук, С.В. Свистунов, Е.В. Андронов, А.Н. Иванов // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2011. – Т. 7(3). – С. 583-586.

32. Maragos, C. M. Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects / C.M. Maragos, D. Morley, D.A. Wink, T.M. Dunams, J.E. Saavedra, A. Hoffman et al. // *Journal of medicinal chemistry*. – 1991. – Vol. 34(11). – P. 3242-3247.

33. Hrabie, J.A. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines / J.A. Hrabie, J.R. Klose, D.A. Wink, L.K. Keefer // *The Journal of Organic Chemistry*. – 1993. – Vol. 58(6). – P. 1472-1476.

34. Cheng, J. Nitric oxide (NO)-releasing macromolecules: Rational design and biomedical applications / J. Cheng, K. He, Z. Shen, G. Zhang, Y. Yu, J. Hu // *Frontiers in chemistry*. – 2019. – Vol. 7. – P. 530.

35. Hasan, N. Diethylenetriamine/NONOate-doped alginate hydrogel with sustained nitric oxide release and minimal toxicity to accelerate healing of MRSA-infected

- wounds / N. Hasan, J. Lee, D. Kwak, H. Kim, A. Saparbayeva, H.J. Ahn et al // Carbohydrate polymers. – 2021. – Vol. 270. – P. 118387.
36. Lee J. In situ hydrogel-forming/nitric oxide-releasing wound dressing for enhanced antibacterial activity and healing in mice with infected wounds / J. Lee, S.P. Hlaing, J. Cao, N. Hasan, H.J. Ahn, K.W. Song et al // Pharmaceutics. – 2019. – Vol. 11(10). – P. 496.
37. Yang, L. Nitric oxide-releasing macromolecular scaffolds for antibacterial applications / L. Yang, E.S. Feura, M.J.R. Ahonen, M.H. Schoenfish // Advanced healthcare materials. – 2018. – Vol. 7(13). – P. 1800155.
38. Yang, T. Progress and Promise of Nitric Oxide-Releasing Platforms / T. Yang, A.N. Zelikin, R. Chandrawati // Advanced Science. – 2018. – Vol. 5(6). – C. 1701043.
39. Zhou, X. Functional poly (ϵ -caprolactone)/chitosan dressings with nitric oxide-releasing property improve wound healing / X. Zhou, H. Wang, J. Zhang, X. Li, Y. Wu, Y. Wei et al // Acta biomaterialia. – 2017. – Vol. 54. – P. 128-137.
40. Титов, В. Предполагаемый механизм специфичности взаимодействия оксида азота с физиологическими мишенями / В. Титов, А. Долгорукова, А. Осипов // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2017. – Т. 4(2). – С. 36-39.
41. Титов, В. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при патологии / В. Титов, М. Крейнина, В. Петров, А. Иванова, В. Болдырихин, Ю. Балякин и др // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2012. Т. 4. – С.11-15.
42. Vanin, A.F. Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms. / A.F. Vanin // Cambridge Scholars Publishing. – 2019.
43. Vanin, A.F. Physico-Chemistry of Dinitrosyl Iron Complexes as a Determinant of Their Biological Activity / A.F. Vanin // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22(19). – P. 10356.
44. Vanin, A. F. How is Nitric Oxide (NO) Converted into Nitrosonium Cations (NO⁺) in Living Organisms?(Based on the Results of Optical and EPR Analyses of Dinitrosyl Iron Complexes with Thiol-Containing Ligands) / A.F. Vanin // Applied Magnetic Resonance. – 2020. – Vol. 51(9). – P. 851-876.

45. Seth, D. A multiplex enzymatic machinery for cellular protein S-nitrosylation / D. Seth, D.T. Hess, A. Hausladen, L. Wang, Y.J. Wang, J.S. Stamler // *Molecular cell*. – 2018. – Vol. 69(3). – P. 451-464.
46. Xu, G.M. Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice / G.M. Xu, X.M. Shi, J.F. Cai, S.L. Chen, P. Li, C.W. Yao et al // *Wound Repair and Regeneration*. – 2015. – Vol. 23(6). – P. 878-884.
47. Gan, L. Medical applications of nonthermal atmospheric pressure plasma in dermatology / L. Gan, S. Zhang, D. Poorun, D. Liu, X. Lu, M. He et al // *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology*. – 2018. – Vol. 16(1). – P. 7-13.
48. Haertel, B. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing / B. Haertel, T. Von Woedtke, K.D. Weltmann, U. Lindequist // *Biomolecules & therapeutics*. – 2014. – Vol. 22(6). – P. 477-490.
49. Shekhter, A.B. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds / A.B. Shekhter, V.A. Serezhenkov, T.G. Rudenko, A.V. Pekshev, A.F. Vanin // *Nitric oxide*. – 2005. – Vol. 12(4). – P. 210-219.
50. Daff, S. NO synthase: structures and mechanisms / S. Daff // *Nitric oxide*. – 2010. – Vol. 23(1). – P. 1-11.
51. Förstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Förstermann, W.C. Sessa // *European heart journal*. – 2012. – Vol. 33(7). – P. 829-837.
52. Thomas, D.D. Signaling and stress: the redox landscape in NOS2 biology / D.D. Thomas, J.L. Heinecke, L.A. Ridnour, R.Y. Cheng, A.H. Kesarwala, C.H. Switzer et al // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2015. – Vol. 87. – P. 204-225.
53. Montfort, W.R. Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor / W.R. Montfort, J.A. Wales, A. Weichsel // *Antioxidants & redox signaling*. – 2017. – Vol. 26(3). – P. 107-121.
54. Bogdan, C. Nitric oxide and the regulation of gene expression / C. Bogdan // *Trends in cell biology*. – 2001. – Vol. 11(2). – P. 66-75.

