

**Артемова Екатерина Викторовна**

**НЕЙРОГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕПАРАЦИИ РАН У ПАЦИЕНТОВ С  
САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

3.1.19. Эндокринология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Москва – 2024 г.**

Работа выполнена в Государственном научном центре Российской Федерации Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

**Галстян Гагик Радикович** - доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, заведующий отделением диабетической стопы ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России

**Официальные оппоненты:**

**Комелягина Елена Юрьевна** - доктор медицинских наук, заведующая отделением «Диабетическая стопа» ГБУ здравоохранения города Москвы «Эндокринологический диспансер Департамента здравоохранения города Москвы»

**Антонова Ксения Валентиновна** - доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2024 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.045.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России) по адресу: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д.11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России [www.endocrincentr.ru](http://www.endocrincentr.ru).

Автореферат разослан «\_\_»\_\_\_\_\_2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук  
Мазурина Наталия Валентиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность научной проблемы

Развитие осложнений сахарного диабета (СД) приводит к значимым социально-экономическим потерям. Диабетическая полинейропатия является одним из наиболее распространенных поздних осложнений сахарного диабета, а также главной причиной формирования язвенных дефектов стоп (Gordois A. et al. 2003). Как известно, кожа является важнейшим барьером, защищающим внутреннюю среду организма от агрессивных воздействий «внешней среды». Интраэпидермальные и дермальные нервы находятся в тесном взаимодействии с большинством клеточных структур, включая иммунокомпетентные клетки Лангерганса, тучные клетки, кератиноциты, клетки Меркеля, эндотелиальные клетки, фибробласты, волосяные фолликулы, потовые и сальные железы. Классические теории патогенеза хронических нейропатических ран у пациентов с сахарным диабетом рассматривают такие механизмы как снижение чувствительности вследствие сенсорной нейропатии, деформация стопы, обусловленная моторной нейропатией, сухость кожи и нарушение кровообращения в системе артериовенозных шунтов. Патологические процессы, приводящие к нарушению процессов дифференцировки, пролиферативной активности и миграции кератиноцитов при сахарном диабете остаются неизученными. Описанные в литературе аспекты не объясняют молекулярно-клеточные механизмы нарушения репарации тканей и не позволяют разработать таргетную терапию хронических раневых дефектов. Существующие же методы терапии факторами роста (эпидермальный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста) (Kim H. S., Yoo H. S., 2013) и прогениторными мезенхимальными клетками являются высокочувствительными, а клиническая эффективность и безопасность не доказана (Ojeh N. et al. 2015). Опираясь на данные фундаментальных исследований, закономерно будет предположить, что повреждение периферической нервной системы влияет на успешный регенеративный процесс.

**Цель исследования** - изучение влияния нарушений периферической иннервации (катехоламинергической и холинергической систем) на регуляцию миграции, пролиферации и дифференцировки кератиноцитов у пациентов с нейропатической формой синдрома диабетической стопы; в стрептозотоциновой модели сахарного диабета у лабораторных животных.

### Задачи:

- I. Исследование гистоморфологических характеристик хронических ран при нейропатической форме синдрома диабетической стопы до и после начала лечения.
  1. Оценить морфологический статус края нейропатической раны и края пролежня с помощью окраски гематоксилин-эозином.
  2. Оценить плотность рецепторов к катехоламинергическим и холинергическим медиаторам ( $\beta$ 2-AR,  $\alpha$ 7nAChR) в кератиноцитах различных слоев эпидермиса с помощью иммуногистохимического окрашивания биоптатов кожи и электронной микроскопии.
  3. Оценить пролиферативный потенциал кератиноцитов (Ki-67) и их способность к дифференцировке (цитокератин 10) и изменению фенотипа на миграционный (цитокератин 17) на разных стадиях раневого процесса на фоне лечения.
  4. Оценить наличие не-нейрональной холинергической и катехоламинергической системы в кератиноцитах края ран.
- II. Исследование нарушения периферической иннервации и динамики репаративных процессов в мягких тканях на стрептозотоциновой модели сахарного диабета у крыс.
  1. Оценить степень тяжести диабет-индуцированной нейропатии в ходе оценки состояния С-волокон (чувствительность к болевым и температурным раздражителям).
  2. Оценить скорость заживления раневого дефекта у крыс с диабетом в сравнении с группой контроля.

3. Оценить морфологический статус края раны с помощью окраски гематоксилин-эозином на 8, 16, 24 сутки.
4. Оценить плотность рецепторов к катехоламинергическим медиаторам ( $\beta$ 2-AR), а также маркеров пролиферации (Ki-67) в кератиноцитах с помощью иммуногистохимического окрашивания биоптатов кожи и электронной микроскопии на 8, 16, 24 сутки.

### **Научная новизна**

В настоящее время в мире проводятся разрозненные исследования по отдельным звеньям патогенеза хронических ран, исследования выполняются в разных лабораториях и практически не связаны единой концепцией, лишь незначительное число работ посвящено изучению патогенеза хронических ран и особенностям репарации тканей при сахарном диабете. Большинство работ носят экспериментальный характер, что не позволяет экстраполировать данные исследований на клиническую практику. Проведенная работа, базируясь на результатах проведенных ранее клинических исследований является актуальной и рассматривает механизмы нарушения нервной и гуморальной регуляции процесса эпителизации у больных сахарным диабетом.

### **Практическая значимость**

В ходе проведенной работы отработана методика забора и маркировки тканей для дальнейшего гистологического исследования. Ответ на поставленные задачи может позволить разработать персонализированный алгоритм терапевтического воздействия по результатам иммуногистохимического типирования образцов ран. Понимание патологических процессов, лежащих в основе формирования хронических нейропатических ран позволит создать необходимую научную базу для поиска и создания новых мишеней для фармакотерапии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Несмотря на соблюдение стандартов лечения, в том числе в стационарных условиях, нейропатические раны имеют низкие темпы заживления и зачастую можно отметить избыточный рост грануляционной ткани наряду с замедлением эпителизации. Формируется патологически утолщенный эпидермис (гипер- и паракератоз), что свидетельствует о нарушении нормального процесса ороговения и наличия патологических изменений клеточного цикла.
2. Все слои эпидермиса края нейропатической раны пролиферируют на разных стадиях раневого процесса, что приводит к патологическому утолщению эпидермиса. Увеличение экспрессии рецепторов  $\alpha$ 7nAChR на фоне сокращения раневых дефектов в размере свидетельствует о низком миграционном потенциале кератиноцитов края нейропатических ран.
3. Показано, что кератиноциты имеют необходимые ферменты для синтеза ацетилхолина, который, в свою очередь, связываясь с М и N-холинорецепторами, регулирует миграцию, дифференцировку, пролиферацию и апоптоз клеток. Так наряду с дефицитом нервных регуляторных влияний (тяжелая нейропатия), отмечается дефицит ацетилхолина в кератиноцитах края нейропатических ран, потенциально необходимого для запуска процессов изменения клеточного цикла клеток кожи.
4. В образцах кожи пациентов с длительно существующими нейропатическими ранами отсутствует инфильтрация воспалительными клетками, по сравнению с образцами контроля, что, может свидетельствовать о «супрессивном» местном иммунном статусе.

### **Апробация результатов**

Работа выполнена на базе отделения Диабетической стопы (зав. отделением, д.м.н. Галстян Г.Р.) ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (директор - д.м.н., профессор, член-корр. РАН Мокрышева Н.Г.). Официальная апробация диссертационной работы состоялась на расширенном межинститутском заседании ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ Эндокринологии» Минздрава России 19 декабря 2023 г. Основные положения диссертации были представлены на национальных и международных специализированных медицинских конференциях и конгрессах: 54th EASD Annual Meeting 2018 Berlin, III

Всероссийский эндокринологический конгресс с международным участием: "Инновационные технологии в эндокринологии" (2017 г.) DFSG 2017 Porto, EWMA 2018 Krakow, III Всероссийская конференция «Сахарный диабет, его осложнения и хирургические инфекции». По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 1 монография, 2 входят в перечень рецензируемых научных журналов, рекомендуемых для опубликования результатов диссертационной работы.

### **Личный вклад автора**

Автор лично провел анализ состояния научной проблемы в мире на основании литературных данных, сформулировал цель, задачи и дизайн диссертационной работы.

Автор принимал непосредственное участие в сборе клиничко-anamnestических данных, подготовил базу данных пациентов, самостоятельно проводил диагностику дистальной полинейропатии и конфокальную микроскопию роговицы, осуществлял забор тканей для дальнейшего гистологического и иммуногистохимического исследования, проводил оценку динамики ран, участвовал в процессе лечения (обработки раневых дефектов и изготовление индивидуальных разгрузочных повязок Total Contact Cast), провел статистическую обработку и интерпретировал полученные результаты, оформил их в виде публикаций и научных докладов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 101 странице машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиография включает 89 источника литературы (из них 7 отечественные и 82 зарубежных). Работа иллюстрирована 4 таблицами и 27 рисунками.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Дизайн исследования**

Работа состоит из двух исследований, представленных в соответствующих разделах глав и включающих пациентов с периферической нефропатией и хроническими раневыми дефектами и экспериментальной части со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом у крыс.

I исследование включает:

- Основную группу - пациентов с нейропатической формой СДС, у которых проведена прижизненная оценка клеточного состава роговицы; оценка морфологического статуса, пролиферативной активности и способности к миграции кератиноцитов околораневой зоны на разных стадиях раневого процесса.
- Группу сравнения 1 – люди без СД, которым проведена прижизненная оценка клеточного состава роговицы;
- Группу сравнения 2 - пациенты без СД, которым проведена оценка морфологического и иммуногистохимического состояния участка пролежня.

Пациенты основной группы проходили обследование и лечение в ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (директор – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН Мокрышева Н. Г.) в период 2017-2018 гг. в отделениях Диабетической стопы (зав. отделением, д.м.н. Галстян Г.Р.) или обращались за медицинской консультацией в консультативно-диагностический центр (руководитель – д.м.н., профессор Волеводз Н. Н.). Группа сравнения 1 - лица без СД.

Набор пациентов группы сравнения 2 исследования I проводился в городских больницах г. Москвы и Московской области согласно критериям включения в 2018 г.

I исследование проведено в дизайне многоцентрового наблюдательного неослепленного динамического (для основной группы) и поперечного (для группы сравнения) сравнительного сплошного нерандомизированного исследования.

**Критерии включения для основной группы:**

- ✓ подписанное информированное согласие на участие в исследовании
- ✓ возраст старше 18 лет
- ✓ наличие СД 1 и 2 типа
- ✓ HbA1c <12%
- ✓ наличие хронического раневого дефекта плантарной поверхности стопы II ст. по Wagner без активной раневой инфекции и/или остеомиелита
- ✓ транскутанное напряжение кислорода в околораневой зоне ( $T_{\text{срO}_2}$ ) >30 мм рт.ст.

