

На правах рукописи



Игрункова Александра Валерьевна

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

14.03.02 – Патологическая анатомия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Шехтер Анатолий Борухович

Официальные оппоненты:

Бабиченко Игорь Иванович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра патологической анатомии, заведующий кафедрой

Берченко Геннадий Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н. Н. Приорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделение патологической анатомии, заведующий отделением

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «16» мая 2022 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

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 [Nussbaum et al., 2018].

Оксид азота (NO) – газовая молекула, которая образуется в организме при участии NO-синтаз и обладает множеством функций, определяющих и регулирующих физиологические и патофизиологические процессы в организме [Carpenter and Schoenfisch 2012; Thomas et al., 2008].

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 [Malone - Povolny et al., 2019; Schäffer et al., 1997]. 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 [Kobayashi, 2010]. При достижении физиологических концентраций NO происходит снижение экспрессии провоспалительных белков [Thomas et al., 2008]. Посредством последовательной активации и ингибирования различных цитокинов (TGF- β 1, VEGF) и сигнальных путей, в фазу пролиферации оксид азота регулирует ангиогенез и пролиферацию фибробластов в гранулирующей ране [Ziche and Morbidelli, 2000; Schwentker et al., 2002; Gürdöl et al., 2010]. Достаточная концентрация оксида азота способствует синтезу коллагена, регуляции апоптоза при ремоделировании грануляционно-фиброзной ткани, пролиферации кератиноцитов [Shaw et al., 2009; Han et al., 2012]. Снижение концентраций NO приводит к нарушению описанных механизмов и замедлению заживления ран, поэтому применение экзогенного оксида азота является перспективным и активно изучаемым направлением терапии раневых процессов [Witte and Barbul 2002; Schulz and Stechmiller 2006; Shekhter et al., 2005; Shekhter et al., 2007; Shekhter et al., 2015].

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 [Fridman et al., 2008; Bernhardt et al., 2019; Kletschkus et al., 2020]. 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) [Шехтер и др., 1998; Pekshev et al., 2018; Shekhter et al., 2005; Shekhter et al., 2019]. Перечисленные аппараты обладают различными техническими характеристиками и обеспечивают специфические параметры воздействия. Однако, оптимальные параметры NO-терапии раневых процессов плазменными потоками не определены.

Также использование доноров NO является одним из перспективных и активно развивающихся направлений применения оксида азота, что обусловлено большим многообразием химических соединений, возможностью модифицировать их свойства и включать в состав тканеинженерных конструкций [Pinto et al., 2022; Dou et al., 2022]. Среди существующих доноров оксида азота выделяют экзогенные и эндогенные производные. Тем не менее, на сегодняшний день ни один из них не был зарегистрирован в качестве лекарственного средства для стимуляции заживления ран.

В многочисленных работах было продемонстрировано, что в экссудате ран больных сахарным диабетом уровень NO значительно ниже, чем у пациентов с нормальным уровнем глюкозы крови [Afzali et al., 2019; Malone-Povolny et al., 2019]. При гипергликемии нарушается хемотаксис и функциональная активность макрофагов, замедляется пролиферация и дифференцировка кератиноцитов. Снижение синтетической активности фибробластов проявляется низкой продуцирующей коллагена и формированием дефективного внеклеточного матрикса, который характеризуется слабой устойчивостью к внешним повреждениям [Schäffer et al., 1997; Witte and Barbul, 2002; Maloney et al., 2019]. Таким образом, поиск оптимальных способов доставки оксида азота в ткани, определение наиболее эффективных доз и параметров их применения являются актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

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

- 1) воздействие газовым потоком (производным плазмы), содержащим NO [Шехтер и др., 1998; Kong et al., 2009; Duchesne et al., 2019];
- 2) применение фармацевтических доноров оксида азота или модуляторов активности NO-синтаз [Pinto et al., 2022; Shekhter et al., 2015; Falconer et al., 2018];
- 3) использование физических индукторов (терагерцового излучения) эндогенного синтеза [Паршина и др., 2006; Киричук и др., 2011, Лукин и др., 2018].