55. Neufeld, B.H. Critical nitric oxide concentration for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm reduction on polyurethane substrates / B.H. Neufeld, M.M. Reynolds // *Biointerphases*. – 2016. – Vol. 11(3). – P. 031012.
56. Dai, X. Dosing: The key to precision plasma oncology / X. Dai, Z. Zhang, J. Zhang, K.K. Ostrikov // *Plasma Processes and Polymers*. – 2020. – Vol. 17(10). – P. 1900178.
57. Daiber, A. New therapeutic implications of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function/dysfunction in cardiovascular disease / A. Daiber, N. Xia, S. Steven, M. Oelze, A. Hanf, S. Kröller-Schön et al // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20(1). – P. 187.
58. Daiber, A. Vascular redox signaling, redox switches in endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction / A. Daiber, M. Oelze, S. Daub, S. Steven, A. Schuff, S. Kroller-Schon et al // *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. – 2014. – P. 1177-1211.
59. Капелько, В. Применение природного донора оксида азота в кардиологии / В. Капелько, В. Лакомкин, А. Тимошин, О. Родненков, А. Зорин, А. Абрамов и др // *Кардиологический вестник*. – 2019. – Т. 14(2). – С. 26-35.
60. Лакомкин, В. Динамика формирования систолической дисфункции сердца при доксорубициновой кардиомиопатии / В. Лакомкин, А. Абрамов, В. Грамович, О. Выборов, Е. Лукошкова, В. Ермишкин и др // *Кардиология*. – 2017. – Т. 57,(1). – С. 59-64.
61. Лакомкин, В. Кардиотропное действие оксакома при экспериментальной сердечной недостаточности / В. Лакомкин, А. Абрамов, Е. Лукошкова, В. Ермишкин, Капелько В. // *Кардиология*. – 2015. – Т. 55(1). – С. 37-42.
62. Гостеев, А. Гемодинамические эффекты синтетического аналога эндогенных донаторов оксида азота (II) – препарата динитрозильных комплексов железа у больных артериальной гипертонией с неосложненными гипертоническими кризами / А. Гостеев, А. Зорин, О. Родненков, А. Драгнев, Е. Чазов // *Терапевтический архив*. – 2014. – Т. 86(9). – С. 49-55.

63. Степуро, Т. Модификация оксидом азота сродства гемоглобина к кислороду в различных условиях кислородного режима / Т. Степуро, В. Зинчук // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99(1). – С. 111-119.
64. Карпин, В. Механизмы развития хронических обструктивных заболеваний артерий нижних конечностей / В. Карпин, Е. Мельникова, В. Полухин // Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом. – 2017. – С. 25-27.
65. Vestweber, D. How leukocytes cross the vascular endothelium / D. Vestweber // Nature Reviews Immunology. – 2015. – Vol. 15(11). – P. 692-704.
66. Dani, C. Nitric oxide for the treatment of preterm infants with severe RDS and pulmonary hypertension / C. Dani, I. Corsini, J. Cangemi, V. Vangi, S. Pratesi // Pediatric pulmonology. – 2017. – Vol. 52(11). – P. 1461-1468.
67. Dowell, J.C. Association of response to inhaled nitric oxide and duration of mechanical ventilation in pediatric acute respiratory distress syndrome / J.C. Dowell, N.J. Thomas, N. Yehya // Pediatric critical care medicine: a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies. – 2017. – Vol. 18(11). – P. 1019.
68. Barrington K. J. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term K.J. Barrington, N. Finer, T. Pennaforte, G. Altit // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2017. Vol. 1.
69. Буров А.А. Терапия оксидом азота в неонатологии / А.А. Буров // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение. – 2014.(4;6). – С. 73-86.
70. Afshari, A. Inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute lung injury in children and adults / A. Afshari, J. Brok, A.M. Møller, J. Wetterslev // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2010. Vol. 7.
71. Weinberger, B. Nitric oxide in the lung: therapeutic and cellular mechanisms of action / B. Weinberger, D.E. Heck, D.L. Laskin, J. D. Laskin // Pharmacology & therapeutics. – 1999. – Vol. 84(3). – P. 401-411.
72. Hallman, M. Nitric oxide and lung surfactant / M. Hallman, K. Bry // Seminars in perinatology. – WB Saunders, 1996. – Vol. 20(3). – P. 173-185.

