

УДК 616

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РЕПАРАЦИИ ДЕРМЫ В ДИНАМИКЕ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА ПРИ СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

И. Э. Барина

Донецкий национальный медицинский университет, г. Донецк

Разнообразие клинических форм и неопределенность патогенетических механизмов развития синдрома диабетической стопы (СДС) определяет резистентность к общепринятым методам лечения ран, высокую частоту прогрессирования гнойно-деструктивного процесса и инвалидизацию пациентов [6]. Заживление раны представляет собой сложный процесс, направленный на ликвидацию повреждения, хронология и конечный исход которого зависят от эффективности реализации последовательных фаз, включая воспаления, пролиферацию резидентных клеток с закрытием раневого дефекта грануляционной тканью, контракцию и эпителизацию раны с ремоделированием внеклеточного матрикса [3]. При этом репаративные процессы, с одной стороны, жестко связаны с характером течения воспаления, а другой – детерминируют сроки восстановления структурного гомеостаза и барьерных свойств кожи [4, 5]. Несмотря на то, что репаративную регенерацию кожи считают стереотипным процессом, на сегодняшний день, по-прежнему, нет ответов на ряд вопросов. Каковы причины (патогенетические факторы) и механизмы нарушения репарации при сахарном диабете? Нарушение работы каких клеток играет ведущую роль в детерминации неэффективной репарации тканей (дермы, эпидермиса), заведомо обладающих высоким регенераторным потенциалом? Каковы структурные проявления и критерии выраженности развивающегося при СДС дизрегенераторного синдрома? С нашей точки зрения, наиболее продуктивным может оказаться анализ формирования грануляционной ткани. Эффективность этого процесса определяется участием двух ключевых видов клеток – миофибробластов, маркером которых является  $\alpha$ -актин гладких миоцитов ( $\alpha$ -SMA), и эндотелиоцитов, идентифицируемых по экспрессии рецепторов к витронектину – CD31<sup>+</sup>. Очевидно, что успешная реализация поставленной задачи требует не только выяснения закономерностей программы репаративной регенерации кожи при СДС, но и количественной оценки структурных изменений, позволяющая объективизировать анализ проявлений дизрегенераторного синдрома, разработать систему критериев прогнозирования течения раневого процесса и эффективности проводимого лечения.

**Целью** работы была формализация критериев оценки репарации дермы в динамике раневого процесса при СДС.

**Материал и методы исследования.** Проведено морфологическое исследование биопататов краевой зоны ран кожи 18 пациентов СДС (ишемическая и смешанная форма, глубина поражения по классификации Wagner - III-IV степень) с позитивной клинической реакцией на проводимое лечение: вскрытие флегмоны или некрэктомия вели к заживлению ран в течение 18-24 дней после поступления в стационар. Оценка состояния маргинальной зоны раны проводили на момент поступления в стационар, через 3-5, 10-14 суток после начала лечения. Биопсийный материал фиксировали в формалине, обезвоживали в спиртах восходящей плотности, заливали в парафин. После дегидратации кусочки заливали в высокоочищенный парафин с полимерными добавками (Richard-Allan Scientific, США) при температуре не выше 60°C. Срезы толщиной 5 мкм выполняли на ротационном микротоме Microm HM325 с системой переноса срезов STS (Carl Zeiss, Германия). Общеморфологическую оценку кожи проводили при окраске гематоксилином и эозином. Для гистохимической оценки химического состава соединительной ткани использовали окраску по методу Маллори, по Унна, толудиновым синим. Для оценки клеточного состава применяли кариометрический анализ и

