

Иванов Евгений Викторович

Нейропатия различных отделов нервной системы и механизмы ранозаживления на фоне изолированной гипергликемии у крыс

14.03.03 – Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре физиологии и общей патологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук Галстян Гагик Радикович

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук Гаврилова Светлана Анатольевна

Официальные оппоненты:

Бирюкова Елена Валерьевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры эндокринологии, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова

Куликов Дмитрий Александрович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры эндокринологии ФУВ, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится «26» июня 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.203.06

кандидат медицинских наук

Горячев Вячеслав Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Сахарный диабет называют неинфекционной пандемией, с 1980 года численность больных от населения Земли возросла с 4,7% до 8,5% (WHO 2016), по текущим прогнозам скорость увеличения числа больных диабетом будет только возрастать.

Среди осложнений сахарного диабета отдельно стоят связанные с нарушениями репаративных процессов. Клинически чаще всего это проявляется в форме синдрома диабетической стопы. В следствие ангиопатии и/или нейропатии на коже дистальных участков конечностей развиваются длительное время незаживающие язвы, трудно поддающиеся лечению (A.L. Mendes, H.A. Miot, V. Haddad 2017). Механизмы нарушения репаративных процессов и ранозаживления при сахарном диабете плохо изучены. В последнее время были открыты новые процессы заживления ран, связанные с изменением фенотипа частично дифференцированных кератиноцитов. Интерес представляет возможное изменение фенотипа кератиноцитов и соотношения кератиноцитов различных типов в процессе заживления раны при сахарном диабете (T.N. Demidova-Rice, M.R. Hamblin, I.M. Herman 2012). При заживлении острых ран у людей в течение первых двух недель кератиноциты края раны преимущественно представлены мигрирующим фенотипом, экспрессирующим такие маркеры, как цитокератины 14 и 16 и в лидирующей части длинного «языка» заживления не экспрессирующих цитокератины 2 и 10. Кератиноциты в краях диабетических язв активно экспрессируют маркеры миграции, например, цитокератин 16 и по некоторым данным не экспрессируют цитокератины дифференцировки, однако, несмотря на это, не мигрируют для закрытия раневого дефекта (M.L. Usui и др. 2008).

Изменение фенотипов кератиноцитов в процессе заживления диабетической раны преимущественно описаны у людей. Полученные сведения не позволяют судить о ключевых механизмах, вызывающих данные эффекты. В экспериментальных моделях репарации кожи при диабете изменения экспрессии цитокератинов показаны в одной работе и неполностью описаны (R.R. Ahmed и др. 2015). Вместе с тем, в современной литературе нет единого мнения относительно того, является ли гипергликемия основным фактором, вызывающим изменения в процессе заживления раны при сахарном диабете. J. Okano и соавт. показали, что у мышей гипергликемия ухудшает барьерные свойства кожи (J. Okano и др. 2016). Влияние гипергликемии на заживление раны, пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов в моделях сахарного диабета остается плохо изученным.

С другой стороны, существуют данные о влиянии изменений, происходящих в нервной системе на заживление ран при сахарном диабете. Нейропатия является одним из ключевых осложнений СД и может проявляться различными путями. На процесс заживления кожи могут влиять нарушения в сенсорном, моторном и автономном отделах нервной системы, как и нарушения в центральной нервной системе. Участие нервной системы в процессах репарации в принципе плохо изучено, прямая связь между диабетической нейропатией и репарацией кожи, реализуемая через непосредственное действие нейромедиаторов на кератиноциты, в литературе только предполагается (S. Generini и др. 2004; N. Xia и др. 2015; Y. Yiangou и др. 2002). Высокая гипергликемия считается одним из пусковых факторов развития нейропатии, однако, как и в случае с нарушениями репарации, она не отделена от других патологических факторов при моделировании заболевания (G.J. Biessels и др. 2014).

В данной работе выбрана модель стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета крыс, поскольку гипергликемия является в ней основным патологическим фактором при умеренной поддержке экзогенным инсулином (Y. Brito-Casillas, C. Melián, A.M. Wägner 2016).

Степень разработанности проблемы

Стрептозотоциновая модель сахарного диабета крысы является одной из наиболее изученных и воспроизводимых в исследованиях механизмов развития заболевания (A. Al-Achi, R. Greenwood 2001; N.A. Calcutt 2004; Z. Hajna и др. 2016; S. Lenzen 2008). В ряде работ использована длительная поддерживающая инсулинотерапия, однако в немногих из них удалось достигнуть стабильного высокого уровня гипергликемии с длительным течением заболевания (G.E. Bestetti и др. 1987; N. Но и др. 2012; M. Yono и др. 2005).

Диабетические язвы и заживление ран при сахарном диабете у больных людей и в моделях заболевания являются объектами исследований во многих работах. Тем не менее, молекулярно-клеточные механизмы протекающих нарушений изучены в меньшей степени. В стрептозотоциновых моделях сахарного диабета, как правило, показано замедленное ранозаживление и снижение клеточной пролиферации (C.O.-L. Yu и др. 2017; Z. Zheng и др. 2017). Процессы изменения фенотипов кератиноцитов относительно хорошо изучены для обычных раневых дефектов (I.M. Freedberg и др. 2001; J.D. Rotty, P.A. Coulombe 2012; M.L. Usui и др. 2005). Показано, что заживление диабетических ран связано с активацией кератиноцитов, однако степень изученности их фенотипического цикла при этом состоянии намного ниже, чем при репарации обычных раневых дефектов (R.R. Ahmed и др. 2015; M.L. Usui и др. 2008).

Различные проявления нейропатии хорошо изучены в моделях сахарного диабета. Во многих работах показано приоритетное развитие автономной нейропатии, проявляющееся снижением вариабельности ритма сердца, однако четко не прослежена связь между гипергликемией и нарушениями ВРС (К.Н. Chon и др. 2014; C.L. Stables, R.L. Glasser, E.L. Feldman 2013). Известно, что в экспериментальных моделях сахарного диабета блокирование β -адренорецепторов замедляет заживление ран, но точные механизмы влияния нервной системы на репарацию не изучены (B. Romana-Souza, J.S. Santos, A. Monte-Alto-Costa 2009).

