

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЭНДОКРИНОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Артемова Екатерина Викторовна

НЕЙРОГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕПАРАЦИИ РАН У
ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

3.1.19 – Эндокринология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
д.м.н. Галстян Г.Р.

Москва – 2024 г.

Оглавление		1
Введение		3
ГЛАВА 1. Обзор литературы		17
1.1	Физиология раневого процесса.....	22
1.2	Патогенетические аспекты формирования хронических ран....	24
1.3	Кератиноциты и раневой процесс.....	27
	1.3.1 Дифференцировка кератиноцитов.....	29
	1.3.2 NF- κ B.....	30
	1.3.3 FOXO1.....	31
	1.3.4 TIG3	31
1.4	Нервные регуляторные влияния.....	34
	1.4.1 Катехоламинэргическая система.....	35
	1.4.2 β –адренорецепторы	35
	1.4.3 D-2 рецепторы	37
	1.4.4 Глутаматэргическая передача	37
	1.4.5 Холинэргическая система	38
	1.4.6 Регуляция местного иммунного статуса.....	41
1.5	Заключение.....	43
Глава 2. Материалы и методы исследования		44
2.1	Дизайн исследования.....	48
2.2	Лабораторные и инструментальные методы исследования.....	56
2.3	Лечение пациентов.....	60
2.4	Статистический анализ данных.....	60
Глава 3. Результаты I исследования		61
3.1	Характеристики основной группы и групп сравнения.....	62

3.2	Патоморфологическое исследование образцов кожи.....	65
3.3	Иммуногистохимическое исследование.....	66
	3.3.1 Окрашивание антителами к Ki-67.....	66
	3.3.2 Окрашивание антителами к $\alpha 7nAChR$	67
	3.3.3 Окрашивание антителами к бета2-адренорецепторам.....	68
	3.3.4 Окрашивание антителами к цитокератину 10	68
	3.3.5 Окрашивание антителами к цитокератину 17.....	69
	3.3.6 Окрашивание антителами к тирозингидроксилазе.....	70
	3.3.7 Окрашивание антителами к везикулярному ацетилхолиновому транспортеру.....	71
Глава 4. Результаты исследования II: эксперимент для изучения динамики заживления ран у крыс с индуцированным стрептозотоцином сахарным диабетом.....		73
4.1	Динамика ранозаживления.....	73
4.2	Морфологический анализ заживления раны.....	74
4.3	Иммуногистохимический анализ заживления ран.....	75
Глава 5. Обсуждение полученных результатов.....		77
5.1	Обсуждение результатов исследования I.....	77
5.2	Обсуждение результатов исследования II	83
Заключение.....		85
Выводы.....		87
Практические рекомендации.....		88
Список сокращений и условных обозначений.....		89
Список литературы.....		91

ВВЕДЕНИЕ

Развитие осложнений сахарного диабета (СД) приводит к значимым социально-экономическим потерям. По данным международной федерации диабета (IDF) распространенность сахарного диабета (СД) среди взрослого населения планеты (20-79 лет) составляет около 9% или, в абсолютных цифрах, 415 миллионов человек. По прогнозам экспертов, к 2040 году их число достигнет 642 миллионов. Неуклонный рост числа пациентов с СД ставит новые задачи по разработке эффективных лекарственных средств и форм их доставки, методов своевременного выявления и профилактики развития заболевания. По данным IDF, в России 12,1 млн больных страдают СД, тогда как зарегистрировано всего около 4 млн пациентов. На сегодняшний день, осложнения СД являются серьезной медико-социальной проблемой, поскольку приводят к значимым социально-экономическим потерям. Проблема оказания помощи больным с поражениями стоп является одной из самых актуальных, а число ампутаций нижних конечностей в большинстве развитых стран неуклонно растет. Это ведет к увеличению числа инвалидов, высокой смертности лиц с диабетом, существенным образом увеличивает расходы здравоохранения и социального обеспечения. Диабетическая полинейропатия (ДПН) является одним из наиболее распространенных поздних осложнений сахарного диабета, а также главной причиной формирования язвенных дефектов стоп [66]. Данные по распространенности нейропатии среди лиц с СД варьируют от 28% до 65%, в зависимости от длительности заболевания и методов диагностики. Начальные признаки повреждения периферической нервной системы, при проведении пункционной биопсии кожи, обнаруживаются уже у 13% у лиц с преддиабетом [67].

Сочетанное поражение нервной системы, магистрального сосудистого русла и системы микроциркуляции у пациентов с сахарным диабетом определяет специфику течения репаративного процесса. Успешная репарация невозможна без последовательно сменяющихся друг друга фаз: воспаления,

пролиферации и заживления. Продолжительность воспалительного ответа является определяющим в процессе репарации; провоспалительные сигналы играют пусковую роль в каскаде реакций, предшествующих эпителизации и, если воспаление принимает персистирующий характер, рана становится хронической. Понимание патогенетических механизмов, происходящих при повреждении ткани у пациентов с СД, лежит в основе разработки оптимальной лечебной стратегии.

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. Однако современное представление о роли нервной регуляции иммунного ответа и репарации в ответ на повреждение является весьма поверхностным.

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 артериоло-венозных 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 [68] и прогениторными мезенхимальными клетками являются высокочувствительными, а клиническая эффективность и безопасность не доказана [69].

Центральная нервная система влияет на иммунную систему путём секреции гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, а также посредством прямых нервных влияний через симпатическую и парасимпатическую нервную систему. Таким образом, гормоны, циркулирующие в системном кровотоке или локально секретлируемые нейротрансмиттеры и нейропептиды регулируют основные иммунные функции, такие как презентации антигена, секреция цитокинов и антител, созревание и селекция основной массы Т лимфоцитов: Т-хелперов (Th) 1 или ответ Th2, активность лимфоцитов, пролиферацию и хемотаксис к зоне повреждения. Значительное число экспериментальных работ на мышинных моделях посвящено исследованию процесса репарации на фоне хронического стресса [70]. Эти исследования подтверждают, что нервная система может играть определяющую роль в регуляции восстановления целостности кожи. Высвобождающиеся нейропептиды участвуют во многих воспалительных процессах, которые принципиально важны для нормального заживления ран, такие как пролиферация клеток, продукция провоспалительных цитокинов и факторов роста, неоваскулогенез [71,72]. Опираясь на данные фундаментальных исследований, закономерно будет предположить, что повреждение периферической нервной системы влияет на успешный регенеративный процесс.

Научная значимость решения проблемы заключается в выявлении патологических процессов, обуславливающих развитие и персистенцию хронических ран при сахарном диабете. Понимание этих процессов позволит создать необходимую научную базу для поиска и создания новых мишеней для фармакотерапии.

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 (β 2-AR, α 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 (β 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 исследования

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 [73]. 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.

Возможности регенеративной медицины на данный момент ограничены отсутствием фундаментальных знаний патогенеза репарации ткани при длительном воздействии гипергликемии, что может обуславливать неуспех применения данной терапии у лиц с сахарным диабетом [69]. Важнейшим аспектом доклинических исследований является определение четких критериев инструментальной диагностики ДПН для своевременного выявления обратимых и необратимых функциональных нарушений, а также морфологических изменений на клеточном уровне. Моделирование дистальной ДПН у животных позволяет анализировать различные стороны

патогенеза этого распространенного осложнения СД и открывает возможность поиска и разработки новых лекарственных препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Кератиноциты являются основным клеточным компонентом эпидермиса, осуществляющими барьерную функцию между внешней средой и внутренней средой организма, играют важную роль в репаративном процессе. Повреждение целостности кожного покрова способствует активации кератиноцитов, что запускает каскад реакций, способствующих изменению фенотипа этих клеток, что происходит параллельно с изменениями способности кератиноцитов к адгезии и конфигурации цитоскелета, тем самым определяет их миграционный потенциал [78, 79].

Исследования коллектива авторов показывают, что морфологические отличия хронических от острых ран характеризуются гиперпролиферацией эпидермиса. Кератиноциты хронической раны сохраняют способность к пролиферации, однако утрачивают способность к миграции в раневое ложе, что препятствует успешному заживлению раневого дефекта. Однако эти исследования не описывают возможного нейрорегуляторного влияния на клеточный цикл кератиноцитов и детально не рассматривают возможных нарушений регуляции жизненного цикла клеток при повреждении периферической нервной системы.

Периферическая нервная система играет важную роль в развитии воспалительного ответа в тканях путём регуляции активности местной иммунной системы. По данным ряда экспериментальных исследований, эфферентное звено парасимпатической нервной системы оказывает «противовоспалительное» действие путём воздействия на различные подтипы рецепторов к ацетилходину (nAChR), находящихся на поверхности различных иммунокомпетентных клеток, модулируя тем самым их активность. Активация $\alpha 7$ nAChR подавляет продукцию провоспалительных цитокинов путем снижения транслокации ядерного фактора NF-kB [8-10].

Открытым также остаётся вопрос, когда начинает повреждаться периферическая нервная система при сахарном диабете, какой тип нервного волокна и отдел нервной системы (симпатическая или парасимпатическая) вовлекается в процесс повреждения первым и как изменяется метаболизм нервных медиаторов на различных стадиях физиологической репарации. Ответ на эти вопросы может позволить разработать персонифицированный алгоритм терапевтического воздействия по результатам иммуногистохимического типирования образцов ран.

В настоящее время активно исследуются нейрогуморальные влияния на кератиноциты в острых ранах, проводятся эксперименты по внедрению некоторых терапевтических подходов, основанных на полученных наблюдениях. На данный момент известно, что в дифференцировке кератиноцитов нервные регуляторные влияния играют важную роль. Так, активация альфа – 7n рецепторов ацетилхолина на кератиноцитах приводит к синтезу внеклеточного матрикса эпидермиса и активируют транскрипцию многих генов, отвечающих за дифференцировку [81]. Также на миграцию и пролиферацию кератиноцитов могут влиять пути, запускаемые с их бета-адренорецепторов. Активированному фенотипу свойственны характерные изменения цитоскелета и рецепторов клеточной поверхности, необходимые для успешной реэпителизации. Экспрессия кератина К6 и К16 способствует реорганизации кератиновых филаментов в клетках на краях раны, дальнейшему изменению цитоархитектоники клетки, что позволяет кератиноцитам мигрировать в раневое ложе и заполнить дефект [82].

Влияние описанных сигнальных путей на процессы репарации тканей в острой ране сейчас только изучается, в хронической – остается неизученным; поэтому эта относительно новая область исследований является перспективной как с научной, так и с клинической (потенциальная разработка ранозаживляющих препаратов) точек зрения.

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.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первая часть работы выполнена на базе ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России и кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». В исследования включено 25 пациентов с нейропатической формой СДС и 5 пациентов без диабета с пролежнями. Пациентам основной группы проводилось лечение согласно стандартам: обработка раневых дефектов, наложение атравматических повязок, разгрузка пораженной конечности. Всем пациентам оценивалась тяжесть периферической нейропатии по шкалам NDS. В ходе обработки на 0 и 24 день проводилась пункционная биопсия края раны для последующего гистологического исследования.

Вторая экспериментальная часть работы выполнялась на базе кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины (ФФМ) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Исследование выполняли на 70 самцах белых беспородных крыс. Животных содержали в условиях вивария с регулируемым световым режимом. Сахарный диабет моделировали однократной внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина. На 42-е сутки крысам ниже левой лопатки наносили круглую рану диаметром 2 см. Забор проб кожи проводили на 8, 16 и 24-е сутки после моделирования раны.

Полученные фрагменты кожи пациентов и лабораторных животных фиксировали, дегидратировали и заливали парафином по стандартной методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, в дальнейшем образцы подвергались иммуногистохимическому окрашиванию.

В ходе исследования применялись методы, соответствующие поставленным задачам, в работе использовались современные статистические методы. Подробнее методология и методы представлены в главе 2.

Степень достоверности

Достоверность изложенных в настоящем исследовании положений, выводов и рекомендаций подтверждаются тщательным анализом научно-исследовательских работ по репарации тканей у пациентов с сахарным диабетом; согласованностью полученных результатов с известными данными; применением методов исследования с доказанной эффективностью; проведением гистологических методов согласно стандартам и с современными средствами измерений; применением статистического анализа для обработки полученных данных. Выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации, соответствуют поставленным задачам, научно обоснованы и вытекают из представленных результатов исследования.

Апробация результатов

Работа выполнена на базе отделения Диабетической стопы (зав. отделением, д.м.н. Галстян Г.Р.) ГНЦ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (директор - д.м.н., профессор, член-корр. РАН Мокрышева Н.Г.).

Официальная апробация диссертационной работы состоялась на межкафедральном заседании сотрудников кафедр “Эндокринологии”, “Диабетологии и диетологии” и “Детской эндокринологии-диабетологии” Института высшего и дополнительного профессионального образования ГНЦ 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.

Публикации ГОСТ

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., Abdulvarova 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., Ключихина 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 Abdulvarova, 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., Ключихина 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.

Внедрение результатов исследования в практику

На основании полученных данных отработана методика забора и маркировки тканей для дальнейшего гистологического исследования.

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-анамнестических данных, лично систематизировал данные историй болезни, подготовил базу данных пациентов, самостоятельно проводил диагностику дистальной полинейропатии и конфокальную микроскопию роговицы у исследуемой группы пациентов, 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), участвовал в мониторинге состояния раневого процесса у исследуемой группы

пациентов, провел статистическую обработку и интерпретировал полученные результаты, оформил их в виде публикаций и научных докладов.

Литературный и клинический опыт сформулированы автором в практических рекомендациях и алгоритме ведения пациентов с сахарным диабетом и нейропатической формой синдрома диабетической стопы.

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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ВВЕДЕНИЕ

История изучения нервной регуляции клеточного цикла и процессов репарации ткани берёт начало в дерматологии и базируется на исследованиях патогенеза кожных заболеваний, таких как атопический дерматит, экзема, псориаз [1], а также злокачественных новообразований кожи [2].

Кератиноциты являются основным клеточным компонентом эпидермиса, осуществляющим барьерную функцию, играют важную роль в репаративном процессе, и, как показывают данные последних исследований, способны секретировать многие стероидные гормоны *de novo* [3]; [4]. Повреждение целостности кожного покрова приводит к активации кератиноцитов, запускает каскад реакций, способствующих изменению фенотипа клеток эпидермиса, приводят к их миграции и пролиферации, что происходит параллельно с изменениями способности к адгезии и конфигурации цитоскелета [5]; [6].

Исследования коллектива авторов показывают, что морфологические отличия хронических от острых ран характеризуются гиперпролиферацией эпидермиса. Как правило, эпидермис хронической раны (венозные язвы, пролежни, раны у пациентов с сахарным диабетом) утолщен и представлен гиперпролиферативными, митотически активными клетками. Кератиноциты хронической раны сохраняют способность к пролиферации, однако утрачивают способность к миграции в раневое ложе, что препятствует успешному заживлению раневого дефекта. Наличие паракератоза свидетельствует также о нарушении процесса дифференцировки в верхних слоях эпидермиса [7]. В настоящее время выяснены далеко не все механизмы нормальной регуляции клеточного цикла кератиноцитов и его нарушений при формировании хронических ран, в частности, при сахарном диабете. В данном обзоре литературы рассмотрены механизмы нейрогуморальной регуляции клеточного цикла кератиноцитов в процессе эпителизации.

Нейрогенная регуляция трофики тканей конечностей осуществляется, в основном, двумя типами немиелинизированных волокон - симпатическими и сенсорными.

Симпатическая нервная система контролирует скелетный гомеостаз, главным образом, через адренергические рецепторы (АР), которые представлены на костных клетках-мишенях: остеобластах и остеокластах. [84,85]. Распределение симпатических нервов в скелете млекопитающих до сих пор плохо описано, присутствие симпатического звена периферической нервной системы определяется на уровне бедренной кости. Симпатические периостальные волокна разветвляются в костном мозге и компактной кости, о чем свидетельствует иммуногистохимическая позитивность тканей в отношении тирозингидоксилазы (ТГ), нейропептида Y. Мелкие ветви периостальных нервных волокон, проходящие через кортикальную кость, связаны с кровеносными сосудами фолькмановского и гаверсова каналов. Некоторые могут проходить через паренхиму костного мозга и заканчиваться на стенках синусоидов, периваскулярных стромальных клетках. ТГ-иммунореактивные волокна обычно имеют спиральную морфологию и охватывают кровеносные сосуды, с которыми они связаны. В целом, области минерализованной кости, которые подвергаются наибольшему механическому воздействию и нагрузке, имеют самую высокую скорость метаболизма и костного обмена. Они также наиболее васкуляризованы и имеют самую высокую плотность симпатических и сенсорных волокон. И надкостница, и костный мозг получают норадренергические волокна (часто связанные с сосудистой сетью), а также вазоактивные интестинальные полипептид (ВИП)-иммунореактивные волокна (часто связанные с паренхимой).

Периферическая нервная система играет важную роль в развитии воспалительного ответа в тканях путём регуляции активности местной иммунной системы (рис 1.). По данным литературы (экспериментальные исследования), эфферентное звено парасимпатической нервной системы

оказывает «противовоспалительное» действие путём влияния на различные подтипы рецепторов к ацетилхолину (nAChR), находящихся на поверхности иммунокомпетентных клеток, модулируя тем самым их активность. Активация $\alpha 7$ nAChR подавляет продукцию провоспалительных цитокинов путем снижения транслокации ядерного фактора NF-kB [8]; [9]; [10].

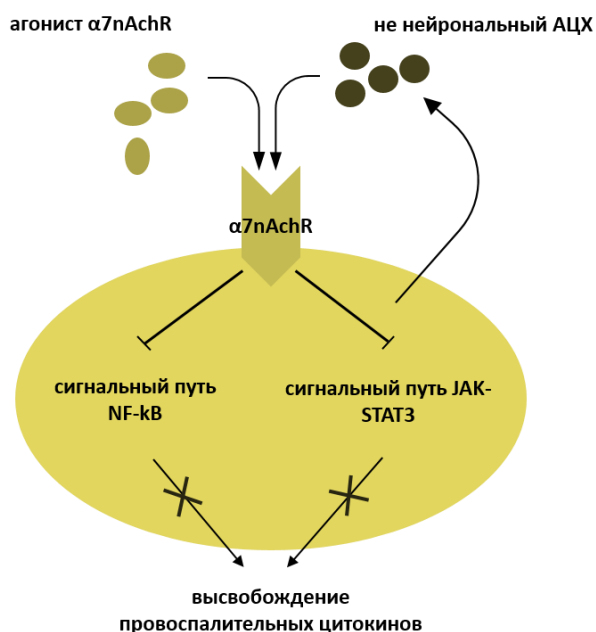


Рисунок 1. Регуляция синтеза провоспалительных цитокинов.