Основными методами генерации холодной плазмы являются плазменная струя, коронный разряд, диэлектрический барьерный разряд и плазменные струи атмосферного

давления [Kong, 2008; Walsh and Kong et al., 2009]. Газовый поток остывающей плазмы состоит из многих активных компонентов, соотношением которых определяются ее свойства. Благоприятное влияние воздушной плазмы на ткани обусловлено бактерицидным действием перекиси водорода и многочисленными эффектами NO [Xu et al., 2015; Naertel et al., 2014; Gan et al., 2018]. В то же время, активные формы кислорода, которые присутствуют в качестве побочных продуктов потока, могут оказывать повреждающее действие посредством индукции окислительного стресса [Gan et al., 2018; Kletschkus et al., 2020]. Поэтому достижение оптимального состава плазмы является активно изучаемой проблемой, одним из направлений решения которой является разработка различных методов генерации. Аппарат Плазон продуцирует плазму методом диэлектрического барьерного разряда, а основной особенностью газового потока является значимое преобладание оксида азота над другими компонентами плазмы, что позволяет рассматривать его применение в NO-терапии [Шехтер и др., 1998; Shekhter et al., 2019; Shekhter et al., 2020; Butenko et al., 2020].

Использование экзогенных доноров NO является одним из наиболее перспективных и активно развивающихся направлений, что обусловлено большим многообразием химических соединений, возможностью модифицировать их свойства и включать в состав тканеинженерных конструкций [Shekhter et al., 2015; Zhou et al., 2017; Hasan et al., 2021]. Эндогенные доноры оксида азота представляют особый интерес, поскольку, помимо непосредственного выделения оксида азота в ткани, они играют роль сигнальных молекул в регуляции регенерации и метаболизма тканей [Cheng et al., 2019; Vanin, 2019; Vanin, 2021].

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) – относительно стабильные комплексы, обладающие собственной метаболической активностью, способные выступать в качестве «ловушки» свободных радикалов, регуляторов экспрессии генов, апоптоза и метаболизма железа [Vanin, 2019; Титов и др., 2017]. В физиологических условиях они образуются из эндогенного NO (причем для синтеза ДНКЖ достаточно низких концентраций, около 25 нМ/мл) и являются самыми значительными по объему внутриклеточными NO-производными. Интеграция NO в ДНКЖ защищает его от окисления, обеспечивает транспорт и взаимодействие с различными мишенями [Vanin, 2020]. В отличие от другого эндогенного донора, S-нитрозотиола, они способны самопроизвольно выделять оксид азота, что позволяет их применять в NO-терапии [Seth, et al., 2018; Vanin, 2020].

Физическим индуктором оксида азота является также терагерцовое излучение на частоте 150,176-150,664 ГГц [Лукин и др., 2018]. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о возможности использования данного вида излучения для коррекции нарушений газового и электролитного состава крови, коагуляционных нарушений при различных заболеваниях [Паршина и др., 2006; Киричук и др., 2011; Лукин и др., 2018]. Однако

данное направление изучается узким кругом специалистов, и пока отсутствуют свидетельства о стимуляции раневого заживления с помощью терагерцового излучения.

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

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 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 первой недели раневого заживления в условиях нормогликемии и гипергликемии NO-СГП и ДНКЖ увеличивают экспрессию виментина в клетках раневого ложа, активность регуляторного белка NF-κB 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

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 была 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. В работе применялись известные морфологические и иммуногистохимические методы исследования с использованием сертифицированного научного оборудования, наборов антител и реактивов, проводилось строгое следование исследовательским методикам. Анализ результатов проведен с применением современных методов количественной статистики и с применением стандартного, сертифицированного пакета программы GraphPad Prism, версия 8.00 для Windows (GraphPad Software, Inc). Достоверность первичной документации и личного участия Игрунковой А.В. в проведении исследования отражена в Акте проверки первичной документации №370/Р от 14 декабря 2021.

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).

Личный вклад автора

Научные результаты, обобщенные в научной работе, получены Игрунковой А.В. самостоятельно в ходе работы в Институте регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Автором проводилась 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, участвовала в разработке нового лекарственного средства – спрея с ДНКЖ. Автором была проведена статистическая обработка полученных данных, интерпретация и анализ результатов комплекса морфологических исследований. Результаты проведенного исследования были представлены в 9 публикациях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 – патологическая анатомия, а также области исследования согласно пунктам: 2 – «Прижизненная диагностика и прогнозная оценка болезней на основе исследований биопсийных материалов, научный анализ патологического процесса, лежащего в основе заболевания», 3 – «Исследование патогенетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ патогенетической терапии».

Публикации результатов 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 исследования

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

NO-содержащий газовый поток

В исследованиях использовался серийный образец аппарата Плазон заводской номер 450, произведенный компанией Center BMSTU, LLC, Moscow, Russia в январе 2019 года и снабженный экспериментальным манипулятором. Аппарат разработан сотрудниками МГТУ им. Н.Э. Баумана А.В. Пекшевым и А.Б. Вагаповым. NO-содержащий газовый поток характеризуется следующими осевыми параметрами в области воздействия на ткань, при обдувании с расстояния 80 мм: 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 [Shekhter et al., 2020].