Цель исследования

Определить влияние нейропатии на репарацию раневого дефекта у крыс в модели стрептозотоцинового сахарного диабета с длительной стойкой гипергликемией

Задачи исследования

- 1) Опираясь на собственные и литературные данные, разработать модификацию модели стрептозотоцинового сахарного диабета крысы с устойчивой длительной (66 суток) гипергликемией, приводящей к развитию нейропатии
- 2) У бодрствующих крыс методом измерения вариабельности ритма сердца оценить развитие автономной формы диабетической нейропатии на фоне длительной гипергликемии.
- 3) Оценить развитие диабетической нейропатии сенсорного отдела нервной системы у крыс методами электроретинографии, офтальмоскопии и измерения температурной чувствительности
- 4) Изучить динамику и морфологические признаки заживления раневого дефекта у крыс на фоне диабетической нейропатии
- 5) Изучить проявления нейропатии в виде изменения плотности рецепторов к медиаторам автономной нервной системы в эпидермисе совместно с фенотипическими изменениями кератиноцитов в процессе репарации раны у крыс в модели сахарного диабета

Научная новизна полученных результатов

В данной работе показано, что нейропатия при сахарном диабете связана с клеточными механизмами репарации кожи. Впервые в стрептозотоциновой модели сахарного диабета крысы изучены процессы фенотипической дифференциации покоящихся и мигрирующих кератиноцитов. Впервые показано, что гипергликемия в

стрептозотоциновой модели сахарного диабета крысы приводит к снижению variability ритма сердца, при этом изменения состояния рецепторного аппарата клеток кожи, подвергающихся вегетативной регуляции, и иннервации сердца затрагивают различные отделы автономной нервной системы. Разработана модель сахарного диабета, существенно отличающаяся от описанных в литературе благодаря изолированному характеру высокой гипергликемии, удерживаемой несмотря на введение поддерживающих доз инсулина. В изученные сроки не было обнаружено значимых изменений болевой чувствительности, что также ранее не описано в литературе.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что в целом в данной работе впервые показано, что выраженная нейропатия с преимущественным поражением автономной нервной системы затрагивает процесс регенерации кожи, однако не вызывает нарушения окончательного заживления ран.

Теоретическая и практическая значимость работы

В проведенном исследовании показано, что гипергликемия приводит к нейропатии вегетативного и в существенно меньшей степени сенсорного отдела нервной системы. При этом нарушаются механизмы репарации раны, но полнота заживления значимо не изменяется. Эти данные идут в разрез с современной концепцией патогенеза сахарного диабета, в которой гипергликемия является одним из ведущих патологических факторов. Впервые получены данные о связи между влияниями нервной системы на кератиноциты и нарушениями клеточных процессов активации клеток в процессе реэпителизации при сахарном диабете.

Полученные результаты указывают на необходимость поиска другого фактора, оказывающего воздействие на состояние нервной системы при сахарном диабете, вероятно большую роль могут играть метаболические и иммунологические механизмы. Подтверждено, что снижение ВРС является одним из первых проявлений диабетической нейропатии, чему уделяется значительное внимание как в фундаментальных, так и в клинических исследованиях.

Результаты работы будут использованы в научной и педагогической практике факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, в том числе в преподавании предмета патологическая физиология, подготовке аспирантов на кафедре физиологии и общей патологии. На основе данной работы будут проведены дальнейшие исследование механизмов развития диабетической нейропатии и нарушения репарации кожи, как доклинические, так и клинические.

Методология и методы исследования

Данная работа основана на моделировании сахарного диабета однократной инъекцией стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг крысам линии Wistar и последующем моделировании раневого дефекта на коже животных. Были использованы следующие методы: динамическое наблюдение, ежедневное взвешивание, измерение концентрации глюкозы и кетоновых тел в крови, запись ЭКГ с оценкой ВРС, оценка болевой чувствительности методом отдергивания хвоста, окулография, электроретинография, патоморфологическое исследование с окрашиванием гематоксилином и эозином, иммуногистохимия, световая микроскопия, статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту

1) В модели стрептозотоцинового сахарного диабета крысы под действием длительной стойкой гипергликемии развивается выраженная автономная нейропатия, ее проявления различаются в сердце и коже

2) Различные компоненты сенсорного отдела нервной системы по-разному реагируют на действие гипергликемии в модели стрептозотоцинового сахарного диабета: температурная чувствительность не нарушается, но проведение во внутренних слоях сетчатки ухудшается на фоне ишемии

3) Нейропатия в модели сахарного диабета крысы замедляет репарацию кожи, нарушает клеточные механизмы реэпителизации, но не препятствует окончательному заживлению раны

Степень достоверности

Работа проведена на самцах крыс линии Wistar, имеющих необходимые ветеринарные свидетельства и полученных из сертифицированного вивария. В работе использована достаточная выборка лабораторных животных. Базовая модель сахарного диабета хорошо изучена и описана в литературе и считается адекватно приближенной к клиническому заболеванию. В проведении исследования использованы сертифицированные приборы с низкой величиной погрешности, методики отработаны.

Апробация результатов

Результаты данного исследования были представлены на VIII Всероссийском диабетологическом конгрессе с международным участием "Сахарный диабет - пандемия

XXI века" (Москва, Россия, 28 февраля – 3 марта 2018 года), на конгрессе Diabetic Foot Study Group of the EASD 15th Scientific Meeting (Берлин, Германия, 28–30 октября 2018 года) и на конференции «Актуальные проблемы биомедицины 2018» (Санкт-Петербург, Россия, 12-13 апреля 2018 года).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личное участие

Автор принял участие в выполнении всех этапов исследования.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки исследования, списка сокращений, списка использованной литературы, включающего 210 публикаций, в том числе 27 на русском языке и 183 на английском языке. Диссертация включает в себя 35 рисунков и 4 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы

В рамках общего протокола эксперимента, крыс рандомизировали по массе и вариабельности ритма сердца. Две основные группы: экспериментальная (сахарный диабет, СД) и контрольная (цитратный буфер, ЦБ) были изначально разделены на три подгруппы каждая по срокам забора материала после нанесения раны на кожу – 8-е, 16-е или 24-е сутки. В каждую подгруппу перед началом эксперимента распределили 14 (в экспериментальной группе) или 10 (в контрольной группе) крыс. В группу интактного контроля также распределили 10 крыс. 8 крыс вошли в предварительный эксперимент для поиска оптимальной поддерживающей дозы инсулина, общее число животных = 90.