Повреждение целостности тканей приводит к выбросу провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1- α , и IL-1 β из активированных иммунных клеток. Высвобождение основных нейромедиаторов и нейропептидов [11]; [12] начинается с первых секунд после повреждения целостности кожного покрова, когда вазоактивные вещества начинают выделяться из чувствительных нервных волокон. Нейропептиды осуществляют местную иммуномодуляцию, также как оказывают влияние на пролиферацию и дифференцировку клеток-мишеней, задействованных в заживлении ран [13].

В настоящее время активно исследуются нейрогуморальные влияния на клеточный цикл кератиноцитов в острых ранах, проводятся эксперименты по внедрению некоторых терапевтических подходов, основанных на полученных

данных. Известно, что в дифференцировке кератиноцитов нервные регуляторные влияния играют важную роль. Так, активация $\alpha 7nAChR$ на кератиноцитах (рис. 2) приводит к синтезу внеклеточного матрикса эпидермиса и активируют транскрипцию многих генов, отвечающих за дифференцировку[14].

Также на миграцию и пролиферацию кератиноцитов могут влиять пути, запускаемые путем активации бета-адренорецепторов с поверхности клетки. Активированному фенотипу свойственны характерные изменения цитоскелета и рецепторов клеточной поверхности, необходимые для успешной реэпителизации. Экспрессия кератина К6 и К16, К17 способствует реорганизации кератиновых филаментов в клетках, образующих край раны, дальнейшему изменению citoархитектоники клетки, что позволяет кератиноцитам мигрировать в раневое ложе и заполнить дефект [15].

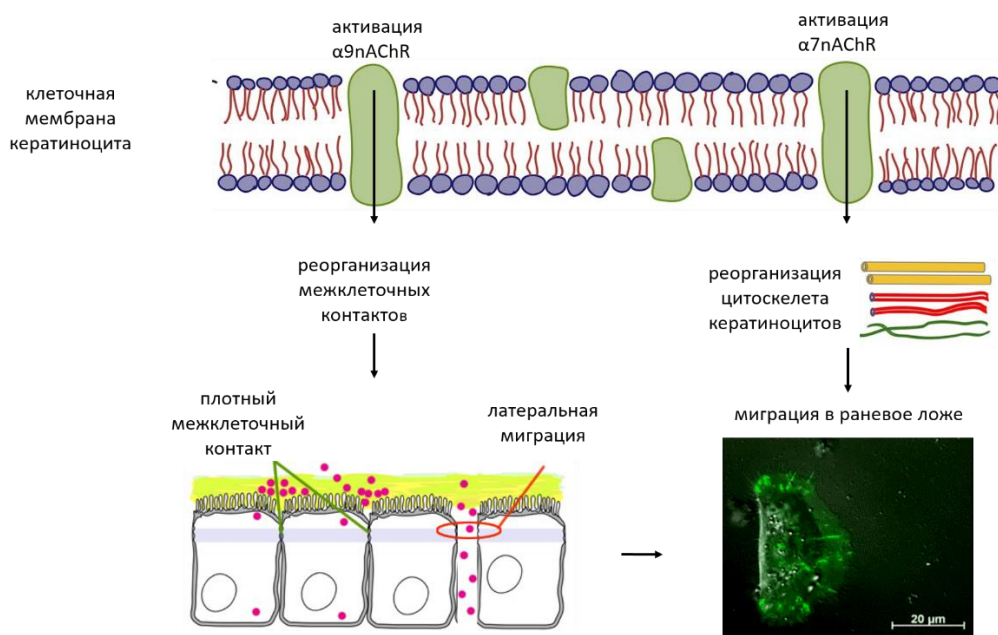


Рисунок 2. Управляемая миграция кератиноцитов.

Таким образом, изучение нервной и гуморальной регуляции процессов репарации тканей открывает перспективы новых терапевтических подходов в лечении пациентов с хроническими ранами.

1.1. ФИЗИОЛОГИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА

Раны – это нарушение целостности кожных покровов и слизистых оболочек с возможным одновременным повреждением глубже лежащих тканей и органов. Их можно классифицировать по многим признакам: причинам возникновения, виду травмирующего агента, наличию в ране микрофлоры, отношению раны к естественным полостям организма, воздействию дополнительных повреждающих факторов и т.д.

При повреждении целостности кожного покрова в ране начинается распад белков, анаэробный гликолиз с накоплением патологических продуктов обмена – гистамина, серотонина, кининов, молочной и пировиноградной кислот, углекислоты и других токсических веществ, развивается ацидоз тканей [16]. Известно, что свеженанесенная асептическая рана имеет щелочную реакцию среды, гнойная – кислую ($\text{pH} < 7$), а хронические раны характеризуются сдвигом pH в сторону алкалоза ($\text{pH} > 7$). Оптимальная активность фибробластов была обнаружена при pH от 6,9 до 7,8, а эпителиоцитов, напротив, в кислой среде ($\text{pH} < 7,0$) [17]. Происходящие патологические изменения приводят к вазодилатации, возникают гиперемия и отек окружающих тканей, лейкоциты мигрируют из сосудов в поврежденные ткани раны. Набухание клеточных коллоидов приводит к разрыву клеточных мембран и вторичной гибели клеток, наблюдается и нарастает ферментативный протеолиз лейкоцитов и других клеток (протеазами, лизоцимом, липазой), а также ферментами микробного происхождения. Протеолитические ферменты ускоряют процесс распада белков некротизированных клеток до пептидов и аминокислот, способствуя лизису некротических тканей и очищению раны [16].

В течении раневого процесса различают три фазы: воспаления, пролиферации и заживления (рис.3).

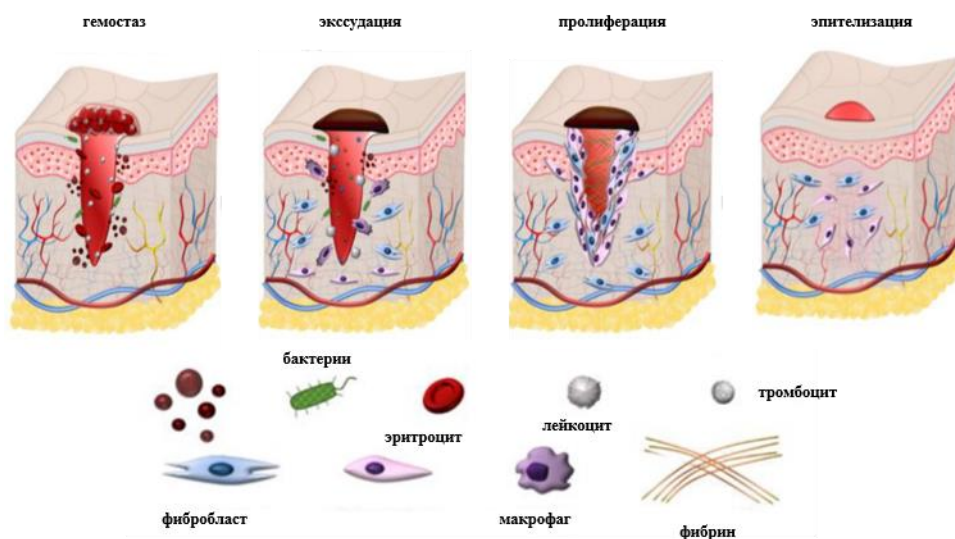


Рисунок 3. Стадии раневого процесса, адаптировано из [86].

Первая фаза, воспаление, приводит к отторжению омертвевших участков тканей, их удалению и очищению раны. Преобладает отек тканей, экссудация, миграция в ткани и в экссудат лейкоцитов, которые, инфильтрируя ткани вокруг зоны некроза, формируют лейкоцитарный вал, отграничивающий рану от окружающих неповрежденных тканей. Ведущую роль на этом этапе играют тромбоциты: они стабилизируют состояние свежей раны путем образования тромбов, они же активируют компоненты комплемента и секретируют цитокины, которые в свою очередь, привлекают в очаг поражения нейтрофилы и другие клетки [18]. Нейтрофилы очищают раневое ложе от детрита, секретируя протеолитические ферменты (матриксные металлопротеиназы, эластазу, катепсин G), антимикробные пептиды, активные формы кислорода и цитокины. В этом также участвуют тучные клетки, лейкоциты и макрофаги, которые фагоцитируют бактерии и омертвевшие ткани. Также важно отметить, что продуцируемые кератиноцитами, нейтрофилами и макрофагами в ответ на микробную стимуляцию Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptor) и антимикробные пептиды (AMPs), такие как β -дефенсины, кателицидины и др. ускоряют заживление ран, стимулируют миграцию кератиноцитов, их пролиферацию и продукцию хемо- и цитокинов [19]. Также важным звеном регуляции на этом

этапе является холинергическая регуляция, подавляющая витамин-D-опосредованный синтез cAMP и провоспалительный каскад [20]. Таким образом, становится ясно, что в течении раневого процесса важную роль играет состояние общего и местного иммунитета и его невральная регуляция.

В фазе пролиферации, которая в норме наступает на 2–3 сутки, на фоне продолжающегося некролиза и очищения раны начинаются пролиферативные процессы с образованием сосудов и грануляционной ткани. На этой стадии важнейшую роль играют макрофаги, которые индуцируют миграцию фибробластов, синтез коллагена и ангиогенез [18]. Макрофаги на этой стадии секретируют множество цитокинов и ростовых факторов, таких как TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, ILGF-1, PDGF, VEGF, TGF α , TGF β и CSF1 [19]. Вновь образуемые капилляры растут от дна раны к её поверхности, вскоре они загибаются в виде петли и продолжают расти в обратном направлении, т. е. в глубь формирующихся грануляций. Фибробласты формируют коллагеновые волокна из поступающих в клетки аминокислот. Также они синтезируют мукополисахариды (гиалуроновая, хондроитинсерная кислоты, глюкозамин) [16]. Именно в этот период наблюдается максимальная экспрессия в ране таких маркеров пролиферативной активности, как СК-14 (экспрессируется во всех слоях эпидермиса, его количество линейно связано с уровнем дифференцировки клеток и нарастает по направлению от рогового слоя к базальному) и Ki-67 (ядерный белок, является высокоселективным маркером пролиферативной активности).

На поверхности грануляционной ткани формируется гнойно-фибринозный экссудат, состоящий из погибших лейкоцитов и поверхностного слоя грануляций. Продолжается накопление коллагеновых волокон и формируемых эластобластами эластических волокон. Эти образования выполняют также защитную функцию по отношению к ране, препятствуя проникновению в глубь тканей микробов. Продолжается вторая фаза раневого процесса 2–4 недели.

Третья фаза – эпителизация и рубцевание раны характеризуется запустеванием сосудов в грануляционной ткани, уменьшением числа фибробластов, увеличением количества коллагеновых и эластических волокон и их реорганизацией. Одновременно происходит эпителизация: в этом участвует множество различных факторов роста, таких как PDGF, ILGF, EGF и др. [18]. Вновь образовавшийся эпителиальный покров не содержит волосяных фолликулов, сальных и потовых желез. Образование нервных волокон в ране происходит в течение 6 месяцев и более. Такой процесс заживления свойственен всем ранам, отличаются лишь темпы заживления. В этом отношении различают заживление первичным натяжением, вторичным натяжением и под струпом. Первичным натяжением заживают обычно линейные (резаные, послеоперационные) раны, особенно, если края их соединены швами. Такие раны быстро склеиваются тонкой фибриновой пленкой. Формирующиеся новые капилляры прорастают на противоположную сторону раны, как бы прошивая ее стенки. Небольшая раневая щель быстро заполняется грануляционной тканью, коллагеновыми и эластическими волокнами с формированием тонкого линейного рубца и быстрой эпителизацией [16].

Заживление вторичным натяжением наблюдается в случаях, когда края и стенки раны не соприкасаются друг с другом, отстоят на некоторое расстояние. Заживление проходит те же стадии, но более длительно, пока рана не выполнится грануляциями с последующей эпителизацией и рубцеванием, рубец при этом более широкий и массивный.

1.2 ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ РАН

В настоящее время хронические раны являются актуальной проблемой для медицины всего мира. В социальном плане они представляют собой значительную проблему, так как, помимо длительных госпитализаций, необходимости частого применения антибиотиков, хронического болевого

синдрома, требующего регулярного приёма анальгетиков, такие раны нередко приводят к инвалидизирующим ампутациям [19].

Несмотря на актуальность проблемы, единого определения хронической раны не существует до сих пор, поскольку патофизиологические механизмы развития хронических ран различны. Современные классификации основаны только на критерии времени: хронической считается рана, существующая более восьми недель [21].

Важнейшим фактором, способствующим хронизации раны, является ее бактериальная обсемененность. Согласно данным некоторых исследователей, в среднем, в язвах встречается от 1,6 до 4,4¹³⁻¹⁶ микроорганизмов. Также было показано, что в 86% язв, которые клинически не проявляют признаков инфицирования, обнаруживается более одного вида бактерий. Выделяют четыре стадии взаимодействия бактерий с хронической раной: контаминация, колонизация, критическая колонизация и инфекция. Самой важной является третья стадия, стадия критической колонизации, на которой число бактерий в ране становится достаточно большим для того, что препятствует её заживлению. При этом клинические критерии инфицирования разнятся. Рассмотрим те, которые касаются непосредственно синдрома диабетической стопы (СДС). Так, согласно «The Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care», рану считают инфицированной при наличии нагноения или наличия двух и более признаков воспаления и системной воспалительной реакции (перифокальной гиперемии, лейкоцитоза, системной гипертермии т.д.). По данным бактериологического посева раневого отделяемого в хронических ранах встречаются как энтеро-, стафило-, энтерококки, так и представители семейства *Pseudomonas* и многие другие. В 75% случаев, по данным ПЦР-анализа, встречаются коринебактерии. Естественно, что бактерии модифицируют естественный иммунный ответ, усиливают его и влияют на течение репарации тканей [22]. Кроме того, наличие некротических тканей и детрита в хронической ране создает идеальную среду для формирования очень устойчивых микробных биопленок

[23,24]. Такие биопленки представляют собой прочную ассоциацию бактериальных клеток и колоний с окружающим их матриксом. Наличие же такой «естественной» среды делает бактерии практически невосприимчивыми к антимикробному иммунитету [25]. Прогрессирующая демиелинизация и аксонопатия при длительном воздействии гипергликемии снижают местный иммунный статус в ответ на микробную инвазию, что характеризует низкий регенераторный потенциал существующей годами нейропатической раны.

Что же в хронической ране мешает протеканию нормального воспалительного ответа и препятствует заживлению? Во-первых, пришедшие в рану нейтрофилы и макрофаги являются постоянным источником протеаз, что приводит к деградации компонентов матрикса и ростовых факторов (таких как эпидермальный, тромбоцитарный фактор роста, $TGF\beta$ и др.). Во-вторых, лейкоциты, которые являются источником активных форм кислорода, делают окислительный потенциал среды крайне высоким, обуславливая тем самым процессы перекисного окисления [25].

В-третьих, фагоцитарная, хемотаксическая и бактерицидная функция лейкоцитов в хронической ране оказывается снижена, что может быть обусловлено интеграцией бактерий с неклеточным матриксом. В результате рана становится еще более уязвимой для инфекции. Почему же так происходит и не срабатывает описанный выше механизм синтеза MMPs через Toll-like рецепторы? Было показано, что экспрессия некоторых подтипов TLR (1, 2, 4, 6, 7, 8 и 13) связана с нарушенной репарацией. В некоторых типах хронических ран в принципе отсутствуют важнейшие AMPs (например, кателицидин при хронических венозных язвах нижних конечностей). В то же время, непосредственные причины и механизмы взаимодействия бактериальной флоры с местным иммунитетом остаются неизученными [19,25].

Важно сделать акцент на том, что хронические раны при СДС, помимо вышеуказанного, характеризуются дефектным ремоделированием экстрацеллюлярного матрикса [26], нарушением миграции кератиноцитов в раневую зону и, как следствие, процесса реэпителизации. Как было описано

выше, морфологические отличия хронических ран от здоровой кожи характеризуются гиперпролиферацией эпидермиса. Кератиноциты хронической раны сохраняют способность к пролиферации, однако утрачивают способность к миграции в раневое ложе, что препятствует успешному заживлению раневого дефекта [27]. Одной из возможных причин этого, помимо вышеуказанных, некоторые авторы считают ингибирование апоптоза среди фибробластов и кератиноцитов. Раневые дефекты у больных с СДС считаются «замершими», в одних случаях на фазе воспаления, в других - пролиферации. Существует мнение, что в подобных случаях происходит чрезмерная экспрессия фибронектина и тромбоспондина, что приводит к клеточной дисфункции и дизрегуляции [28].

Без сомнения, в здоровой коже нервная, эндокринная и местная иммунная системы находятся в тесной взаимосвязи, обеспечивая адекватный ответ на повреждение и микробную инвазию. При сахарном диабете вследствие воздействия хронической гипергликемии в процесс повреждения вовлекается как периферическая нервная система, так и система микроциркуляции, нарушается местный иммунный статус.

1.3 КЕРАТИНОЦИТЫ И РАНЕВОЙ ПРОЦЕСС

Кератиноциты являются важнейшими клетками покровной системы человека. Они образуют сложный комплекс клеток, выполняющих барьерную функцию и защищающих организм от физических, механических и химических воздействий, а также от бактерий, вирусов, грибов и паразитов. Эпидермальный барьер формируется кератиноцитами в ходе их дифференцировки, которая протекает в три этапа. Первый этап – замещение внутриклеточных органелл компактным протеиноподобным цитоскелетом, второй – формирование кросс-сшивок между белками по периферии клетки, что помогает создать корнифицированный «клеточный конверт», и третий – связывание отдельных кератиноцитов в многоклеточную, функционально пассивную структуру [29].

1.3.1 Дифференцировка кератиноцитов

Эпидермальные стволовые клетки располагаются в базальном слое эпидермиса и в основании волосяных фолликулов (рис.4). Проходя через асимметричное деление, они дают начало тем клеткам, которые не обладают пролиферативной активностью и сразу вступают на путь терминальной дифференцировки. В процессе отделения от базальной мембраны и достижения супрабазального слоя, происходит изменение экспрессии различных генов под влиянием p63 и других транскрипционных факторов. Такие клетки, помимо кератинов K5 и K14, синтезируемых пролиферирующими кератиноцитами, начинают синтезировать кератины K1 и K10. Затем, в процессе дифференцировки, экспрессия генного кластера, называемого «эпидермальным комплексом дифференцировки» (EDC), приводит к синтезу белков инволюкрина и лорикрина. Они сшиваются белками из семейства трансглутаминаз (TGase). TGase1, как главный фермент этого семейства, локализуется на клеточной мембране и участвует в создании структуры, называемой «корнифицированным конвертом». Филлагрин, также закодированный в EDC, является главным компонентом кератогиалиновых гранул, по которым зернистый слой и получил свое название. После дефосфорилирования и протеолиза профиллагрина, филлагрин распространяется по клетке и вызывает агрегацию промежуточных филаментов кератина. Механическая прочность рогового слоя обеспечивается за счет «корнифицированных конвертов» состоящих в основном из кератинов [29].