Спреи с ДНКЖ

ДНКЖ с глутатионовым лигандом получали в реакции Fe^{2+} с глутатионом и газообразным NO при давлении 150 мм рт. ст. и молярном соотношении Fe^{2+} : GSH 1: 3 в аппарате Тунберга, как описано в [Vanin et al., 2010].

Лиофилизированный порошок ДНКЖ с глутатионом растворяли 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 Beixuan 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 30 мм и окрашенные спреи с ДНКЖ, были определены оптимальное расстояние и угол для распыления всей дозы на область раны [Igrunkova et al., 2022].

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 195 мм, имплантировали в образовавшийся дефект, после чего наружный диаметр кольца закрывали перфорированной полиэтиленовой пленкой для предотвращения высыхания, внешнего загрязнения и сокращения раны. Раны у всех животных были сделаны со стандартной площадью размером 3 см².

Экспериментальная работа включала в себя 2 основных направления: определение эффектов воздействия NO-содержащих газовых потоков и ДНКЖ с глутатионовым лигандом на раневое заживление в условиях нормогликемии и в условиях сахарного диабета, индуцированного стрептозотоцином. В качестве первого шага, с целью определения

оптимальных параметров NO-терапии для стимуляции регенерации, были проведены пилотные эксперименты с использованием 3-х режимов NO-содержащего газового потока и 3-х доз ДНКЖ с контрольной точкой 4 суток после нанесения ран. В каждом из пилотных экспериментов было использовано 24 животных, которые были поровну распределены на 4 группы: 3 экспериментальные и 1 контрольная (поток теплого воздуха в эксперименте по определению оптимальных параметров NO-СГП; вода в эксперименте по определению оптимальной дозы ДНКЖ).

Обработка кожных ран

На 1-й, 2-й и 3-й 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 ежедневно, 1 раз в сутки проводили лечение ран методами NO-терапии.

В пилотном эксперименте с NO-содержащими газовыми потоками (NO-СГП), определяли оптимальную длительность воздействия при постоянных параметрах газового потока. 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. После проведения указанных манипуляций, раны снова закрывали перфорированной полиэтиленовой пленкой.

В серии экспериментов с ДНКЖ в контрольной группе на дно ран распыляли дистиллированную воду, в экспериментальных группах - 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.

На следующем этапе работы, 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, NO – 80 мг/см²), контрольная 2 (вода) и экспериментальная 2 (ДНКЖ, в дозе 16,6 мкг/см²). Во второй группе было 3 подгруппы, контрольная (без лечения), экспериментальная 1 (NO-СГП, NO – 80 мг/см²) и экспериментальная 2 (ДНКЖ, в дозе 16,6 мкг/см²). Контрольные точки были определены как 4, 7, 14, 21 сутки. Каждая из указанных подгрупп включала 5 животных на каждый экспериментальный срок.

Общее количество животных, использованных в экспериментальной работе, составило 223 особи (по 24 в каждом пилотном эксперименте, 100 в эксперименте по сравнительной оценке эффектов NO-СГП и ДНКЖ на раневое заживление в условиях нормогликемии и 75 в эксперименте по определению эффектов NO-СГП и ДНКЖ на раневое заживление при сахарном диабете).

План эксперимента наглядно представлен на рисунке 1.