иммуноцитохимическое исследование с использованием моноклональных антител к CD31 и  $\alpha$ -SMA. Препараты докрасивали гематоксилином Майера. При морфологическом исследовании оценивали удельный объем (УО) сосудов, тканевых элементов в состоянии деструкции, УО инфильтратов. В участках неинфильтрированной соединительной ткани учитывали также УО клеток, основного аморфного вещества и волокон [1]. При иммуноцитохимическом исследовании устанавливали распределение иммунопозитивных клеток в разных слоях дермы и гиподерме, количество (удельную плотность - УП), локализацию и характер ассоциации с другими структурными компонентами дермы. Оценку количества клеток проводили в 10 полях зрения каждого слоя кожи при увеличении  $\times 630$ . При оценке межклеточных коопераций в 10 полях зрения выбирали по 100 клеток, среди которых производили подсчет количества разных видов клеток. Учитывали также отношение удельной плотности (УП) эндотелиоцитов (ЭнЦ) и УО сосудов. Интенсивность иммуноцитохимической реакции оценивали полуколичественным методом на основании выраженности окраски (цвет) и количества гранул в цитоплазме как слабую (+), умеренную (++) и выраженную (+++). В качестве контроля использовали биоптаты кожи 5 пациентов сходного возраста без СД. При статистической обработке использовали критерий Манна-Уитни для сравнения малых групп при отсутствии нормального распределения, для выявления взаимосвязи между показателями – коэффициент ранговой корреляции Спирмена [2].

**Результаты исследования и их обсуждение.** При морфологическом исследовании краевой зоны ран кожи у больных СДС на момент госпитализации выявлено наличие деструкции, воспалительной инфильтрации и репарации – затрагивающих все слои кожи. В эпидермисе имели место явления деструкции клеток на фоне перемежающегося отсутствия рогового слоя. Пространства между кератиноцитами базального и шиповатого слоев были расширены. В сосочковом слое дермы на фоне вазодилатации и повышения УО сосудов (на 51,71% по сравнению с контролем;  $p < 0,01$ ) отмечалось обилие мелких сосудов с позитивной реакцией на CD31<sup>+</sup> вблизи эпидермо-дермальной границы. Расширение веноулярного отдела петель поверхностной сети сосудов сопровождалось развитием умеренного отека соединительной ткани, о чем свидетельствовало повышение УО основного аморфного вещества на 27,61% по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). На этом фоне количество волокон и клеток снижалось соответственно на 30,77% и 26,84% относительно контроля ( $p < 0,01$ ), несмотря на присутствие в составе сосочков макрофагов, отдельных лимфоцитов и нейтрофилов. Суммарная оценка удельной плотности эндотелиоцитов с позитивной реакцией на CD31 оказалась практически на 50% ниже, чем в контроле ( $p < 0,01$ ). При этом в составе сосочков определялись единичные миофибробласты, присутствие которых здесь, как и в других слоях кожи, очевидно, было связано с длительно текущим воспалением и стимуляцией репаративных процессов локально продуцируемыми цитокинами [6]. Характерно, что количество миофибробластов, как и выраженность реакции клеток сосудистого эндотелия были выше в сосочках, чем в зоне под гребешками эпидермиса. Основная масса инфильтратов в поверхностной части дермы была ассоциирована с крупными сосудами поверхностного сплетения. В их составе преобладающим клеточным элементом были лимфоциты и макрофаги. Кроме того, здесь определялись отдельные плазмциты и тучные клетки и нейтрофилы.

Строение сетчатого слоя оказалось более полиморфным. В области края раны отмечалась деструкция коллагеновых волокон (фибриноидное набухание и некроз). Зона альтерации была окружена инфильтратом, образованным в основном нейтрофилами и макрофагами. На периферии таких зон определялись участки, богатые кровеносными сосудами. Их эндотелиальная выстилка была гетерогенной – участки деструкции эндотелиоцитов чередовались с зонами выраженной иммунореактивности на CD31. Иногда вследствие пролиферации CD31<sup>+</sup> клетки закрывали просвет капилляров. Но при этом УО сосудов оказался в 2 раза выше контроля ( $p < 0,01$ ). Эндотелий крупных сосудов характеризовался набуханием ядер и цитоплазмы, выявлялись участки деструкции эндотелиоцитов, явления краевого стояния лейкоцитов. Среди последних преобладали нейтрофилы, реже моноциты. Эти типы лейкоцитов обнаруживались в большом количестве в периваскулярной зоне. В некоторых участках в стенке сосудов отмечались