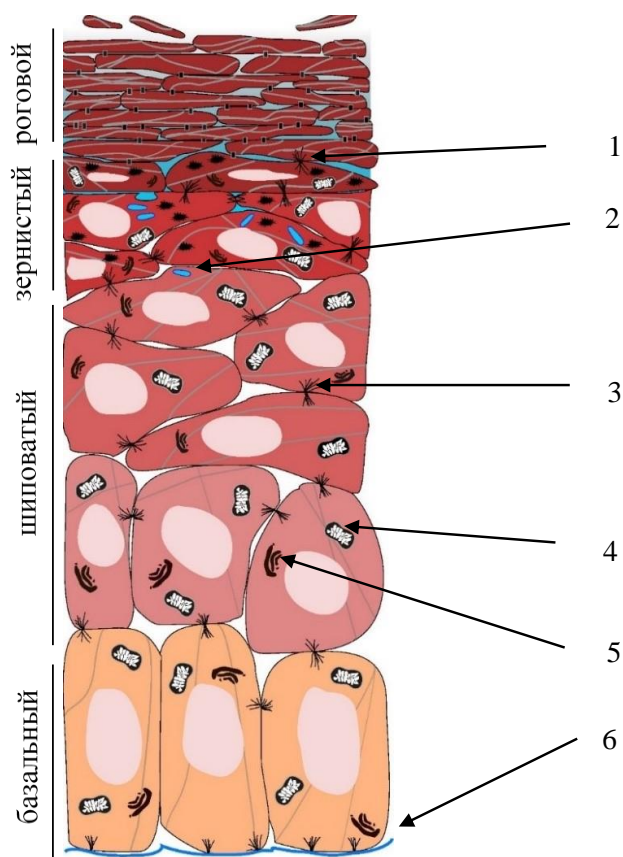


Рисунок 4. Строение эпидермиса. 1 – корнеодесмосомы, 2- ламеллярные гранулы, 3 – десмосомы, 4 – митохондрии, 5 – комплекс Гольджи, 6 – базальная мембрана. Адаптировано из [87].

Предполагается, что определенную роль в стимуляции роста и делении эпидермальных стволовых клеток играет ростовой фактор кератиноцитов (KGF). Он обнаруживается, в основном, в дерме и в небольших количествах в эпидермисе, и оказывает паракринное влияние на интактную и, особенно, поврежденную кожу. Необходимо отметить, что у мышей с генотипом KGF-рецептор $-/-$ наблюдалось значительное замедление эпителизации ран. В то же время, у мышей с генотипом KGF $-/-$ реэпителизация протекает без особенностей, что позволяет предположить наличие других активирующих лигандов у KGF-рецепторов. Самым подходящим кандидатом на роль такого лиганда является FGF-10, связывающийся с KGF-рецептором с высокой аффинностью. FGF-10 также обнаруживается и в поврежденной коже, однако, его количество остается неизменным. Возможно, это объясняется тем, что при

неизменном суммарном количестве FGF-10, возрастает доля его биоактивных молекул. Были продемонстрированы и многочисленные эффекты KGF, реализуемые через его влияние на экспрессию различных генов. Так, KGF стимулирует пролиферацию кератиноцитов посредством с-мус, SHL-1 и активин, стимулирует формирование грануляционной ткани с помощью VEGF, стимулируя ангиогенез, через стимуляцию глутатионпероксидазы и ферментов, восстанавливающих ДНК, стимулирует защитные механизмы в кератиноцитах и, наконец, через стромелизин-2 стимулирует миграцию кератиноцитов. Становится очевидно, что пути, запускаемые KGF, очень важны при заживлении ран [30].

1.3.2 NF-κB

Процесс дифференцировки кератиноцитов *in vivo* происходит после отделения клетки от базальной мембраны. Сигнал дифференцировки в этом случае поступает от свободных β1-интегринов. В то же время, такие интегрины могут индуцировать апоптотическую гибель клетки. Было показано, что NF-κB, транскрипционный фактор, обеспечивающий устойчивость к апоптозу, при дифференцировке клетки активируется и транслоцируется в ядро. NF-κB – это комплекс, сформированный путем гомо- и гетеродимеризации белков семейства NF-κB, таких как p50, p52, RelA (p65), RelB, и c-Rel. Множество триггеров активируют сигнальные пути, сходящиеся в точке активации IκB – киназного (IKK) комплекса, состоящего из IKK1 и IKK2 каталитических субъединиц и регуляторной единицы NEMO (также известной, как IKKγ). IKK комплекс фосфорилирует ингибиторные IκB белки NF-κB, отправляя их по пути протеосомальной деградации. Это приводит к активации NF-κB, собственно к транслокации NF-κB и его транскрипционной активности. Проапоптотическим антагонистом NF-κB в этом случае выступает белок семейства TNF (TNFR1). Имеются предположения о наличии NF-κB-зависимого сигнального пути, подавляющего TNFR1-зависимую активацию JNK, что приводит к эпидермальной гиперпролиферации. Суммируя все

вышесказанное, можно констатировать, что NF-κB в коже предотвращает TNFR1-зависимый путь апоптоза и воспаления, что позволяет реализовать процессы кернификации и формирования эпидермального барьера. В то же время, до сих пор не ясно, связан ли эффект NF-κB с антиапоптотическим эффектом альфа-катенина в супрабазальных клетках [29].

1.3.3 FOXO1

Недавно был обнаружен транскрипционный фактор FOXO1, который, по мнению исследователей, оказывает значительное влияние на дифференцировку кератиноцитов и реэпителизацию ран, регулируя экспрессию TGF-β, и защищая клетки от окислительного стресса. В отсутствие FOXO1 уровень повреждения клеток возрастает, снижается интенсивность миграции и пролиферации кератиноцитов в ране, а также возрастает количество апоптотических клеток, что суммарно приводит к нарушению реэпителизации [31].

1.3.4 TIG3

Тазаретон-индуцируемый ген 3 (TIG3) – белковый опухолевый супрессор. В эпидермисе он обнаруживается в дифференцированных, супрабазальных слоях и регулирует терминальные этапы дифференцировки. Он активирует трансглутаминазу 1 на клеточной мембране, а значит, обеспечивает формирование «кернифицированного конверта» и ингибирует деление центромер в митозе, чем нарушает функцию микротрубочек. Это дает основания считать TIG3 одним из ключевых генов в регуляции дифференцировки кератиноцитов.

В течение последних лет стало ясно, что некроз может быть таким же контролируемым процессом, как апоптоз, поэтому такой некроз называют некроптозом. Он реализуется через активацию киназ RIPK1 и RIPK3, являющихся проапоптотическими ферментами. Обычно активность этих киназ регулируется комплексом FADD/каспаза-8, связываясь с которым,

киназы инактивируются. У мышей с Fadd^{-/-} или Casp8^{-/-} генотипом после рождения в коже наблюдается повышенное число гибнущих клеток, развивается воспаление, нарушение кожного барьера, что в конечном итоге приводит к их гибели.

Кератиноциты в ходе реализации своего жизненного цикла проходят два основных пути: дифференциации и активации. В процессе дифференцировки они постепенно переходят от базального слоя к роговому слою, что сопровождается увеличением механической прочности и потерей клеточного ядра [43]. При заживлении ран и многих патологических состояниях кератиноциты активируются, превращаются в мигрирующие гиперпролиферативные клетки, которые производят и секретируют компоненты внеклеточного матрикса и сигнальные полипептиды. В то же время их цитоскелет также изменяется в результате производства определенных белков кератина. Эти изменения управляются факторами роста, хемокинами и цитокинами, продуцируемыми кератиноцитами и другими типами кожных клеток. Анализ этих процессов привел к предположению о существовании цикла активации кератиноцитов, в котором клетки сначала активируются путем высвобождения IL-1. Впоследствии они поддерживают активированное состояние за счет аутокринной выработки провоспалительных цитокинов. Согласно литературным данным цитокератины K6 и K16 - маркеры активного состояния. Сигналы от лимфоцитов в форме интерферона вызывают экспрессию K17 и заставляют кератиноциты сократиться, поменять свой фенотип на миграционный и переместиться в раневое ложе. Это позволяет кератиноцитам сокращать временную базальную мембрану, богатую фибронектином. Сигналы от фибробластов в форме TGF индуцируют экспрессию K5 и K14, возвращают кератиноциты к базальному фенотипу и, таким образом, завершают цикл активации. В хронических ранах регуляция клеточного цикла кератиноцитов нарушается, и рана «застревает» на той или иной стадии раневого процесса.

Цитокератины К5 и К14 экспрессируются в базальном, активно пролиферирующем слое, К1, К2 и К10 - в дифференцирующихся клетках. Пучки кератинов 1 и 10 одной стороной присоединяются к ядерной мембране, другой – к десмосомам, благодаря их полимеризации в процессе созревания кератиноциты уплощаются [44]. Однако в ответ на повреждение эпидермиса или при определенных патологических состояниях, таких как псориаз, для кератиноцитов открыт альтернативный путь активации [45,46,47,48]. На процесс активации могут влиять факторы роста и цитокины, такие как интерлейкин-1 (IL-1), фактор некроза опухоли α (TNF- α), трансформирующий фактор роста α (TGF- α), TGF- β и интерферон- γ (IFN- γ). Обычно активированные кератиноциты экспрессируют кератиновые белки К6, К16 и К17, отличные от кератинов здорового эпидермиса. Активированные кератиноциты изменяют свой цитоскелет, увеличивают уровни рецепторов клеточной адгезии и продуцируют компоненты базальной мембраны. Эти ответы необходимы для реэпителизации поврежденной области. Активированные кератиноциты также производят паракринные сигналы, оказывающие влияние на фибробласты, эндотелиальные клетки, меланоциты и лимфоциты, а также действуют аутокринно. В конце концов, отреагировав на повреждение, кератиноциты получают сигнал «деактивации» и возвращаются к нормальному пути дифференцировки.

Цитокератин К17 экспрессируется в различных здоровых эпителиях [49], включая миоэпителиальные клетки, базальные слои переходного эпителия дыхательных и мочевыводящих путей. Часто его можно обнаружить в клетках кожи при определенных патологических состояниях, включая такие заболевания, как псориаз, аллергические реакции и кожную Т-клеточную лимфому, а также в доброкачественных опухолях молочной железы, базальноклеточных эпителиомах, карциноме легких и некоторых других доброкачественных и злокачественных новообразованиях [50]. Общими характеристиками этих клеток является способность сокращаться и / или часто

изменять форму [49]. На поздних стадиях ранозаживления происходит сокращение межклеточного матрикса. Ключевую роль в этом процессе играют способные сокращаться фибробласты. Тем не менее, кератиноциты также имеют большое значение в стяжении межклеточного вещества. Приобретая способность сокращаться, они стягивают новообразованную богатую фибронектином базальную мембрану. Клеточный цикл кератиноцитов приведен на рис. 5.

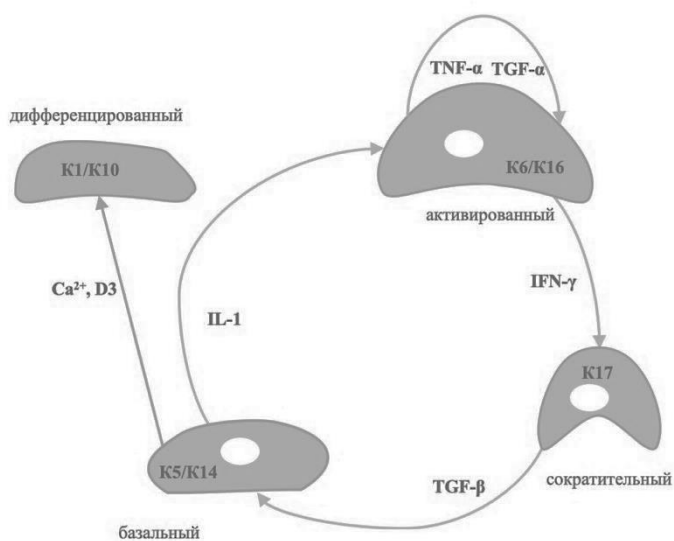


Рисунок 5. Схема клеточного цикла кератиноцитов. Изменение фенотипа клеток в ответ на гуморальную стимуляцию.

1.4 НЕРВНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ ВЛИЯНИЯ НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ КЕРАТИНОЦИТОВ

Важную роль в дифференцировке кератиноцитов играют нервные регуляторные влияния. Как показал ряд исследований, на миграцию и пролиферацию кератиноцитов могут влиять пути, запускаемые также бета-адренорецепторами. Стимуляция бета-2 адренорецепторов приводит, с одной стороны, к активации кальциевого каскада, приводящего к снижению направленной миграции кератиноцитов в ране, с другой стороны – к фосфорилированию и инактивации ERK-киназы, что снижает скорость миграции и замедляет эпителизацию [32][33].

1.4.1 Катехоламинэргическая система

1.4.2 β -адренорецепторы

Направленная миграция кератиноцитов крайне важна для реэпителизации раны и контролируется многими факторами. Одним из путей регуляции являются β -адренорецепторы (β aR).

β aR – трансмембранные белки, в большом количестве экспрессируемые недифференцированными кератиноцитами кожи человека. Они могут связываться как с $G_{\alpha s}$, так и с $G_{\alpha i}$ субъединицами в разных типах клеток, как повышая, так и понижая уровень cAMP. Ранее считалось, что катехоламины (агонисты адренорецепторов) синтезируются только в надпочечниках и пресинаптических симпатических нервных окончаниях. В настоящее время известно, что многие клетки, например, иммунные клетки и кератиноциты также способны синтезировать катехоламины самостоятельно [6]. Возможно, катехоламины являются своеобразным универсальным языком общения между иммунной и нервной системами, позволяя тканям быстро адаптироваться к изменениям в окружающей среде.

В ране кератиноциты способны ориентироваться благодаря так называемому гальванотаксису (своеобразному электрическому компасу, механизм действия которого основан на поступлении в клетку ионов кальция, активации PKA с вовлечением β 4-интегрина и рецептора EGF). β 2aR могут влиять на этот электрический «компас»: β 2-агонисты снижают гальванотаксис, а антагонисты, наоборот, повышают. Схожие результаты показаны в работах на крысах *in vivo*, и на кератиноцитах человека *ex vivo*. У крыс с дефектом в гене норадреналина наблюдалось замедление реэпителизации ран. Антагонисты β 2aR улучшали заживление ран *ex vivo* в человеческих кератиноцитах, усиливая фосфорилирование промиграторной и промитогенной ERK кератиноцитов, что приводило к усилению их пролиферации и миграции.

Некоторые воздействия, такие как ультрафиолетовое излучение и высокие температуры приводят к повышению экспрессии $\beta 2aR$ и $СAMP$ в кератиноцитах. В то же время, в эксперименте на монослойной культуре кератиноцитов было показано, что в ответ на нанесение раны (повреждения по типу царапины) в клетках снижается плотность $\beta 2$ -адренорецепторов в течение первого часа, но к 6 часу после повреждения возвращается к нормальным значениям (при этом добавление тимолола – адреноблокатора – препятствует этим колебаниям). Механические повреждения также снижают аффинность адренорецепторов к их лигандам и синтез катехоламинов самими кератиноцитами (за счет снижения количества тирозингидроксилазы и N-метилтрансферазы, необходимых для образования адреналина). В то же время, увеличивается содержание внеклеточного норадреналина.

Таким образом, повышенная концентрация внеклеточных катехоламинов за счет воздействия на $\beta 2$ адренорецепторы дозозависимо снижает подвижность кератиноцитов. При стимуляции бета-1 адренорецепторов в эксперименте такого эффекта не наблюдалось, в отличие от селективного $\beta 2$ -агониста ICI-118,551 [34].

Также в ряде исследований было показано, что агонисты $\beta 2aR$ снижают адгезивную способность нейтрофилов и препятствуют выработке ими активных форм кислорода [35]. Интересно, что такой же эффект наблюдается и при использовании антагонистов $\beta 2aR$. Эти парадоксальные данные объясняются особым строением $\beta 2aR$, способного к спонтанной активации. Как было показано, агонисты способны активировать рецептор, а антагонисты, связываясь с ним, могут стабилизировать его спонтанно активизировавшееся состояние.

Одним из наиболее важных процессов в репарации тканей является рост новообразованных сосудов - ангиогенез. В ране возникают так называемые латеральные электрические поля, и эндотелиальные клетки, которые мигрируют в направлении электрических полей, секретируют VEGF - важнейший фактор роста сосудов в поврежденной ткани. Он запускает

пролиферацию эндотелиальных клеток, их вытягивание и реориентацию в пространстве, трансформацию их морфологической структуры, что в конечном итоге приводит к формированию высокоупорядоченных клеточных линий, составляющих внутренний слой новообразованных сосудов.

Эндотелиальные клетки, как и кератиноциты, способны экспрессировать $\beta 2aR$, активация которых снижает проницаемость сосудов и усиливает ангиогенез. Стресс-индуцированная активация $\beta 2aR$ приводит к ангиогенезу в опухолях, однако новообразованные сосуды получаются неполноценными и неупорядоченными. Аналоги СAMP усиливают ангиогенез у мышей с диабетом, агонисты $\beta 2aR$ индуцируют секрецию VEGF макрофагами через СAMP-зависимый механизм. В некоторых исследованиях было показано снижение ангиогенеза при применении $\beta 2$ -агонистов. Таким образом, активация $\beta 2aR$ влияет на ангиогенез, однако, до конца механизм этих влияний еще не изучен [36].

1.4.3 D-2 рецепторы

Кератиноциты также имеют дофаминовые D2-рецепторы на своей поверхности. Их стимуляция дофамином дозозависимо повышает продукцию кератиноцитами IL-6 и 8, а антагонистом сульпиридом, наоборот, снижает. Исследователи полагают, что дофаминэргическая передача может выступать связующим звеном между клетками эпидермиса и иммунными клетками [35].

1.4.4 Глутаматэргическая передача

На кератиноцитах также экспонированы NMDA глутаматные рецепторы, чьим эндогенным коагонистом является D-серин, при этом конверсия неактивного L-серина в активный D-серин с помощью серин-рацемазы может осуществляться в самих кератиноцитах. Было показано, что NMDA рецепторы в коже участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки, а также в формировании эпителиального барьера, однако их роль на настоящий момент до конца не изучена [37].