Для моделирования сахарного диабета крысам экспериментальной группы и/п вводили стрептозотоцин в дозе 65 мг/кг, растворенный в цитратном буфере (pH = 4,5, t = +4°C), крысам контрольной группы – только цитратный буфер. На 3-и сутки после введения вещества оценивали концентрацию глюкозы в крови крыс. В экспериментальной группе животных с уровнем глюкозы менее 15 мМ/мл исключали из исследования, этот день считали точкой отсчета эксперимента. С этого дня начинали поддерживающие инъекции инсулина детемир (Левемир®) в дозе 2 ЕД/кг, которую подобрали в предварительном эксперименте. В данной концентрации введение инсулина поддерживало общее состояние животных на стабильном уровне, при этом средняя концентрация глюкозы в крови оставалась стабильно высокой.

В течение всего времени исследования животных в основном эксперименте ежедневно взвешивали, еженедельно крысам измеряли концентрацию глюкозы в крови. Измерение проводили утром до введения ежедневной дозы инсулина. Уровень кетоновых тел измеряли перед началом эксперимента, на 14-е, 28-е, 42-е сутки и в конечных точках.

На 42-е сутки крысам, анестезированным диэтиловым эфиром, на спине под левой лопаткой по трафарету вырезали круглую рану диаметром 2 см. Площадь открытого раневого дефекта измеряли каждые третьи сутки вплоть до конечной точки. Трафареты сканировали и размеры ран подсчитывали в программе ImageJ. В конечных точках, на 8-е, 16-е или 24-е сутки проводили забор гистологического материала. У крыс группы интактного контроля материал забирали на 4-м месяце жизни. Кожу вырезали вместе со всей площадью раны или сформировавшегося рубца, после чего разрезали по короткой стороне дефекта. Для иммуногистохимического исследования использовали следующие первичные антитела: к цитokerатину 10 – АТ мыши (ab9025, Abcam), к цитokerатину 17 – АТ мыши (ab19067, Abcam), к β 2-адренорецепторам – АТ кролика (ab182136, Abcam), к α 7-NACh-рецепторам – АТ кролика (ab10096, Abcam). Использовали 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. Плотность окрашивания оценивали в программе ImagePro Plus 4,5 (Media Cybernetica), сравнивая с отрицательным контролем.

Для оценки состояния хронотропной функции сердца методом анализа ВРС у крыс регистрировали ЭКГ в 1-ом отведении 20 минут в состоянии спокойного бодрствования и 10 минут после холодной пробы (ХП). Для выполнения ХП животных переносили в стеклянный куб на пакет со снегом (+4°C) на 3 минуты. По 5-минутным фрагментам записи определяли медиану значений ЧСС (HR, уд/мин), и медиану длительности среднего RR-

интервала (RR, мс). Из параметров ВРС, определяемых во временной области, рассчитывали показатели, характеризующие: 1) общую ВРС – стандартное отклонение для RR-интервалов (SD_{RR} , мс) и для ЧСС (SD_{HR} , уд/мин) и их коэффициенты вариации (KV_{RR} , KV_{HR}); 2) наиболее быстрые изменения ритма сердца – квадратный корень из среднего квадрата разностей величин длительности смежных RR-интервалов синусового происхождения (RMSSD, мс), процент RR-интервалов синусового происхождения, отличающихся от предыдущего более чем на 3 мс – pNN3; 3) относительно медленные изменения ритма – SD_{AvgRR} и SD_{AvgHR} , т.е. стандартные отклонения средних значений RR-интервалов и ЧСС, вычисленных по 1-минутным сегментам записи, аналоги принятого для человека показателя SDANN, рассчитываемого по 5-минутным сегментам. В спектральной области определяли общую мощность (TP, мс²) спектра в частотном диапазоне 0–2,5 Гц, мощности в низко- (LF, мс², 0,2–0,8 Гц) и высокочастотном (HF, мс², 0,8–2,5 Гц) диапазонах, их отношение (LF/HF), а также их значения, нормированные на общую мощность (LF%, HF%). Болевую чувствительность оценивали по времени отдергивания хвоста крысы, погруженного на 3 см в горячую воду (+55°C).

Электроретинографическое исследование (электроретинограмма, ЭРГ) проводили с помощью электроретинографа «Нейро-ЭРГ» (Neurosoft, РФ) по валидированным методикам. Для оценки функционального состояния сетчатки в темноте записывали палочковую ЭРГ, максимальную ЭРГ, осцилляторные потенциалы, на свету регистрировали колбочковую ЭРГ, ритмическую ЭРГ, зрительные вызванные потенциалы. Офтальмоскопическое исследование обоих глаз проводили с использованием непрямого бинокулярного офтальмоскопа (линза 70D).

Статистический анализ проводили в программном пакете SPSS Statistics 20.0 (IBM, США). Для статистического анализа использовали регрессию Кокса, точный двухсторонний тест Фишера, дисперсионный анализ повторных измерений, смешанную линейную модель. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Развитие сахарного диабета

В начале эксперимента раствор стрептозотоцина в цитратном буфере ввели 42 крысам, цитратный буфер – 30 крысам, 10 крыс вошли в группу интактного контроля. После введения стрептозотоцина на третьи сутки гипергликемия не развилась у 6 животных, 2 крысы умерли, всего в эксперимент в группе СД таким образом вошли 34 крысы. В контрольной группе все животные выжили, уровень глюкозы находился в пределах нормы.

В ходе эксперимента в группе СД умерло 10 из 34 животных. В группе ЦБ зафиксировали 5 летальных исходов из 30 животных. Модель регрессионного анализа Кокса с учетом всех летальных исходов не показала статистически значимых различий (ОР = 1,773, 95% ДИ 0,606 – 5,189, $p = 0,296$).

В результате инъекции стрептозотоцина уровень глюкозы у крыс в группе сахарного диабета в исходной точке развития диабета в 4 – 7 раз превышал среднее значение в контрольной группе ($34,5 \pm 3,2$ ммоль/л по сравнению с $6,2 \pm 2,4$ ммоль/л) и значимо не менялся в течение всего эксперимента (достигая 40 ммоль/л). Различия между группами СД и ЦБ оказались статистически значимы ($p < 0,05$) во всех точках начиная с 1-х суток эксперимента, между временными точками в каждой отдельной группе значимых различий не обнаружено. Уровень кетоновых тел в среднем составил $0,6 \pm 0,3$ ммоль/л, не изменялся по мере развития диабета и не отличался от контрольных групп.

Была зафиксирована медленная отрицательная динамика массы тела животных в экспериментальной группе. Потеря массы за период эксперимента составила около 25% по сравнению с исходным значением, в то время как крысы в группе ЦБ в среднем прибавили 20% массы. Различия между группами СД и ЦБ были статистически значимы на 14-е – 66-е сутки, кроме того, на 42-е – 70-е сутки масса крыс в группе СД была значимо ниже исходной.