73. Lei C. Protocol of a randomized controlled trial testing inhaled Nitric Oxide in mechanically ventilated patients with severe acute respiratory syndrome in COVID-19 (SARS-CoV-2) / C. Lei, B. Su, H. Dong, A. Bellavia, R. Di Fenza, B.S. Fakhr et al // medRxiv. – 2020.
74. Fakhr, B.S. High concentrations of nitric oxide inhalation therapy in pregnant patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) / B.S. Fakhr, S.B. Wiegand, R. Pincioli, S. Gianni, C.C. Morais, T. Ikeda et al // *Obstetrics and Gynecology*. – 2020. – Vol. 136(6). – P. 1109.
75. Adhikari, N.K. Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: systematic review and meta-analysis / N.K. Adhikari, K.E. Burns, J.O. Friedrich, J.T. Granton, D.J. Cook, M.O. Meade // *Bmj*. – 2007. – Vol. 334(7597). – P. 779.
76. Ruan, S.Y. Inhaled nitric oxide therapy and risk of renal dysfunction: a systematic review and meta-analysis of randomized trials / S.Y. Ruan, T.M. Huang, H.Y. Wu, H.D. Wu, C.J. Yu, M.S. Lai // *Critical Care*. – 2015. – Vol. 19(1). – P. 1-10.
77. Wang, J. Inhaled nitric oxide and acute kidney injury risk: a meta-analysis of randomized controlled trials / J. Wang, X. Cong, M. Miao, Y. Yang, J. Zhang // *Renal failure*. – 2021. – Vol. 43(1). – P. 281-290.
78. Мартынюк, Т.В. Ингаляционный оксид азота: клинические эффекты и влияние на профиль провоспалительных маркеров у пациентов с идиопатической легочной гипертензией / Т.В. Мартынюк, С.Н. Наконечников, В.П. Масенко, И.Е. Чазова // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2012. – Т. 8(4). – С. 500-508.
79. Павленко, П. Эффективность и безопасность применения ингаляционного оксида азота у пациентов с легочной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью III-IV функционального класса, перенесших инфаркт миокарда левого желудочка: результаты сравнительного нерандомизированного исследования / П. Павленко, О. Драпкина, И. Сергеев, В. Ивашкин // *Клиницист*. – 2011. Т. 3. – С. 36-43.
80. Nathan, S.D. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of pulsed, inhaled nitric oxide in subjects at risk of pulmonary hypertension associated with

pulmonary fibrosis / S.D. Nathan, K.R. Flaherty, M.K. Glassberg, G. Raghu, J. Swigris, R. Alvarez et al // *Chest*. – 2020. – Vol. 158(2). – P. 637-645.

81. Alvarez, R. An acute dose escalation study to assess the safety and hemodynamic efficacy of pulsed inhaled nitric oxide (iNO) in subjects with pulmonary hypertension associated with pulmonary fibrosis (PF) or sarcoidosis / R. Alvarez, R. Dudenhofer, K. Ahmad, M. Glassberg Csete, L. Lancaster, G. Raghu et al // B56. Pulmonary hypertension clinical trials endeavor safety, combination what else? – American Thoracic Society, 2020. – P. A3818-A3818.

82. Fernandes, J.L. Comparison of inhaled nitric oxide versus oxygen on hemodynamics in patients with mitral stenosis and severe pulmonary hypertension after mitral valve surgery / J.L. Fernandes, R.O. Sampaio, C.M. Brandão, T.A.D. Accorsi, L.F. Cardoso, G.S. Spina et al // *The American journal of cardiology*. – 2011. – Vol. 107(7). – P. 1040-1045.

83. Lee, J. Nitric oxide in the kidney: its physiological role and pathophysiological implications / J. Lee // *Electrolyte & Blood Pressure*. – 2008. – Vol. 6(1). – P. 27-34.

84. Bahadoran Z. Inorganic nitrate, a natural anti-obesity agent: A systematic review and meta-analysis of animal studies / Z. Bahadoran, S. Jeddi, S. Gheibi, P. Mirmiran, K. Kashfi, A. Ghasemi // *EXCLI journal*. – 2020. – Vol. 19. – P. 972.

85. Kashiwagi, S. eNOS phosphorylation on serine 1176 affects insulin sensitivity and adiposity / S. Kashiwagi, D.N. Atochin, Q. Li, M. Schleicher, T. Pong, W.C. Sessa W. C., Huang P. L. et al // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2013. – Vol. 431(2). – P. 284-290.

86. Sansbury, B.E. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype / B.E. Sansbury, T.D. Cummins, Y. Tang, J. Hellmann, C.R. Holden, M. Harbeson // *Circulation research*. – 2012. – Vol. 111(9). – P. 1176-1189.

87. Oleson, B.J. Nitric oxide suppresses β -cell apoptosis by inhibiting the DNA damage response / B.J. Oleson, K.A. Broniowska, A. Naatz, N. Hogg, V.L. Tarakanova, J.A. Corbett // *Molecular and cellular biology*. – 2016. – Vol. 36(15). – P. 2067-2077.

88. Oleson, B.J. The role of metabolic flexibility in the regulation of the DNA damage response by nitric oxide / B.J. Oleson, K.A. Broniowska, C.T. Yeo, M. Flancher, A. Naatz, N. Hogg et al // *Molecular and cellular biology*. – 2019. – Vol. 39(18). – P. e00153-19.
89. Sansbury, B.E. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide / B.E. Sansbury, B.G. Hill // *Free radical biology and medicine*. – 2014. – Vol. 73. – P. 383-399.
90. Yan, Z. Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise / Z. Yan, H.R. Spaulding // *Redox biology*. – 2020. – Vol. 32. – P. 101508.
91. Long, J.H.D. Glucocorticoid-induced myopathy is mediated by impaired Nitric Oxide synthesis. – University of Florida. – 2007.
92. Betters, J.L. Nitric oxide reverses prednisolone-induced inactivation of muscle satellite cells / J.L. Betters, J.H. Long, K.S. Howe, R.W. Braith, Q.A. Soltow, V.A. Lira et al // *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*. – 2008. – Vol. 37(2). – P. 203-209.
93. Toda, N. Cigarette smoking impairs nitric oxide-mediated cerebral blood flow increase: Implications for Alzheimer's disease / N. Toda, T. Okamura // *Journal of pharmacological sciences*. – 2016. – Vol. 131(4). – P. 223-232.
94. Ma, S.X. Enhanced nitric oxide concentrations and expression of nitric oxide synthase in acupuncture points/meridians / S.X. Ma // *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*. – 2003. – Vol. 9(2). – P. 207-215.
95. Abraham, T.S. TRPV1 expression in acupuncture points: response to electroacupuncture stimulation / T.S. Abraham, M.L. Chen, S.X. Ma // *Journal of chemical neuroanatomy*. – 2011. – Vol. 41(3). – P. 129-136.
96. Ma, S.X. Nitric oxide signaling molecules in acupoints: toward mechanisms of acupuncture / S.X. Ma // *Chinese journal of integrative medicine*. – 2017. – Vol. 23(11). – P. 812-815.
97. Kamalian, A. Interventions of natural and synthetic agents in inflammatory bowel disease, modulation of nitric oxide pathways / A. Kamalian, M.S. Asl, M. Dolatshahi,