1.4.5 Холинэргическая система

В кератиноцитах существует и так называемая не-нейрональная холинэргическая система. Кератиноциты имеют все необходимые ферменты (холинацетилтрансферазу, ацетилхолинэстеразу) для синтеза, хранения, секреции и инактивации ацетилхолина, который, в свою очередь, способен связываться с М и N-холинорецепторами, регулируя миграцию, дифференциацию, пролиферацию и апоптоз клеток. Кератиноцит может синтезировать около 2×10^{-17} моль и секретировать 7×10^{-19} моль АХ в минуту. Более высокие концентрации АХ наблюдаются в верхних слоях кожи, так как большее количество ферментов, разрушающих его, сосредоточено в нижних слоях. Как показывают данные экспериментальных исследований, различные подтипы рецепторов к ацетилхолину могут запускать как миграцию, так и дифференцировку клеток эпидермиса (таб.1).

Таблица 1. Эффекты на клеточный цикл кератиноцитов в зависимости от стимуляции различных подтипов рецепторов.

	Фенотипы кератиноцитов		
	базальный	шиповатый	ороговевший
Никотиновый путь	$\alpha 3\beta 2$ и $\alpha 3\beta 4$ ↑миграционной способности ↑нестабильность клеточных контактов	$\alpha 3(\beta 2/\beta 4) \alpha 5$ ↑дифференцировки ↑стабильных клеточных контактов	$\alpha 7$ ↓миграционной способности ↑ороговения
	$\alpha 9$ ↑подвижности цитоплазмы	$\alpha 9$ ↑подвижности цитоплазмы	$\alpha 9$ ↑апоптоза
Мускариновый путь	M_3	M_4 ↓апоптоза	M_1 ↑дифференцировки

	↓миграционной способности ↓пролиферативной активности ↑клеточно/субстратных взаимодействий	↑миграционной способности	↓миграционной способности
	M ₄ ↓ апоптоза ↑миграционной способности		

Семейство N-холинорецепторов включает в себя лиганд-связывающие ионотропные рецепторы, состоящих из гомо-или гетеротипичных комбинаций из 9 α-субъединиц (от α2 до α10) и трех β-субъединиц (β2 – β4). В зависимости от слоя кератиноциты экспрессируют разные типы субъединиц холинорецепторов.

Особую роль в поддержании барьерной функции эпидермиса и регуляции локального иммунного статуса играет α7nAChR подтип. У мышей, имеющих фенотип α7nAChR -/- значительно снижается экспрессия генов, отвечающих за терминальную дифференцировку кератиноцитов (генов профилагрина, цитокератина-1, цитокератина-10). Более того, у таких мышей наблюдается снижение продукции белков внеклеточного матрикса (коллагена-1α1, эластина, металлопротеиназы-1).

Также известно, что наблюдающееся при хронических стрессовых воздействиях повышение концентрации АХ в коже коррелирует со снижением сопротивляемости к инфекциям, что наталкивает на мысль о возможности влияния ацетилхолина на местный иммунитет. Было показано, что наличие в среде культивирования с АХ приводит к 50% снижению продукции САМР кератиноцитами. В эксперименте с α-бунгаротоксином (селективным антагонистом α7nAChR) было показано, что при его применении уровень

продукции cAMP восстанавливается практически до нормальных значений (тогда как использование агонистов $\alpha 7nAChR$ продолжало снижать уровень cAMP). Это обуславливало большую устойчивость к *S.aureus* (рост бактерий был ограничен почти на 90% по сравнению с необработанными бунгаротоксином клетками). Отсюда следует, что ацетилхолин значительно снижает антибактериальный ответ кератиноцитов, в основном, влияя на концентрацию кателицидина [14].

Помимо наличия на поверхности кератиноцитов рецепторов к медиаторам симпатической и парасимпатической нервной системы, кератиноциты также способны секретировать биогенные амины - катехоламины [38], ацетилхолин также [39], гистамин и каннабиноиды.

Ацетилхолин, вырабатываемый ими в ответ на стресс, регулирует возникающий воспалительный ответ. При этом роль кератиноцитов в формировании местного иммунитета остается недостаточно изученной. По данным исследований, ацетилхолин оказывает регуляторное иммуносупрессивное действие и вырабатывается с целью ингибирования избыточного воспаления [20].

Несомненно, нервная и местная катехоламинэргическая и холинэргическая системы оказывают значительное влияние на процесс репарации. Воздействие нервной системы начинается с первых секунд после повреждения, когда вазоактивные вещества начинают выделяться из чувствительных нервных волокон. Нейропептиды осуществляют местную иммуномодуляцию и оказывают влияние на пролиферацию и дифференцировку клеток-мишеней, задействованных в репарации. Важную роль играют также и нейротрофические факторы, в частности, NGF, NT-4, BDNF. NGF, например, индуцирует миграцию (но не пролиферацию) фибробластов человека, а у мышей в целом ускоряет процесс репарации.

CGRP индуцирует миграцию и пролиферацию кератиноцитов человека, а так же стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов. VIP способен как индуцировать, так и тормозить пролиферацию кератиноцитов, а SP

стимулирует синтез ДНК в культуре гладкомышечных клеток и стимулирует дифференцировку эндотелиоцитов в капилляроподобные структуры [13].

1.4.6 Регуляция местного иммунного статуса.

В ряде работ описана роль кератиноцитов в качестве иммунокомпетентных клеток. Так показано, что кератиноциты могут напрямую взаимодействовать с Т-клетками посредством презентации антигена. Более того, кератиноциты продуцируют антимикробные пептиды, которые могут напрямую убивать вторгшиеся патогены и таким образом способствовать заживлению ран. Описаны эпигенетические механизмы, которые, регулируют иммунные функции кератиноцитов, включая модификации гистонов, небелковые РНК (например, микроРНК и длинные некодирующие РНК) и динамику хроматина. Суммируя текущие данные о дисрегуляции иммунных функций кератиноцитов в хронических незаживающих ранах, можно предположить, что кератиноциты вносят значительный вклад в патогенез хронического воспаления.

Кератиноциты, как клетки первой линии защиты, могут улавливать специфические низкомолекулярные структуры, присутствующие на бактериях и других микроорганизмах, которые называются патоген-ассоциированными молекулярными структурами (PAMP) [51]. PAMP, такие как бактериальные липополисахариды (LPS), эндотоксины или нуклеиновые кислоты вирусного происхождения, распознаются рецепторами распознавания «чужого» (PRR). Кератиноциты экспрессируют различные PRR, включая Toll-подобные рецепторы (TLR), лектиновые рецепторы С-типа, нуклеотид-связывающие рецепторы [52]. Узнавание лиганда через специфические PRR приводит к последующей активации различных сигнальных путей и продукции воспалительных цитокинов, хемокинов и антимикробных молекул. После того, как эти факторы высвобождаются из кератиноцитов, они выполняют важную функцию в активации резидентных в

коже иммунных клеток и привлечении циркулирующих иммунных клеток к месту раны [53].

IL-1 α и IL-1 β являются важными провоспалительными цитокинами, продуцируемыми многими типами клеток, включая кератиноциты, которые экспрессируют IL-1 α и, в меньшей степени, IL-1 β . Экспрессия IL-1 быстро увеличивается при повреждении кожи, а связывание IL-1 α с рецептором IL-1 типа I стимулирует кератиноциты экспрессировать CCL20 для привлечения иммунных клеток. IL-1 β индуцирует противомикробную защиту кожи и вместе с IL-6 и IL-23 имеет решающее значение для T-клеток, продуцирующих IL-17 [54].

IL-6 по-разному воздействует на разные клетки, способствуя заживлению ран. При повреждении кожи экспрессия ИЛ-6 и его рецептора повышается в кератиноцитах. Рецептор IL-6 состоит из субъединицы рецептора IL-6 (IL-6R) и гликопротеина 130, передающего сигнал IL-6 (gp130). Его активация с помощью IL-6 вызывает пролиферацию кератиноцитов посредством передачи сигналов STAT3. Кроме того, кератиноциты экспрессируют растворимый рецептор IL-6 (sIL-6R), который реагирует на IL-6, способствуя восстановлению кожного барьера [43]. IL-17 и IL-22 в основном продуцируются иммунными клетками, и они играют ключевую роль в иммунорегуляции и защите хозяина. Передача сигналов IL-17 опосредуется через гетеродимерный рецептор IL-17 A / C (IL-17RA / C) и A / D (IL-17RA / D) для индукции экспрессии IL-23 и AMP в кератиноцитах, а при повреждении кожи – кератиноциты активируют IL-17RA [42,44]. Передача сигналов IL-22 опосредуется через гетеродимерный рецептор IL-22 (IL-22R) и рецептор IL-10 β 2 (IL-10R β 2) в кератиноцитах для активации передачи сигналов STAT3.

1.5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытым остаётся вопрос, когда начинает повреждаться периферическая нервная система в условиях гипергликемии, какие типы нервных волокон вовлекаются в процесс повреждения первыми и как меняется метаболизм нервных медиаторов на различных стадиях физиологической репарации. Понимание этих процессов позволит разработать необходимую научную базу для создания новых точек приложения лекарственных препаратов как диабетической нейропатии, так и длительно незаживающих ран у пациентов с сахарным диабетом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 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 стрептозотоцининдуцированным 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 отделении 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 > 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 ($T_{sp}O_2 < 30$ 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 клинико-anamnestических данных;
2. осмотр нижних конечностей, оценка состояния кожных покровов и ногтей, наличия отеков, оценка периферической чувствительности, оценка раневого дефекта по классификации Wagner (Таблица 2.) [55], измерение его площади и глубины, фотографирование и архивирование изображений раны;
3. оценка состояния периферического кровотока путём определения транскутанного напряжения кислорода в околораневой зоне; определение лодыжечно-плечевого индекса; конфокальная микроскопия роговицы, осмотр глазного дна в условиях мидриаза;
4. оценка состояния углеводного обмена (HbA1c), скорости клубочковой фильтрации (СКФ), основных биохимических показателей крови.

Таблица 2. Классификация раневых дефектов при синдроме диабетической стопы по Wagner.

Степень	Характеристика
---------	----------------

0	Раневой дефект отсутствует, но есть сухость кожи, клювовидная деформация пальцев, выступание головок метатарзальных костей, другие костные и суставные аномалии
1	Поверхностный язвенный дефект без признаков инфицирования
2	Глубокая язва, обычно инфицированная, но без вовлечения костной ткани
3	Глубокая язва с вовлечением в процесс костной ткани, наличием остеомиелита
4	Ограниченная гангрена (пальца или стопы)
5	Гангрена всей стопы

Схема дизайна исследования I приведена на рис. 6.

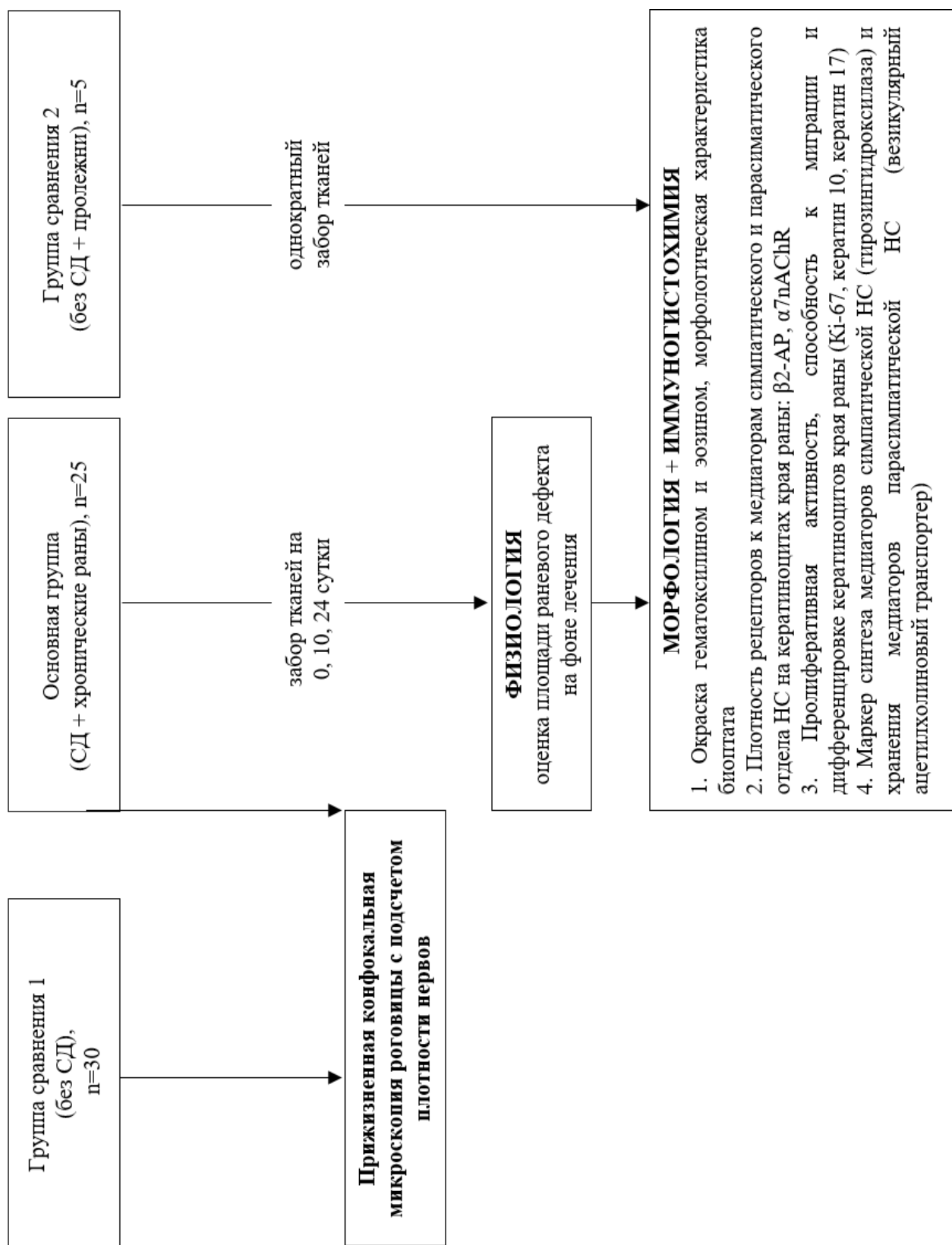


Рисунок 6. Дизайн исследования I.

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 ледяном 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 мМ/мл 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 мМ/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 позволяют 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 3). Схема эксперимента по исследованию заживления ран на разных сроках развития сахарного диабета представлена на рис.7.

Таблица 3. 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

K14-8	14 сутки после инъекции ЦБ	8 сутки после нанесения раны	10	Контроль
K14-16	14 сутки после инъекции ЦБ	16 сутки после нанесения раны	10	Контроль
K14-24	14 сутки после инъекции ЦБ	В точке полного заживления (24 суток)	10	Контроль
K42-8	42 сутки после инъекции ЦБ	8 сутки после нанесения раны	10	Контроль
K42-16	42 сутки после инъекции ЦБ	16 сутки после нанесения раны	10	Контроль
K42-24	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

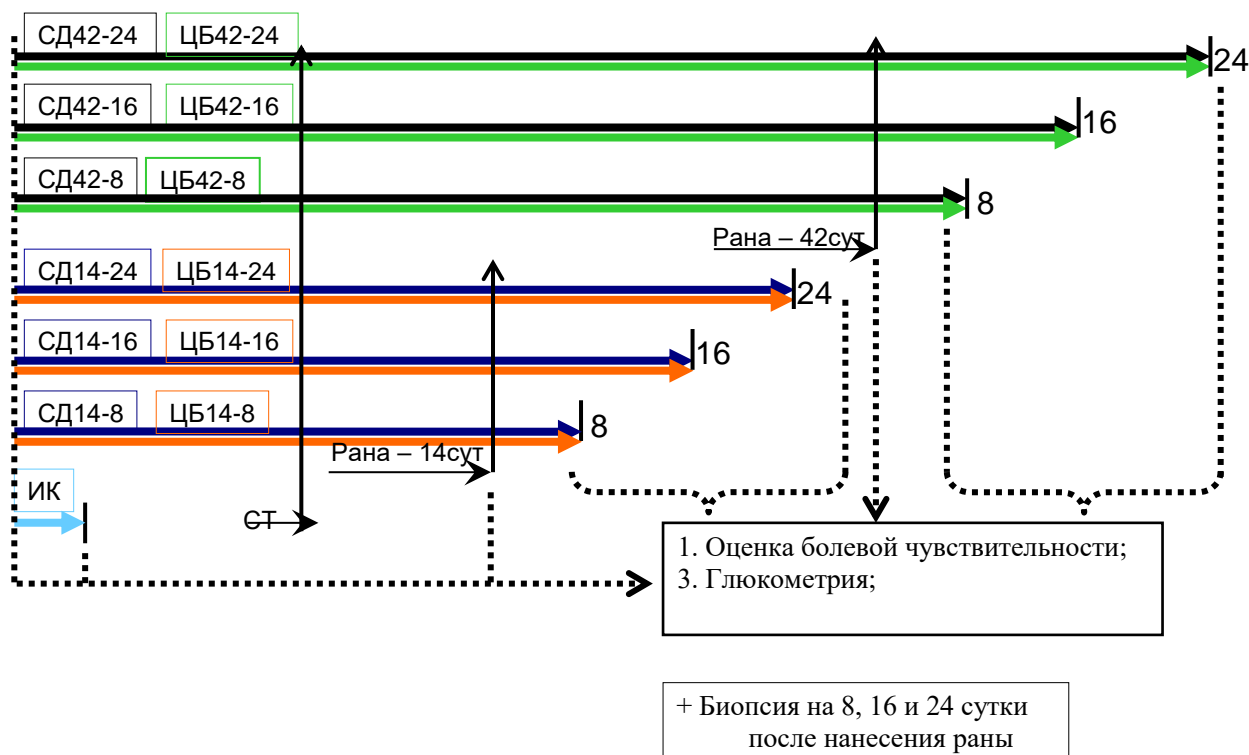


Рисунок 7. Схема эксперимента по исследованию заживления ран на разных сроках развития сахарного диабета.

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 холодового воздействия, оценивали изменение порога болевой чувствительности, проводили глюкометрию.

На микротоме MicromHM200 Ergostar получали срезы толщиной 5 мкм и закрепляли их на предметные стекла с полилизиновым 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 $\beta 2$ -АР 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).

2.2 Лабораторные и инструментальные методы исследования

Лабораторные методы диагностики исследования I проводились на базе клинико-диагностической лаборатории ГНЦ 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. Общеклинический анализ крови производился на автоматическом анализаторе «Sysmex ХЕ-2100 D» по стандартным методикам с использованием реагентов производителя. Забор образцов крови проводился из кубитальной вены строго натощак.