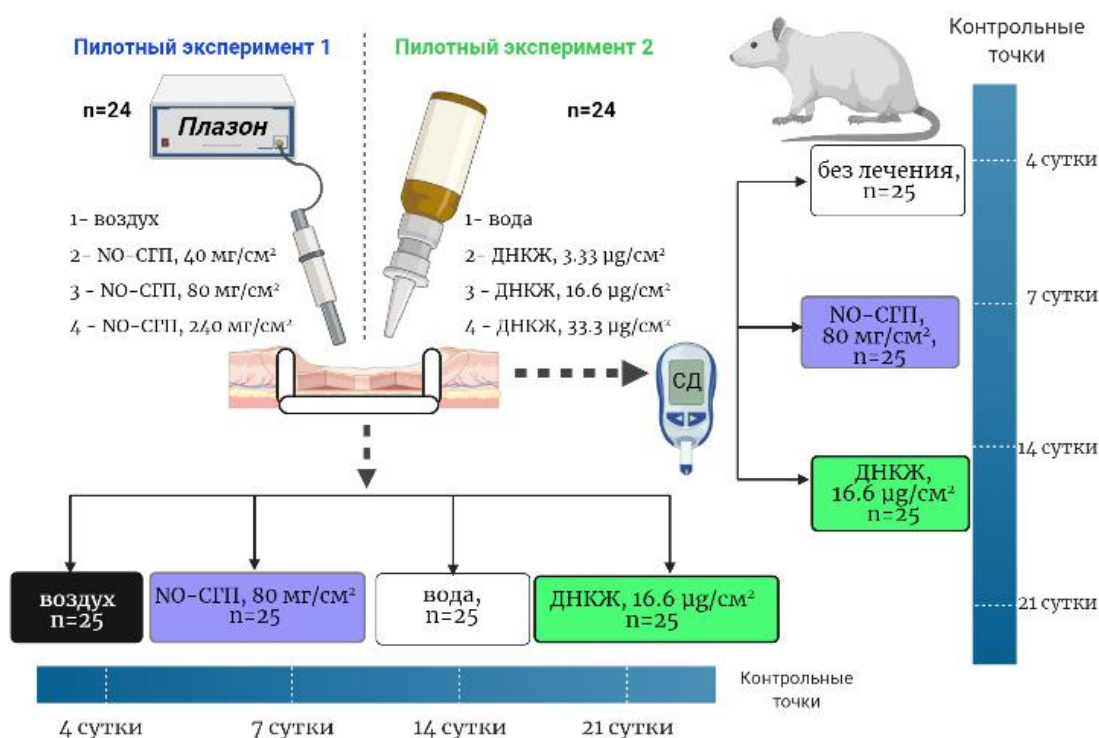


Рисунок 1 – Схема экспериментальной работы (создано с помощью BioRender.com.)

Моделирование стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета

Порошок стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в расчете 0,006 г на 100 г животного 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 0,5 г дигидрата тринатриевой соли, растворенные в 20 мл дистиллированной воды). pH получившегося раствора проверяли pH-метром (HI 2210-02, Hanna Instruments, Италия).

Свежеприготовленный раствор стрептозотоцина вводили животным интраперитонеально. Перед инъекцией животные находились в состоянии голодания в течение 24 ч. Перед введением стрептозотоцина всем крысам проводили анестезию путем

внутримышечной инъекции раствора ZOLETIL 100 (VIRBAC, Франция) в дозе 4 мг активного ингредиента на 1 кг массы тела животного [Байрашева и др., 2015; Blinova et al., 2021]. 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.

Оценка раневого заживления

На 7-е, 14-е, 21-е сутки от начала эксперимента раны животных, обводили по контуру перманентным маркером на плотной полиэтиленовой пленке. Далее области ран фотографировали на цифровую фотокамеру, используя стандартную линейку в качестве масштабного объекта. Измерение площади ран проводилось в микрометрах с использованием программы Leica Application Suite, version 4.9.0 (Build 129) (Швейцария), полученные значения пересчитывались в см² с использованием линейного масштабного отрезка.

В исследовании проводился анализ мазков-отпечатков дна ран, полученных на 3-и и 4-е сутки после операции и окрашенных по Романовскому-Гимза., На 4-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки раневого заживления методом полуколичественного балльного анализа по 5-бальной системе (отсутствие признака, слабая, средняя, высокая и наивысшая выраженность признака) оценивали гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, пикросириусом красным, толудиновым синим и по Маллори («БиоВитрум», Россия), а также изученные с помощью фазово-контрастной и поляризационной микроскопии. В частности, оценивали выраженность признаков воспаления (экссудация, бактериальная контаминация, инфильтрация, нарушения микроциркуляции) и регенерации (неоангиогенез, пролиферация фибробластов, объем и зрелость грануляционной ткани). Кроме того, определяли функциональную активность тучных клеток по методу [Линднер, 1980]. Начиная с 7-х суток определяли выраженность фиброобразования грануляционной ткани, используя описанную выше шкалу. Образцы тканей ран животных из группы 1 (нормогликемия), иссеченные на 4-е, 7-е, 14-е сутки, изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

При иммуногистохимическом исследовании (ИГХ) использовали набор антител к виментину (маркер клеток мезенхимального происхождения), α -гладкомышечному актину (α -SMA) (маркер миофибробластов), индуцибельной синтазе NO (iNOS) (фермент, участвующий в синтезе оксида азота в ране), нуклеарному фактору- κ B (NF- κ B) (белок, регулирующий воспаление и регенерацию) с последующим контрастированием диаминобензидином. Результаты оценивали в 5 полях зрения каждого препарата на увеличении $\times 400$ по формуле:

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

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

Интенсивность метки (ИМ) оценивали полуколичественным методом: при негативной («0» - нет реакции), слабопозитивной («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-κB проводилась отдельно в макрофагах и фибробластах. Поскольку роль NF-κB зависит от локализации этого маркера в клетке [Shi et al., 2018], активность этого маркера (A) рассчитывали по формуле (2):

$$A = X1/X2, \quad (2)$$

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

Для оценки содержания виментина и α-SMA в клетках животных всех контрольных и экспериментальных групп, проводилась сегментация положительно окрашенных клеток на изображениях участков грануляционной ткани ран, сделанных при 400-кратном увеличении. Для этого применяли программу ilastik (версия 1.3.3), использующую машинное обучение, в которой проводили ручную маркировку клеток по следующим классам: положительно окрашенные клетки (клетки, содержащие в ядре и/или цитоплазме коричневые гранулы), другие (клетки, окрашенные гематоксилином и эозином) и «фон» (в основном, белые пиксели или межклеточный матрикс).

Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием стандартного пакета программы GraphPad Prism, версия 8.00 для Windows (GraphPad Software, Inc). Для определения распределения данных использовался тест Шапиро-Уилка. 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 ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На модели полнослойной кожной раны в условиях нормогликемии была определена оптимальная массовая доза оксида азота в газовом потоке, генерируемом аппаратом Плазон. Газовый поток, использовавшийся в настоящем эксперименте, имел стандартные характеристики: температура 39 °C, 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. При фиксированном расстоянии до поверхности раны 80 мм время обдувания было вариативным

параметром. Изменение времени воздействия, таким образом, определяло массовую дозу оксида азота в потоке. В ходе краткосрочного эксперимента (с оценкой заживления ран в течение первых 4 суток после нанесения экспериментального повреждения) был продемонстрирован дозозависимый эффект на рост грануляционной ткани. При содержании NO в потоке выше 40 мг/см² наблюдалось снижение выраженности воспаления по сравнению с контролем ($p < 0.05$), при дозе 80 мг/см² отмечалось интенсивное нарастание объема грануляционной ткани, которое резко снижалось при дозе NO 240 мг/см². Таким образом, массовая доза оксида азота 80 мг/см² была определена как оптимальная для стимуляции раневого заживления.

Впервые был разработан спрей с донором оксида азота – ДНКЖ, и изучены особенности регенерации ран при воздействии различными дозами 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. Средний коэффициент овальности для полученного спрея составлял $1,03 \pm 0,05$; он не различался между растворами ДНКЖ разной концентрации, что доказывает способность спреев к равномерному распылению. Дозировка ДНКЖ в единичном распыляемом объеме была стабильной и составляла в среднем $0,1 \pm 0,043$ мкг.

В ходе пилотных экспериментов при морфологическом исследовании мы продемонстрировали, что применение ДНКЖ резко ускоряет пролиферацию фибробластов, рост грануляционной ткани, а также оказывает дозозависимый эффект на снижение воспаления и нарастание зрелости грануляционной ткани. Таким образом, впервые было показано, что доза ДНКЖ 16,6 мкг/см² является оптимальной для стимуляции раневого заживления.

При **макроскопическом изучении** в долгосрочном эксперименте в условиях нормогликемии было показано, что терапия оксидом азота как при использовании Плазона, так и ДНКЖ, снижает интенсивность экссудации в ранах на 4-е сутки после операции. К 7-м суткам наименьшая площадь ран была в группах, в которых применяли Плазон и ДНКЖ. Она была достоверно ниже, чем в группе, в которой раны обрабатывали водой ($p < 0,001$, $p < 0,01$, соответственно) или воздухом ($p < 0,01$). При этом на 21-е сутки в группе, в которой применяли NO-СГП, полная эпителизация наблюдалась у 5 из 6 животных, в то время как в экспериментальной группе 2 (ДНКЖ) и контрольной группе 1 (воздух) она выявлялась только в 2 случаях, а в контрольной группе 2 (вода) отсутствовала.

У животных с экспериментальным сахарным диабетом на 4-е сутки раневого заживления в группах, в которых применяли NO-терапию, дно ран было чистым, в отличие от группы контроля, где раны большинства животных были покрыты заметным слоем рыхлого фибрина и экссудата. Статистически значимое уменьшение площади дефектов в экспериментальных

группах по сравнению с животными контрольной группы, у которых раны заживали самостоятельно, наблюдалось только на 14-е сутки после операции. NO-терапия способствовала сокращению размеров ран в среднем более, чем на 25% по сравнению с ранами, оставленными без специфического лечения ($p < 0.01$).

При цитологическом анализе мазков, сделанных у животных с нормогликемией на 3-и сутки после операции, наименьшее количество нейтрофилов наблюдалось в группе, где раны обдували NO. В среднем оно было на 64% меньше, чем в группе, в которой раны обрабатывали водой. На 4-й день не отмечалось значительного изменения числа нейтрофилов, их было значительно меньше в экспериментальной группе 1 (NO-СГП), чем в группах, которых раны орошали раствором ДНКЖ и водой ($p < 0,001$).