- K. Afshari, S. Shamshiri, N.M. Roudsari et al // *World Journal of Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 26(24). – P. 3365.
98. Jädert, C. Preventive and therapeutic effects of nitrite supplementation in experimental inflammatory bowel disease / C. Jädert, M. Phillipson, L. Holm, J.O. Lundberg, S. Borniquel // *Redox biology*. – 2014. – Vol. 2. – P. 73-81.
99. Tun, X. Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis / X. Tun, K. Yasukawa, K.I. Yamada // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2014. – Vol. 74. – P. 108-117.
100. Slomiany, B. Role of LPS-elicited signaling in triggering gastric mucosal inflammatory responses to *H. pylori*: modulatory effect of ghrelin / B. Slomiany A. Slomiany // *Inflammopharmacology*. – 2017. – Vol. 25(4). – P. 415-429.
101. Somasundaram, V. Molecular mechanisms of nitric oxide in cancer progression, signal transduction, and metabolism / V. Somasundaram, D. Basudhar, G. Bharadwaj, J.H. No, L.A. Ridnour, R.Y. Cheng et al // *Antioxidants & redox signaling*. – 2019. – Vol. 30(8). – P. 1124-1143.
102. Wink, D.A. The reemergence of nitric oxide and cancer / D.A. Wink, L.A. Ridnour, S.P. Hussain, C.C. Harris // *Nitric oxide: biology and chemistry/official journal of the Nitric Oxide Society*. – 2008. – Vol. 19(2). – P. 65.
103. Thomas, D.D. A. NOS2 as an Emergent Player in Progression of Cancer / D.D. Thomas, D.A. Wink // *Antioxidants & redox signaling*. – 2017. – Vol. 26(17). – P. 963-965.
104. Sektioglu, I.M. Macrophage-derived nitric oxide initiates T-cell diapedesis and tumor rejection / I.M. Sektioglu, R. Carretero, N. Bender, C. Bogdan, N. Garbi, V. Umansky et al // *Oncoimmunology*. – 2016. – Vol. 5(10). – P. e1204506.
105. Ridnour, L.A. NOS inhibition modulates immune polarization and improves radiation-induced tumor growth delay / L.A. Ridnour, R.Y. Cheng, J.M. Weiss, S. Kaur, D.R. Soto-Pantoja, D. Basudhar et al // *Cancer research*. – 2015. – Vol. 75(14). – P. 2788-2799.
106. Klug, F. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS+/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy / F. Klug, H.

- Prakash, P.E. Huber, T. Seibel, N. Bender, N. Halama // *Cancer cell*. – 2013. – Vol. 24(5). – P. 589-602.
107. Sorg, H. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts / H. Sorg, D.J. Tilkorn, S. Hager, J. Hauser, U. Mirastschijski // *European Surgical Research*. – 2017. – Vol. 58(1-2). – P. 81-94.
108. Wallace, H. Wound Healing Phases. StatPearls / H. Wallace, P. Zito // *Book Wound Healing Phases. StatPearls / EditorTreasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.*
109. Xue, M. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring / M. Xue, C.J. Jackson // *Advances in wound care*. – 2015. – Vol. 4(3). – P. 119-136.
110. Nyström, A. Matrix molecules and skin biology / A. Nyström, L. Bruckner-Tuderman // *Seminars in cell & developmental biology*. – Vol. 89. – Elsevier. – 2019. – P. 136-146.
111. Rodrigues, M. Wound healing: a cellular perspective / M. Rodrigues, N. Kosaric, C.A. Bonham, G.C. Gurtner // *Physiological reviews*. – 2019. – Vol. 99(1). – P. 665-706.
112. Atala, A. Principles of regenerative medicine / A. Atala, R. Lanza, T. Mikos, R. Nerem. – 3-d edition. – Academic press, 2018. – P. 1337.
113. Wilgus, T.A. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions / T.A. Wilgus, S. Roy, J.C. McDaniel // *Advances in wound care*. – 2013. – Vol. 2(7). – P. 379-388.
114. Larouche, J. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets / J. Larouche, S. Sheoran, K. Maruyama, M.M. Martino // *Advances in wound care*. – 2018. – Vol. 7(7). – P. 209-231.
115. Арустамова, А. Влияние фактора роста эндотелия сосудов VEGF на выработку NO / А. Арустамова, А. Белоус, М. Покровский, Т. Покровская, В. Якушев, А. Барсук и др. // *Актуальные проблемы медицины*. – 2011. – Т. 13(4-99). – С. 62-64.