Верификация нефропатии проводилась на основании учета стадии ХБП и определения ХБП по уровню альбуминурии [55].

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 [56]. Оценка температурной чувствительности проводилась с использованием прибора

«Тип-Терм» («Neue Medizintechnik GmbH», Германия). Вибрационная чувствительность определялась с помощью градуированного камертона (128 Гц) (Kircher&Wilhelm, Германия) на медиальной поверхности головки 1-й плюсневой кости, медиальной лодыжке, на бугристости большеберцовой кости. Проверка коленного, ахиллова рефлекса проводилась при помощи неврологического молоточка.

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 дебридмента), 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, объемом 1 см³).

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 β 2-адренорецепторам – АТ кролика (ab182136, Abcam); к тирозингидроксилазе – АТ кролика (ab93652, Abcam); к везикулярному ацетилхолиновому транспортеру – АТ кролика (ab108319, Abcam); к α 7-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

фикси́ровали и обраба́тывали 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 ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (зав. отделением д.м.н. Липатов Д. В.). Стадии диабетической ретинопатии выставлялись согласно рекомендациям [55].

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 (Tomo-Cap; Heidelberg Engineering GmbH). Перед началом исследования в оба глаза осуществлялась инсти́ляция капель анестетика «Алкаин» (проксиметакаин 0.5%). Продолжительность процедуры составляла в среднем около 5-10 минут, ни один из обследованных не жаловался на боль, дискомфорт, или нарушения зрения.

С помощью конфокального микроскопа производились сканирование центральной зоны роговицы обоих глаз разрешением 384x384 пкс, и полем зрения микроскопа 400x400 μm^2 . Для анализа отбирались 6 изображений (по 3 с каждого глаза) хорошего качества (без артефактов движения) суббазального нервного сплетения, расположенного под боуменовой мембраной. Среднее значение трех измерений использовали для последующего сравнительного анализа. Количественный анализ нервов проводился с помощью автоматизированного программного обеспечения ASCMetrics (Университет Манчестера, Манчестер, Великобритания). В ходе анализа исследовались

следующие параметры: плотность нервных волокон / мм² роговицы (CNFD), общая длина нервных волокон / мм² (CNFL); плотность ветвей нервных волокон (CNBD), общая площадь нервных волокон / мм² (CNFA); и ширина нервных волокон (CNFW) – средняя толщина нерва / мм².

Конфокальная микроскопия роговицы, забор материала из раны, лечение пациентов и анализ результатов обследования проводилась лично диссертантом.

2.3 Лечение пациентов

Всем обследованным, независимо от включения в исследование, проводилось лечение основного заболевания, его осложнений и сопутствующей патологии.

Также проводилось стандартное лечение [88], включающее обработку раневых дефектов острым путем, перевязки с атравматическими повязками, антибактериальная терапия при необходимости, разгрузка конечности при помощи индивидуальной разгрузочной повязки Total Contact Cast, съёмный вариант (рис. 8) или разгрузочный башмак на передний отдел.

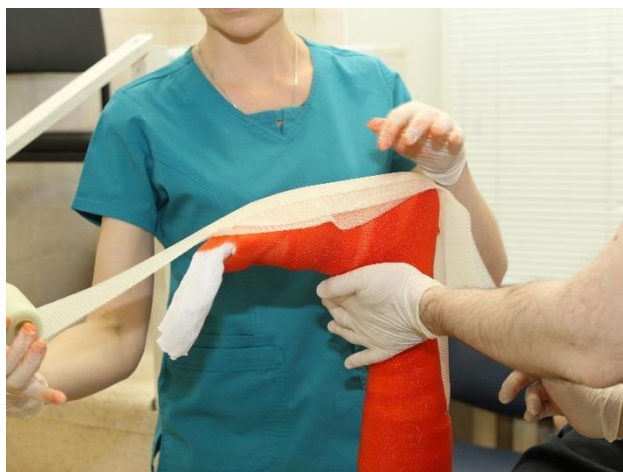


Рисунок. 8. Индивидуальная разгрузочная повязка Total Contact Cast.

2.4 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.

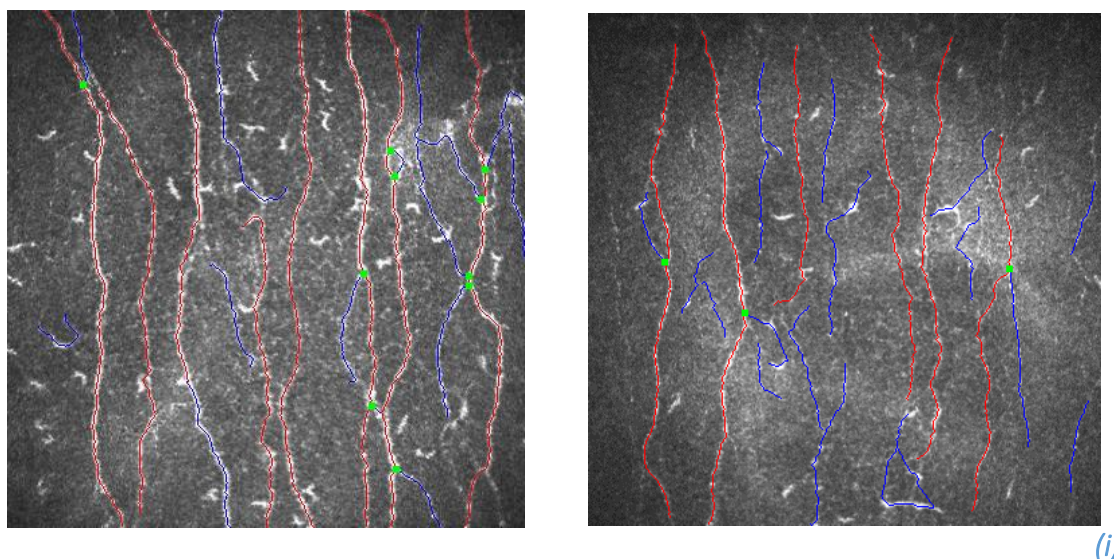
Для оценки выживаемости применяли модель Кокса, допускающую частичную неполноту данных. Для оценки динамики ранозаживления и изменения болевой чувствительности использовали функцию дисперсионного анализа повторных измерений (repeated measures ANOVA). Для сравнения плотностей экспрессии различных белков использовали многофакторный дисперсионный анализ с построением смешанной линейной модели (метод наименьшей значимой разницы по Фишеру). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ I ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. 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. 9) - $20,1 \pm 7,4$ fibres/mm² по сравнению с полученными нами ранее данными у пациентов без диабета $35,5 \pm 9,4$ fibres/mm² (данные представлены means \pm SD).



А **Б**
Рисунок 9. 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 4).

Таблица 4. 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 ² , n (%)	5 (20%)	-
ДРП	НР - 12 ППР - 8 ПР - 5	-
Характеристика раневых дефектов и анамнез малых ампутаций		
Длительность существования раневого дефекта до включения в исследование, мес.	6 [3;8]	8 [6;12]
Локализация раневого дефекта, n	Фаланги пальцев - 9 головки плюсневых костей, опилы плюсневых костей при метатарзальной ампутации – 13 предплюсна (нейроостеоартр опатия Шарко) - 3	Пролежни крестцовой области
Размер раневого дефекта (Одень), см	5,56 [1,7; 6,4]	7,4 [3,4; 12,4]
Тяжесть инфекционного процесса (IDSA)	0	0
Тип кровотока по доплеру	магистрально/из м.	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. 10). 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 массивным гиперкератозом, отделяемое из раны имело серозный характер, местного отёка и гиперемии, как и системных признаков инфекции не было отмечено.



А

Б

Рисунок 10. Внешний вид нейропатической раны основной группы – А, группы сравнения – Б.

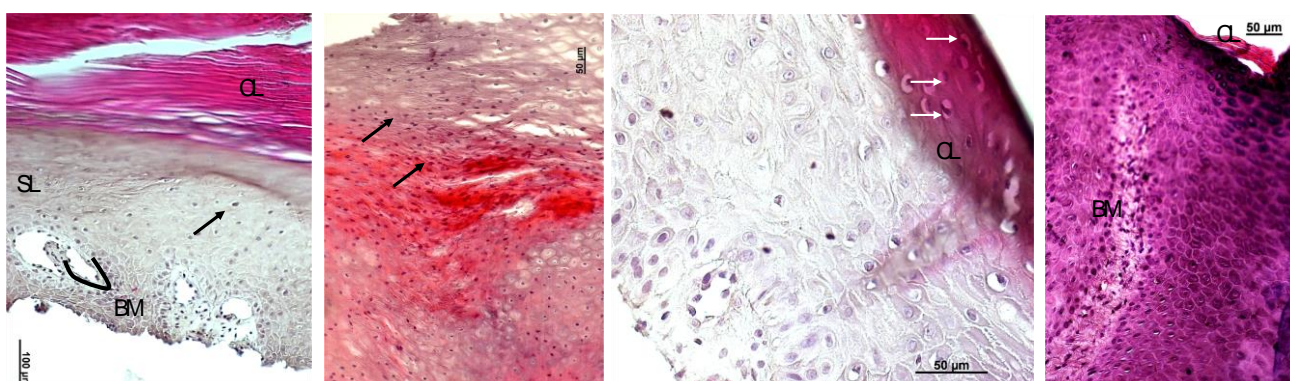
Протокол лечения включал:

- а) местное ведение раневого дефекта (удаление гиперкератоза, фибринового слоя, перевязка с атрауматическими 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 см², 24 день - 3.29 см², $p < 0,004$).

3.2. 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.11), 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.



А.

Б.

В.

Г.

Рисунок 11. 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. Схематично нейропатическая рана изображена на рис. 12.

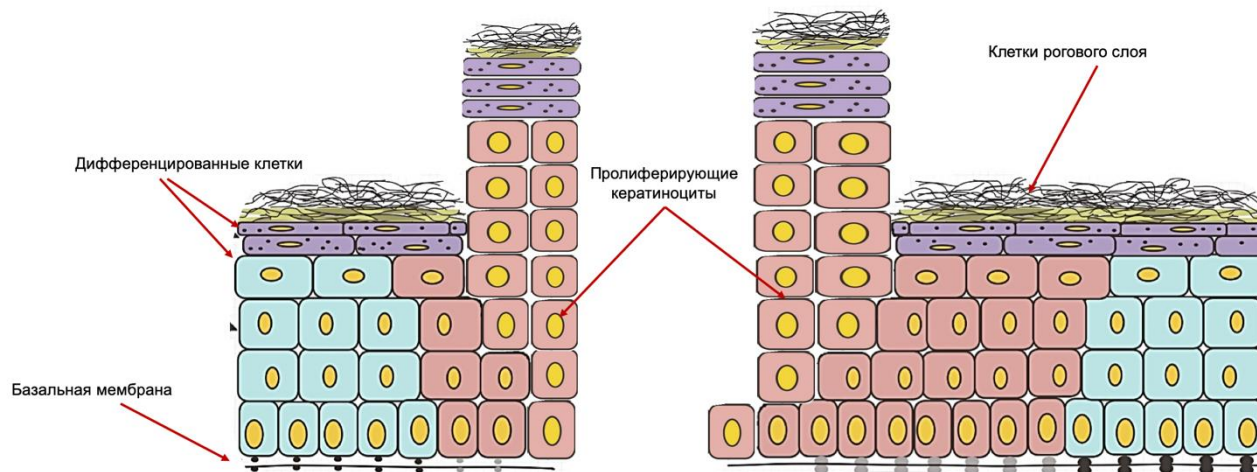
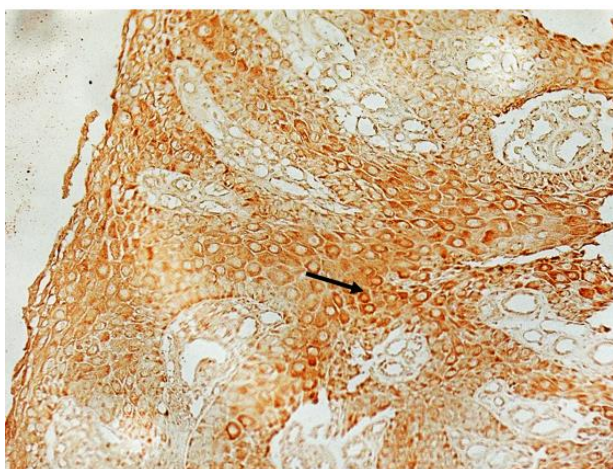


Рисунок 12. Схематичное изображение кератиноцитов нейропатической раны.

3.3 Результаты иммуногистохимического исследования образцов кожи.

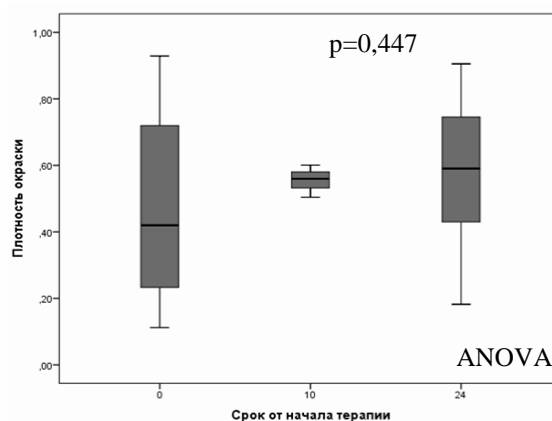
3.3.1 Окрашивание антителами к Ki-67.

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. 13). Интенсивность пролиферации эпидермиса значимо в течение



периода наблюдения не менялась ($p=0,447$).

А.

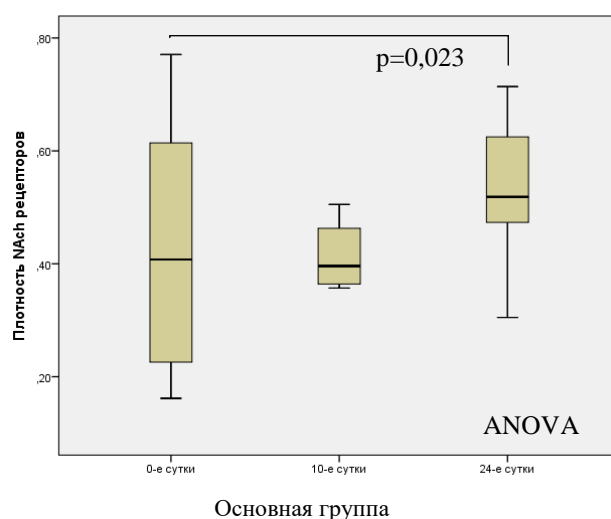
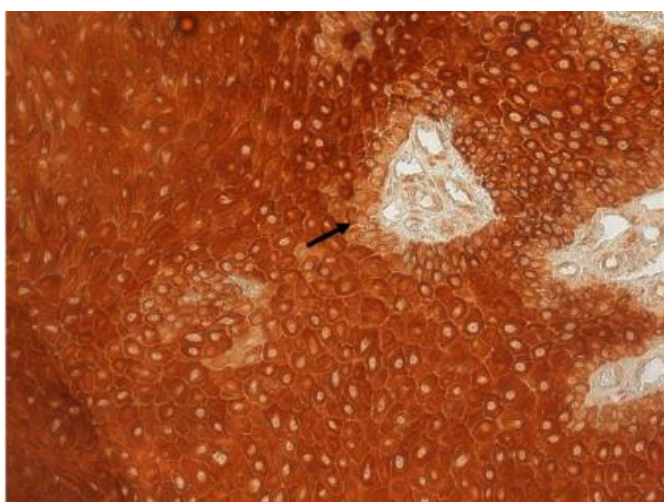


Б.

Рисунок 13. 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.

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

Все слои эпидермиса экспрессировали рецепторы к медиатору парасимпатической нервной системы - ацетилхолину ($\alpha 7nAChR$) (рис. 14 А). По сравнению со стартом терапии к 10 и 24 дню отмечалось увеличение плотности экспрессии маркера (рис. 14 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.

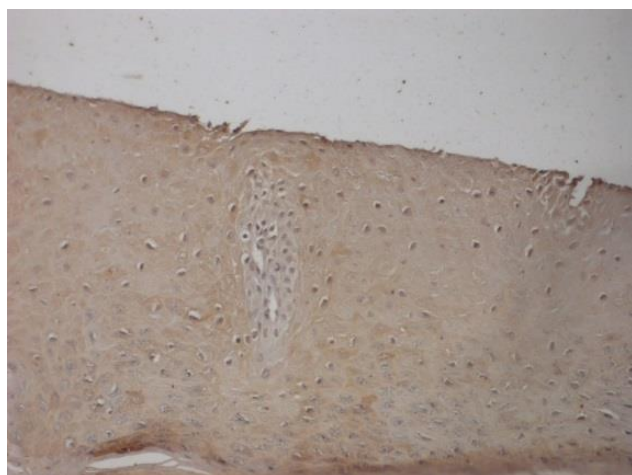
Б.

Рисунок 14. Иммуногистохимическое окрашивание (А) на $\alpha 7nAChR$ (увеличение $\times 200$). Коричневое окрашивание – наличие маркера. Б –

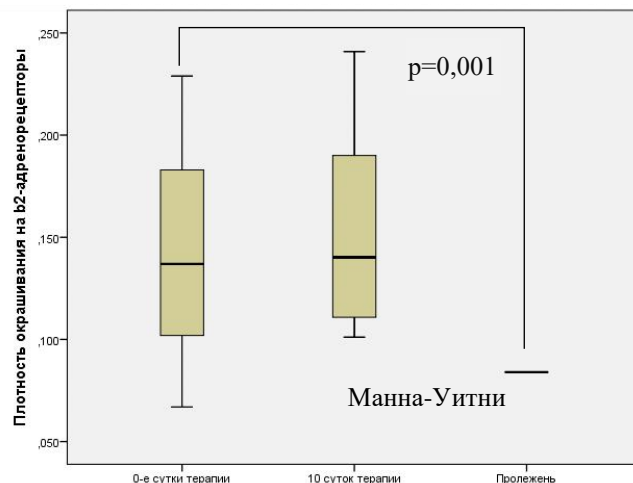
плотность холинорецепторов ($\alpha 7nAChR$) в эпидермисе на 24 сутки от начала терапии больше относительно 0 точки, $p=0,023$, Апостериорный тест методом наименьшей значимой разницы.

3.3.3 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. 15).



А.



Б.