**Критерии невключения:**

- ✓ неподписанное информированное согласие на участие в исследовании
- ✓ HbA1c > 12%
- ✓ возраст <18 или >65 лет
- ✓ ишемическая и нейроишемической форма СДС
- ✓ наличие критической ишемии конечности ( $T_{\text{срO}_2}$  <30 мм.рт. ст.)
- ✓ наличие активной раневой инфекции и/или остеомиелита
- ✓ раневые дефекты 0, III и IV ст. по Wagner
- ✓ предшествующая хирургическая обработка язвенного дефекта
- ✓ разгрузка нижней конечности до включения в исследование

**Критерии исключения из исследования:**

- ✓ пропуск запланированного визита
- ✓ невыполнение рекомендаций по лечению раневого дефекта

**Критерии включения в группу сравнения 1:**

- ✓ подписанное информированное согласие на участие в исследовании
- ✓ возраст старше 18 лет
- ✓ лица без СД

**Критерии включения в группу сравнения 2:**

- ✓ подписанное информированное согласие
- ✓ возраст пациентов от 18 до 65 лет
- ✓ лица без СД
- ✓ наличие пролежней крестцовой области (с травматическим повреждением спинного мозга: повреждение торако-люмбального отдела позвоночника, с синдромом передней части спинного мозга с полным двигательным параличом, потерей болевой и температурной чувствительности, с сохранением проприоцептивной и вибрационной чувствительности)

Для формирования основной группы проводился скрининг пациентов сплошным способом с включением пациентов согласно критериям включения и невключения.

В рамках скрининга проводилось обследование пациентов:

1. сбор клиничко-anamnestических данных;
2. осмотр нижних конечностей, оценка состояния кожных покровов и ногтей, наличия отеков, оценка периферической чувствительности, оценка раневого дефекта по классификации Wagner, измерение его площади и глубины, фотографирование и архивирование изображений раны;
3. оценка состояния периферического кровотока путём определения транскутанного напряжения кислорода в околораневой зоне; конфокальная микроскопия роговицы, осмотр глазного дна в условиях мириаза;
4. оценка состояния углеводного обмена (HbA1c), скорости клубочковой фильтрации (СКФ), основных биохимических показателей крови.

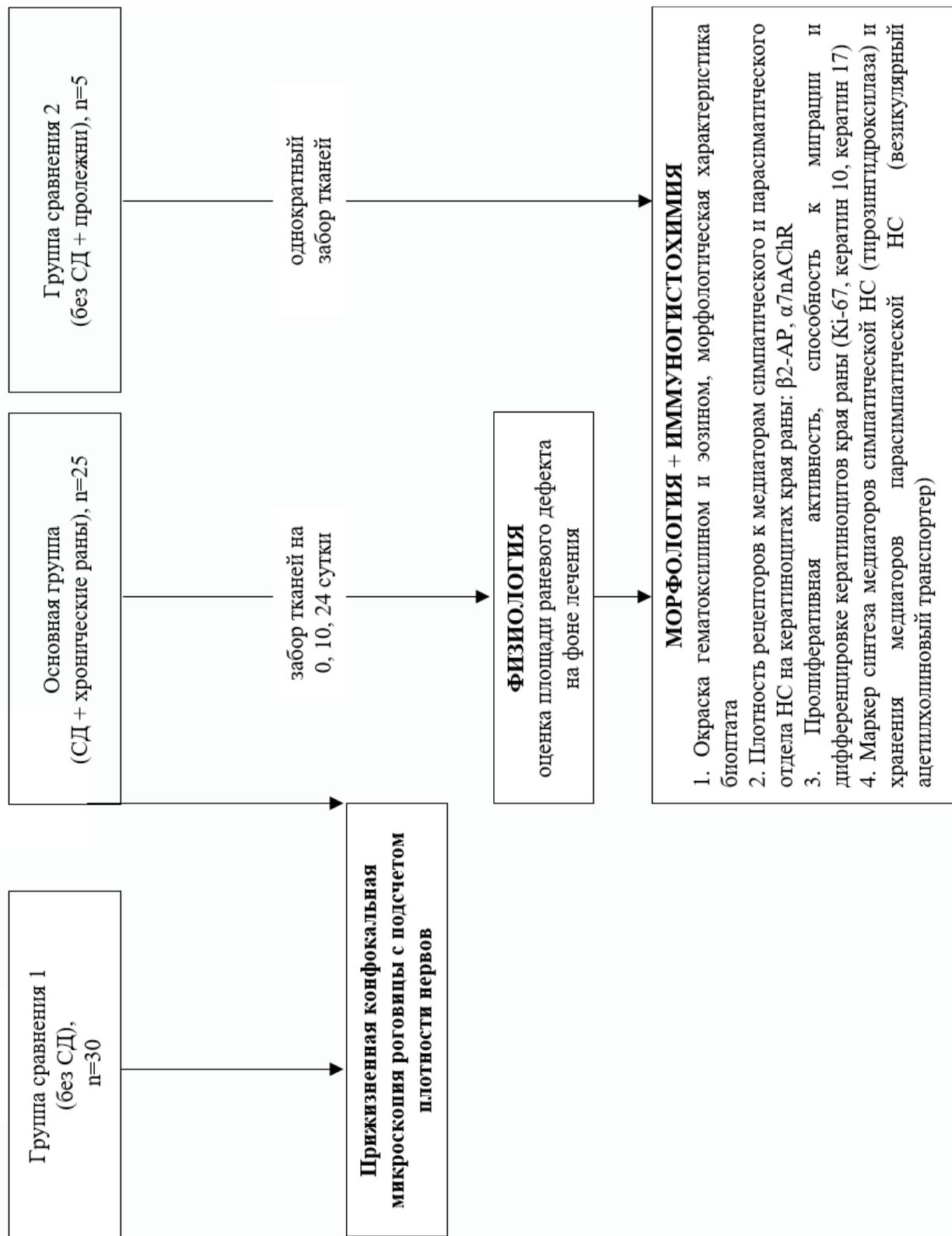


Рисунок 1. Дизайн исследования I.

II исследование включает: протокол эксперимента для изучения динамики заживления ран у крыс с индуцированным стрептозотоцином сахарным диабетом.

**Животные.** Исследование выполняли на самцах белых беспородных крыс весом  $m=250\pm 25$ г ( $n=130$ ), которых содержали в условиях вивария с регулируемым световым режимом: 12 часов – день, 12 часов – ночь, со свободным доступом к воде и пище. При работе с экспериментальными животными руководствовались Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва «Об утверждении Правил лабораторной практики»), а также рекомендациям, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Бунятян Н.Д., Миронов А.Н., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.М., Лепяхин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В., и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, М. Гриф и К. 2012. 942 с.).

**Моделирование стрептозотоцинового диабета 1 типа у крыс.** Диабет моделировали путём однократной в/б инъекцией стрептозотоцина в лебяном 0.1М цитратном буфере ( $pH = 4.5$ ) в дозе 65мкг/кг. Контрольной группе осуществлялось введение растворителя стрептозотоцина – 0.1М цитратный буфер. Инъекцию стрептозотоцина всегда проводили во второй половине дня в наименьший период активности животных, пищевую депривацию не проводили. На третьи сутки опыта с помощью оценки уровня глюкозы оценивали успешность моделирования диабета. Крыс с уровнем глюкозы выше 15 ммоль/л отбирали для дальнейшего участия в эксперименте, а крыс с более низкими показателями глюкометрии выводили из эксперимента.

Для увеличения продолжительности жизни все животные основной группы эксперимента с моделированным сахарным диабетом всегда в первой половине дня получают поддерживающую дозу инсулина детемира (препарат Левемир®), которая подобрана в отдельной серии экспериментов и равна 1,0 ед/кг подкожно.

#### **Подбор поддерживающей дозы инсулина.**

Предварительно на самцах белых беспородных крыс начальной массой  $m = 250\pm 25$  ( $n = 20$ ) была подобрана поддерживающая доза инсулина. Условие на подобранную дозу инсулина накладывалось следующее: она не должна снижать уровень гликемии более чем на 10 %. На третьи сутки опыта у животных оценивали уровень глюкозы и оставляли в эксперименте только тех, у кого концентрация глюкозы в крови была выше 15 ммоль/л.

Далее, 1 раз в сутки, ежедневно вводили повышающиеся инсулина детемира (препарат Левемир), начиная с рекомендованных в инструкции 0.1-0.2 ед/кг, каждый день дозу инсулина повышали до появления эффекта – снижения уровня гликемии в крови крысы. Уровень глюкозы измеряли через 1 час и через 6-8 часов после введения инсулина пока, через 6-8 часов, регистрируемый уровень глюкозы не демонстрировал снижение не менее чем на 10%. Регистрацию показателей проводили с помощью госпитального глюкометра OneTouch Verio Pro. Мониторинг уровня глюкозы в крови крыс проводился дважды в день: утром и вечером.

**Моделирование стандартной раны.** Острую рану кожи выполняли в двух экспериментальных постановках: у трех групп крыс на 14 сутки течения диабета и у трех групп крыс на 42 сутки (наиболее вероятные сроки развития периферической нейропатии) развития диабета. В межлопаточной области шерсть выбривали и наносили контур раны маркером по шаблону, всегда немного левее лопаток, поскольку в межлопаточной области выступающие лопатки не позволят правильно оценить динамику заживления раны, всегда будут рельефные искажения поверхности. Диаметр раны равен 2 см. Операцию выполняли под хлоралгидратным наркозом, 400 мг/кг, внутрибрюшинно. Контрольным животным выполняли острую рану по той же схеме.

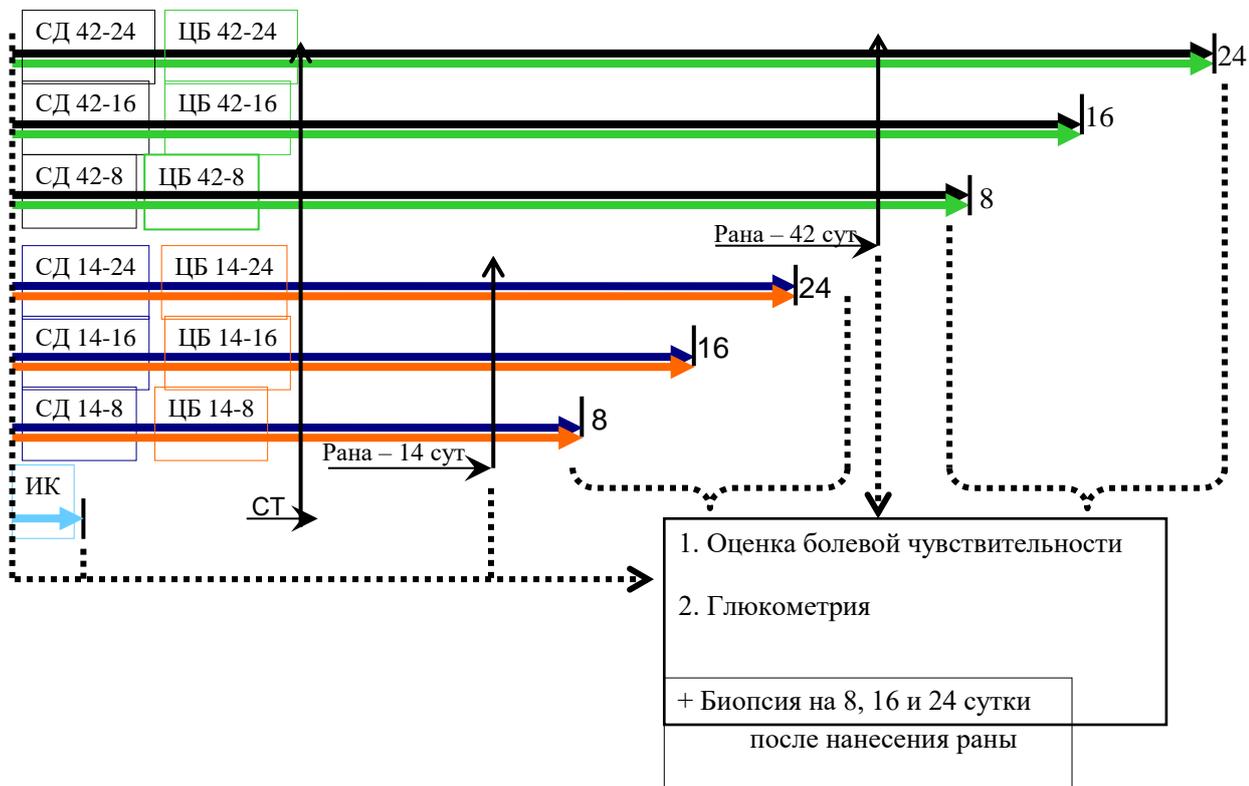
### Экспериментальные группы.