фигуры митоза эндотелиоцитов. Вокруг таких сосудов выявлялись макрофаги и фибробласты с овальными активными ядрами. Суммарный УО резидентных клеток в этом слое снизился на 43,07% по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ), но при этом УО лейкоцитов достигал  $12,7 \pm 1,75\%$  от общего объема сетчатого слоя. Вследствие деструкции и отека межклеточного вещества УО волокон с нормальным строением снизился на 32,4% ( $p < 0,01$ ). Вероятно, компенсаторной реакцией на это явилось увеличение численности миофибробластов, УО которых достигал 50% от суммарного количества клеток дифферона механоцитов в данном слое дермы. Миофибробласты в основном обнаруживались в периваскулярном регионе сетчатого слоя, а также на границе перифокальной инфильтрации вокруг зон деструкции. В ряде случаев участки деструкции и нейтрофильной инфильтрации отмечались на границе с гиподермой. Интересно, что при этом достаточно многочисленные клетки позитивные на  $\alpha$ -SMA обнаруживались вокруг мелких сосудов между адипоцитами, где явления лимфоцитарной и нейтрофильной инфильтрации практически отсутствовали. Реакция на CD31 также была равномерно интенсивной в капиллярах вокруг групп адипоцитов.

Через 3-5 суток после операции и эффективного консервативного лечения в зоне грануляции отмечалось суммарное повышение количества сосудистых профилей при снижении УО сосудов на 4,55% в сосочковом и на 13,64% в сетчатом слоях дермы ( $p < 0,05$ ). Этот феномен был ассоциирован с явлениями ангиогенеза и повышением удельной плотности эндотелиальных клеток на 25 % по сравнению с таковым до начала лечения ( $p < 0,05$ ), хотя данный показатель был на 37,5% ниже, чем в контроле ( $p < 0,01$ ). Реорганизация микроциркуляторного русла сосочкового слоя сопровождалась снижением отека (УО основного аморфного вещества снизился на 13,03%;  $p < 0,05$ ), что сопровождалось повышением плотности расположения клеток на 18,05% по сравнению с данными в предыдущий срок исследования ( $p < 0,05$ ). Во многом это было связано с повышением количества миофибробластов, УП которых выросла практически в 2 раза ( $p < 0,01$ ), отражая стимуляцию репаративной регенерации в дерме. Интересно, что данные события сопровождалось повышением толщины эпидермиса и снижением УО деструктивно измененных клеток при усилении пролиферативной активности клеток базального и шиповатого слоев. На границе между сосочковым и сетчатым слоем дермы по-прежнему отмечались лимфоцитарные инфильтраты, вокруг которых обнаруживались диффузно расположенные миофибробласты.

В сетчатом слое определялось также снижение отека – УО аморфного вещества уменьшился на 29,12% по сравнению с данными на момент госпитализации ( $p < 0,01$ ). Снижение УО инфильтратов на 19,69% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с предыдущим сроком исследования сопровождалось повышением суммарной клеточности сетчатого слоя. Это было связано с формированием многочисленных «дорожек» CD31<sup>+</sup> клеток, отражающих неоваскуляризацию. Участки последней были окружены макрофагами и многочисленными миофибробластами. УП  $\alpha$ -SMA позитивных клеток в данном слое выросла на 150% ( $p < 0,001$ ), а эндотелиоцитов – на 40% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с показателями до лечения. Однако при этом оставался низким процент зрелых фибробластов, УП которых оказалась на 57,14% ниже, чем в контроле ( $p < 0,01$ ). Эти изменения во многом были обусловлены снижением инфильтрации, УП нейтрофилов снизилась на 40% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с предыдущим сроком исследования, но местами достигала 10-12% от количества клеток сетчатого слоя. К позитивным изменениям можно также отнести снижение степени дегрануляции тучных клеток. При этом межклеточное вещество сетчатого слоя в зонах репарации характеризовалась признаками незрелости с преобладанием тонких ретикулярных волокон.

Через 10-16 суток после поступления в стационар клинически у обследованных больных отмечалась краевая эпителизация раны. Морфологически в этой зоне отмечалась тенденция к восстановлению структуры дермы. При этом УО сосудов, хотя и снизился на 16,67% по сравнению с предыдущим сроком исследования ( $p < 0,05$ ), но на 20,69% превышал контрольный уровень ( $p < 0,05$ ). Преобладали относительно широкие сосуды с небольшим количеством эндотелиоцитов. Удельная плотность CD31<sup>+</sup> клеток за прошедшую неделю выросла на 20% ( $p < 0,05$ ), но оставалась на 25% ниже контроля ( $p < 0,05$ ). Дизморфогенез сосочкового слоя проявлялся повышением высоты сосочков,