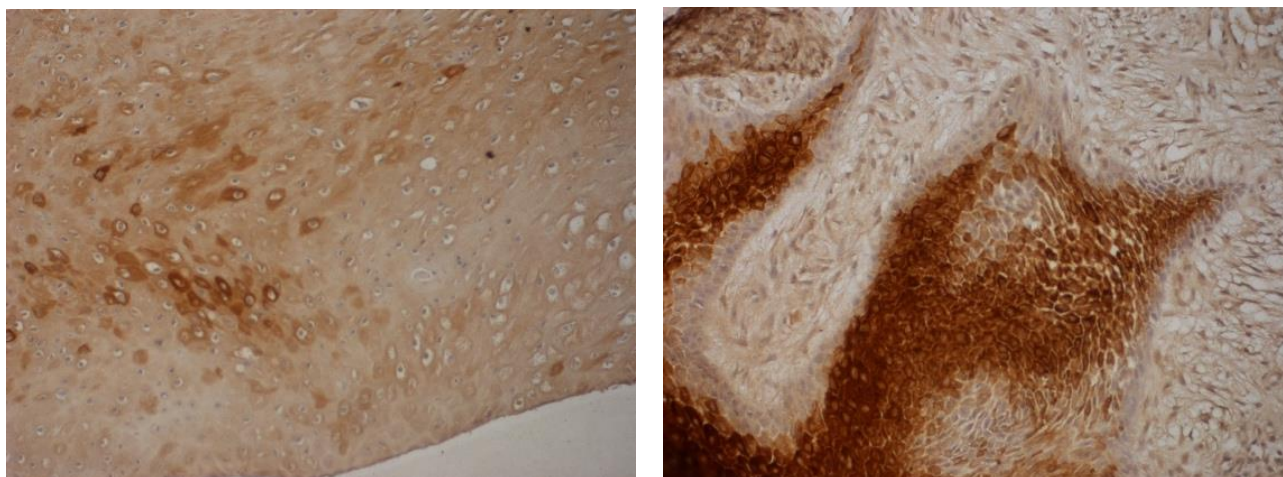
Рисунок 15. А – Иммуногистохимическое окрашивание края нейропатической раны на 10-е сутки после начала терапии. Коричневое окрашивание клеток обозначает экспрессию b2-адренорецепторов (увеличение $\times 200$). Б – плотность окрашивания образцов кожи основной группы на 0 и 10 сутки и группы сравнения 2 на b2-адренорецепторы. Сравнение групп пациентов основной группы и группы контроля на 0 день исследования проведено с использованием критерия Манна-Уитни, $p=0.001$.

3.3.4 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. 16 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. 16). Результаты статистической обработки данных показали, что количество таких клеток значимо меньше у пациентов на 0-е сутки терапии, чем на 10-е, 24-е и у пациентов с пролежнями (рис 17).



А. Б.
Рисунок 16. Иммуногистохимическое окрашивание клеток эпидермиса нейропатической раны на цитокератин 10 (увеличение x200). А – 0-е сутки, Б – 10-е сутки терапии.

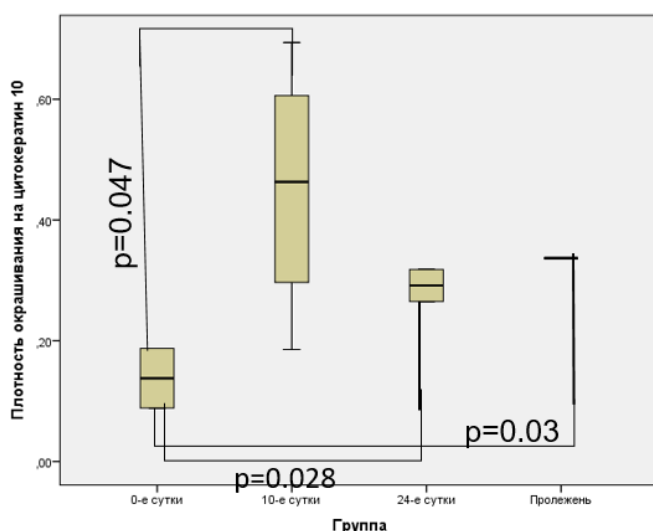
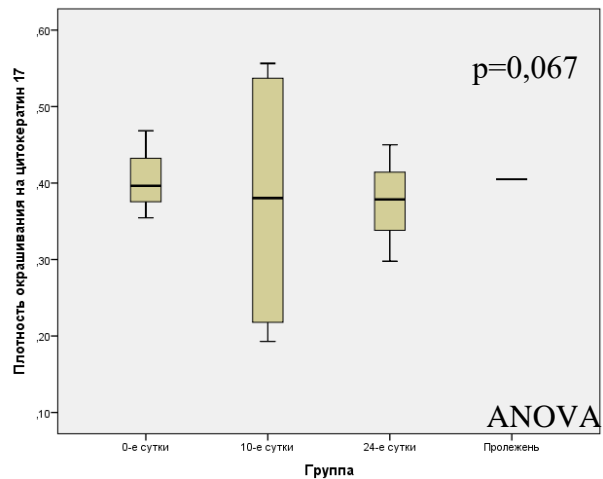
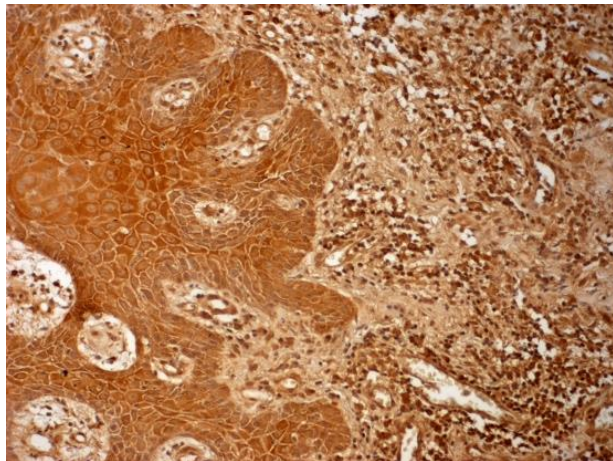


Рисунок 17. Плотность окрашивания на цитокератин 10 нейропатической раны на 0,10, 24-е сутки, пролежня. Количество кератиноцитов, окрашенных на цитокератин 10 на 0 сутки значимо меньше, по сравнению с пролежнями ($p=0,03$, метод Манна-Уитни), а также на 10-е ($p=0,047$, метод Вилкоксона) и 24-е ($p=0,028$, метод Вилкоксона) сутки лечения.

3.3.5 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 18.



А

Б

Рисунок 18. 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.

3.3.6 Окрашивание антителами к тирозингидроксилазе.

Тирозингидроксилаза является ферментом, ответственным за каталитическое превращение L-тирозина аминокислоты в дигидроксифенилаланин (DOPA). DOPA является предшественником допамина, 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. 20).

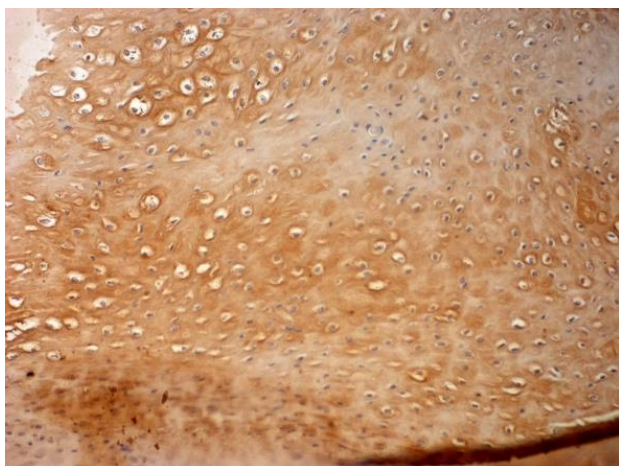


Рисунок 19. Пример иммуногистохимического окрашивания антителами к тирозингидроксилазе, 0 сутки (увеличение x200).

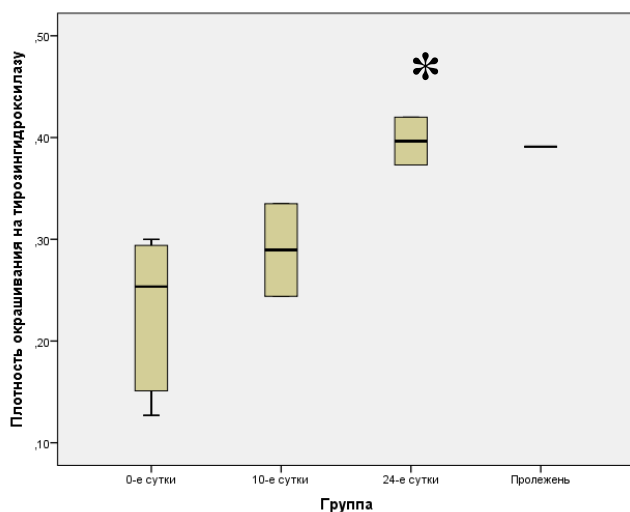


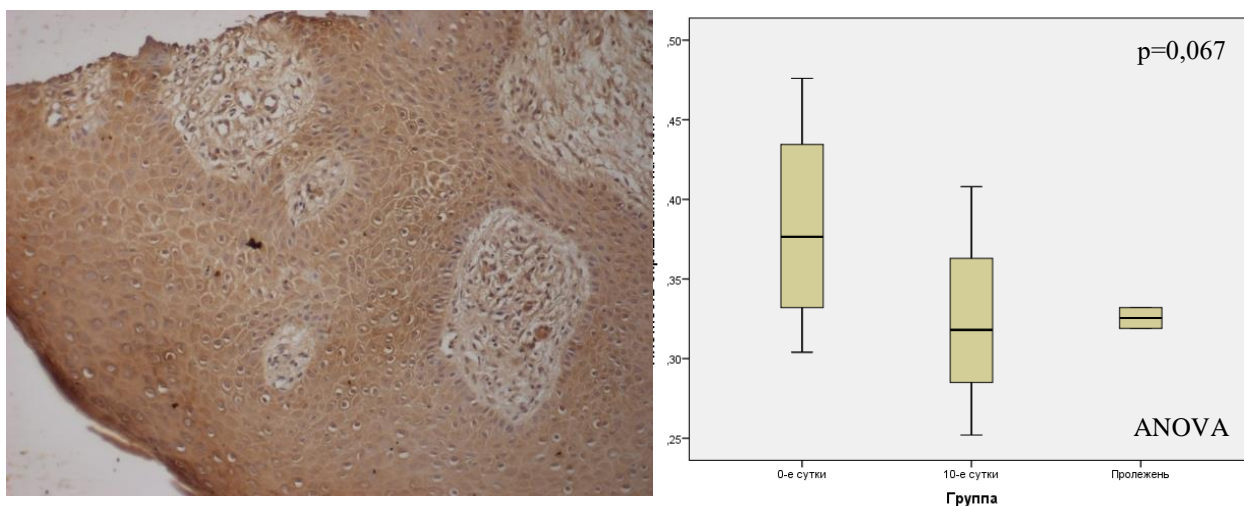
Рисунок 20. Плотность окрашивания на тирозингидроксилазу нейропатической раны на 0,10, 24-е сутки, пролежня.

3.3.7 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. 21, А). Плотность окрашивания клеток эпидермиса составила в среднем около 35%, значимые различия не были обнаружены между группами ($p=0,67$) (Рис 21,Б). Наблюдается тенденция к более интенсивному окрашиванию на 0-е сутки лечения (рис. 21,Б).



А.

Б.

Рисунок 21. 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.

Глава 4. Результаты исследования II: эксперимент 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 мМ) 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 ± 55 г, в группе ЦБ 372 ± 73 г, в группе ИК 360 ± 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 ($p=0,017$).

4.1 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. 22). В группе ЦБ в отличие от СД у всех крыс рана зажила к 24-м суткам.

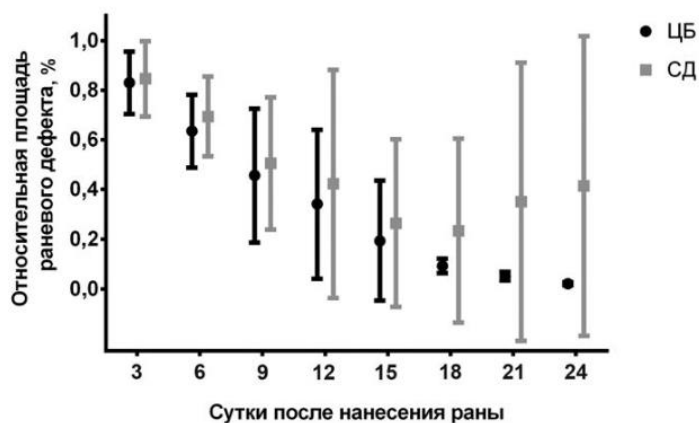


Рисунок 22. Динамика ранозаживления у крыс разных групп ($M \pm m$). ЦБ — группа крыс с инъекцией цитратным буфером (группа контроля); СД — опытная группа с инъекцией срептозотоцина и формированием сахарного диабета.

4.2 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. 23 а).

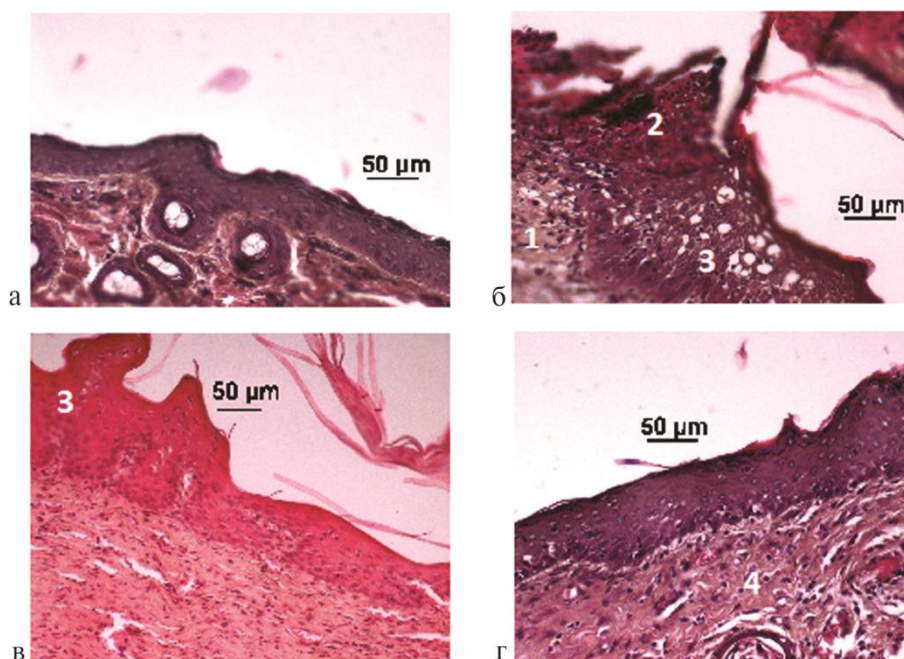


Рисунок 23. Морфология кожи крыс при окраске гематоксилином и эозином. а — типичная картина интактной кожи крысы; б — утолщенный край регенерирующего эпидермиса на 8-е сутки раны; в — утолщенный край регенерирующего эпидермиса на 16-е сутки раны; г — рубцовая ткань и восстановленный эпидермис в области 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. 23 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. 23 в), отмечено формирование грубоволокнистой рубцовой ткани (рис. 23 г), что по всей видимости обусловлено заживлением раны «под струпом». У ряда лабораторных животных группы СД к 24 дню полной эпителизации не происходило.

4.3 Иммуногистохимический анализ заживления ран

Общий вид препаратов, окрашенных методом иммуногистохимии, представлен на рис 24.

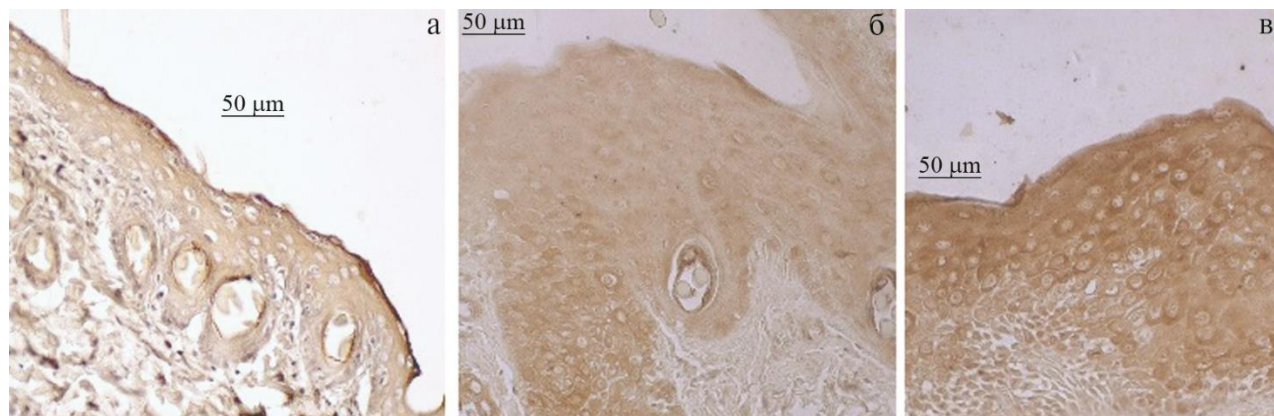


Рисунок 24. Примеры иммуногистохимического окрашивания. ДАБ: а — отрицательный контроль — неспецифически окрашивается только полоска рогового слоя эпидермиса, б — окрашивание на $\beta 2$ - адренорецепторы, край раны, окрашенные клетки расположены преимущественно в глубоких слоях, в — окрашивание на 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. 25), что свидетельствует о физиологическом течении процесса репарации и его замедлении у животных с гипергликемией.

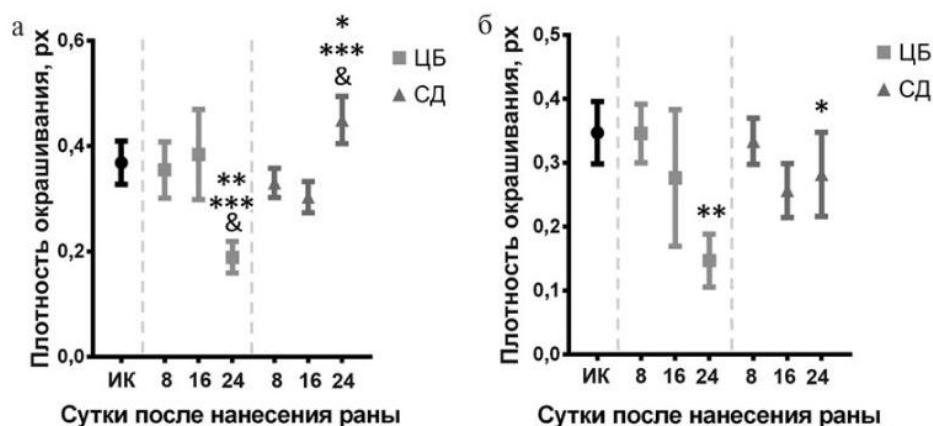


Рисунок 25. Плотность окрашивания на маркер Ki-67 ($M \pm m$): а — в отдаленных участках кожи, б — в крае раны. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой ЦБ, ** — $p < 0,05$ по сравнению с группой ИК, *** — $p < 0,05$ по сравнению с 8-ми сутками внутри группы, & — $p < 0,05$, по сравнению с 16-ми сутками 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. 26).