116. Wang, J. Neutrophils in tissue injury and repair / J. Wang // Cell and tissue research. – 2018. – Vol. 371(3). – P. 531-539.
117. Landén, N. X. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing / N.X. Landén, D. Li, M. Ståhle // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2016. – Vol. 73(20). – P. 3861-3885.
118. Cañedo-Dorantes, L. Skin acute wound healing: a comprehensive review / L. Cañedo-Dorantes, M. Cañedo-Ayala // International journal of inflammation. – 2019. – Vol. 2019. – P. 2-15.
119. Schäffer, M.R. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice / M.R. Schäffer, U. Tantry, F.J. Thornton, A. Barbul // The European journal of surgery. – 1999. – Vol. 165(3). – P. 262-267.
120. Coneski, P.N. Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting / P.N. Coneski, M.H. Schoenfisch // Chemical Society Reviews. – 2012. – Vol. 41(10). – P. 3753-3758.
121. Ridnour, L.A. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and-independent pathways / L.A. Ridnour, A.N. Windhausen, J.S. Isenberg, N. Yeung, D.D. Thomas, M.P. Vitek et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – Vol. 104(43). – P. 16898-16903.
122. Kaplani, K. Wound healing related agents: Ongoing research and perspectives / K. Kaplani, S. Koutsi, V. Armenis, F.G. Skondra, N. Karantzelis, S.C. Tsaniras, S. Taraviras // Advanced drug delivery reviews. – 2018. – Vol. 129. – P. 242-253.
123. Luo, H.R. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation / H.R. Luo, F. Loison // American journal of hematology. – 2008. – Vol. 83(4). – P. 288-295.
124. Jia, Y. Inducible nitric oxide synthase links NF- κ B to PGE 2 in polyunsaturated fatty acid altered fibroblast in-vitro wound healing / Y. Jia, J.J. Turek // Lipids in Health and Disease. – 2005. – Vol. 4(1). – P. 1-10.
125. Galli, S.J. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils / S.J. Galli, N. Borregaard, T.A. Wynn // Nature immunology. – 2011. – Vol. 12(11). – P. 1035.

126. Barraud, N. Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases / N. Barraud, M.J. Kelso, S.A. Rice, S. Kjelleberg // *Current pharmaceutical design*. – 2015. – Vol. 21(1). – P. 31-42.
127. Hossain, S. Discovery of two bacterial nitric oxide-responsive proteins and their roles in bacterial biofilm regulation / S. Hossain, L.M. Nisbett, E.M. Boon // *Accounts of chemical research*. – 2017. – Vol. 50, № 7. – P. 1633-1639.
128. Römling, U. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies / U. Römling, C. Balsalobre // *Journal of internal medicine*. – 2012. – Vol. 272(6). – P. 541-561.
129. Fadok, V.A. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF / V.A. Fadok, D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, P.M. Henson // *The Journal of clinical investigation*. – 1998. – Vol. 101(4). – P. 890-898.
130. Du, X.L. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site / X.L. Du, D. Edelstein, S. Dimmeler, Q. Ju, C. Sui, M. Brownlee // *The Journal of clinical investigation*. – 2001. – Vol. 108(9). – P. 1341-1348.
131. Boykin, Jr J.V. Wound nitric oxide bioactivity: a promising diagnostic indicator for diabetic foot ulcer management / Jr J.V. Boykin // *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing*. – 2010. – Vol. 37,(1). – P. 25-32.
132. Свистунов, А.А. Экспериментальное и клиническое обоснование применения электромагнитных волн терагерцевого диапазона на частотах излучения и поглощения оксида азота и кислорода при различных формах патологии / А. А. Свистунов, А.А. Цымбал, П.Ф. Литвицкий, И.А. Будник // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2017. – Т. 72(5). – С. 365-374.
133. Majumder, S.A. Comparative study of NONOate based NO donors: spermine NONOate is the best suited NO donor for angiogenesis / S. Majumder, S. Sinha, J.H. Siamwala, A. Muley, H. R. Seerapu, G. K. Kolluru et al. // *Nitric Oxide*. – 2014. – Vol. 36. – P. 76-86.

134. Borodulin, R.R. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO⁺ donors / R.R. Borodulin, L.N. Kubrina, V.D. Mikoyan, A.P. Poltorakov, V.O. Shvydkiy, D.S. Burbaev et al. // Nitric Oxide. – 2013. – Vol. 29. – P. 4-16.
135. Киреев, С. Применение ТГЧ-терапии в комплексной послеоперационной реабилитации пациентов со статическими деформациями стоп / С. Киреев, А. Имамов, В. Белоногов, В. Киреев, Д. Имамова // Вестник новых медицинских технологий. – 2015. – Т. 22(1). – С. 67-71.
136. Von Woedtke, T. Plasmas for medicine / T. Von Woedtke, S. Reuter, K. Masur, K.D. Weltmann // Physics Reports. – 2013. – Vol. 530(4). – P. 291-320.
137. Lunov, O. Cell death induced by ozone and various non-thermal plasmas: therapeutic perspectives and limitations / O. Lunov, V. Zablotskii, O. Churpita, E. Chánová, E. Syková, A. Dejneka, Š. Kubinová // Scientific reports. – 2014. – Vol. 4(1). – P. 1-11.
138. Козлов, Н.П. Теплофизические аспекты проблемы создания плазменных хирургических установок / Н.П. Козлов, А.В. Пекшев, Ю.С. Протасов, В. Суслов // Радиационная плазмодинамика. – 1991. – С. 498-552.
139. Козлов, Н. Разработка плазменных хирургических установок / Н. Козлов, В. Маликов, А. Пекшев, Н. Шарапов // Вестник МГТУ. – 1998. – Т. 4. – С. 127-41.
140. Кротовский, Г. Терапия экзогенным оксидом азота – новый метод стимуляции заживления трофических дефектов кожи на фоне хронической венозной недостаточности / Г. Кротовский, А. Пекшев, А. Зудин, И. Учкин, А. Мосесов // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2001. – Т. 3. – С. 37-42.
142. Кротовский, Г. Экзогенный оксид азота – новый способ терапии больных с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей / И. Учкин, А. Зудин // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2002. Т. 4. – С. 63.
143. Выренков, Ю. Применение монооксида азота в хирургической практике / Ю. Выренков, А. Есипов, В. Мусаилов, В. Москаленко, В. Шишло, А. Поваляев // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2014. Т. 1. – С. 33-39.
144. Суздальцев, И.В. Применение экзогенного монооксида азота в комплексном лечении язвенно-некротических поражений у больных с синдромом