сохранением до 16-21 суток в их структуре макрофагов и миофибробластов при снижении доли зрелых фибробластов. Изменение межклеточных отношений отразилось на составе межклеточного вещества, УО аморфного вещества оказался на 7,27% выше ( $p < 0,05$ ), а волокон – на 16,67% ниже ( $p < 0,05$ ), чем в контроле. На границе между сосочковым и сетчатым слоем, по-прежнему, сохранились лимфо-гистиоцитарные инфильтраты, хотя их УО уменьшился на 18,83% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с предыдущим сроком исследования и на 65,35% ( $p < 0,01$ ) относительно исходного состояния. Аналогичная динамика была отмечена в сетчатом слое и вокруг глубокого сосудистого сплетения дермы. Типичным признаком было сохранение «незрелости» соединительной ткани, проявляющееся повышением плотности клеток, пролонгированием ремоделирования сосудистого русла на фоне относительной ишемии (дефицит эндотелиоцитов на фоне широких сосудов). В межклеточном веществе имело место снижение УО волокон, в результате чего матрикс местами был по структуре характерен для рыхлой, а не для плотной неоформленной соединительной ткани. В ее составе выявлено большее содержание ретикулярных волокон при дефиците толстых коллагеновых и эластических волокон. При этом часть волокон находилась в состоянии набухания, и такие участки были окружены лейкоцитами, в составе которых помимо лимфоцитов и макрофагов определялись нейтрофилы и плазмоциты. Это может свидетельствовать о незавершенности процесса замены матрикса, повреждение которого произошло еще до поступления в стационар.

#### Заключение

Развитие раневого процесса при СДС протекает на фоне предсуществующего хронического воспаления и эндотелиальной дисфункции. На момент госпитализации в коже превалирует гнойно-деструктивный процесс. Через 3-5 суток после лечения наблюдается снижение нейтрофильной инфильтрации, стимуляция процессов ангиогенеза и формирования грануляций. При этом 1,5-2-кратный прирост УП миофибробластов происходит на фоне дефицита удельной плотности эндотелиоцитов, сохранении перивакулярных лимфоцитарных инфильтратов и диффузной инфильтрации нейтрофилами сетчатого слоя дермы. Эпителизация раны сопровождается замедлением созревания соединительной ткани, нарушением ремоделирования межклеточного вещества и дизморфогенезом эпидермиса.

#### Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М. Медицина, 1991. – 381 с.
2. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики / Ю.Е. Лях, ГВ. Гурьянов, В.Н. Хоменко, О.А. Панченко. – Д. – 2006. – 211 с.
3. Мяделец О.Д. Морфофункциональная дерматология / О.Д. Мяделец, В.П. Адаскевич // Медлит. – 2006.
4. Федоров Д.Н., Ивашкин А.Н., Шинин В.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика репаративных процессов в длительно не заживающих ранах / А.Н. Ивашкин, В.В. Шинин // Арх. патол. – 2002. – №1. – С. 8-11.
5. Dinh T.L. Review of the mechanisms implicated in the pathogenesis of the diabetic foot / T.L. Dinh // Int. J. Low Extrem. Wounds. – 2005, № 4. – P. 154 -159.
6. Sweitzer S.M. What is the future of diabetic wound care? / S.M. Sweitzer // Diab. Educ. – 2006. – Vol. 32, №. – P. 197-210.

#### Реферати

##### КІЛЬКІСНА ОЦІНКА РЕПАРАЦІЇ ДЕРМИ В ДИНАМІЦІ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ ЗА УМОВ СИНДРОМУ ДІАБЕТИЧНОЇ СТОПИ

Барінова М.Е.

З метою формалізації критеріїв оцінки репарації дерми в динаміці ранового процесу за умов цукрового діабету проведено морфометричний аналіз біоптатів шкіри 18 хворих на синдром діабетичної стопи на момент госпіталізації, через 3-5, 10-14 діб після початку лікування з використанням імуноцитохімії. На момент госпіталізації в шкірі

##### QUANTITATIVE ANALYSIS OF DERMIS REPARATION DURING WOUND PROCESS AT DIABETIC FOOT SYNDROME

Barinova M.E.