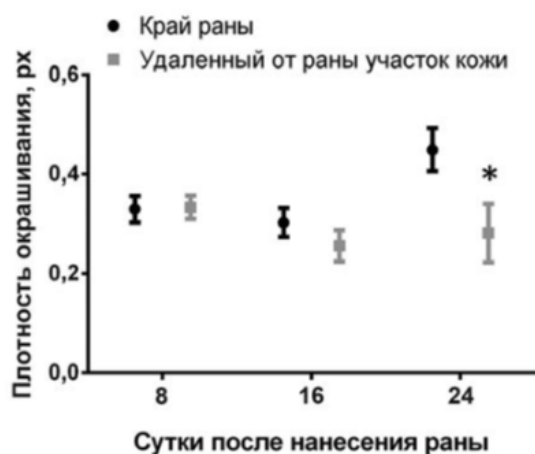


Рисунок 26. Сравнение плотности окрашивания на Ki-67 в крае раны и отдаленном участке эпидермиса на 8, 16 и 24-е сутки в группе СД ($M \pm m$); * — $p < 0,05$ по сравнению с краем раны.

Ни в одной группе, включая ИК, мы не обнаружили окрашивания эпидермиса на $\beta 1$ - и $\alpha 1$ -АР. В2-адренорецепторы в значительной степени экспрессировались кератиноцитами животных всех групп, включая ИК. Следует отметить преимущественно базальное расположение положительно окрашенных клеток в эпидермисе (рис. 24 б).

На 8-е и 16-е сутки экспрессия $\beta 2$ -АР 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. 27).

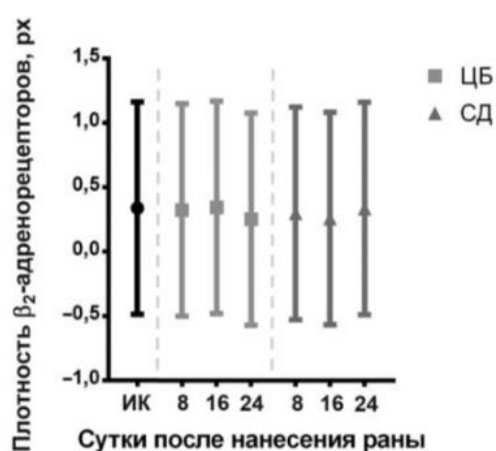


Рисунок 27. Интенсивность экспрессии $\beta 2$ -АР в разных участках кожи крыс с СД на разных сроках ранозаживления.

Глава 5. Обсуждение полученных результатов

5.1 Обсуждение результатов исследования I.

У всех пациентов удалось достигнуть положительного клинического результата – полной эпителизации ран. У 5 - в период наблюдения (заживление произошло у больных с меньшими по площади раневыми дефектами, а также ранами, локализующимися в переднем отделе стопы), у остальных - сроки заживления варьировали от 2 – 6 месяцев. У менее комплаентных пациентов (не соблюдавших рекомендованный режим разгрузки пораженных нижних конечностей – ограничение ходьбы) отмечались менее выраженные темпы сокращения раневых дефектов. Согласно данным литературы, даже несмотря на соблюдение стандартов лечения, включающих разгрузку пораженной

конечности, хирургическую обработку раневого дефекта, в том числе в стационарных условиях, закрытие раны атравматическими повязками [1,7], зачастую отмечается избыточный рост грануляционной ткани, что в конечном итоге замедляет эпителизацию [5,7]. Кроме того, несмотря на разгрузку конечности при обработке раневых дефектов на плантарной поверхности мы сталкивались с наличием гипер- и паракератоза, что, по-видимому, свидетельствует о нарушении нормального процесса ороговения и наличия патологических изменений клеточного цикла. Данные наблюдения легли в основу проведенной научной работы. Персистенция раневых дефектов в конечном итоге приводит к углублению язвы, вовлечению в процесс повреждения костных структур, что может повлечь за собой потерю части стопы или всей конечности.

При развитии тяжелой нейропатии происходит повреждение периферических нервных окончаний, снижается плотность интраэпидермальных нервных волокон, формируется аксонопатия и демиелинизация крупных нервных стволов [59]. Ранее было показано, что интраэпидермальные немиелинизированные С-волокна экспрессируют как mAChR, так и nAChR рецепторы на аксональной мембране [8]. По данным литературы [2], различные подтипы nAChR – рецепторов избирательно представлены в различных слоях эпидермиса. Клетки рогового слоя экспрессируют преимущественно $\alpha 7$ nAChR, а кератиноциты базального слоя - $\alpha 3\beta 2$ или nAChR $\alpha 3\beta 4$ nAChR. Все слои одинаково экспрессируют $\alpha 9$ nAChR. Активация каждого подтипа рецепторов nAChR, по всей видимости, связана с различными каскадами реакций, запускающих либо апоптоз, либо пролиферацию, миграцию и дифференцировку. По результатам проведенного иммуногистохимического анализа кожа околораневой зоны в исследуемой группе экспрессировала $\alpha 7$ nAChR во всех слоях, стоит отметить более низкую интенсивность окрашивания клеток базального слоя. Согласно литературным данным у лабораторных животных, нокаутных по $\alpha 7$ nAChR -/- ингибируется терминальная дифференцировка кератиноцитов, также снижение продукции

белков внеклеточного матрикса (коллагена-1 α 1, эластина, металлопротеиназы-1). Таким образом кожа края нейропатических ран не утрачивает способность к дифференцировке.

В некоторых исследованиях описывают непосредственную роль другого подтипа ацетилхолиновых рецепторов (α 9nAChR) в регуляции миграции кератиноцитов. Первый этап эпителизации раны, то есть инициация латеральной миграции, требует от кератиноцитов разобщения стабильных контактов (десмосомные кадгерины) как с клетками, так и с субстратом (интегрины). Второй шаг - так называемая локомоция - зависит от способности кератиноцитов перемещаться по субстрату, что включает в себя динамический процесс сборки и разборки фокальных адгезивных контактов с помощью мигрирующих интегринов и линкерных белков. Заключительный этап, позволяющий успешно завершить процесс эпителизации, зависит от способности кератиноцитов, мигрировавших с противоположных сторон раны, прекращать миграцию при столкновении, формируя первые спаечные контакты, за которыми следует образование прочных десмосомных соединений. Результаты экспериментов *in vitro* с использованием кроличьего анти- α 9 антитела продемонстрировали, что передача сигналов через α 9nAChR запускает фосфорилирование белков фокальной адгезии (кадгеринов и интегринов), необходимых для реорганизации интегрин-цитоскелетных взаимодействий в мигрирующих клетках [60]. По результатам нашего исследования в ходе окраски на цитокератин 17, который экспрессируют активные сократительные кератиноциты, отмечено, что статистически значимых различий между группами не было обнаружено, то есть кератиноциты сохраняли постоянный уровень мигрирующих кератиноцитов на всех стадиях раневого процесса.

Несмотря на наличие по данным литературы в кератиноцитах ключевых ферментов для синтеза, хранения и секреции и инактивации ацетилхолина (холинацетилтрансферазу, ацетилхолинэстеразу), концентрации ацетилхолина, по видимости, недостаточно для эффективной миграции клеток в раневое ложе.

По литературным данным исследования *ex vivo* кератиноцит синтезирует около 2×10^{-17} моль и секретирует 7×10^{-19} моль АХ в минуту. Экспрессия везикулярного ацетилхолинового транспортера была выше на старте терапии и уменьшалась к 10 дню, что свидетельствует об истощении запасов медиатора, расходуемого в процессе инициации латеральной миграции клеток края раны у пациентов с тяжёлой нейропатией и хроническими нейропатическими ранами. Низкий уровень указанного маркера отмечался и у пациентов с пролежнями. Полученные наблюдения свидетельствует о низком миграционном потенциале кератиноцитов края изучаемых ран.

Интенсивность пролиферации эпидермиса значимо в течение периода лечения наблюдения не менялась. Полученные данные позволяют констатировать, что все слои эпидермиса раневого дефекта активно пролиферируют на условно разделенных стадиях раневого процесса (0, 10, 24 сутки), что приводит к патологическому утолщению кожи, несмотря на регулярные обработки. В литературе подобный эпидермис с активно пролиферирующими клетками характеризуется нарушением прочности десмосом [61], что в дальнейшем может приводить к неполноценности формируемого рубца и способствовать рецидиву раневого дефекта.

Мы обнаружили, что кожа человека в значительном количестве экспрессирует β_2 -адренорецепторы, визуальная окраска существенно не различалась в различных слоях эпидермиса. Плотность окрашивания на β_2 -адренорецепторы оказалась статистически значимо выше у пациентов с сахарным диабетом, чем у пациентов с пролежнями и не менялась на протяжении всего периода наблюдения. Активация β -адренорецепторов подавляет миграцию кератиноцитов через циклический аденозинмонофосфат-независимый механизм (Chen et al., 2002). Так в исследованиях *in vitro* изопротеренол, селективный агонист β -адренергических рецепторов, ингибировал миграцию клеток, стимулированную эпидермальным фактором роста или внеклеточный Ca^{2+} зависимым от концентрации способом.

Стоит упомянуть, что нейрогенная регуляция трофики тканей конечностей осуществляется, в основном, двумя типами немиелинизированных волокон - симпатическими и сенсорными. Распределение симпатических нервов в скелете млекопитающих до сих пор плохо описано, присутствие симпатического звена периферической нервной системы определяется на уровне бедренной кости. Симпатические периостальные волокна разветвляются в костном мозге и компактной кости, о чем свидетельствует иммуногистохимическая позитивность тканей в отношении тирозингидроксилазы (ТГ), нейропептида Y. Мелкие ветви периостальных нервных волокон, проходящие через кортикальную кость, связаны с кровеносными сосудами фолькмановского и гаверсова каналов. Некоторые могут проходить через паренхиму костного мозга и заканчиваться на стенках синусоидов, периваскулярных стромальных клетках. ТГ-иммунореактивные волокна обычно имеют спиральную морфологию и охватывают кровеносные сосуды, с которыми они связаны. Парасимпатических волокон в конечностях, особенно в дистальных отделах, практически нет, возможны клинически незначимые по числу волокон в проксимальных зонах нижних конечностей, проникающих по сосудам периваскулярно из таза.

Плотность окрашивания на тирозингидроксилазу оказалась статистически значимо выше у пациентов с пролежнями и на 24-е сутки терапии по сравнению с 0-ми и 10-ми сутками. Тирозингидроксилаза является ферментом, превращающим тирозин в диоксифенилаланин (ДОФА), являющимся предшественником нейромедиаторов симпатической нервной системы норэпинефрина (норадреналин) и эпинефрина (адреналин) [62, 63, 64]. В целом образцы кожи, забранные у пациентов на 0-е и 10-е сутки терапии, характеризовались низкой плотностью окрашивания, в отличие от образцов, взятых на 24-е сутки.

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

экспрессировали все кератиноциты, вне зависимости от стадии раневого процесса. Экспрессия цитокератина K10, обычно представленного в постмитотических, терминально дифференцирующихся эпидермальных кератиноцитах, ингибирует сигнальный путь превращения кератиноцитов в сократительные, способными к активному перемещению в раневое ложе.

Стоит отметить тот факт, что у пациентов с длительно существующими нейропатическими раневыми дефектами зачастую не отмечается как локальных признаков воспаления, так и системных, таких как повышение температуры тела, нейтрофильный лейкоцитоз, кроме случаев с тяжёлым инфекционным процессом (остеомиелит, абсцесс или флегмона). В исследуемых образцах кожи пациентов с нейропатическими ранами не отмечалось инфильтрации воспалительными клетками, по сравнению с образцами кожи пациентов с пролежнями, где отмечалась выраженная воспалительная инфильтрация. Как показано в ряде исследований парасимпатическая нервная система способна модулировать активность иммунокомпетентных клеток и ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов [65]. В условиях тяжёлой нейропатии нарушается реализация физиологического воспаления в ответ на травматизацию кожных покровов и не происходит перехода раны в следующую стадию репаративного процесса, таким образом, рана «застревает» в какой-либо определенной фазе, становясь хронической.

В проведённом исследовании впервые оценены маркеры пролиферативной активности, миграционной способности и дифференцировки у пациентов с тяжёлой диабетической дистальной нейропатией и нейропатическими раневыми дефектами. Найти сопоставимый контроль с пролежнями пяточных областей не удалось, ввиду частого наличия у данной когорты пациентов ишемического компонента (атеросклероза с гемодинамически значимыми стенозами артерий нижних конечностей), как и забрать материал в динамике, что является определённым ограничением исследования.

5.2 Обсуждение результатов исследования II.

В рамках исследования на животных моделях были изучены гистоморфологические особенности течения раневого процесса в условиях гипергликемии при развитии периферической нейропатии. В качестве основной гипотезы выбрано предположение о роли немиелинизированных волокон (сенсорные волокна) в репаративном процессе.

Тест болевой чувствительности показал, что у крыс группы СД на исследуемых сроках развивается периферическая нейропатия, затрагивающая немиелинизированные С – волокна, отвечающие за восприятие боли и тепла. [89].

Результаты морфологического исследования подтвердили, что регенерация ран у крыс в модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета нарушена и осуществляется с опозданием относительно контрольной группы цитратного буфера.

При исследовании гистологических образцов на светооптическом уровне отмечена картина заживления вторичным натяжением под струпом: уменьшалась лейкоцитарная инфильтрация, постепенно индуцировался неоваскулогенез с формированием грануляционной ткани, раневой дефект подвергался краевой эпителизации.

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 группами контроля. Найденные различия в плотности окрашивания данным маркером свидетельствуют об активной пролиферации клеток края раны при замедлении сокращения раны по площади по сравнению с контрольными группами, в которых процесс эпителизации к 24 дню был практически завершен. Эти наблюдения могут быть обусловлены сниженным миграционным потенциалом кератиноцитов у животных с развившейся периферической нейропатией.

Плотность окрашивания β 2-AP в кератиноцитах значимо не различалась между группами. Согласно данным литературы стимуляция β -2

адренорецепторов в культуре клеток дозозависимо снижает подвижность кератиноцитов. Постоянный уровень экспрессии исследуемого маркера во всех группах на фоне сокращения раневых дефектов в контрольных группах противоречит вышеуказанному тезису или же ингибирование миграции клеток кожи осуществляется через другие сигнальные пути.

Ограничения исследования

Немногочисленная выборка пациентов группы сравнения, забор биопсийного материала которой проводился из ран иной локализации. Мощность выборки предварительно не оценивалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение финального этапа заживления раны – эпителизации, является одной из основных причин формирования хронических ран у пациентов с нейропатической формой синдрома диабетической стопы. Кератиноциты хронических раневых дефектов утрачивают способность к миграции, нарушаются межклеточные взаимодействия - дефекты плотных межклеточных контактов, нарушаются механизмы антигенпрезентации, что приводит к формированию хронических ран с высоким процентом микробной колонизации, образованию бактериальных биоплёнок. Клетки эпидермиса в краях хронических ран представлены в основном активно пролиферирующим фенотипом. В дополнение к ухудшению миграции нарушается процесс дифференцировки, что выражается в присутствии ядер в роговом слое и нарушению прочностных характеристик кожного барьера, нарушением процесса кератинизации. Формирование полноценного рогового слоя является неотъемлемым для восстановления барьерной функции кожного покрова.

В настоящее время исследователи уделяют особое внимание нервным влияниям на различные механизмы ранозаживления: на пролиферацию и миграцию кератиноцитов, ангиогенез, формирование соединительнотканного рубца. Было обнаружено множество разнонаправленных эффектов от воздействия на различные подтипы адreno- и холинорецепторов, NMDA – рецепторов и др. [10]. Наряду с поиском патогенетических механизмов повреждения нервного волокна при сахарном диабете и совершенствования методов инструментальной диагностики нейропатии на ранней стадии необходимо изучение патологических особенностей формирования нейропатических ран, поиск сигнальных путей, блокирующих излишнюю пролиферацию клеток эпидермиса, формирующих патологически утолщенный эпидермис с низкой миграционной способностью.

При развитии тяжелой нейропатии происходит повреждение периферических нервных окончаний, снижается плотность интраэпидермальных нервных волокон, формируется аксонопатия и

демиелинизация крупных нервных стволов. Таким образом, в результате повреждения периферической нервной системы при сахарном диабете происходит ослабление нейрогуморального влияния на периферические ткани. Как было показано, кератиноциты экспрессируют ключевые ферменты для синтеза, хранения и секреции ацетилхолина, который, в свою очередь, способен связываться с холинорецепторами и регулировать миграцию, дифференцировку, пролиферацию и апоптоз клеток.

Полученные данные могут послужить основой для разработки местной терапии раневых дефектов, а именно локальной аппликации или введению агонистов рецепторов $\alpha 7nAChR$ для усиления миграции кератиноцитов. При этом необходим поиск сигнальных путей, блокирующих излишнюю пролиферацию клеток эпидермиса, формирующих патологически утолщенный эпидермис.

Проведенное исследование позволило оценить состояние кератиноцитов хронической раны и темпы заживления раны в модели стрептозотоцинового диабета у крыс. На фоне поддерживающей инсулинотерапии в предложенном протоколе у крыс развивалась гипергликемия, однако это не сопровождалось летальностью в течение 56 суток. При этом постепенно гипергликемия привела к развитию нейропатии, затрагивающая немиелинизированные С-волокна, а, следовательно, снижалась болевая чувствительность, что особенно ярко проявилось к 56-м суткам эксперимента. Результаты морфологического исследования указывают на ухудшение реэпителизации раны у крыс группы СД.

Изучение плотности интраэпидермальных нервных волокон, концентрации метаболитов нейромедиаторов, а также расширение спектра исследуемых нейрональных и не-нейрональных систем регуляции ранозаживления позволят сформировать комплексное представление о процессах, протекающих в хронической диабетической ране, найти новые потенциальные мишени для терапии и в конечном счете улучшить качество оказываемой помощи пациентам с СДС.