диабетической стопы / И.В. Суздальцев, И.А. Полапин // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2013. – Т. 8(1). – С. 111-115.

145. Суздальцев, И. Результаты и качество жизни пациентов с осложнёнными формами синдрома диабетической стопы после проведённого комплексного лечения с применением экзогенного монооксида азота / И. Суздальцев, Е. Печёнкин, И. Полапин // Современные проблемы науки и образования. – 2016. Т. 2. – С. 156-156.

146. Павлович, В. NO-терапия при лечении келоидных и гипертрофических рубцов в области лица и шеи: опыт применения / В. Павлович, В. Эзрохин, А. Шехтер // Вестник эстетической медицины. – 2009. – Т. 8(2). – С. 50-57.

147. Vasilets, V.N. Air plasma-generated nitric oxide in treatment of skin scars and articular musculoskeletal disorders: Preliminary review of observations / V.N. Vasilets, A.B. Shekhter, A.E. Guller, A.V. Pekshev // Clinical Plasma Medicine. – 2015. – Vol. 3(1). – P. 32-39.

148. Решетов, И.В. Особенности клинического применения воздушно-плазменного аппарата «Плазон» при реконструктивно-пластических операциях в онкологии / И.В. Решетов, Р.К. Кабисов, С.А. Кравцов // NO-терапия: теоретические аспекты, клинический опыт и проблемы применения экзогенного оксида азота в медицине. Под ред. С.В. Грачева, А.Б. Шехтера, Н.П. Козлова. – 2001. – С. 74.

149. Кабисов, Р.К. Роль экзогенной NO-терапии в системе комплексного лечения ран и раневой патологии у онкологических больных / Р.К. Кабисов, А.Б. Шехтер, А.В. Пекшев, И.В. Решетов, М.В. Манейлова, А.Л. Николаев и др. // Российский онкологический журнал. – 2002. – С. 16-22.

150. Марченко, С.Б. Опыт применения плазменного скальпеля-коагулятора «Плазон» в условиях гарнизонного военно-морского госпиталя / С.Б. Марченко, В.Е. Макаренко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2012. – Т. 47(1-2). – С. 89-92.

151. Давыдов, А.И. Клиническая оценка интраоперационного применения воздушно-плазменного потока, обогащенного монооксидом азота, при операциях

на матке и ее придатках / А.И. Давыдов, С. Кучухидзе, А. Шехтер, А. Ханин, А. Пекшев, В. Панкратов // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2004. – Т. 3(4). – С. 12-17.

152. Грищенко, Н.Г. Оптимизация результатов программ ЭКО при использовании экзогенного оксида азота для повышения рецептивности эндометрия / Н.Г. Грищенко, Ю.А. Котлик, Т.Л. Весич, О.А. Кузьмина // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15(2;1). – С. 80-82.

153. Чеснокова, Н. Экспериментальное обоснование применения оксида азота в газовом потоке для лечения травм глаза / Н. Чеснокова, Р. Гундорова, О. Кваша, В. Быков, Н. Давыдова, О. Безнос и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2003. Т. 5. – С. 40-44.

154. Свистушкин, В. Применение NO-терапии в ранние сроки после тимпаноластики / В. Свистушкин, Е. Шевчик, Д. Рогаткин, Г. Никифорова, Г. Голубовский, Н. Захарова и др. // Альманах клинической медицины. – 2012. Т. 26. – С. 68-73.

155. Шевчик, Е.А. Значение NO-терапии в репаративном процессе после тимпаноластики / Е.А. Шевчик, В.М. Свистушкин, Н.М. Захарова, С.Н. Шатохина, Г.Н. Никифорова, А.В. Ратова и др. // Российская оториноларингология. – 2012. Т. 5. – С. 132-137.

156. Malik, M.A. Nitric oxide production by high voltage electrical discharges for medical uses: a review / M.A. Malik // Plasma Chemistry and Plasma Processing. – 2016. – Vol. 36(3). – P. 737-766.

157. Shekhter, A.B. Dose-dependent effect of plasma-chemical NO-containing gas flow on wound healing. An experimental study / A.B. Shekhter, A.V. Pekshev, A.B. Vagarov, A.V. Butenko, A.L. Fayzullin, T.G. Rudenko et al // Clinical Plasma Medicine. – 2020. – Vol. 19. – P. 100101.