To formalize the criteria of estimation of dermis reparation at diabetes mellitus the morphometric analysis of skin biopsies of 18 patients with diabetic foot syndrome was performed at the moment of hospitalization, after 3-5 and 10-14 days after treatment using immunocytochemistry. It was shown that at before treat-

превалює гнійно-деструктивний процес. Загоєння ран реалізується за участю клітин-попередниць, що розташовані в глибоких шарах дерми і гіподермі. Розвиток грануляції проявляється підвищенням кількості CD31<sup>+</sup> клітин і міофібробластів, що супроводжується дизморфогенезом епідермісу.

**Ключові слова:** репарація дерми, рановий процес, діабетична стопа.

ment the destructive process in skin took place. Wound healing depends on precursors which are located in deep layers of dermis and hypodermis. Granulation tissue development was accompanied with increase of CD31<sup>+</sup> and  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> cells. Reparation had features of dys-morphogenesis.

**Key words:** dermis reparation, wound process, diabetic foot.

УДК 616.32/35-092.9:615.916'175

### ПРОДУКЦІЯ СУПЕРОКСИДНОГО АНІОН-РАДИКАЛУ В ТКАНИНАХ ОРГАНІВ ТРАВЛЕННЯ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ВІДПРАЦЬОВАНОГО МОТОРНОГО МАСЛА НА ТЛІ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ НІТРАТОМ НАТРІЮ

І.В. Барухіна  
ВДНЗ України "Українська медична стоматологічна академія", м. Львів

*Стаття є фрагментом планової НДР ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» «НО-залежні механізми розвитку патологічних процесів та їх корекція фізіологічно активними речовинами» (№ держреєстрації №0104U000746).*

Підвищення наприкінці ХХ століття антропогенного впливу на довкілля призвело до появи нової екологічної та медико-біологічної проблеми, пов'язаної з підвищенням вмісту продуктів нафтової переробки та мінеральних добрив в організмі людини. За оцінками експертів, реальне добове навантаження неорганічними азотовмісними сполуками складає в середньому 150-350 мг/людину, сягаючи в ряді випадків 500, 600 та більше мг/людину за добу, що в 1,5-2 рази перевищує відповідний показник в країнах Європи і США [5]. Щороку збільшуються обсяги споживання мастильних матеріалів і, як наслідок, обсяги відпрацьованих масел. Останні містять токсичні сполуки, мають невисокий ступінь біорозкладання (10-30%) і є небезпечними відходами, що підлягають обов'язковому збору й утилізації, а в окремих випадках – знищенню. Проте, законодавство в Україні та Росії з цього питання до нашого часу відсутнє. 26-77% усіх відпрацьованих масел нелегально скидається на ґрунт і у водойми; 40-48% - збирається, але з зібраних відпрацьованих масел тільки 14 – 15% йде на очищення [1].

До цього часу практично відсутні роботи щодо дослідження механізмів структурних та функціонально-метаболических порушень організму при сукупному надходженню в організм нітратів та відпрацьованого моторного масла (ВММ). Першими органами, які можуть бути мішенню для токсичної дії цих токсикантів за умов перорального їх введення, є органи системи травлення.

**Метою** роботи було дослідження змін продукції супероксидного аніон-радикалу мікосомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) та НАДФН-оксидазою лейкоцитів тканин пародонту, слизової оболонки шлунку (СОШ) та тонкої кишки за умов дії ВММ на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію

**Матеріал та методи дослідження.** Дослідження були проведені на 40 білих щурах лінії Вістар масою 130-160 г. У першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварин (контрольна серія); у другій серії – після інтрагастрального введення ВММ (500 мг/кг маси на добу) протягом 2-х місяців; у третій серії – після відтворення хронічної інтоксикації нітратом натрію. Для введення тваринам використовували суміш автомобільного масла, що міститься у 1000 відпрацьованих фільтрів. Хронічну інтоксикацію нітратом натрію відтворювали шляхом щоденного введення нітрату натрію з їжею у дозі 200 мг/кг протягом 60 діб. Щурів декапітували під ефірним наркозом.

Утворення супероксидного аніон-радикалу ( $\cdot O_2^-$ ) в тканинах щурів оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ) з індукторами у вигляді НАДН, НАДФН та бактеріальних ліпополісахаридів (пірогенал) [3]. Отримані дані оброблювали варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.