Рандомизацию крыс проводили таким образом, чтобы экспериментальные группы животных были одинаковы по массе, уровню вариабельности ритма сердца и уровню глюкозы в крови. Предварительно произвели замеры этих параметров у всей популяции крыс, участвующих в эксперименте, а затем распределили их по группам (Таблица 1). Схема эксперимента по исследованию заживления ран на разных сроках развития сахарного диабета представлена на рис. 2.

**Таблица 1. Распределение крыс опытной и контрольных групп с указанием времени: инъекции стрептозотоцина, нанесения раны, забоя животных.**

Группа	Время нанесения раны	Время забоя	Число крыс	Категория группы
СД14-8	14 сутки после инъекции СТЗ	8 сутки после нанесения раны	10	Опыт
СД14-16	14 сутки после инъекции СТЗ	16 сутки после нанесения раны	10	Опыт
СД14-24	14 сутки после инъекции СТЗ	В точке полного заживления (24 суток)	10	Опыт
СД42-8	42 сутки после инъекции СТЗ	8 сутки после нанесения раны	10	Опыт
СД42-16	42 сутки после инъекции СТЗ	16 сутки после нанесения раны	10	Опыт
СД42-24	42 сутки после инъекции СТЗ	В точке полного заживления (24 суток)	10	Опыт
К14-8	14 сутки после инъекции ЦБ	8 сутки после нанесения раны	10	Контроль
К14-16	14 сутки после инъекции ЦБ	16 сутки после нанесения раны	10	Контроль
К14-24	14 сутки после инъекции ЦБ	В точке полного заживления (24 суток)	10	Контроль
К42-8	42 сутки после инъекции ЦБ	8 сутки после нанесения раны	10	Контроль
К42-16	42 сутки после инъекции ЦБ	16 сутки после нанесения раны	10	Контроль
К42-24	42 сутки после инъекции ЦБ	В точке полного заживления (24 суток)	10	Контроль
Интактный контроль (ИК)			10	Контроль

**Примечание:** СД – сахарный диабет; К – контроль; СТЗ – стрептозотоцин; ЦБ – цитратный буфер



**Рисунок 2.** Схема эксперимента по исследованию заживления ран на разных сроках развития сахарного диабета. **Примечание:** СД – сахарный диабет; ИК – интактный контроль; ЦБ – цитратный буфер

На протяжении всего опыта все экспериментальных животных трижды проходили через комплексный анализ всех жизненных показателей: 1) до моделирования стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета для оценки исходного уровня параметров и возможности распределения животных в группы; 2) в сроки нанесения раны на спине животного (на 14 или 42 сутки течения диабета); 3) в конечной точке эксперимента перед взятием биопсии (на 8, 16 или 24 сутки после выполнения раны).

Комплексный анализ включал: 1) оценку болевой чувствительности в тесте с отдергиванием хвоста; 2) оценку уровня глюкозы в крови с помощью тест-полосок. Кроме того, у крыс: 1) еженедельно мониторировали уровень глюкозы в крови; 2) ежедневно оценивали массу и рассчитывали количество инсулина детемира для инъекции; 3) каждые 3 дня планиметрически оценивали процесс заживления раны (в программе Universal Desktop Ruler).

**Оценка болевой чувствительности** оценивали по времени отдергивания хвоста крысы, погруженного на 2 см в воду (+65°C).

**Забор материала.** В эксперименте на 24, 16 и 8 сутки опыта после моделирования раны у наркотизированных опытных и интактных крыс забирали образцы ткани кожи для оценки репарационных процессов.

Перед забоем у всех крыс регистрировали ЭКГ до и после холодого воздействия, оценивали изменение порога болевой чувствительности, проводили глюкометрию.

На микротоме MicromHM200 Ergostar получали срезы толщиной 5 мкм и закрепляли их на предметные стекла с полилизинным адгезивным покрытием. Для обеспечения прикрепления срезов стекла смазывали отфильтрованной смесью яичного белка с глицерином (1:1) и формальдегидом (3 капли). Срезы высушивали и окрашивали гематоксилин-эозином в последовательности: ксилол 1 – 15 мин; ксилол 2 – 1 мин, 100% спирт 1 – 1 мин; 100% спирт 2 – 1 мин, 96% спирт – 1 мин; 70% спирт – 1 мин, дистиллированная вода – 1 мин; гематоксилин – 3 мин; дистиллированная вода – 10 с; эозин – 1 мин; дистиллированная вода – 10 с; 96% спирт – 1 мин; 100% спирт 2 – 1 мин; 100% спирт 1 – 1 мин, ксилол 2 – 1 мин; ксилол 1 – 1 мин. Срезы высушивали и заключали в клей для срезов BioOptica под покровные стекла.

Образцы нарезали таким образом, чтобы в микропрепарат попадали участки раневого дефекта и окружающей его неповрежденной кожи. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Для иммуногистохимического окрашивания на Ki-67,  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1- и  $\beta$ 2-AP использовали первичные антитела кролика (Abcam), вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (козел против кролика, Abcam), и систему визуализации DAB. Препараты изучали с помощью светового микроскопа Zeiss Imager A1 Axio («Zeiss», Германия), фотографии получали с помощью программы AxioVision 3,5 («Zeiss», Германия). Относительную плотность окрашивания измеряли в программе ImagePro и сравнивали с отрицательным контролем (образцы, окрашенные без первичных антител).

### **Лабораторные и инструментальные методы исследования**

*Лабораторные методы диагностики исследования I* проводились на базе клинично-диагностической лаборатории ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (зав. лабораторией – к.м.н. Никанкина Л.В.). За весь период проведения работы использовавшееся оборудование, методики и производители реагентов не менялись. Определение гликированного гемоглобина осуществлялось в капиллярной крови с использованием автоматического биохимического анализатора D10 (BioRad Laboratories, США) и набора того же производителя по стандартной методике. Метод сертифицирован в соответствии с National Glycohemoglobin Standardization 40 Program. Показатели биохимического анализа крови определялись на автоматическом биохимическом анализаторе «Architect c8000» («Abbott Laboratories», США) по стандартным методикам с использованием реагентов производителя. Верификация нефропатии проводилась на основании учета стадии ХБП и определения ХБП по уровню альбуминурии.

#### *Инструментальные обследования исследования I*

Верификация и тяжесть дистальной полинейропатии оценивалась согласно шкале неврологических нарушений (NDS) [55]. Тактильная чувствительность оценивалась при помощи монофиламента массой 10 г (North Coast Medical Inc., США), согласно рекомендациям IWGDF.

*Диагноз нейропатической формы синдрома диабетической стопы* подтвержден характерной клинической картиной (длительно существующие безболезненные дефекты на плантарной поверхности стоп в точках максимального нагрузочного давления), результатами оценки периферической чувствительности по шкале NDS (с оценкой вибрационной, тактильной, болевой и температурной чувствительности, исследования сухожильных рефлексов).

У основной группы I исследования до начала лечения, на 10 день и на 24 день терапии проводилась биопсия ткани из зоны раневого дефекта для последующего морфологического и иммуногистохимического исследования. Сроки забора материала выбраны сообразно срокам течения каждой фазы раневого процесса: пролиферативная фаза в большинстве случаев возникает спустя 5–20 дней после ранения (в нашем случае активного дебримента), далее сменяется фазой эпителизации.

У пациентов с пролежнями забор тканей осуществлялся однократно. Для стандартизации забора гистологического материала разработан протокол с проведением маркировки края раны для последующей ориентации при проводке через парафин и приготовления срезов (край раны и околораневая зона с кожей).

*Гистологическое исследование исследования I* проводилось на базе кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (заведующий кафедрой - д.б.н., профессор Кошелев В.Б.).

Забранный от пациентов гистологический материал края ран подвергался стандартной обработке. Образцы кожи фиксировали в 10% растворе формалина в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 1 – 2 суток. Затем образцы промывали проточной холодной водой в течение 8 – 12 часов. Проводку осуществляли с помощью автоматического аппарата для гистологической проводки карусельного типа по следующей программе: этанол 50% (6 часов) – этанол 70% (6 часов) – этанол 96% (6 часов) – этанол 96% (6 часов) – этанол 100% (6 часов) – этанол /хлороформ 1:1 (6 часов) – хлороформ 100% (6 часов) – хлороформ/парафин (6 часов) – парафин (5 часов) – парафин (2 часа). Для инфильтрации в процессе проводки и для заливки использовали парафин Histomix (Biovitrum, Россия). Образцы заливали парафином при

температуре 55 – 60°C. Готовые блоки застывали в течение не менее 24 часов, после чего их охлаждали до температуры +4°C за один 30 – 60 минут до нарезки. С помощью микротомы Thermo Scientific HM355 получали срезы толщиной 5 мкм, которые помещали на предметные стекла и высушивали в течение не менее чем 24 часов при комнатной температуре.

Окрашивание гематоксилином и эозином проводили в соответствии со стандартной методикой. Срезы кожи регидратировали по следующей схеме: ксилол 100% – ксилол 100% – этанол 100% – этанол 100% – этанол 96% – этанол 70% – дистиллированная вода (каждый этап по 3 минуты). Затем срезы помещали в кювету с эозином на 3 минуты, промывали дистиллированной водой, помещали в кювету с гематоксилином на 5 минут, промывали дистиллированной водой. Дегидратировали срезы по схеме, аналогичной схеме регидратации в обратном направлении (от дистиллированной воды к ксилолу, также по 3 минуты). Для заключения под покровные стекла использовали эпоксидную смолу Витрогель (Biovitrum).

Стандартное *иммуногистохимическое исследование* при окрашивании с использованием пероксидазных антител проводили по следующему протоколу:

1. Регидратация (аналогично протоколу окрашивания гематоксилином и эозином);
2. Тепловая демаскировка эпитопов – 20 минут в цитратном буфере (pH = 6,0) на водяной бане при температуре 80 – 85°C;
3. Нанесение блокирующего раствора – 10 минут (Protein block, Abcam);
4. Нанесение первичных антител – инкубация при +4°C на ночь во влажных камерах;
5. Инкубация с раствором пероксида водорода 3%;
6. Нанесение вторичных антител, меченных пероксидазой хрена – инкубация при +37°C 1 час;
7. Нанесение DAB (Abcam) на 10 минут в темноте;
8. Нанесение гематоксилина на 5 минут;
9. Дегидратация и заключение под покровное стекло; между этапами стекла промывали в фосфатно-солевом буфере в течение 3 минут.

При окрашивании препаратов с флуоресцентным методом визуализации в протокол вносили следующие изменения:

1. Инкубацию с пероксидом водорода не производили;
2. Для заключения под покровное стекло использовали эпоксидную смолу FluroShield, содержащую краситель DAPI для визуализации ядер.

Использованные первичные антитела (АТ): к цитокератину 10 – АТ мыши (ab9025, Abcam); к цитокератину 17 – АТ мыши (ab19067, Abcam); к b2-адренорецепторам – АТ кролика (ab182136, Abcam); к тирозингидроксилазе – АТ кролика (ab93652, Abcam); к везикулярному ацетилхолиновому транспортеру – АТ кролика (ab108319, Abcam); к a7-NAch-рецепторам – АТ кролика (ab10096, Abcam).

Использованные вторичные антитела: меченные пероксидазой хрена, козел против кролика (ab6721, Abcam); меченные пероксидазой хрена, козел против мыши (ab6789, Abcam).

В качестве отрицательного контроля использовали микропрепараты, окрашенные по стандартному протоколу без аппликации первичных антител.

Полученные микропрепараты исследовали на микроскопе Axio Imager A2 (Zeiss, Германия) с флуоресцентным модулем, микрофотографии фиксировали и обрабатывали в программе Zen (Zeiss, Германия). Все фотографии препаратов получали с одинаковыми значениями настроек объектива камеры: яркостью, балансом белого и контрастностью, что обеспечивало унификацию процедуры обсчета. Интенсивность окрашивания оценивалась в программе Image-ProPlus с последующим подсчетом относительной площади окрашенных участков.

*Офтальмологическое обследование больных СД* проводилось на базе отделения диабетической ретинопатии и офтальмохирургии ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (зав. отделением д.м.н. Липатов Д. В.). Стадии диабетической ретинопатии выставлялись согласно клиническим рекомендациям.

*Конфокальная микроскопия роговицы* проводилось на томографе Heidelberg Retina Tomograph III Rostock Cornea Module (HRTIII/RCM; HeidelbergEngineeringGmbH, Heidelberg, Germany). На линзу объектива наносился гель Видисик (0,2% карбомер; Dr. GerhardMann, Германия), сверху помещался одноразовый стерильный колпачок (Томо-Сар; Heidelberg Engineering GmbH). Перед началом исследования в оба глаза осуществлялась инстиляция капель анестетика проксиметакаин 0.5%. Продолжительность процедуры составляла в среднем около 5-10 минут, ни один из обследованных не жаловался на боль, дискомфорт, или нарушения зрения. Производилось сканирование центральной зоны роговицы обоих глаз разрешением 384x384 пкс. Для анализа отбирались 6 изображений (по 3 с каждого глаза) хорошего качества (без артефактов движения). Количественный анализ нервов проводился с помощью автоматизированного программного обеспечения ACCMetrics (Университет Манчестера, Манчестер, Великобритания).

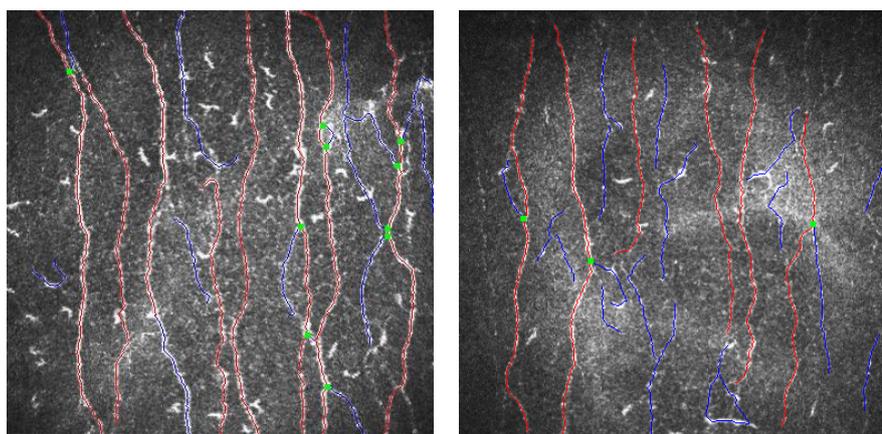
#### **Статистический анализ данных.**

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакета прикладных программ STATISTICA (StatSoft Inc. США, версия 13.0). Учитывая небольшие объемы выборок и распределения, отличающиеся от нормального, использованы непараметрические методы анализа данных. Сравнение независимых групп по количественным признакам осуществлены непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна-Уитни. Сравнение зависимых групп по количественным признакам осуществлено непараметрическим методом с использованием критерия Вилкоксона. Для оценки выживаемости применяли модель Кокса, допускающую частичную неполноту данных. Для оценки динамики ранозаживления и изменения болевой чувствительности использовали функцию дисперсионного анализа повторных измерений (repeated measures ANOVA). Для сравнения плотностей экспрессии различных белков использовали многофакторный дисперсионный анализ с построением смешанной линейной модели (метод наименьшей значимой разницы по Фишеру). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### **СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**

#### **Характеристики основной группы и групп сравнения.**

Основная группа состояла из 25 пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типов с длительностью течения СД 17,4 [13; 20]. У пациентов основной группы по данным конфокальной микроскопии роговицы отмечалось значимое снижение плотности нервных волокон (рис. 3) -  $20,1 \pm 7,4$  fibres/mm<sup>2</sup> по сравнению с полученными нами ранее данными у пациентов без диабета  $35,5 \pm 9,4$  fibres/mm<sup>2</sup> (данные представлены means  $\pm$  SD).



А

Б

**Рисунок 3.** Плотность нервов в роговице: А – здоровых добровольцев, Б – пациентов с нейропатической формой синдрома диабетической стопы. Красная маркировка – нервное волокно, синяя маркировка – ветви нервных волокон, зеленая маркировка – точки ветвления.

В группу сравнения 2 вошли пациенты с травматическим повреждением спинного мозга (повреждение торако-люмбального отдела позвоночника, с синдромом передней части спинного мозга с

полным двигательным параличом, потерей болевой и температурной чувствительности, с сохранением проприоцептивной и вибрационной чувствительности), без диабета и наличием пролежней крестцовой области (n=5) (Таблица 2).

**Таблица 2. Клиническая характеристика пациентов основной группы и группы сравнения**

Параметр	Основная группа, n = 25	Группа сравнения 2, n = 5
Возраст, годы	57,4 [54; 60]	41,3 [30; 62]
Тип СД 1/2 (%)	12,5/87,5	-
Длительность течения СД, годы	17,4 [13; 20]	-
Гликированный гемоглобин, %	9,4 [8,3; 10,8]	-
Тяжесть ДПН (шкала NDS, баллы)	> 8	-
СКФ GRF (EPI) <60 мл/мин/1.73м <sup>2</sup> , n (%)	5 (20%)	-
ДРП	НР - 12 ППР - 8 ПР - 5	-
Характеристика раневых дефектов и анамнез малых ампутаций		
Длительность раневого дефекта до включения в исследование, мес.	6 [3;8]	8 [6;12]
Локализация раневого дефекта, n	Фаланги - 9 головки плюсневых костей, опилы плюсневых костей при метатарзальной ампутации – 13 предплюсна (нейроостеоартропатия) - 3	Пролежни крестцовой области
Размер раневого дефекта (0 день), см	5,56 [1,7; 6,4]	7,4 [3,4; 12,4]
Тяжесть инфекционного процесса (IDSA)	0	0
Тип кровотока по доплеру	магистрально/изм.	магистрально/изм.
Малые ампутации на стопе в анамнезе, n	6 (24%)	-

**Примечание:** СД– сахарный диабет, ДПН – диабетическая полинейропатия, шкала NDS - шкала неврологических расстройств; CNFD – плотность нервных волокон в роговице, СКФ GRF (EPI) – скорость клубочковой фильтрации, ДРП – диабетическая ретинопатия, НР - непролиферативная ретинопатия, ППР – препролиферативная ретинопатия, ПР – пролиферативная ретинопатия.

Раневые дефекты глубиной 2 ст. по классификации Wagner локализовались в местах максимального нагрузочного давления на подошвенной поверхности стоп: в проекции головок плюсневых костей, в предплюсневом отделе на фоне нейроостеоартропатии Шарко (рис. 4). Адекватной разгрузки стоп ранее пациенты не получали, сложной ортопедической обувью не пользовались, в анамнезе имели нейропатические раны. Макроскопически дно ран было представлено грануляционной тканью, по периферии окруженной гиперкератозом, отделяемое из раны имело серозный характер, местного отёка и

гиперемии, как и системных признаков инфекции не было отмечено.



**Рисунок 4.** Внешний вид нейропатической раны основной группы – А, группы сравнения – Б.

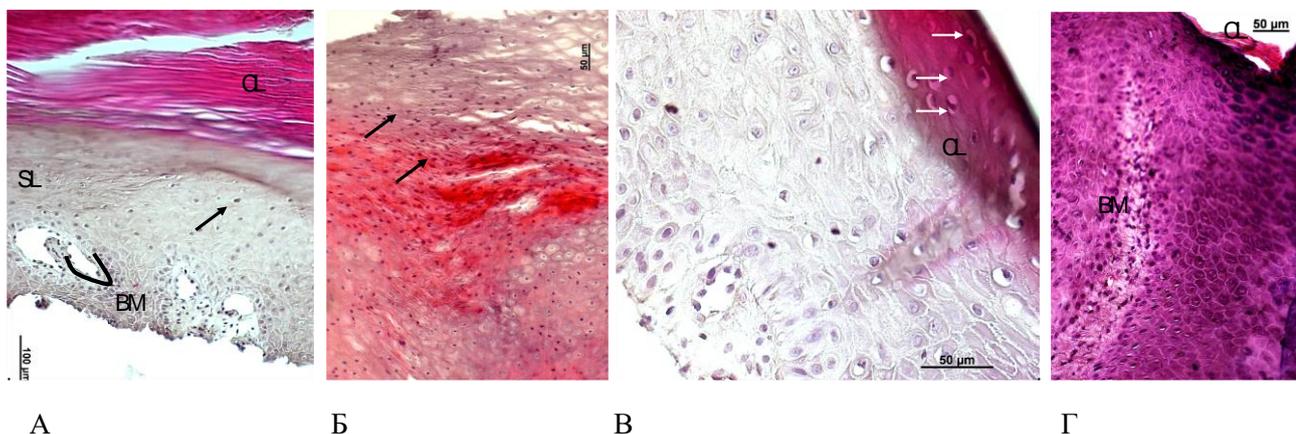
Протокол лечения включал:

- а) местное ведение раневого дефекта (удаление гиперкератоза, фибринового слоя, перевязка с атравматическими сетчатыми повязками);
- б) наложение индивидуальной разгрузочной повязки Total Contact Cast, съёмный вариант;
- в) коррекцию гипергликемии, сопутствующей патологии.

На фоне лечения за период наблюдения отмечено статистически значимое сокращение площади раневых дефектов (0 день - 5.56 см<sup>2</sup>, 24 день - 3.29 см<sup>2</sup>,  $p < 0,004$ ).

#### Результаты патоморфологического исследования образцов кожи.

При гистологическом исследовании отмечено, что нейропатические раны имели значительно утолщенный роговой слой, митотически активные клетки локализовались во всех слоях эпидермиса (рис.5), включая слои с дифференцированными клетками, зернистый слой практически отсутствовал, кератиноциты рогового слоя сохраняли ядра (паракератоз); образцы кожей больных с пролежнями не отличалось от здорового эпидермиса.



**Рисунок 5.** Морфологическая характеристика ран пациентов с СДС (основная группа) и с травматическим повреждением спинного мозга (группа сравнения 2). Окраска гематоксилином и эозином. А, Б, В – морфология края нейропатической раны; Г – морфология участка пролежня. Стрелками указаны митотически активные клетки. Размер масштабной линейки здесь и дальше указан в мкм.

В здоровой коже клетки с активными митозами располагаются в базальном слое, по мере дифференцировки их становится все меньше, клетки рогового слоя вовсе лишены органелл. Пациенты с пролежнями не имели утолщенного рогового слоя, отмечался умеренно выраженный акантоз (утолщение эпителия за счет усиленной пролиферации базального и шиповатого слоев), дерма без особенностей.

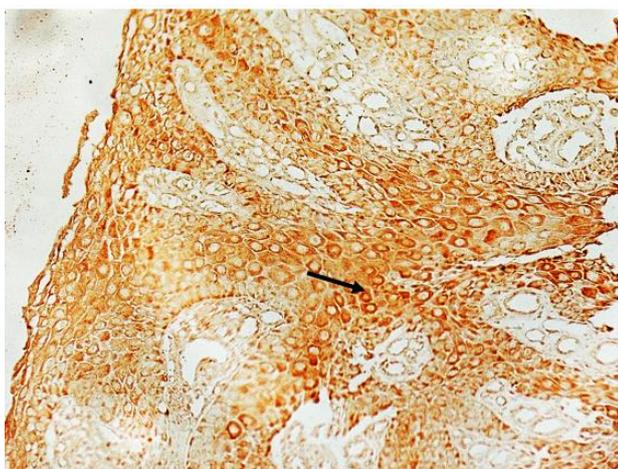
В образцах кожи пациентов с нейропатическими ранами не отмечалось инфильтрации

воспалительными клетками, по сравнению с образцами кожи пациентов с пролежнями, где отмечалась выраженная воспалительная инфильтрация. Клетки рогового слоя не имели ядер, наибольшее число митозов наблюдалось в базальном слое.

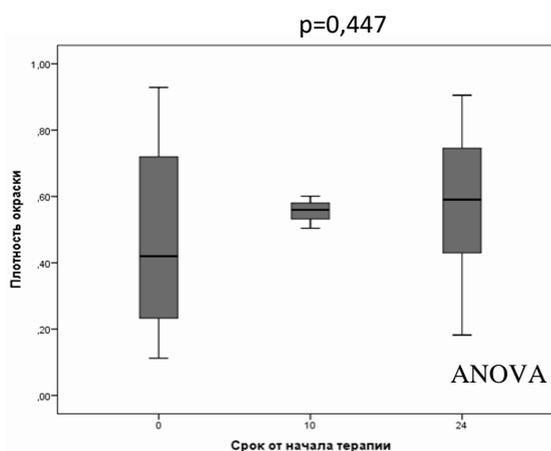
### Результаты иммуногистохимического исследования образцов кожи.

#### Окрашивание антителами к Ki-67.

Все слои эпидермиса нейропатических ран экспрессировали маркер пролиферативной активности Ki-67, плотность окрашивания не изменялась на фоне лечения, более интенсивное окрашивание отмечалось в базальном слое (рис. 6). Интенсивность пролиферации эпидермиса значимо в течение периода наблюдения не менялась ( $p=0,447$ ).



А

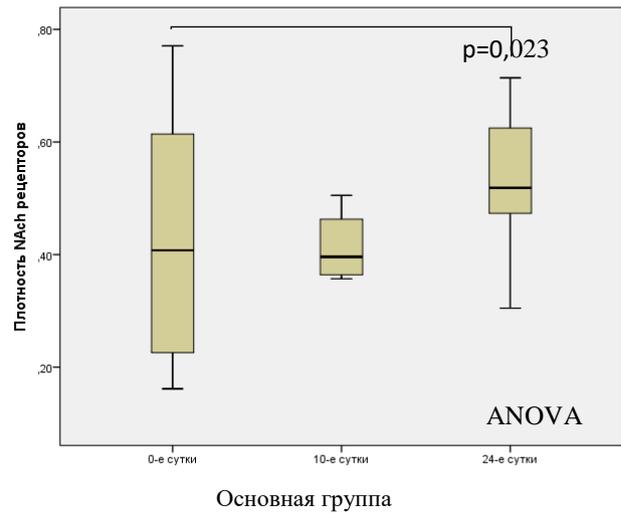
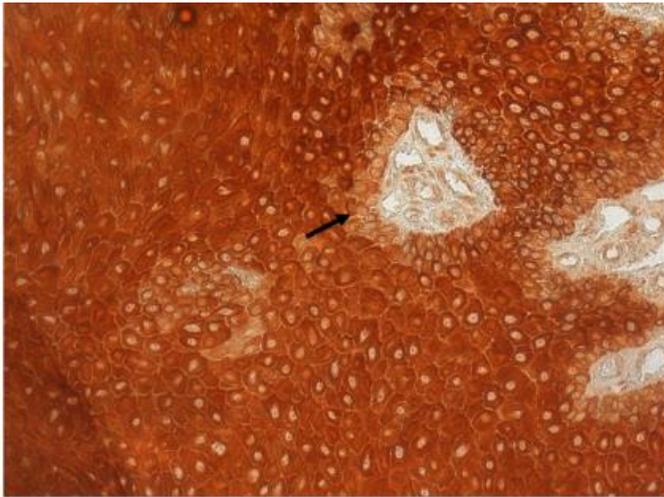


Б

**Рисунок 6.** А – Иммуногистохимическое окрашивание на Ki-67 (увеличение  $\times 200$ ), участок кожи нейропатической раны, обращенный в сторону края раны, 24 сутки от начала терапии. Коричневое окрашивание – наличие маркера. Базальный слой эпидермиса окрашен сильнее (стрелка). Б. – плотность окрашивания слоев эпидермиса в процессе заживления раны (0,10,24 день),  $p=0,447$  для фактора срока от начала терапии, ANOVA.

#### Окрашивание антителами к $\alpha 7nAChR$ .

Все слои эпидермиса экспрессировали рецепторы к медиатору парасимпатической нервной системы - ацетилхолину ( $\alpha 7nAChR$ ) (рис. 7 А). По сравнению со стартом терапии к 10 и 24 дню отмечалось увеличение плотности экспрессии маркера (рис. 7 Б). По результатам апостериорных сравнений методом наименьшей значимой разницы, наблюдаемое влияние фактора времени связано с большей плотностью холинорецепторов в эпидермисе на 24 сутки после начала терапии, относительно 0 точки ( $p=0,023$ ). Точка 10 дней после начала терапии от остальных временных точек не имела значимых различий. В целом, количество рецепторов в течение наблюдения в коже увеличивалось к 24 дню. В отличие от окрашивания на Ki-67 окрашивание базального слоя (стрелка) слабее, чем у остального эпидермиса, как показывают данные литературы.



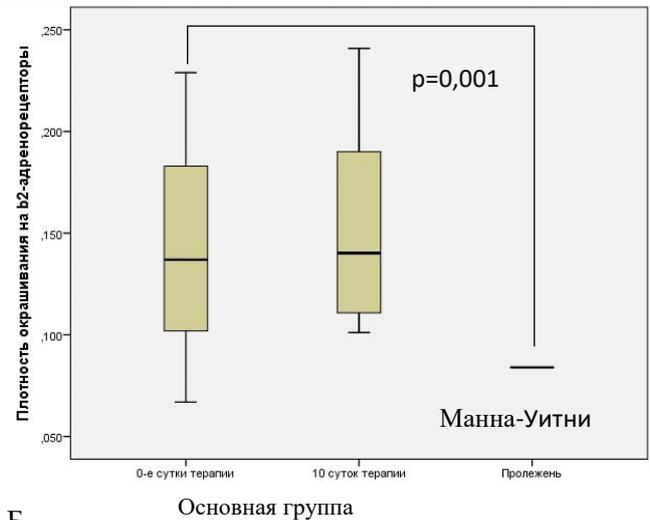
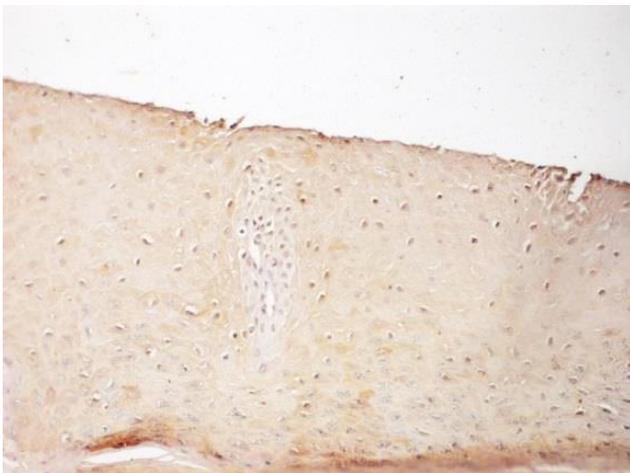
А

Б

**Рисунок 7.** Иммуногистохимическое окрашивание (А) на  $\alpha 7nAChR$  (увеличение  $\times 200$ ). Коричневое окрашивание – наличие маркера. Б – плотность холинорецепторов ( $\alpha 7nAChR$ ) в эпидермисе на 24 сутки от начала терапии больше относительно 0 точки,  $p=0,023$ , Апостериорный тест методом наименьшей значимой разницы.

*Окрашивание антителами к бета2-адренорецепторам.*

Плотность бета2-адренорецепторов оказалась выше в коже края раны пациентов с сахарным диабетом, чем в коже у пациентов с пролежнями  $p=0,001$ ) (рис. 8).



А

Б

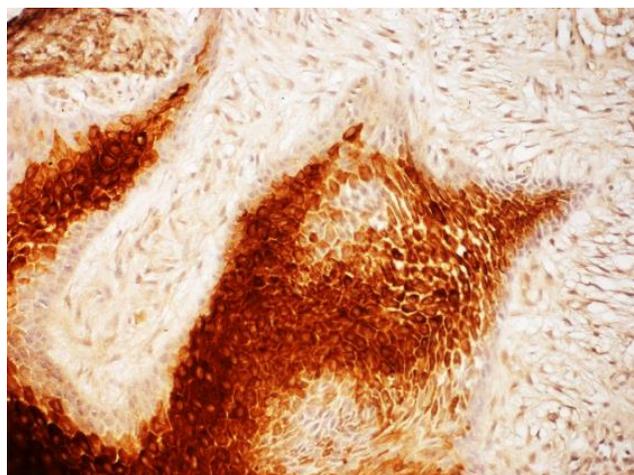
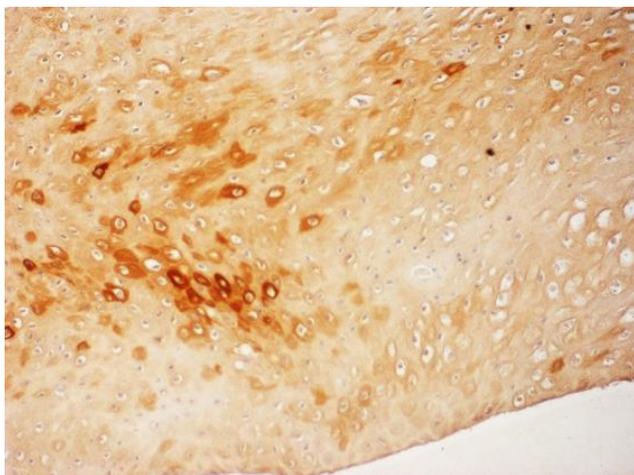
**Рисунок 8.** А – Иммуногистохимическое окрашивание края нейропатической раны на 10-е сутки после начала терапии. Коричневое окрашивание клеток обозначает экспрессию b2-адренорецепторов (увеличение  $\times 200$ ). Б – плотность окрашивания образцов кожи основной группы на 0 и 10 сутки и группы сравнения 2 на b2-адренорецепторы. Сравнение групп пациентов основной группы и группы контроля на 0 день исследования проведено с использованием критерия Манна-Уитни,  $p= 0.001$ .

*Окрашивание антителами к цитокератину 10.*

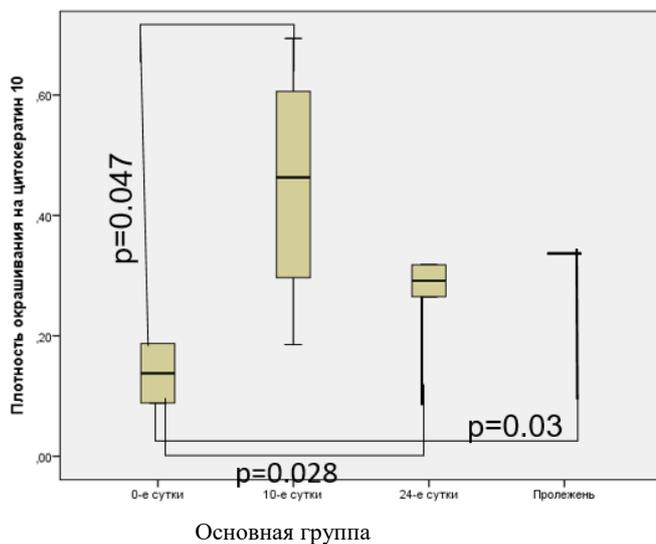
Цитокератины K2 и K10 экспрессируются в дифференцирующихся клетках. Активированные кератиноциты экспрессируют кератиновые белки K6, K16 и K17. Активированные кератиноциты изменяют свой цитоскелет, увеличивают уровни рецепторов клеточной адгезии и продуцируют

компоненты базальной мембраны.

Кератиноциты, положительно окрашиваемые на цитокератин-10, в различных образцах занимали от 20% до 80% от общей площади эпидермиса (рис. 9 А, Б). Во всех исследуемых группах и интактном контроле кожа активно экспрессировала цитокератин 10. Базальный слой клеток преимущественно оказался не окрашен, а в верхних слоях эпидермиса цитокератин 10 экспрессируют все кератиноциты не зависимости от группы (рис. 10). Результаты статистической обработки данных показали, что количество таких клеток значительно меньше у пациентов на 0-е сутки терапии, чем на 10-е, 24-е и у пациентов с пролежнями (рис 10).



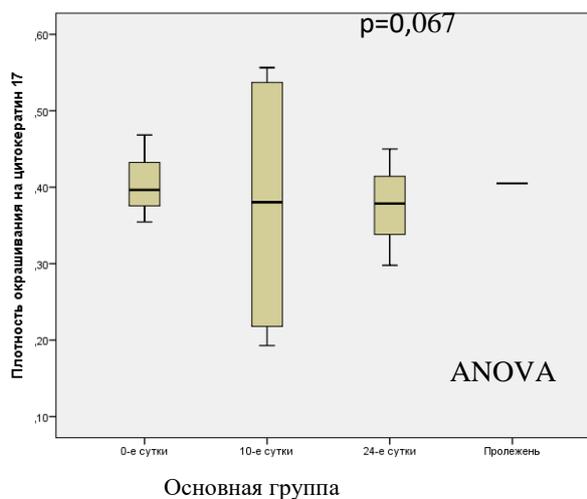
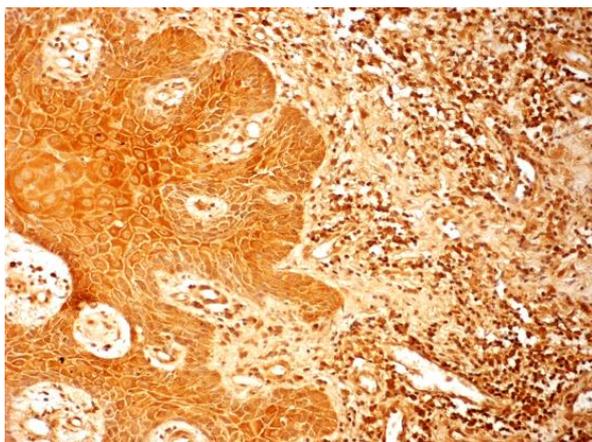
А Б  
**Рисунок 9.** Иммуногистохимическое окрашивание клеток эпидермиса нейропатической раны на цитокератин 10 (увеличение x200). А – 0-е сутки, Б – 10-е сутки терапии.



**Рисунок 10.** Плотность окрашивания на цитокератин 10 нейропатической раны на 0,10, 24-е сутки, пролежня. Количество кератиноцитов, окрашенных на цитокератин 10 на 0 сутки значительно меньше, по сравнению с пролежнями ( $p=0,03$ , метод Манна-Уитни), а также на 10-е ( $p=0,047$ , метод Вилкоксона) и 24-е ( $p=0,028$ , метод Вилкоксона) сутки лечения.

### Окрашивание антителами к цитокератину 17.

Плотность клеток, окрашенных цитокератином 17, составила от 20% до 50%, статистически значимых различий между группами не было обнаружено ( $p=0,067$ ), рис 11.

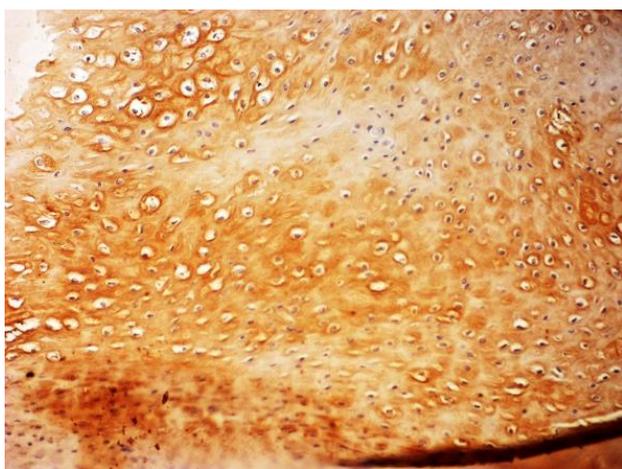


**А**  
**Рисунок 11.** А – пример окрашивания на цитокератин 17, край пролежня (увеличение  $\times 200$ ). Б – плотность окрашивания на цитокератин 17 нейропатической раны на 0,10, 24-е сутки, пролежня,  $p=0,067$ , ANOVA.

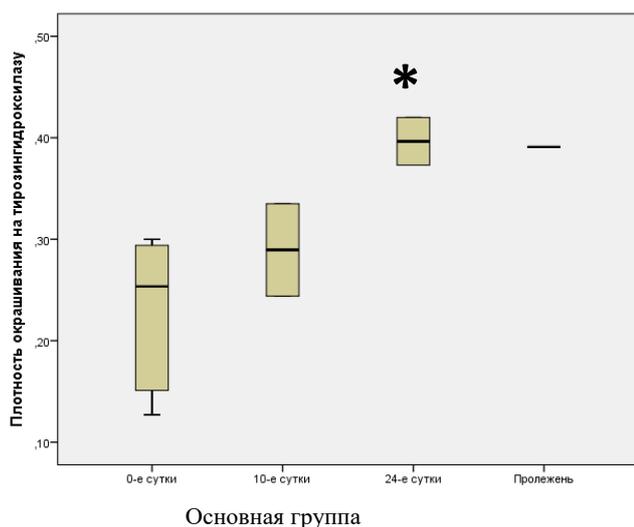
### Окрашивание антителами к тирозингидроксилазе.

Тирозингидроксилаза является ферментом, ответственным за каталитическое превращение L-тирозина аминокислоты в дигидроксифенилаланин (ДОФА). ДОФА является предшественником дофамина, который, в свою очередь, является предшественником норадреналина (норадреналина) и адреналина (адреналин). Фермент является высокоспецифичным и идентифицируется только в надпочечниках и в катехоламинэргических нейронах, причем преимущественно в их нервных окончаниях.

Пример окрашивания антителами к тирозингидроксилазе на 0 сутки представлен на рис 19. Плотность окрашивания на тирозингидроксилазу оказалась статистически значимо выше у пациентов с пролежнем и на 24-е сутки терапии по сравнению с 0-ми и 10-ми сутками (рис. 12).



**Рисунок 12.** Пример иммуногистохимического окрашивания антителами к тирозингидроксилазе, 0 сутки (увеличение  $\times 200$ ).

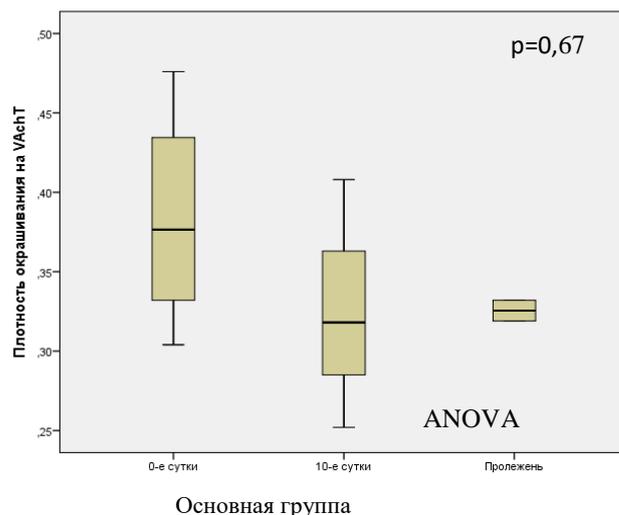
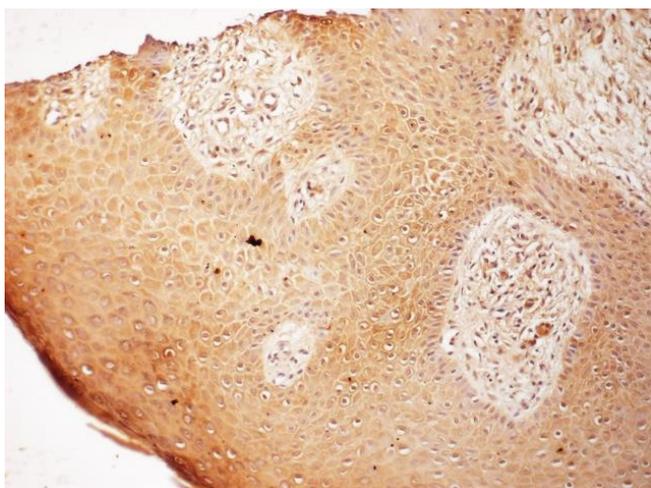


**Рисунок 13.** Плотность окрашивания на тирозингидроксилазу нейропатической раны на 0,10, 24-е сутки, пролежня,  $p=0,04$ , ANOVA.

*Окрашивание антителами к везикулярному ацетилхолиновому транспортеру.*

Ацетилхолин хранится в синаптических везикулах. Его высвобождение при возбуждении происходит путем полного опорожнения каждой везикулы. Перенос ацетилхолина, содержащегося в цитозоле нейрона, в синаптический пузырек осуществляется под действием везикулярного транспортера ацетилхолина. Кератиноциты имеют все необходимые ферменты (холинацетилтрансферазу, ацетилхолинэстеразу) для синтеза, хранения, секреции и инактивации ацетилхолина, который, в свою очередь, способен регулировать клеточный цикл этих клеток.

При иммуногистохимическом окрашивании визуально не выявлялись определенные паттерны экспрессии маркера (рис. 14, А). Плотность окрашивания клеток эпидермиса составила в среднем около 35%, значимые различия не были обнаружены между группами ( $p=0,67$ ) (Рис14,Б). Наблюдается тенденция к более интенсивному окрашиванию на 0-е сутки лечения (рис. 14,Б).



**Рисунок 14.** А – Иммуногистохимическое окрашивание на везикулярный ацетилхолиновый транспортер края нейропатической раны, 0-е сутки (увеличение  $\times 200$ ). Б – Плотность окрашивания на везикулярный ацетилхолиновый транспортер в нейропатической ране на 0, 10 сутки, пролежне. Значимых различий в плотности везикулярного ацетилхолинового транспортера на 0 день в основной группе и группе сравнения 2, а также в динамике ранозаживления выявлено не было,  $p=0,67$ , ANOVA.

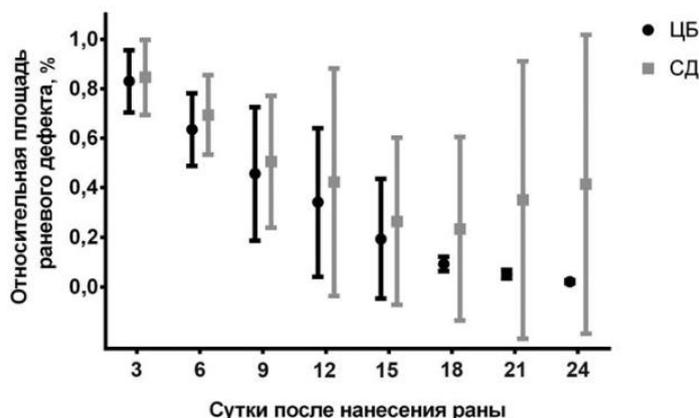
## Результаты эксперимента для изучения динамики заживления ран у крыс с индуцированным стрептозотоцином сахарным диабетом.

Однократная инъекция стрептозотоцина приводила к развитию сахарного диабета у крыс на 3-и сутки: уровень глюкозы в крови в 4—7 раз превышал исходный (6,2 ммоль/л) и оставался повышенным на протяжении всего эксперимента. Для предупреждения развития комы и летальности животным ежедневно вводили инсулин пролонгированного действия. За весь срок эксперимента погибли 3 крысы из 70. Исходная масса крыс составляла в группе СД  $367 \pm 55$  г, в группе ЦБ  $372 \pm 73$  г, в группе ИК  $360 \pm 84$  г. Снижение массы тела у животных группы СД к концу эксперимента составила 25%.

Для оценки развития сенсорной нейропатии (температурно-болевая чувствительность) проводили тест с отдергиванием хвоста после погружения в воду температурой 55 °С. У животных групп ЦБ и ИК время отдергивания хвоста составляло в среднем  $1,7 \pm 0,3$  с. В группе животных с диабетом, начиная с 7-х суток, это время постепенно нарастало и к 56-м суткам составило  $2,9 \pm 0,4$  с ( $p=0,017$ ).

### Динамика ранозаживления.

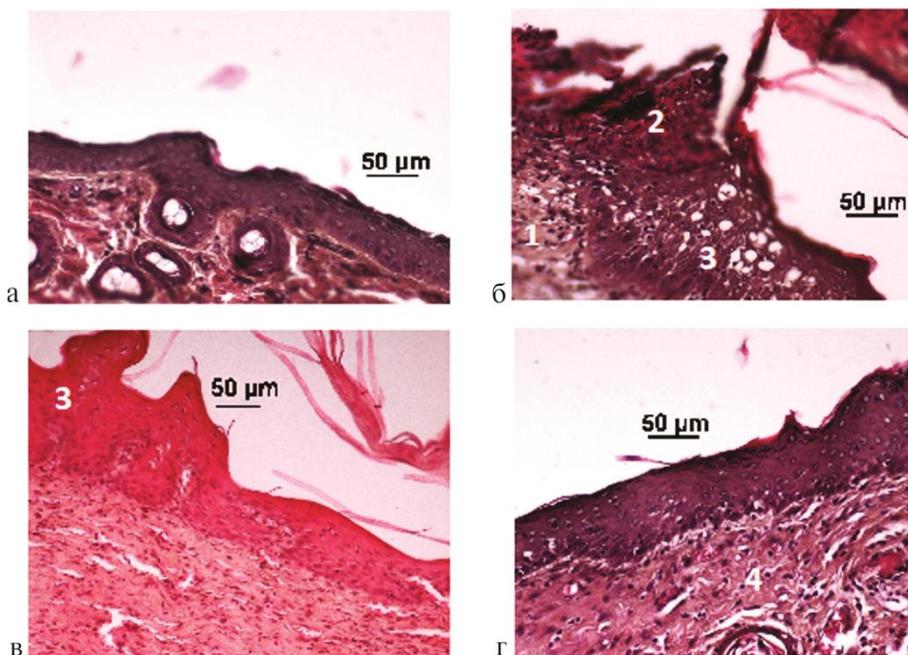
Скорость ранозаживления у крыс групп СД и ЦБ не различалась ( $p=0,672$ ). Однако это могло быть связано с большим разбросом размеров раны в группе СД (рис. 15). В группе ЦБ в отличие от СД у всех крыс рана зажила к 24-м суткам.



**Рисунок 15.** Динамика ранозаживления у крыс разных групп ( $M \pm m$ ). ЦБ – группа крыс с инъекцией цитратным буфером (группа контроля); СД – опытная группа с инъекцией стрептозотоцина и формированием сахарного диабета.

### Морфологический анализ заживления раны.

У интактных крыс в срезах кожи, окрашенных гематоксилином и эозином, визуализирован нормальной толщины эпидермис с четко выраженными базальным, шиповатым и зернистым слоями (рис. 16 а).

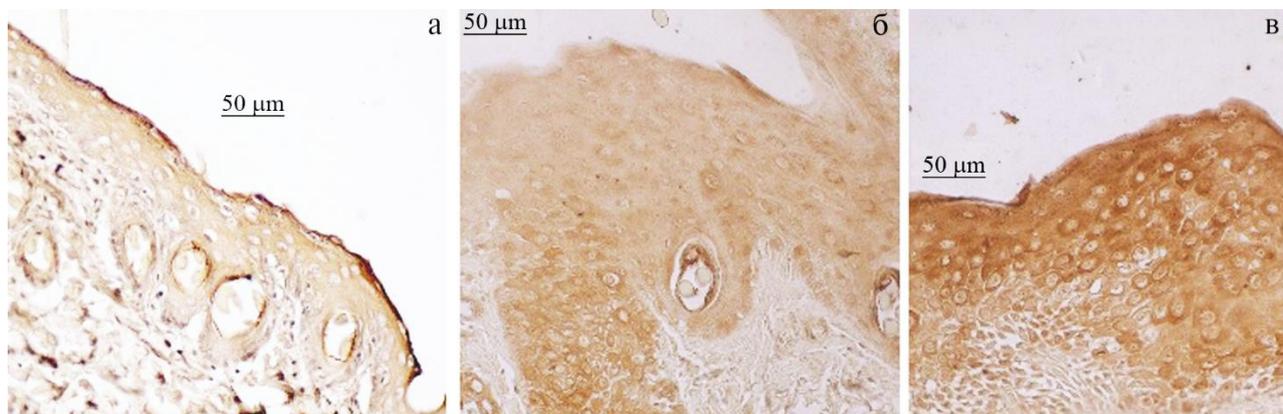


**Рисунок 16.** Морфология кожи крыс при окраске гематоксилином и эозином. а — типичная картина интактной кожи крысы; б — утолщенный край регенерирующего эпидермиса на 8-е сутки раны; в — утолщенный край регенерирующего эпидермиса на 16-е сутки раны; г — рубцовая ткань и восстановленный эпидермис в области раны на 24-е сутки. 1 — грануляционная ткань, 2 — некротические массы, 3 — край раны, 4 — фиброзная ткань.

На 8-е сутки после нанесения раны большая часть раны была представлена грануляционной тканью, интенсивно инфильтрированной нейтрофилами, макрофагами и лимфоцитами (рис. 16 б). Грануляционную ткань покрывал слой некротических масс ввиду того, что раневой дефект не закрывался повязками. Регенерирующий край эпидермиса часто был утолщен. На 16-е сутки наблюдались затухание воспалительного процесса и исчезновение признаков острого повреждения (рис. 16 в), отмечено формирование грубоволокнистой рубцовой ткани (рис. 16 г), что по всей видимости обусловлено заживлением раны «под струпом». У ряда лабораторных животных группы СД к 24 дню полной эпителизации не происходило.

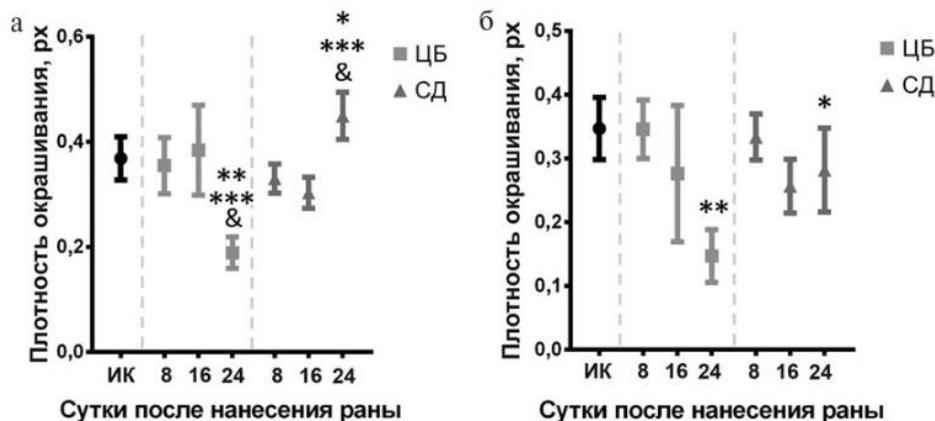
#### *Иммуногистохимический анализ заживления ран.*

Общий вид препаратов, окрашенных методом иммуногистохимии, представлен на рис 17.



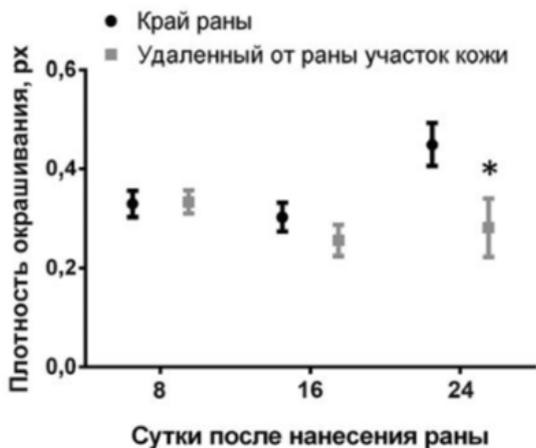
**Рисунок 17.** Примеры иммуногистохимического окрашивания. ДАБ: а — отрицательный контроль — неспецифически окрашивается только полоска рогового слоя эпидермиса, б — окрашивание на  $\beta 2$  - адренорецепторы, край раны, окрашенные клетки расположены преимущественно в глубоких слоях, в — окрашивание на Ki-67, край раны.

Кератиноциты группы ИК в значительной степени экспрессировали Ki-67, маркер клеточной пролиферации. На 24-е сутки на фоне значимого сокращения раны и ее эпителизации в группе контроля отмечалось снижение экспрессии маркера Ki-67 по сравнению с ИК и животными с СД (рис. 18), что свидетельствует о физиологическом течении процесса репарации и его замедлении у животных с гипергликемией.



**Рисунок 18.** Плотность окрашивания на маркер Ki-67 ( $M \pm m$ ): а — в отдаленных участках кожи, б — в крае раны. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой ЦБ, \*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с группой ИК, \*\*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с 8-ми сутками внутри группы, & —  $p < 0,05$ , по сравнению с 16-ми сутками внутри группы.

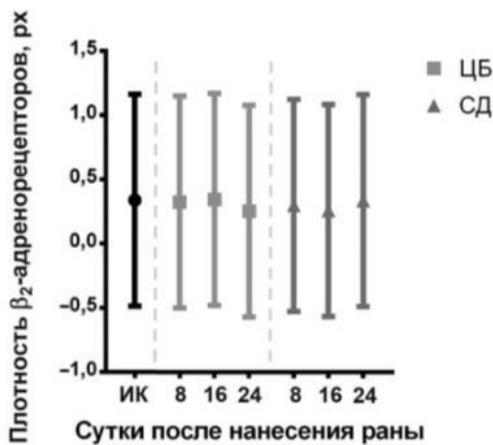
В группе СД как на 8-е, так и на 16-е сутки экспрессия Ki-67 значимо не изменилась, но на 24-е сутки в области края раны увеличилась по сравнению с группой ИК ( $p = 0,036$ ), ЦБ ( $p = 0,041$ ) и предыдущей временной точкой ( $p = 0,028$ ) (рис. 19).



**Рисунок 19.** Сравнение плотности окрашивания на Ki-67 в крае раны и отдаленном участке эпидермиса на 8, 16 и 24-е сутки в группе СД ( $M \pm m$ ); \* —  $p < 0,05$  по сравнению с краем раны.

Ни в одной группе, включая ИК, мы не обнаружили окрашивания эпидермиса на  $\beta 1$  - и  $\alpha 1$  - AR. В2-адренорецепторы в значительной степени экспрессировались кератиноцитами животных всех групп, включая ИК. Следует отметить преимущественно базальное расположение положительно окрашенных клеток в эпидермисе (рис. 17 б).

На 8-е и 16-е сутки экспрессия  $\beta 2$ - AR не различалась между группами и участками кожи. На 24-е сутки их экспрессия уменьшилась в группе ЦБ в отдаленных участках кожи ( $p = 0,046$ ) (рис. 20).



**Рисунок 20.** Интенсивность экспрессии  $\beta_2$ - AR в разных участках кожи крыс с СД на разных сроках ранозаживления.

## ВЫВОДЫ

### 1. Клиническая часть

- I. У пациентов с нейропатическими ранами нарушен нормальный процесс ороговения: формируется патологически утолщенный эпидермис с наличием пролиферирующих клеток в дифференцированных слоях.
- II. Кожа края нейропатических ран экспрессировала  $\alpha 7nAChR$  во всех слоях, плотность окрашивания увеличивалась к 24 дню терапии, когда рана находилась в стадии эпителизации, что свидетельствует о преобразовании фенотипа кератиноцитов в миграционный. Экспрессия  $\beta$ -адренорецепторов увеличивалась к 24 дню терапии, таким образом, запускался путь терминальной дифференцировки.
- III. Все слои эпидермиса раневого дефекта основной группы активно пролиферировали на условно разделенных стадиях раневого процесса (0, 10, 24 сутки), что приводило к патологическому утолщению кожи. Край раны экспрессировал цитокератин 10 (маркер дифференцировки), а плотность окрашивания увеличивалась на фоне лечения. Экспрессия цитокератина K17 (активированные клетки) количественно не менялась, что свидетельствует о низком миграционном потенциале кератиноцитов края нейропатических ран.
- IV. На фоне лечения за период наблюдения отмечено статистически значимое сокращение площади раневых дефектов, а у ряда пациентов удалось достигнуть полной эпителизации.

### 2. Экспериментальная часть

- I. Патология немиелинизированных С-волокон формировалась с 7-х суток стрептозотоцин-индуцированной гипергликемии и к 56-м суткам время отдергивания хвоста увеличивалось в 2 раза по сравнению с группами контроля.
- II. Скорость заживления ран статистически не различалась у животных контрольной и диабетической групп, однако ни у одной крысы с СД к 24-м суткам не отмечено окончательного заживления раневого дефекта.
- III. При окраске гематоксилин-эозином отмечена картина заживления вторичным натяжением под струпом с последовательной сменой фаз раневого процесса и краевой эпителизацией.
- IV. Клетки края раны животных с СД избыточно пролиферировали на фоне замедления сокращения площади дефекта в отличие от групп сравнения, в которых процесс эпителизации к 24 дню был практически завершен. Достоверных отличий в плотности окрашивания  $\beta 2$ -AR в кератиноцитах между группами не отмечено.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенты с высоким риском нейропатической формы синдрома диабетической стопы должны пользоваться сложной ортопедической обувью, индивидуальными стельками во избежание рецидива раневого дефекта в связи с нарушением процесса корнизификации и формированием непрочного рубца.
2. Основным методом лечения является разгрузка пораженной конечности при помощи имеющихся и подходящих пациенту приспособлений для достижения максимальной приверженности к лечению.

### Список работ, опубликованных автором по теме диссертации:

1. Артемова Е. В. и др. Механизмы нейрогуморальной регуляции клеточного цикла кератиноцитов при сахарном диабете // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19. – №. 5. – С. 366-374.
2. Артемова Е.В., Абдульвапова З.Н., Бердалин А.Б., Горбачева А.М., Токмакова А.Ю., Гаврилова С.А., Галстян Г.Р. (Artemova E.V., Abdulvapova Z.N., Berdalin A.B., Gorbacheva A.M., Tokmakova A. Yu., Gavrilova S.A., Galstyan G.R.) Non-neuronal control of proliferation and migration of keratinocytes on site of ulceration // 54th EASD Annual Meeting Abstract Book (2018 г.).
3. Артемова Е.В., Джемилова З.Н., Горбачева А.М., Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю., Бердалин А.Б., Гаврилова С.А. Влияние периферической нервной системы на пролиферацию и миграцию кератиноцитов в околораневой зоне // Сахарный диабет. — 2024. — Т. 27. — №2. — С.104-112. doi: 10.14341/DM13123.
4. Артемова Е.В., Абдульвапова З.Н., Бердалин А.Б., Горбачева А.М., Клочихина Е.М., Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю. Гаврилова С.А. Нейропатические раны у пациентов с синдромом диабетической стопы: динамика клинических и гистологических характеристик // Материалы конгресса "III Всероссийский эндокринологический конгресс с международным участием: Инновационные технологии в эндокринологии" (2017 г.).
5. 2018 Non-neuronal control of proliferation and migration of keratinocytes on site of ulceration Ekaterina Artemova, Zera Abdulvapova, Evgeniy Ivanov, Anna Gorbacheva, Alla Tokmakova, Svetlana Gavrilova, Gagik Galstyan в сборнике Diabetic Foot Study Group of the EASD 15th Scientific Meeting. Programme and Abstracts, место издания Berlin, Germany, тезисы, с. 62-62.
6. 2017 Influence of peripheral nervous system on proliferation and migration of keratinocytes on site of ulceration Ekaterina Artemova, Zera Abdulvapova, Gagik Galstyan, Alla Tokmakova, Anna Gorbacheva, Alexander Berdalin, Maria Morozova, Svetlana Gavrilova в сборнике Diabetic Foot Study Group of the EASD: 14th Scientific Meeting, Programme and Abstracts, место издания Porto, Portugal, тезисы, с. 63-63.
7. Иванов Е.В., Гаврилова С.А., Морозова М.П., Клочихина Е.М., Ердяков А.К., Горбачева А.М., Джемилова З.Н., Артемова Е.В., Галстян Г.Р., Кошелев В.Б. Механизмы ранозаживления у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом // Проблемы эндокринологии. – 2018. – Т. 64. – №. 5. – С. 292-298.
8. Абдульвапова З.Н., Артемова Е.В., Горбачёва А.М., Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю., Гаврилова С.А. Сравнительная оценка различных моделей дистальной диабетической полинейропатии у крыс: преимущества и недостатки // Проблемы эндокринологии. – 2018. – Т. 64. – №. 3. – С. 188-193.
9. Артемова Е. В. и др. Нейрогуморальная регуляция репарации тканей при сахарном диабете. – 2022. Монография. ООО издательство "Курс".

10. Ключихина Е. М. и др. Электрическая активность сетчатки у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом //Сахарный диабет. – 2018. – Т. 21. – №. 5. – С. 356-363.
11. Морозова М. П. и др. Динамика вариабельности ритма сердца у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом //Сахарный диабет. – 2019. – Т. 22. – №. 1. – С. 44-52.
12. Артемова Е. В. и др. Не-нейрональный контроль пролиферации и миграции кератиноцитов в околораневой зоне нейропатических ран //Сахарный диабет-пандемия XXI. – 2018. – С. 235-236.
13. Горбачева А. М. и др. оценка болевой чувствительности и скорости ранозаживления у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом //Сахарный диабет-пандемия XXI. – 2018. – С. 503-504.
14. Морозова М. П. и др. Развитие нейропатии вегетативного отдела нервной системы у крыс в модели стрептозотоцин-индуцированного диабета //Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. ИП Павлова с международным участием. – 2017. – С. 1380-1382.

### **Список сокращений и условных обозначений**

nAChR - никотиновый ацетилхолиновый рецептор (н-холинорецептор)  
 $\beta$ 2-AR – бета2-адренорецептор  
 $\beta$ 1-AR – бета1-адренорецептор  
АТ – антитела  
DAF - 3, 3'-диаминобензидин, система визуализации для иммуногистохимии  
Ki-67 - маркер пролиферативной активности  
HbA1c – гликированный гемоглобин  
TcPO<sub>2</sub> – транскутанное напряжение кислорода  
ИК – интактный контроль  
СТЗ – стрептозотоцин  
ЦБ – цитратный буфер