Характеризуя состояние животных в полученной модификации стрептозотоциновой модели сахарного диабета можно заключить, что ведущим патологическим фактором в ней является гипергликемия. Концентрация глюкозы на протяжении эксперимента в группе животных с сахарным диабетом была выше в 5-6 раз по сравнению с контрольной группой, концентрация кетоновых тел статистически значимо не менялась, что указывает на отсутствие явных метаболических нарушений. На фоне инсулиновой поддержки смертность в экспериментальной группе значимо не отличалась от контрольной, на протяжении 42 суток эксперимента масса тела была относительно стабильной, отрицательная динамика проявилась после нанесения раны. В мировых литературных источниках гипергликемию выделяют в качестве одного из основных факторов развития диабетической нейропатии, а ее первые признаки фиксируют уже через 4 недели (B.L. Furman 2015; A. King, J. Bowe 2016). Полученная в эксперименте модель сахарного диабета оказалась подходящей для изучения хронических эффектов гипергликемии, в частности развития нейропатии.

Функциональные признаки диабетической нейропатии

При оценке болевой чувствительности не было выявлено статистически значимых различий между группами СД и ЦБ. Несмотря на тенденцию к большему времени отдергивания хвоста в группе СД по сравнению с ЦБ на 35-е, 50-е и 56-е сутки в целом нельзя утверждать, что моделирование сахарного диабета привело к снижению болевой чувствительности в проведенном эксперименте. Исходя из этого можно предположить, что температурная чувствительность не изменилась по мере развития стрептозотоцинового сахарного диабета.

Состояние автономной нервной системы оценивали по изменениям вариабельности ритма сердца (ВРС). Хотя ВРС имеет многофакторную природу, изменение ее параметров часто трактуют как показатели активности автономной нервной системы и отдельных ее отделов. ВРС часто применяют как в экспериментальном изучении, так и в клинической диагностике диабетической автономной нейропатии (А.Л.М. Boulton 2014, Y. Xuan, Y. Wang, M. Xue 2015). У крыс контрольной группы инъекция цитратного буфера значимо не влияла на структуру ВРС в состоянии спокойного бодрствования у крыс на всех сроках эксперимента, а также не влияла на реакции на ХП на всех сроках опыта. У крыс группы СД на 42-е сутки и всех последующих сроках выявлена выраженная брадикардия: ЧСС значимо снизилась с 348 уд/мин до 258 уд/мин, на 26% по сравнению с исходным состоянием животных (длина RR-интервала увеличилась на 35% с 172 мс до 223 мс). Также у крыс с СД в среднем в 2 раза уменьшилась реакция ЧСС на предъявление холодной пробы.

Анализ параметров ВРС у крыс с СД показал значимое снижение общей ВРС в среднем на 56% на 42-е сутки опыта (и всех последующих сроках эксперимента). Детальное исследование структуры ВРС выявило значимое снижение на 30-62% показателя SD_{AvgHR} , характеризующего вклад симпатической нервной системы в общую ВРС, и увеличение в 2,6 раза параметра $rNN3$, характеризующего вклад парасимпатической нервной системы в общую ВРС, по сравнению с исходным уровнем.

Исследование ВРС в спектральной области не выявило изменения параметра TP , характеризующего общую ВРС, но показало увеличение на 30% показателя $LF\%$, согласующееся с картиной, наблюдаемой в параметрах временной области. Показатели, характеризующие высокочастотные колебания ритма, HF и $HF\%$, были увеличены по сравнению с исходным уровнем на 85% и в 2 раза соответственно, что, в конечном итоге, привело к снижению соотношения LF/HF на 55%.

У крыс с СД на 7-е и 15-е сутки после нанесения раны (49-е, 57-е сутки после моделирования СД) исходно все показатели ВРС не отличались от таковых на 42-е сутки развития СД. На 23-и сутки ранозаживления (65-е сутки развития СД) наблюдали увеличение в 2,5 раза показателей SD_{AvgRR} и SD_{AvgHR} . Анализ спектральных показателей не выявил значимых отличий между всеми параметрами на 42-е сутки развития СД и на всех остальных сроках регенерационного процесса в коже. Интересно, что холодовая проба показала статистически значимое увеличение реакции параметра общей ВРС, SD_{HR} в два раза на 7-е (49-е сутки развития СД) сутки после выполнения раны по сравнению с исходным состоянием нормы и 42-ми сутками развития СД. Анализ чувствительности спектральных показателей ВРС у этих животных после теста с ХП не выявил значимых различий по сравнению с 42-ми сутками СД.

Исследование состояния периферической нервной системы крыс показало, что в изученном промежутке времени развиваются значительные изменения в автономной нервной системе, но не в болевой чувствительности. На 42-е сутки развития СД выявлены признаки нейропатии: ритм сердца приблизился к базальной ЧСС, снизился уровень общей ВРС, вычисляемый по показателям временной области, а при более детальном рассмотрении структуры – и временные показатели, характеризующие наиболее медленные колебания ритма. В результате нарушения структуры ВРС соотношение высокочастотных и низкочастотных колебаний ритма сдвинулось в сторону преобладания последних в регуляции ритма сердца. Сравнение нескольких показателей временного и спектрального доменов позволяет заключить, что в структуре активности автономной нервной системы существенно снизилась доля симпатической нервной системы и увеличился вклад парасимпатической нервной системы.

По результатам офтальмоскопии глазное дно крыс в экспериментальной группе имело ярко выраженные признаки ишемии: побледнение глазного дна, размытие диска зрительного нерва. По данным электроретинографии ответ палочковой системы практически не изменялся, как и смешанный ответ палочек и колбочек. Анализ осцилляторных потенциалов показал, что на 50-е сутки у крыс в группе СД амплитуды волн А1, А2-3 и А4-5 были значимо ниже по сравнению с группой ЦБ в 1,23, 1,67 и 1,44 раза соответственно ($p < 0,05$). К 58-м суткам регистрировали значимое снижение амплитуд волн А4-5 и А6-7 у крыс в группе СД по сравнению с группой ЦБ соответственно на 11 и 12,4% ($p < 0,05$). Снижение амплитуды волны А4-5 в группе СД по сравнению с группой ЦБ сохранялось на 66-е сутки эксперимента и составляло 31,9% ($p < 0,05$). Кроме этого, к 66-м сутками наблюдали снижение амплитуды волн А2-3, А4-5 и А6-7 в группе СД по сравнению

с исходными значениями до введения в эксперимент на 6,3, 4,6 и 1,99%. Латентности волн практически не изменялись по сравнению с группой ЦБ. Только к концу эксперимента наблюдали увеличение латентностей волн L1-3 и L5-7, в особенности, L5-7 на 6% ($p < 0,05$). Таким образом, наиболее ранним сигналом ухудшения зрительной функции при развитии сахарного диабета в эксперименте оказалось снижение амплитуд волн осцилляторных потенциалов, но не увеличение их латентностей, что свидетельствует о сниженной активности клеток Мюллера.