158. Wise, J. Refinements in nitric acid technology / J. Wise // Nitrogen. – 1990. Vol. 186. – P. 32-34.

159. Липатов, К. Использование газового потока, содержащего оксид азота (NO-терапия), в комплексном лечении гнойных ран / К. Липатов, М. Сопромадзе, А. Шехтер, А. Емельянов, С. Грачев // Хирургия. – 2002. Т. 2. – С. 41-43.
160. Butenko, A.V. Review of clinical applications of nitric oxide-containing air-plasma gas flow generated by Plason device / A.V. Butenko, A.B. Shekhter, A.V. Pekshev, A.B. Vagarov, A.L. Fayzullin, N.B. Serejnikova et al. // Clinical Plasma Medicine. – 2020. – Vol. 19. – P. 100112.
161. Ларичев, А.Б. Профилактика раневой инфекции и морфологические аспекты заживления асептической раны / А.Б. Ларичев, В.К. Шишло, А.В. Лисовский, А.Л. Чистяков, А.А. Васильев // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2011. – Т. 4(4). – С. 728-733.
162. Шулутко, А. Воздушно-плазменная технология в комплексном лечении раневой инфекции / А. Шулутко, Э. Османов, Т. Гогохия, А. Натрошвили, А. Мачарадзе // Georgian medical. – 2018. – С. 7.
163. Леднев, П. Применение воздушно-плазменного потока для лечения послеоперационной стернальной инфекции / П. Леднев, Ю. Белов, Л. Марахонич, А. Стоногин, А. Лысенко, Г. Салагаев // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2017. – Т. 10(6). – С. 28-33.
164. Клименко И.Г. NO-терапия и низкочастотный ультразвук в лечении гнойных заболеваний мягких тканей: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.27/И.Г.Клименко. – Е., 2009. – 157 с.
165. Киршина, О. Особенности заживления гнойных ран при комбинированном использовании NO-терапии и низкочастотного ультразвука / О. Киршина, И. Клименко, Н. Григорьев, А. Горынин // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2009. – Т. 3(26). – С. 77-79.
166. Кривихин, Д. В. Применение экзогенного оксида азота на этапах подготовки раны к аутодермальному закрытию у больных с синдромом диабетической стопы после «Малых» операций / Д. В. Кривихин, В. Кривихин, О. Амбросимова, Ю. Лазарев, В. Павленко, Н. Михайловская // Альманах клинической медицины. – 2006. Т. 11. – С. 63-66.

167. Сандаков, П. Я. Применение экзогенного монооксида азота в комплексном лечении больных с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы / П.Я. Сандаков, В.А. Самарцев, А.А. Паршаков // Пермский медицинский журнал. – 2011. – Т. 28(5). – С. 31-36.
168. Павлович В.А. Лечение и профилактика келоидных и гипертрофических рубцов в области лица и шеи: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.17/В.А.Павлович. – М., 2010. – 157 с.
169. Ялаева, И. Комбинация оксид-азотной терапии и низкочастотного ультразвука в лечении гнойных ран / И. Ялаева, О. Киршина, П. Коновалов, О. Лобут, А. Лобанов // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2015. Т. 2. – С. 82-86.
170. Снимщикова, И. Опыт использования локальной иммунокоррекции в лечении гнойных ран / И. Снимщикова, М. Халилов // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12(3). – С. 227-234.
171. Халилов, М. Использование топической иммунокоррекции в лечении гнойных ран / М. Халилов // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. 16(4). – С. 165-168.
172. Wang, Y.N. Decoding nitric oxide release rates of amine-based diazeniumdiolates / Y.N. Wan, J. Collins, R.J. Holland, L.K. Keefer, J. Ivanic // The Journal of Physical Chemistry A. – 2013. – Vol. 117(30). – P. 6671-6677.
173. Han, G. Chronic wound healing: a review of current management and treatments / G. Han, R. Ceilley // Advances in therapy. – 2017. – Vol. 34(3). – P. 599-610.
174. Kandhwal, M. Understanding the Potential Role and Delivery Approaches of Nitric Oxide in Chronic Wound Healing Management / M. Kandhwal, T. Behl, A. Kumar, S. Arora // Current Pharmaceutical Design. – 2021. – Vol. 27(17). – P. 1999-2014.
175. Мартусевич, А. Депонированные формы оксида азота: биомедицинские аспекты / А. Мартусевич, С. Ашихмин, С. Перетягин, А. Давыдюк // Вятский медицинский вестник. – 2014. Т. 3-4. – С. 18 – 24.

176. Vanin, A. The Free-Radical Nature of Nitric Oxide Molecules as a Determinant of Their Conversion to Nitrosonium Cations in Living Systems / A. Vanin // *Biophysics*. – 2020. – Vol. 65(3). – P. 353-367.
177. ТИТОВ, В. Особенности метаболизма оксида азота в норме и при воспалении / В. ТИТОВ, А. ОСИПОВ, М. КРЕЙНИНА, А. ВАНИН // *Биофизика*. – 2013. – Т. 58(5). – С. 857-870.
178. Vanin, A. Mono-and binuclear dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in various biosystems / A. Vanin, V. Mikoyan, L. Kubrina, R. Borodulin, E. Burgova // *Biophysics*. – 2015. – Vol. 60(4). – P. 603-612.
179. Lok, H.C. A nitric oxide storage and transport system that protects activated macrophages from endogenous nitric oxide cytotoxicity / H. C. Lok, S. Sahni, P.J. Jansson, Z. Kovacevic, C.L. Hawkins, D.R. Richardson // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 291(53). – P. 27042-27061.
180. Vanin, A.F. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl–iron complexes with thiol-containing ligands / A.F. Vanin, V.A. Serezhenkov, V.D. Mikoyan, M.V. Genkin // *Nitric oxide*. – 1998. – Vol. 2(4). – P. 224-234.
181. Shekhter, A. Dinitrosyl iron complexes with thiol ligands promote skin wound healing in animals / A. Shekhter, T. Rudenko, V. Serezhenkov, A. Vanin // *Biophysics*. – 2007. – Vol. 52(5). – P. 515-520.
182. Chen, Y.C. Cell-Penetrating Delivery of Nitric Oxide by Biocompatible Dinitrosyl Iron Complex and Its Dermato-Physiological Implications / Y.C. Chen, Y.H. Chen, H. Chiu, Y.H. Ko, R.T. Wang, W.P. Wang et al // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22(18). – P. 10101.
183. Mikoyan, V.D. The binuclear form of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in animal tissues / V.D. Mikoyan, E.N. Burgova, R.R. Borodulin, A.F. Vanin // *Nitric Oxide*. – 2017. – Vol. 62. – P. 1-10.
184. Igrunkova, A. Spray with Nitric Oxide Donor Accelerates Wound Healing: Potential off-the-Shelf Solution for Therapy? / A. Igrunkova, A. Fayzullin, S. Churbanov, P. Shevchenko, N. Serejnikova, N. Chepelova et al // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2022. – Vol. 16. – P. 349-362