При анализе мазков ран животных с сахарным диабетом на 3-и и 4-е сутки максимальное число нейтрофилов наблюдалось в группе, в которой животные не получали лечения. Количество полиморфноядерных лейкоцитов в этой группе в среднем было на 24% выше, чем в группе, где раны обдували NO-СГП ($p < 0,001$). На 4-е сутки разница между данными группами составляла уже 30% ($p < 0,001$). 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.

При гистологическом исследовании ран, заживающих в условиях нормогликемии, на всех сроках наблюдения интенсивность воспаления была максимальной в группе, где раны орошали водой. В группе, где применяли аппарат Плазон, признаки воспаления прогрессивно снижались, а выраженность признаков регенерации (пролиферация фибробластов, неоангиогенез, объем и зрелость грануляционной ткани) и фиброзирования, а также толщина слоя грануляционной ткани статистически значимо нарастали, начиная с 7-го дня после операции по сравнению с контролем.

Применение спрея с ДНКЖ слабо влияло на воспалительные изменения в тканях, что согласуется с данными, полученными при анализе мазков. Тем не менее, использование ДНКЖ способствовало резкому нарастанию 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 этой ткани и фиброзирование происходили менее активно, чем в экспериментальной группе 1 (Плазон).

В результате данного эксперимента было показано, что использование ДНКЖ уменьшает выраженность воспалительных изменений и стимулирует рост и созревание грануляционной ткани на сроке 4 суток, однако применение NO-СГП является более предпочтительным способом терапии оксидом азота, поскольку оказывает выраженные про-

регенеративные и противовоспалительные эффекты на всех сроках раневого заживления. Поэтому был сделан вывод о необходимости пролонгации курса применения ДНКЖ для стимуляции раневого заживления.

Биохимический анализ крови животных с сахарным диабетом. Согласно данным литературы у крыс с сахарным диабетом значения глюкозы крови превышают 8,3 ммоль/л [Furman et al., 2021]. В текущем эксперименте на следующий день после индуцирования сахарного диабета концентрация глюкозы в крови животных составляла $16,6 \pm 2,6$ ммоль/л. При рутинных измерениях уровня глюкозы в капиллярной крови животных с интервалом 2 суток в течение всего периода наблюдения данный показатель варьировал от 9,5 до 21 ммоль/л.

При гистологическом исследовании ран в условиях сахарного диабета оба способа применения оксида азота продемонстрировали благоприятное влияние на созревание грануляционной ткани (ангиогенез, пролиферация фибробластов, объем и зрелость грануляционной ткани). На 4-е сутки процессы регенерации протекали значительно активнее в экспериментальной группе 1 (NO-СГП), чем в группе контроля ($p < 0,0001$). При этом наибольший объем грануляционной ткани определялся в экспериментальной группе 2 (ДНКЖ), этот слой был в среднем в 4,8 раза толще, чем в группе, в которой раны были оставлены без лечения ($p = 0,056$). На 7-е сутки применение NO-терапии способствовало статистически значимому уменьшению интенсивности воспалительной реакции (отека, фибринозной экссудации, нейтрофильной инфильтрации, сладжа эритроцитов), а также значительно ускорило 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 фиброзирования в среднем 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). 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 ($p < 0,0001$). В этих группах признаки регенерации более, чем в 1,5 раза выше, у животных без специфического лечения ($p < 0,0001$). Самый высокий показатель фиброзирования наблюдался в группе, в которой использовали аппарат Плазон; он был на 30% выше, чем в контроле ($p < 0,05$).

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

С помощью **трансмиссионной электронной микроскопии** было показано, что при лечении экзогенным оксидом азота, в ранах животных с нормогликемией уже на 4-е сутки

появляются макрофаги, фибробласты имеют расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, а в межклеточном веществе, помимо разрушенных волокон коллагена, выявляются скопления гликозаминогликанов. На 7-е сутки среди них определяются тонкие поперечно-исчерченные фибриллы коллагена, что свидетельствует об активном коллагеногенезе фибробластами (Рисунок 2).