К 50-м суткам развития диабета наблюдали статистически значимое увеличение латентности b-волны колбочкового ответа на все цветовые стимулы по сравнению с группой ЦБ в среднем на 5,4% ($p < 0,05$). Латентность b-волн в ответ на синий и зеленый стимулы увеличилась в среднем на 8,5% по сравнению с группой ЦБ ($p < 0,05$) на 58-е сутки. К 66-м суткам статистически значимые различия между латентностями b-волн между группами СД и ЦБ зафиксированы в ответ на любые цветовые стимулы. Латентности b-волн с увеличением срока наблюдения значительно не возрастали. Амплитуда a-волны колбочкового ответа значимо не изменялась. Сахарный диабет привел к снижению амплитуды ритмического ответа при стимуляции с частотой 8 и 12 Гц на 66-е сутки в среднем на 25% ($p < 0,05$) по сравнению с группой ЦБ. Изменения b-ответа в первую очередь указывают на нарушение функций внутренних слоев сетчатки.

По результатам офтальмоскопического и электроретинографического исследований можно прийти к заключению, что выраженная гипергликемия у крыс приводит к развитию диабетической ретинопатии, которая преимущественно затрагивает внутренние слои сетчатки и связана с ишемическим повреждением.

В целом можно заключить, что нейропатия у крыс с сахарным диабетом преимущественно затрагивала автономную нервную систему. Сенсорный отдел нервной системы пострадал в существенно меньшей степени: температурная чувствительность не была нарушена, изменения в состоянии сетчатки имели относительно небольшую величину и могли быть связаны с ишемией.

Заживление раневых дефектов

Средние значения размера раны между группами сахарного диабета и цитратного буфера значимо не отличались. К концу срока эксперимента в группе ЦБ практически все животные имели полностью зажившую рану, а в группе с СД наблюдали вариабельность скорости ранозаживления, поэтому животных разделили на две группы: относительно зажившие раны (площадь менее 15% от исходной) и незажившие раны (более 15% от

исходной площади). Двухсторонний точный тест Фишера показал, что на 18-е сутки количество крыс с незажившими ранами в экспериментальной и контрольной группах статистически значимо отличаются ($p = 0,046$) (Рисунок 1). У всех крыс в группе цитратного буфера наблюдали полное ранозаживление. У крыс в группе СД, несмотря на общее истощение и истончение кожного покрова, в большинстве случаев процесс заживления раны протекал сходным с группой ЦБ образом. У двух крыс из подгруппы СД24 процесс заживления раны не завершился к конечной точке эксперимента.

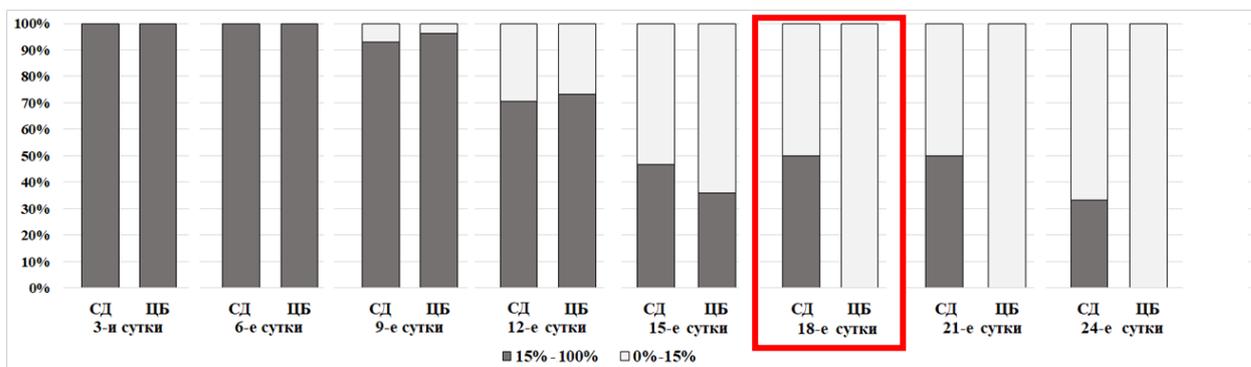


Рисунок 1. Доли крыс с зажившими и не зажившими ранами. СД – сахарный диабет, ЦБ – цитратный буфер. Выделена временная точка со статистически значимыми различиями.

Морфологически на 8-е сутки группе крыс цитратного буфера процесс эпителизации протекал быстрее, кроме того, воспалительная реакция на поверхности раны была менее выражена. На 16-е сутки у большинства крыс в группе цитратного буфера рана частично эпителизовалась, у некоторых животных процесс восстановления эпителия завершился. У крыс с сахарным диабетом на 16-е сутки процесс заживления был замедлен, в некоторых случаях эпителизовались только края раны (Рисунок 2).

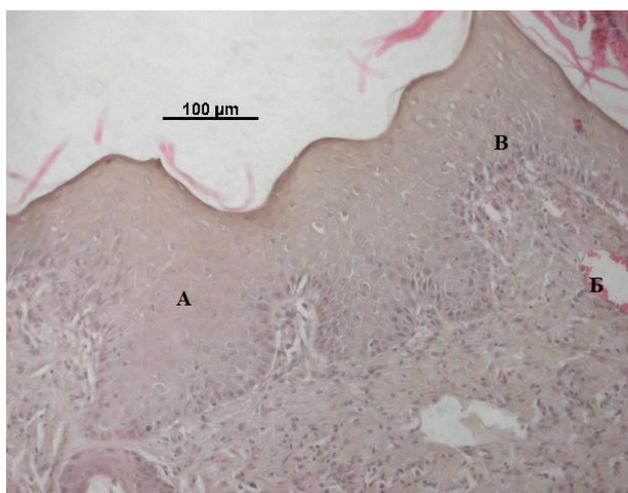


Рисунок 2. Морфологическая картина кожи края раны крысы из группы СД при окраске гематоксилином и эозином на 16-е сутки после повреждения. А – увеличение толщины шиповатого слоя, Б – зрелая грануляционная ткань, В – участок базального слоя с нарушенными межклеточными контактами. Увеличение 200х.