185. Vanin, A.F. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands: electron paramagnetic resonance and optical studies / A.F. Vanin, A.P. Poltorakov, V.D. Mikoyan, L.N. Kubrina, D.S. Burbaev // *Nitric oxide*. – 2010. – Vol. 23(2). – P. 136-149.
186. Байрашева, В. Моделирование сахарного диабета и диабетической нефропатии в эксперименте / В. Байрашева // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – Т. 4. – С. 460.
187. Blinova, E. Cerium-Containing N-Acetyl-6-Aminohexanoic Acid Formulation Accelerates Wound Reparation in Diabetic Animals / E. Blinova, D. Pakhomov, D. Shimanovsky, M. Kilmyashkina, Y. Mazov, T. Demura, V. Drozdov, D. Blinov, O. Deryabina, E. Samishina, A. Butenko et al // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11(6). – P. 834.
188. Линднер, Д. Морфометрический анализ популяции тучных клеток / Д. Линднер, И. Поберий, М. Розкин, В. Ефимов // *Архив патологии*. – 1980. – Т. 42(6). – С. 60-64.
189. Shi, X.M. Low-temperature plasma promotes fibroblast proliferation in wound healing by ROS-activated NF- κ B signaling pathway? X.M. Shi, G.M. Xu, G.J. Zhang, J.R. Liu, Y.M. Wu, L.G. Gao et al. // *Current medical science*. – 2018. – Vol. 38(1). – P. 107-114.
190. Yan, C. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor- α through bone morphogenic protein-2 / C. Yan, W. A. Grimm, W. L. Garner, L. Qin, T. Travis, N. Tan et al. // *The American journal of pathology*. – 2010. – Vol. 176(5). – P. 2247-2258.
191. Tomasek, J.J. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling / J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R.A. Brown // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2002. – Vol. 3(5). – P. 349-363.
192. Chitturi, R.T. The role of myofibroblasts in wound healing, contraction and its clinical implications in cleft palate repair / R.T. Chitturi, A.M. Balasubramaniam, R.A. Parameswar, G. Kesavan, K.M. Haris, K. Mohideen // *Journal of international oral health: JIOH*. – 2015. – Vol. 7(3). – P. 75.

193. Na, J. Histone H3K27 demethylase JMJD3 in cooperation with NF- κ B regulates keratinocyte wound healing / J. Na, K. Lee, W. Na, J.Y. Shin, M.J. Lee, T.Y. Yune et al // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2016. – Vol. 136(4). – P. 847-858.
194. De Farias Gabriel, A. Photobiomodulation therapy modulates epigenetic events and NF- κ B expression in oral epithelial wound healing / A. De Farias Gabriel, V.P. Wagner, C. Correa, L.P. Webber, E.F.S. Pilar, M. Curra et al // *Lasers in medical science*. – 2019. – Vol. 34(7). – P. 1465-1472.
195. Brun, P. Helium generated cold plasma finely regulates activation of human fibroblast-like primary cells / P. Brun, S. Pathak, I. Castagliuolo, G. Palù, P. Brun, M. Zuin et al // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9(8). – P. e104397.
196. Bauer, J.A. Evaluation of linear polyethyleneimine/nitric oxide adduct on wound repair: therapy versus toxicity / J.A. Bauer, W. Rao, D.J. Smith // *Wound Repair and Regeneration*. – 1998. – Vol. 6(6). – P. 569-577.
197. Qi, S. Ampelopsin reduces endotoxic inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathways / S. Qi, Y. Xin, Y. Guo, Y. Diao, X. Kou, L. Luo, Z. Yin // *International immunopharmacology*. – 2012. – Vol. 12(1). – P. 278-287.
198. Lawrence, T. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF- κ B / T. Lawrence, C. Fong // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2010. – Vol. 42(4). – P. 519-523.
199. Xie, Q. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase / Q. Xie, Y. Kashiwabara, C. Nathan // *Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269(7). – P. 4705-4708.
200. Muscará, M.N. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor / M.N. Muscará, W. McKnight, S. Asfaha, J.L. Wallace // *British Journal of Pharmacology*. – 2000. – Vol. 129(4). – P. 681-686.
201. Solovieva, A.B. Is it possible to combine photodynamic therapy and application of dinitrosyl iron complexes in the wound treatment? / A.B. Solovieva, A.F. Vanin, A.B. Shekhter, N.N. Glagolev, N.A. Aksenova, V.D. Mikoyan, S.L. Kotova et al. // *Nitric Oxide*. – 2019. – Vol. 83. – P. 24-32.