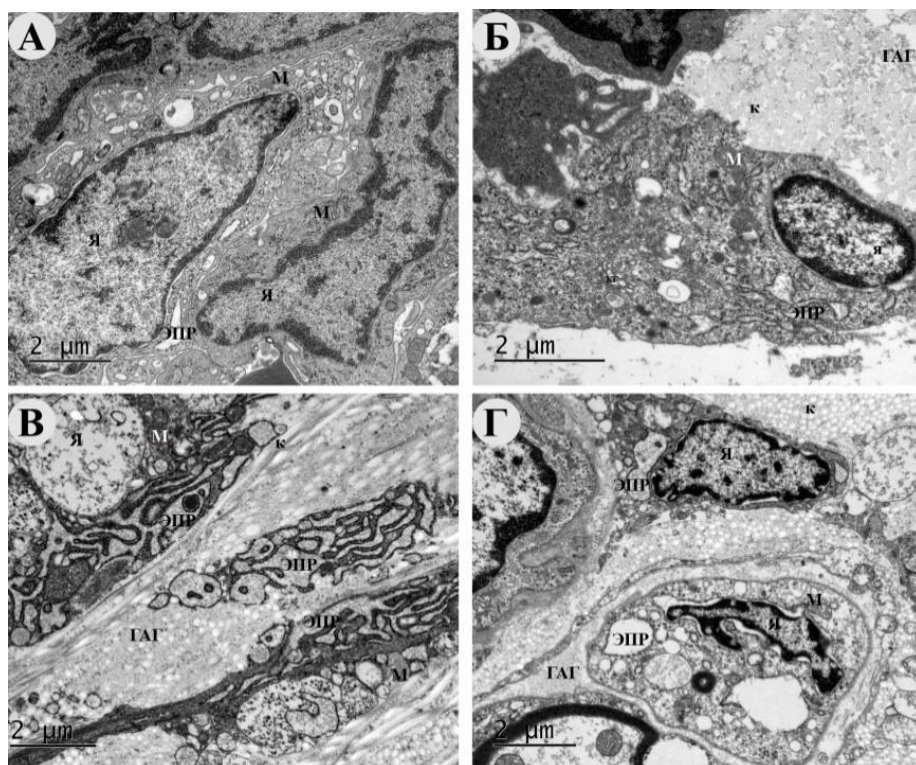


Рисунок 2 – Трансмиссионная электронная микроскопия дна ран животных контрольных (воздух (А), вода (Б)) и экспериментальных групп (Плазон (В), ДНКЖ (Г)) на 7-е сутки. Увеличение $\times 15000$. Я – ядро, М – митохондрия, ГАГ – гликозамингликаны, к – коллаген

Иммуногистохимическое исследование с антителами к виментину показало, что NO-терапия способствует ускорению стадии пролиферации за счет увеличения виментин-положительных клеток в течение первой недели раневого заживления в условиях нормогликемии и сахарного диабета по сравнению с группами контроля. В то же время использование обоих методов экспериментальной терапии в условиях нормогликемии, а также NO-СГП в условиях гипергликемии приводило к уменьшению площади виментин-положительных клеток, начиная с 14-х суток после операции, что ассоциировано со снижением риска заживления с образованием рубцовой ткани [Yan et al., 2010].

При оценке реакции с антителами к маркеру миофибробластов – α -SMA было показано, что 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 [Tomasek et al., 2002], 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.

На более поздних сроках (21-е сутки) в контрольных группах число α -SMA-положительных клеток и индекс экспрессии данного маркера продолжали нарастать, а в экспериментальных прогрессивно снижаться. Известно, что при нормальных условиях на поздних сроках раневого заживления количество миофибробластов сильно снижается за счет апоптоза, что предотвращает чрезмерное сокращение краев раны и образование рубцов [Chitturi et al., 2015]. 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.

У животных с сахарным диабетом в течение эксперимента индекс экспрессии α -SMA был примерно одинаковым во всех опытных группах. Тем не менее, на 21-е сутки площадь α -SMA-положительных клеток значительно уменьшалась в группе, в которой раны обрабатывали раствором ДНКЖ. Поскольку у животных с нормогликемией применение этого донора оксида азота также способствовало более выраженному снижению индекса экспрессии и уменьшению количества клеток, реагирующих с антителами к α -SMA на этом сроке, чем использование NO-СГП, можно предположить, что применение ДНКЖ будет эффективно снижать риск образования 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 NF- κ B 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.

Продукты окисления оксида азота, в частности избыток нитрит-анионов, в условиях ацидоза активирует регуляторную систему метаболизма оксида азота и синтез его эндогенного донора – ДНКЖ [Vanin, 2019]. Интересно, что в нашем исследовании статистически значимое увеличение 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 выраженностью воспаления в этих группах не выявлялось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного диссертационного исследования

В результате морфологического исследования было показано, что применение NO-терапии (NO-содержащий газовый поток и динитрозильные комплексы железа) способствует более быстрому очищению ран и снижению выраженности признаков воспаления, ускоряет рост грануляционной ткани, рубцевание, сокращение площади ран и эпителизацию. Для достижения этих эффектов важно использовать оптимальные параметры воздействия экзогенным оксидом азота, которые зависят от способа терапии. Для лечения 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 улучшить результаты использования данного аппарата для лечения раневых процессов. Разработана новая, простая в получении и использовании лекарственная форма ДНКЖ для местного применения в виде спрея. Настоящее исследование показало, что оптимальная доза ДНКЖ в спрее для стимуляции раневого заживления составляет 16,6 µг/см². В долгосрочном эксперименте показано, что NO-СГП эффективнее ускоряет раневое заживление, чем донор оксида азота ДНКЖ. Тем не менее увеличение длительности курса лечения ДНКЖ может повысить эффективность лечения раневых процессов, поскольку на ранних сроках данный метод NO-терапии оказывал выраженное стимулирующее действие на рост и созревание грануляционной ткани на ранних сроках раневого заживления (4 сутки).