У некоторых животных вся поверхность раны была покрыта эпидермисом, толщина клеточных слоев которого в некоторых местах превышала 150 мкм. На 24-е сутки после нанесения раны волокнистая ткань, покрытая тонким слоем эпидермиса, сформировалась у всех крыс в группе цитратного буфера и у 4 из 6 крыс в группе сахарного

диабета. У крыс группы СД с завершившейся реэпителизацией сохранялось утолщение клеточных слоев эпидермиса с увеличенным количеством крупных ядер в шиповатом слое. Таким образом, эпидермис, образовавшийся над раневым дефектом у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом к 24-м суткам, оказался по своей морфологии похож на такой же эпидермис, обнаруженный в области дефекта у крыс группы ЦБ на 16-е сутки после повреждения. При этом подлежащая дерма морфологически оказалась сходной по структуре с волокнистой тканью области репарации крыс группы ЦБ в той же временной точке.

Результаты иммуногистохимического исследования

Цитокератин 10 – маркер дифференцированных кератиноцитов. Во всех исследуемых группах и интактном контроле кожа активно экспрессировала цитокератин 10. В целом, в крае раны экспрессия цитокератина 10 оказалась статистически значимо на 10 – 15% выше, чем в коже интактных крыс.

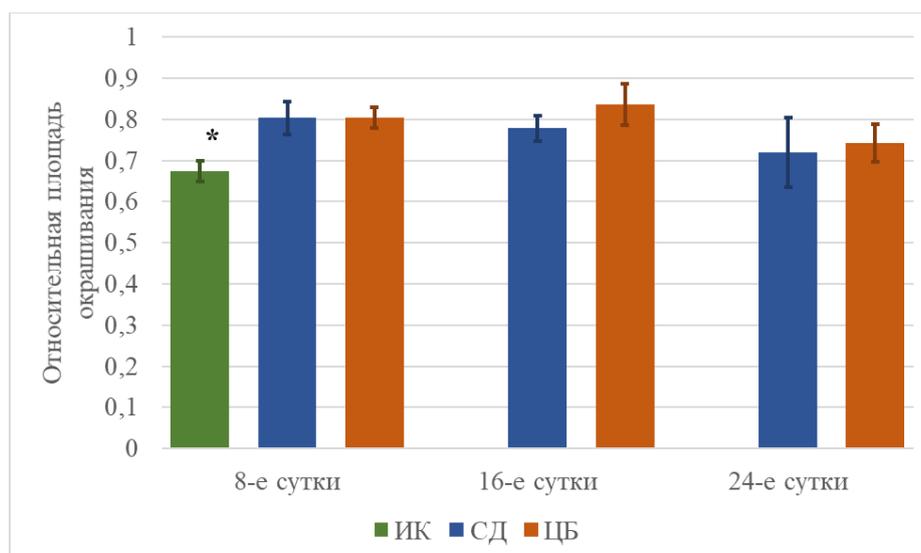


Рисунок 3. Относительная плотность окрашивания антителами к цитокератину 10 в коже края раны и коже интактных крыс. * – $p < 0,05$ по сравнению с другими группами. Данные представлены в виде среднее \pm станд. отклон. СД – сахарный диабет, ЦБ – цитратный буфер, ИК – интактный контроль.

Цитокератин 17 – промежуточный филамент, характерный для субпопуляций кератиноцитов придатков кожи, а также экспрессируемый в процессе заживления ран клетками, способными к сокращению. Во всех исследуемых группах значительная часть кератиноцитов положительно метилась антителами к цитокератину 17 с большей интенсивностью окрашивания у края раны. У крыс в контрольной группе на 16-е и 24-е сутки увеличивалась интенсивность окрашивания на цитокератин 17 в крае раны. Прирост

в плотности окрашивания составил в среднем 20–30%, различия были статистически значимы в сравнении с контролем ($p=0,012$ и $0,019$ для ЦБ 16 и 24 соответственно), с ЦБ8 ($p=0,015$ и $0,021$ соответственно) и с СД в тех же временных точках ($p=0,041$ и $0,046$ соответственно).

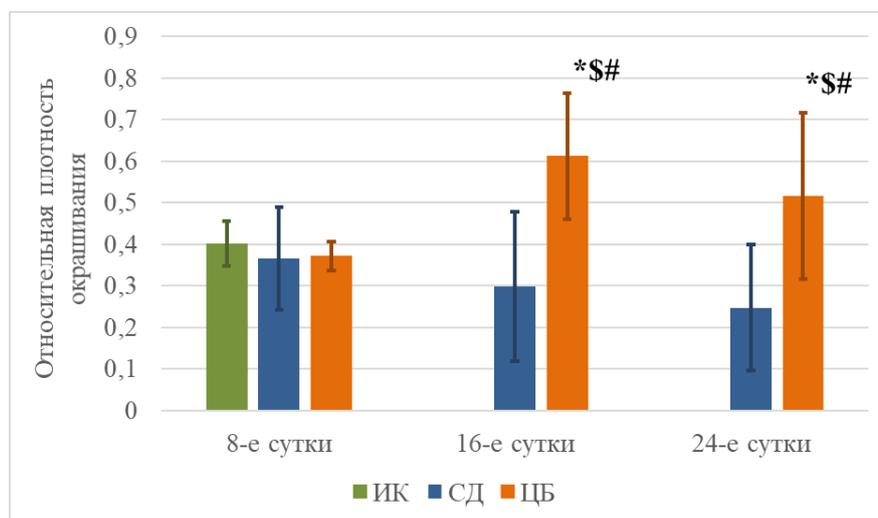


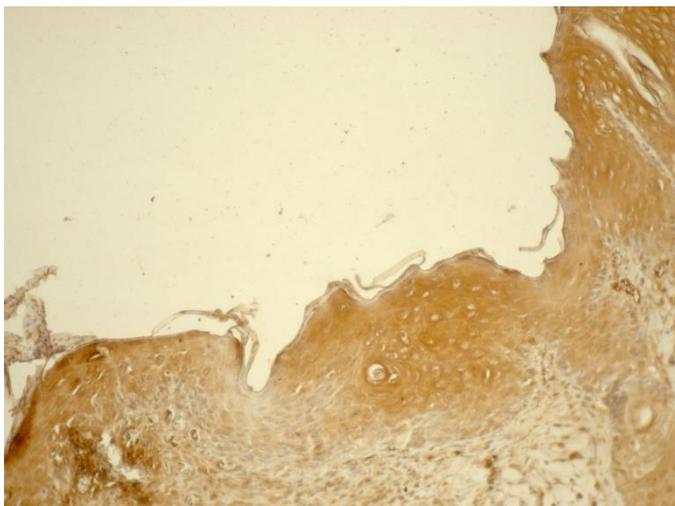
Рисунок 4. Плотность окрашивания эпидермиса кожи края раны крыс антителами к цитокератину 17. Данные представлены в виде среднее \pm станд. отклон. * - $p < 0,05$ в сравнении с ИК, \$ - $p < 0,05$ в сравнении с 8-ми сутками, # - $p < 0,05$ в сравнении между группами СД и ЦБ в одной временной точке. СД – сахарный диабет, ЦБ – цитратный буфер, ИК – интактный контроль.

Адренорецепторы широко представлены в коже млекопитающих, включая человека и крысу. Они всегда экспрессируются гладкомышечными клетками сосудов и экзокринными клетками придатков кожи. Кроме того, показано наличие большого числа адренорецепторов на мембранах кератиноцитов. Сравнение препаратов кожи, окрашенной данными маркерами интактных крыс, экспериментальных животных и отрицательного контроля показало, что $\beta 2$ -адренорецепторы диффузно распределены в коже животных как в норме, так и в края эпителизирующегося раневого дефекта. Окрашивание в коже интактного контроля и отдаленных от раны участках кожи в группах СД и ЦБ не отличалось по распределению и интенсивности.

Статистическая обработка данных показала, что плотность никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в крае раны статистически значимо ниже на 16-е сутки в группе цитратного буфера ($p < 0,001$), а на 24-е сутки существенно уменьшается как в группе сахарного диабета, так и в группе цитратного буфера ($p < 0,01$). Снижение плотности никотиновых ацетилхолиновых рецепторов на кератиноцитах может свидетельствовать об активной работе парасимпатической нервной системы, участвующей на поздних стадиях в процессе ранозаживления. Высокая экспрессия рецепторов в крае раны на 16-е сутки может

свидетельствовать о нарушенном влиянии парасимпатической нервной системы у крыс с сахарным диабетом.

Рисунок 5. Экспрессия никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в крае раны. Группа сахарного диабета, 24-е сутки. Увеличение 200 х.



Анализируя результаты иммуногистохимического окрашивания, можно заключить, что нейропатия сопровождается нарушениями клеточных механизмов заживления. У крыс с сахарным диабетом не увеличилась плотность окрашивания цитокератина 17 в эпидермиса края раны, что может свидетельствовать о нарушении сократимости раневого дефекта. Также плотность ацетилхолиновых рецепторов кератиноцитов, сниженная на 16-е сутки в контрольной группе, в экспериментальной уменьшилась только на 24-е. В результате этого периферическая нервная система могла оказывать более длительное воздействие на процесс репарации, что согласуется с результатами анализа ВСП, в которых увеличился относительный вклад парасимпатического отдела.

Анализируя полученные результаты, можно прийти к заключению, что нарушения репарации в полученной модели сахарного диабета в основном локализованы на клеточном уровне и сопровождаются значительными нарушениями преимущественно в вегетативном отделе нервной системы. Незначительное влияние этих нарушений на общий процесс ранозаживления может быть обусловлено действием неизвестных компенсаторных факторов.

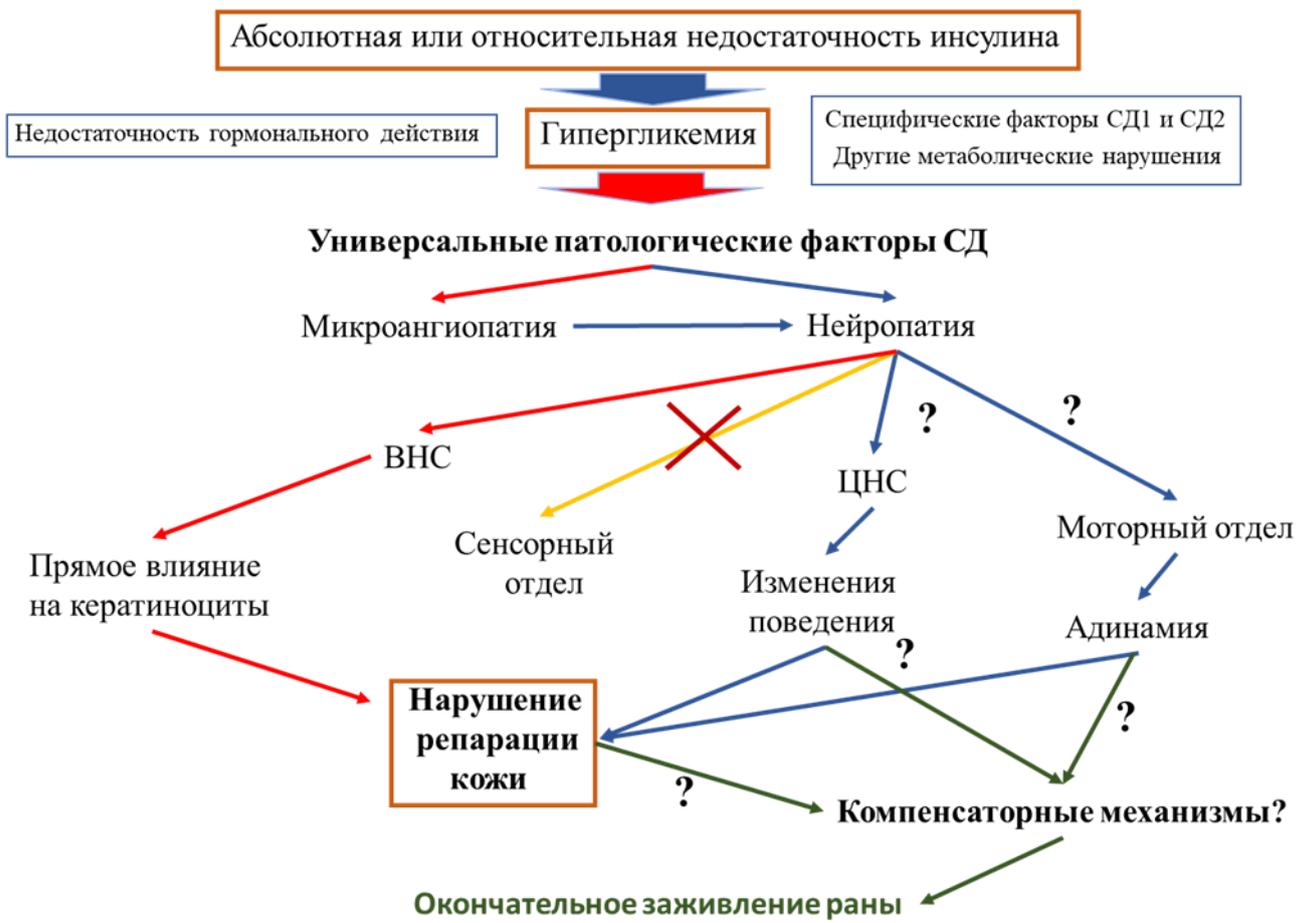


Рисунок 6. Патофизиологическая схема связи отдельных компонентов диабетической нейропатии и репарации кожи, изученные вопросы.

ВЫВОДЫ

1) Модификация модели стрептозотоцинового сахарного диабета ежедневным введением субтерапевтических доз инсулина поддерживает стабильную концентрацию глюкозы в крови, общее состояние животных и позволяет использовать ее как модель диабетической нейропатии

2) Нейропатии автономного отдела нервной системы в модели стрептозотоцинового сахарного диабета характеризуется преимущественным поражением симпатического отдела нервной системы по данным variability ритма сердца

3) Сенсорный отдел умеренно повреждается в модели стрептозотоцинового сахарного диабета: развивается ишемия сетчатки, нарушается функциональное состояние ее внутренних слоев, но температурная чувствительность не изменяется

4) Нейропатия в модели стрептозотоцинового сахарного диабета замедляет реэпителизацию раны по расчету площади дефекта на 18-е сутки и по морфологическим признакам на 16-е сутки, но не препятствует окончательному заживлению

5) Диабетическая нейропатия проявляется замедленным изменением плотности никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в эпидермисе края раны, что сопровождается нарушенной активацией кератиноцитов с контрактильным фенотипом

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1) Пациентам с синдромом диабетической стопы проводить развернутую диагностику развития диабетической нейропатии, в частности – автономной нервной системы, в том числе анализ variability ритма сердца

2) Относить пациентов с выраженной автономной нейропатией к группе высокого риска развития синдрома диабетической стопы

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Иванов Е. В., Гаврилова С. А., Морозова М. П., Клочихина Е. М., Ердяков А. К., Горбачева А. М., Джемилова З. Н., Артемова Е. В., Галстян Г. Р., Кошелев В. Б. Механизмы ранозаживления у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом // Проблемы Эндокринологии. 2018. 64(5). С. 292–298.
2. Клочихина Е. М., Ердяков А. К., Морозова М. П., Гаврилова С. А., Ахапкина Е. С., Иванов Е. В., Джемилова З. Н., Артемова Е. В., Токмакова А. Ю., Кошелев В. Б., Галстян Г. Р. Электрическая активность сетчатки у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом // Сахарный диабет. 2018. 21(5). С. 356–363.
3. Горбачева А. М., Иванов Е. В., Морозова М. П., Клочихина Е. М., Ердяков А. К., Абдульвапова З. Н., Артемова Е. В., Галстян Г. Р., Гаврилова С. А., Токмакова А. Ю., Кошелев В. Б. Оценка болевой чувствительности и скорости ранозаживления у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом // Сборник тезисов VIII (XXV) Всероссийского диабетологического конгресса с международным участием. ООО УП ПРИНТ. Москва, 2018. С. 503–504.
4. Говорухина В. Г., Королев Ю. М., Иванов Е. В., Гаврилова С. А. Изучение механизмов репарации раневого дефекта у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом // Актуальные проблемы биомедицины – 2018 : Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. Санкт-Петербург, 12-13 апреля 2018 г. РИЦ ПСПбГМУ Санкт-Петербург, 2018. С. 76–76.
5. Gorbacheva A., Ivanov E., Morozova M., Artemova E., Abdulvapova Z., Rzhavina E., Gavrilova S., Erdiakov A., Tokmakova A., Koshelev V., Galstyan G. Mechanisms of wound healing in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus // Diabetic Foot Study Group of the EASD: 15th Scientific Meeting, Programme and Abstracts. P. 179–179.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ – антитела	HF – high frequency, высокочастотные колебания
ВРС – вариабельность ритма сердца	LF – low frequency, низкочастотные колебания
ДИ – доверительный интервал	SD – стандартное отклонение
ОР – относительный риск	
СД – сахарный диабет	
ЦБ – цитратный буфер	
ЭРГ – электроретинография	

РЕЗЮМЕ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Е.В. Иванова

«Нейропатия различных отделов нервной системы и механизмы ранозаживления на фоне изолированной гипергликемии у крыс»

В настоящем диссертационном исследовании изучено развитие нейропатии и процессов ранозаживления у крыс в модели стрептозотоцинового сахарного диабета. Была сформирована модель сахарного диабета со стабильным течением патологии и стойкой высокой гипергликемией. На этом фоне зафиксировано развитие автономной нейропатии, проявившейся значительным изменением параметров variability ритма сердца, указывающих на общее снижение вегетативного контроля работы сердца, а также уменьшение относительного вклада симпатической нервной системы. Работы сенсорного отдела нервной системы была нарушена незначительно. Раны, нанесенные на 42-е сутки от развития диабета, у крыс в экспериментальной группе заживали медленнее, однако в конечном итоге различия были несущественны. При этом по сравнению с контрольной группой в эпидермисе оказалась в значительной степени ниже экспрессия маркеров сократимых кератиноцитов (цитокератин 17) и замедлились изменения плотности никотиновых ацетилхолиновых рецепторов. Таким образом, на фоне автономной нейропатии нарушились клеточные механизмы репарации раны, но процесс ранозаживления пострадал незначительно.

PHD thesis Abstract

Neuropathy of different nervous system divisions and wound healing mechanisms during rat isolated hyperglycemia by Evgenii E. Ivanov

Neuropathy development and wound healing processes were studied in rat streptozotocin-induced diabetes. Diabetes mellitus model with high hyperglycemia and stable course was made. Severe autonomic neuropathy progressed by hearth rate variability changes, with general nervous system hearth rate control and sympathetic nervous system component decrease. Sensory nervous system changed a little. In experimental group wounds, inflicted on 42-th diabetes day, healed slower with no end point differences. Comparing to control contractility keratinocytes marker (cytokeratin 17) expression and nicotinic acetylcholine receptors density changes in diabetic rats epidermis were broken. In general autonomic neuropathy accompanied by cell reparation disfunction did not affect general wound healing in diabetic rats.