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 β -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 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 β 2-АР 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 корнизации 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 сокращений и условных обозначений

nAChR - никотиновый ацетилхолиновый рецептор (н-холинорецептор)

NF- κ B - транскрипционный (ядерный) фактор «каппа-би»

TNF- α – фактор некроза опухолей альфа

IL-1- α – интерлейкин 1-альфа

IL-1 β - интерлейкин 1-альфа

AMP - антимикробный пептид

CAMP – циклический аденозинмонофосфат

PDGF – фактор роста тромбоцитов

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

CSF1 – колониестимулирующий фактор

IGF – инсулиноподобный фактор роста

TGF β - трансформирующий ростовой фактор-бета

MMP – матричные металлопротеиназы

FGF-10 – фактор роста фибробластов 10

C-MYC - протоонкогенный белок Мус

CHL-1 – белок некадгериновой системы клеточной адгезии

p50, p52, RelA (p65), RelB, и c-Rel - белки семейства NF- κ B/REL (регуляторы транскрипции)

FOXO1 - фактор транскрипции, который у человека кодируется геном FOXO1

NMDA - ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат

NGF – фактор роста нерва

NT-4 – нейротрофин-4

BDNF – нейротропный фактор мозга

CGRP – кальцитонин-ген родственный пептид

VIP – вазоинтестинальный полипептид

SP – субстанция P, нейрорегуляторный пептид

Ki-67 - маркер пролиферативной активности

HbA1c – гликированный гемоглобин

TcPO² – транскутанное напряжение кислорода

ИК – интактный контроль

СТЗ – стрептозотоцин

ЦБ – цитратный буфер

Список литературы

1. Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol.* 2003;139:1479-1488. doi:10.1001/archderm.139.11.1479.
2. Noda S, Lammerding-Köppel M, Oetting G, Drews U. Characterization of muscarinic receptors in the human melanoma cell line SK-Mel-28 via calcium mobilization. *Cancer Lett.* 1998;133(1):107-114. doi:10.1016/S0304-3835(98)00215-8.
3. Slominski AT, Manna PR, Tuckey RC. Cutaneous glucocorticosteroidogenesis: Securing local homeostasis and the skin integrity. *Exp Dermatol.* 2014;23(6):369-374. doi:10.1111/exd.12376
4. Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, et al. Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;137:107-123. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.02.006.
5. Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature.* 2003;422(6929):317-322. doi:10.1038/nature01893.
6. Kirfel J, Magin TM, Reichelt J. Keratins: A structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):56-71. doi:10.1007/s000180300004.
7. Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol.* 2005;167(1):59-69. doi:10.1016/S0002-9440(10)62953-7.
8. Pongratz G, Straub RH. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(2):117-126. doi:10.1038/nrrheum.2012.181.
9. Vinik AI, Nevoret M-L, Casellini C, Parson H. Diabetic neuropathy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013;42(4):747-787. doi:10.1016/j.ecl.2013.06.001.

10. Van Maanen M a, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. The cholinergic anti-inflammatory pathway: towards innovative treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(4):229-232. doi:10.1038/nrrheum.2009.31.
11. Iwata, Yohei et al. The epidermal Integrin beta-1 and p75NTR positive cells proliferating and migrating during wound healing produce various growth factors, while the expression of p75NTR is decreased in patients with chronic skin ulcers. *J Dermatol Sci*, 2013. 71(2): 122-9. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.006
12. Sachs BD, Akassoglou K. Regulation of cAMP by the p75 neurotrophin receptor: insight into drug design of selective phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1273-1277. doi:10.1042/BST0351273.
13. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1309-1379. doi:10.1152/physrev.00026.2005.
14. Curtis BJ, Radek K a. Cholinergic regulation of keratinocyte innate immunity and permeability barrier integrity: new perspectives in epidermal immunity and disease. *J Invest Dermatol*. 2012;132(1):28-42. doi:10.1038/jid.2011.264.
15. Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: Defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol*. 1996;132(3):381-397. doi:10.1083/jcb.132.3.381.
16. Галимов О. В. и др. Биохимические механизмы заживления ран // Башкирский химический журнал. – 2008. – Т. 15. – №. 3.
17. Фаттахов В. Л., Винник Ю. С., Теплякова О. В. Влияние кислотно-основного состояния среды на течение раневого процесса при сахарном диабете // Сибирское медицинское обозрение. – 2009. – Т. 60. – №. 6.
18. Tatsioni A. et al. Usual care in the management of chronic wounds: A review of the recent literature *J AM COLL SURGEONS*. 2007; 205(4):617-624e57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.05.032>

19. Grice EA, Segre JA. Interaction of the microbiome with the innate immune response in chronic wounds. *AdvExpMedBiol.* 2012;946(0065-2598 (Print)):55-68. doi:10.1007/978-1-4614-0106-3.
20. Curtis BJ, Radek K a. Cholinergic regulation of keratinocyte innate immunity and permeability barrier integrity: new perspectives in epidermal immunity and disease. *J Invest Dermatol.* 2012;132(1):28-42. doi:10.1038/jid.2011.264.
21. Dissemond J, Augustin M, Eming S a, et al. Modern wound care - practical aspects of non-interventional topical treatment of patients with chronic wounds. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014:1-13. doi:10.1111/ddg.12351.
22. Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(2):143-149. doi:10.1093/jac/dkh513.
23. Ланичева А. Х. Иммуногистохимическая характеристика динамики раневого процесса после механической травмы кожи белых крыс и экспериментальное обоснование перспективных направлений его коррекции // Медицинский вестник Башкортостана. – 2010. – Т. 5. – №. 3.
24. Zhao G, Usui ML, Lippman SI, et al. Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Adv wound care.* 2013;2(7):389-399. doi:10.1089/wound.2012.0381.
25. Ganesh K, Sinha M, Mathew-Steiner SS, Das A, Roy S, Sen CK. Chronic Wound Biofilm Model. *Adv Wound Care.* 2014;00(00):150127064149004. doi:10.1089/wound.2014.0587.
26. Зайцева Е.Л., Доронина Л.П., Молчков Р.В., И Др. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика интенсивности репаративных процессов в мягких тканях нижних конечностей у лиц с нейропатической и нейроишемической формами синдрома диабетической стопы // Сахарный диабет. - 2015. - Т. 18. - №4 - С. 72-78. doi: 10.14341/DM7587

27. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv wound care*. 2014;3(7):445-464. doi:10.1089/wound.2013.0473.
28. Токмакова А. Ю., Страхова Г. Ю., Арбузова М. И. Особенности хронических ран у больных сахарным диабетом и пути их коррекции // Эндокринная хирургия. – 2007. – №. 1.
29. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2013;1833(12):3471-3480. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.010.
30. Beer HD, Gassmann MG, Munz B, et al. Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Vol 5. ; 2000:34-39. doi:10.1046/j.1087-0024.2000.00009.x.
31. Hameedaldeen A, Liu J, Batres A, Graves GS, Graves DT. FOXO1, TGF-?? regulation and wound healing. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):16257-16269. doi:10.3390/ijms150916257.
32. Sivamani RK, Lam ST, Isseroff RR. Beta Adrenergic Receptors in Keratinocytes. *Dermatol Clin*. 2007;25(4):643-653. doi:10.1016/j.det.2007.06.012.
33. Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2008;456(4):693-700. doi:10.1007/s00424-007-0357-5.
34. Sivamani RK, Shi B, Griffiths E, et al. Acute wounding alters the beta2-adrenergic signaling and catecholamine synthetic pathways in keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8):2258-2266. doi:10.1038/jid.2014.137.
35. Parrado AC, Canellada A, Gentile T, Rey-Roldan EB. Dopamine agonists upregulate IL-6 and IL-8 production in human keratinocytes. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(6):359-366. doi:10.1159/000342140.

36. Pullar CE, Manabat-Hidalgo CG, Bolaji RS, Isseroff RR. beta-Adrenergic receptor modulation of wound repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):158-164. doi:10.1016/j.phrs.2008.07.012.
37. Inoue R, Yoshihisa Y, Tojo Y, et al. Localization of serine racemase and its role in the skin. *J Invest Dermatol.* 2014;134(6):1618-1626. doi:10.1038/jid.2014.22.
38. Grando S a, Pittelkow MR, Schallreuter KU. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol.* 2006;126(9):1948-1965. doi:10.1038/sj.jid.5700151.
39. Grando SA, Kist DA, Qi M, Dahl M V. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol.* 1993;101(1):32-36. doi:10.1111/1523-1747.ep12358588.
40. IDF Diabetes Atlas - 7th Edition. [cited 2015]. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/>
41. Gordois A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA. The Health Care Costs of Diabetic Peripheral Neuropathy in the U.S. *Diabetes Care.* 2003;26(6):1790-1795. doi:10.2337/diacare.26.6.1790.
42. Ziegler D, Strom A, Lobmann R, Reiners K, Rett K, Schnell O. High prevalence of diagnosed and undiagnosed polyneuropathy in subjects with and without diabetes participating in a nationwide educational initiative (PROTECT study). *J Diabetes Complications.* 2015;29(8):998-1002. doi:10.1016/j.jdiacom.2015.09.008.
43. Tomic-Canic M. et al. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes // *Journal of dermatological science.* – 1998. – T. 17. – №. 3. – C. 167-181. DOI: 10.1016/s0923-1811(98)00016-4
44. Paladini R. D. et al. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16 // *The Journal of cell biology.* – 1996. – T. 132. – №. 3. – C. 381-397. DOI: [10.1083/jcb.132.3.381](https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.381)

45. Barker J. N. W. N. et al. Keratinocytes as initiators of inflammation //The Lancet. – 1991. – T. 337. – №. 8735. – C. 211-214. DOI: [10.1016/0140-6736\(91\)92168-2](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92168-2)
46. Nickoloff B. J., Turka L. A. Keratinocytes: key immunocytes of the integument //The American journal of pathology. – 1993. – T. 143. – №. 2. – C. 325.
47. Kupper T. S., Groves R. W. The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation //Journal of Investigative Dermatology. – 1995. – T. 105. – №. 1. – C. S62-S66. DOI: [10.1111/1523-1747.ep12316087](https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12316087)
48. Tomic-Canic M. et al. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes //Journal of dermatological science. – 1998. – T. 17. – №. 3. – C. 167-181 DOI: [10.1016/s0923-1811\(98\)00016-4](https://doi.org/10.1016/s0923-1811(98)00016-4)
49. Troyanovsky S. M., Leube R. E., Franke W. W. Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern //European journal of cell biology. – 1992. – T. 59. – №. 1. – C. 127-137.
50. Guelstein V. I. et al. Monoclonal antibody mapping of keratins 8 and 17 and of vimentin in normal human mammary gland, benign tumors, dysplasias and breast cancer //International journal of cancer. – 1988. – T. 42. – №. 2. – C. 147-153 DOI: [10.1002/ijc.2910420202](https://doi.org/10.1002/ijc.2910420202)
51. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8790. Published 2020 Nov 20. doi:10.3390/ijms21228790
52. Lebre M.C., van der Aar A.M.G., van Baarsen L., van Capel T.M.M., Schuitemaker J.H.N., Kapsenberg M.L., de Jong E.C. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. J. Investig. Derm. 2007;127:331–341. doi: 10.1038/sj.jid.5700530.
53. Chen Y.E., Fischbach M.A., Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. Nature. 2018;553:427–436. doi: 10.1038/nature25177

54. MacLeod A.S., Mansbridge J.N. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv. Wound Care.* 2016;5:65–78. doi: 10.1089/wound.2014.0608
55. Дедов И. И. и др. «Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом» Под редакцией ИИ Дедова, МВ Шестаковой, АЮ Майорова 9-й выпуск // Сахарный диабет. – 2019. – Т. 22. – №. 1S1. – С. 1-144. <https://doi.org/10.14341/DM221S1>
56. Schaper N.C. et al. Practical Guidelines on the prevention and management of diabetic foot disease (IWGDF 2019 update) // *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 2020. Vol. 36, № S1 DOI: [10.1002/dmrr.3266](https://doi.org/10.1002/dmrr.3266)
57. Ступин В.А., Аникин А.И., Алиев С.Р. Транскутанная оксиметрия в клинической практике: методические рекомендации. – М., 2010. – 57 с
58. Mills Sr J. L. et al. The society for vascular surgery lower extremity threatened limb classification system: risk stratification based on wound, ischemia, and foot infection (WIFI) // *Journal of vascular surgery.* – 2014. – Т. 59. – №. 1. – С. 220-234. e2. DOI: 10.1016/j.jvs.2013.08.003
59. Valls-Canals J, Povedano M, Montero J, Pradas J. Diabetic polyneuropathy. Axonal or demyelinating? *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 2002 Jan-Feb;42(1):3-6. PMID: 11851006.
60. Schoenwaelder S. M., Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins // *Current opinion in cell biology.* – 1999. – Т. 11. – №. 2. – С. 274-286. doi: 10.1016/s0955-0674(99)80037-4.
61. Chidgey M. et al. Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation // *The Journal of cell biology.* – 2001. – Т. 155. – №. 5. – С. 821-832. DOI: 10.1083/jcb.200105009
62. Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis // *Journal of Biological Chemistry.* – 1964. – Т. 239. – №. 9. – С. 2910-2917.

63. Kvetnansky R., Sabban E. L., Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches // *Physiological reviews*. – 2009. – T. 89. – №. 2. – С. 535-606. DOI: 10.1152/physrev.00042.2006
64. Tekin I. et al. Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase // *Journal of neural transmission*. – 2014. – T. 121. – №. 12. – С. 1451-1481. DOI: 10.1007/s00702-014-1238-7
65. Grando S. A., Pittelkow M. R., Schallreuter K. U. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2006. – T. 126. – №. 9. – С. 1948-1965. DOI: 10.1038/sj.jid.5700151
66. Gordois A. et al. The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US // *Diabetes care*. – 2003. – T. 26. – №. 6. – С. 1790-1795. doi: 10.2337/diacare.26.6.1790.
67. Ziegler D. et al. Prevalence of polyneuropathy in pre-diabetes and diabetes is associated with abdominal obesity and macroangiopathy: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3 // *Diabetes care*. – 2008. – T. 31. – №. 3. – С. 464-469 DOI: 10.2337/dc07-1796
68. Kim H. S., Yoo H. S. In vitro and in vivo epidermal growth factor gene therapy for diabetic ulcers with electrospun fibrous meshes // *Acta biomaterialia*. – 2013. – T. 9. – №. 7. – С. 7371-7380. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.03.018
69. Ojeh N. et al. Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications // *International journal of molecular sciences*. – 2015. – T. 16. – №. 10. – С. 25476-25501. doi: 10.3390/ijms161025476.
70. Gouin J. P., Kiecolt-Glaser J. K. The impact of psychological stress on wound healing: methods and mechanisms // *Immunology and Allergy Clinics*. – 2011. – T. 31. – №. 1. – С. 81-93. doi: 10.1016/j.iac.2010.09.010.
71. Tanaka T. et al. Effects of substance P and substance K on the growth of cultured keratinocytes // *Journal of investigative dermatology*. – 1988. – T. 90. – №. 3.

- 72.Lindsey K. Q. et al. Neural regulation of endothelial cell-mediated inflammation //Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. – Elsevier, 2000. – T. 5. – №. 1. – C. 74-78. doi: 10.1046/j.1087-0024.2000.00013.x.
- 73.Moura L. I. F., Cruz M. T., Carvalho E. The effect of neurotensin in human keratinocytes–implication on impaired wound healing in diabetes //Experimental biology and medicine. – 2014. – T. 239. – №. 1. – C. 6-12. DOI: 10.1177/1535370213510665
- 74.Steinhoff M. et al. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation //Archives of dermatology. – 2003. – T. 139. – №. 11. – C. 1479-1488. DOI: 10.1001/archderm.139.11.1479
- 75.Noda S. et al. Characterization of muscarinic receptors in the human melanoma cell line SK-Mel-28 via calcium mobilization //Cancer letters. – 1998. – T. 133. – №. 1. – C. 107-114.
- 76.Slominski A. T., Manna P. R., Tuckey R. C. Cutaneous glucocorticosteroidogenesis: securing local homeostasis and the skin integrity //Experimental dermatology. – 2014. – T. 23. – №. 6. – C. 369-374. DOI: 10.1111/exd.12376
- 77.Slominski A. et al. Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions //The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. – 2013. – T. 137. – C. 107-123. DOI: [10.1016/j.jsbmb.2013.02.006](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.02.006)
- 78.Jamora C. et al. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development //Nature. – 2003. – T. 422. – №. 6929. – C. 317-322.
- 79.Reichelt J., Furstenberger G., Magin T. M. Loss of keratin 10 leads to mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, increased keratinocyte turnover, and decreased tumor formation in mice //Journal of investigative dermatology. – 2004. – T. 123. – №. 5. – C. 973-981.

80. Stojadinovic O. et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of β -catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing // *The American journal of pathology*. – 2005. – T. 167. – №. 1. – C. 59-69.
81. Curtis B. J., Radek K. A. Cholinergic regulation of keratinocyte innate immunity and permeability barrier integrity: new perspectives in epidermal immunity and disease // *Journal of investigative dermatology*. – 2012. – T. 132. – №. 1. – C. 28-42
82. Paladini R. D. et al. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16 // *The Journal of cell biology*. – 1996. – T. 132. – №. 3. – C. 381-397.
83. Pullar C. E. et al. β -Adrenergic receptor modulation of wound repair // *Pharmacological research*. – 2008. – T. 58. – №. 2. – C. 158-164.
84. Bjurholm A. et al. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. // *Peptides*. 1988;1(9):165-171
85. Bellinger D.L. et al. Innervation of lymphoid organs and implications in development, aging, and autoimmunity. // *International journal of immunopharmacology*. 1992;3(14):329-344.
86. Trinh, X.-T.; Long, N.-V.; Van Anh, L.T.; Nga, P.T.; Giang, N.N.; Chien, P.N.; Nam, S.-Y.; Heo, C.-Y. A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9573. <https://doi.org/10.3390/ijms23179573>
87. Eckhart L. et al. Cell death by cornification // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2013. – T. 1833. – №. 12. – C. 3471-3480
88. Chen P, Vilorio NC, Dhatariya K, Jeffcoate W, Lobmann R, McIntosh C, Piaggese A, Steinberg J, Vas P, Viswanathan V, Wu S, Game F. Guidelines on interventions to enhance healing of foot ulcers in people with diabetes (IWGDF 2023 update). *Diabetes Metab Res Rev*. 2024 Mar;40(3):e3644. doi: 10.1002/dmrr.3644. Epub 2023 May 25. PMID: 37232034

89.Yorek MA. Alternatives to the streptozotocin-diabetic rodent. *Int Rev Neurobiol.* 2016;127:89-112. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.03.002>