Перспективы дальнейшей разработки темы

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. Также было показано, что концентрация ДНКЖ в растворе снижается за 2,5 часа почти в 2 раза. Таким образом, разработка более стабильной формы ДНКЖ является перспективным направлением дальнейших исследований.

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 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 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, в том числе при сахарном диабете, 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 в потоке находится на уровне ~2.3 мг/с, двуокиси азота ~0.2 мг/с.

2. Разработанный спрей с ДНКЖ является удобным способом местной NO-терапии ран при отсутствии аппарата Плазон. Для стимуляции раневого заживления раствором ДНКЖ оптимальная доза активного вещества составляет 16,6 мкг/см².

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Бутенко, А.В.** Зависит ли эффективность оксида азота от способа его доставки? / А.В. Бутенко, А.В. Пекшев, А.Ф. Ванин, и др. // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Медицинская Весна». Москва, – 2019. – С.405
2. **Butenko, A.V.** The application of gaseous nitric oxide and nitric oxide donors for wound healing / A.V. Butenko, A.V. Pekshev, A.F. Vanin, et al. // TERMIS European Chapter Meeting 2019. Tissue Engineering Therapies: From Concept to Clinical Translation & Commercialisation. Rodos, 27-31 May 2019. – P.1399
3. **Бутенко, А.В.** Различные способы доставки оксида азота для стимуляции раневого заживления / А.В. Бутенко, А.В., Пекшев А.Ф. Ванин., и др. // Гены и клетки №4, Приложение «Сборник материалов IV Национального конгресса по регенеративной медицине». Москва, 20–23 Ноября 2019 г. – С.45
4. Shekhter, A. B. Dose-dependent effect of plasma-chemical NO-containing gas flow on wound healing / A. B. Shekhter, A. V. Pekshev, A.B. Vagapov, **A. V. Butenko**, et al. // An experimental study. **Clinical Plasma Medicine**. – 2020. – 19. – С. 100101. [Scopus].
5. **Butenko, A.** Review of clinical applications of nitric oxide-containing air-plasma gas flow generated by Plason device / A. Butenko, A. Shekhter, A. Pekshev, et al. // **Clinical Plasma Medicine**. – 2020. – С. 100112. [Scopus].
6. **Butenko, A.V.** NO-containing gas flow accelerates wound healing by 7 days. / A.V. Butenko, A.B. Shekhter, A.L. Fayzullin, et al. // Pan pacific connective tissue societies symposium 2020. Melbourne, 24-26 November 2020. – P.354
7. Blinova, E. Cerium-Containing N-Acetyl-6-Aminohexanoic Acid Formulation Accelerates Wound Reparation in Diabetic Animals / D. Pakhomov, D. Shimanovsky, M. Kilmyashkina, Y. Mazov, T. Demura, V. Drozdov, D. Blinov, O. Deryabina, E. Samishina, **A. Butenko**, S. Skachilova, A.

- Sokolov, O. Vasilkina, B. A. Alkhatatneh, O. Vavilova, A. Sukhov, D. Shmatok, I. Sorokvasha, O. Tumutolova, E. Lobanova, et al // **Biomolecules**. – 2021. – Т. 11. – №. 6. – С. 834. [**Scopus, PubMed**].
8. **Butenko, A.** Aerosol form of dinitrosyl iron complexes accelerates wound healing / A. Butenko, A. Fayzullin, S. Churbanov, et al. // Termis 6th World Congress. Maasricht, 15-19 November 2021. – P.1495
9. **Igrunkova, A.** Spray with Nitric Oxide Donor Accelerates Wound Healing: Potential off-the-Shelf Solution for Therapy? / A. Igrunkova, A. Fayzullin, S. Churbanov et al. // **Drug Design, Development and Therapy**. – 2022. – 16. – P. 349-362 [**Scopus, PubMed**].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

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

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

NO – оксид азота

NO-СГП – оксид азота-содержащий газовый поток

NF- κ B – нуклеарный фактор κ B

TGF- β трансформирующий фактор роста β

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов