

**EKSPERIMENTAL SHAROITDA DIABETIK YARANI BARTARAF ETISHNING
ZAMONAVIY YONDASHUVI**

Malikov Nodirbek Muzaffar o'g'li
Toshkent tibbiyot akademiyasi
2-son Umumiy jarrohlik kafedrası assistenti

Usnatdinova Gulayim Miratdinovna
Toshkent tibbiyot akademiyasi
Pediatriya fakulteti 3- kurs talabasi

Цель:

лечение ран, вызванных аллоксановым диабетом, в экспериментальных условиях современным местным препаратом.

Материал и методы: для эксперимента были отобраны здоровые крысы. Экспериментальные исследования проведены на 155 белых крысах-самцах массой 150-200 г, содержащихся в виварии ТМА.

Результаты: использование этого типа коллагена предотвратило эндогенную интоксикацию, а также была доказана высокая эффективность нового местного препарата. При лечении общей интоксикации и механических травм у крыс с диабетом, что позволило рекомендовать его к использованию в лечении больных сахарным диабетом с дефектом стопы.

Выводы: коллаген с кверцетином помог понять молекулярные факторы развития синдрома диабетической стопы, патогенетические механизмы эндотелиальной дисфункции и процессы неоангиогенеза в нарастании тяжести патологии.

Ключевые слова: композитный коллаген, диабетическая стопа, кверцетин, аллоксан, эксперимент.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет — одно из наиболее распространенных хронических заболеваний, постепенно приобретающее черты неинфекционной эпидемии. По прогнозам Международной диабетической федерации, к 2030 году заболеваемость диабетом достигнет 578 миллионов человек, к 2035 году распространенность диабета достигнет 600 миллионов человек в мире, а к 2045 году, по оценкам, она достигнет 700 миллионов человек. Это представляет острую угрозу на отдаленную перспективу, поскольку часть больных остается недиагностированной, поэтому у них высок риск развития сосудистых осложнений (Белозерцева Ю.П. и др., 2016; Гурьева И.В., 2016; Дедов И.Д. и др., 2017; Пикард Ф. и др., 2017). Ввиду ранней инвалидности и высокой смертности, а также поздних осложнений это заболевание является одной из важных медицинских, социальных и экономических проблем во всем мире (Ансиферов М.Б., Комелягина Е.Ю., 2013; Игнатович И.Н., Кондратенко Г.Г., 2013; Дедов И.Д. и др., 2017). Среди наиболее частых и опасных осложнений сахарного диабета— синдром диабетической

стопы (СДС).

СДС характеризуется появлением хронических гнойно-некротических процессов (трофических язв) в ноге с поражением кожи, мягких тканей и костно-суставного аппарата (Белозерцева Ю.П. и др., 2016; Мадянов И.В., 2016), что часто заканчивается плачевно. последствия - инвалидность и смерть (Корейба К.А., 2016). Эффективное самозаживление диабетической раны при СДО обычно невозможно (Wella L., Formoza S., 2017). Диабетические язвы на стопах лечатся лишь в 2/3 всех случаев, а рецидивы достигают 60-70% (Спичкина О.Г. и др., 2012). Диабетические язвы у 28% больных могут привести к ампутации голени (Гурьева И.В., 2016; Чаканов Т.И., Култаев Ю.Т., 2016). Ежегодно в результате СД и осложнений основного заболевания умирают более 1 млн человек. Каждые 20 секунд в мире из-за СД ампутруют ногу (Гурьева И.В., 2016).

После операции, то есть период летальности после ранней ампутации, может достигать 23%. Кроме того, в ближайшие 5 лет от 8% до 22% могут подвергнуться реампутации на той же ноге или от 26% до 50% случаев происходит ампутация контрлатеральной конечности (Ансиферов М.Б., Комелягина Е.Ю., 2013). Через 3 года выживаемость в этой группе составляет в среднем 50%, а через 5 лет - 40% (Ансиферов М.Б., Комелягина Е.Ю., 2013).

Несмотря на достижения, лечение диабетических трофических язв остается сложной, не до конца решенной проблемой медицины: как правило, длительность лечения этих хронических ран очень длительна. Только 24–30% ран могут зажить в течение 12–20 недель при использовании наилучших стандартов ухода (Лев-Тов Х. и др., 2013). Зачастую стандартные методы лечения вообще не приводят к заживлению раневых дефектов (Спичкина О.Г. и др., 2012; Краус И. и др., 2017).

Однако нерешенной проблемой является отсутствие патофизиологически ориентированной программы лечения диабетических язвенных дефектов. Практика показала, что даже если врач выберет соответствующую тактику лечения больного с СДС-язвой, желаемый результат может не быть достигнут в ожидаемый период времени [3, 4].

Продукция, полученная на основе медицинских исследований – коллаген уже имеет желаемую клиническую ценность и, соответственно, является продуктом с большими перспективами с точки зрения эффективной стимуляции регенеративной и пролиферативной фазы раны. Коллаген типа I представляет собой белок внеклеточного матрикса и является наиболее распространенным элементом соединительной ткани в большинстве тканей, обладающим свойствами клеточного хемотаксиса и капиллярной проницаемости [6, 7].

Несомненно, важность и эффективность биопластичных материалов при лечении острых и хронических ран подтверждена многими исследователями, однако в настоящее время нет достоверных доказательств экспериментальных методов лечения диабетических ран с использованием различных форм коллагена у животных с СДС.

Синдром диабетической стопы — одно из серьезных осложнений сахарного диабета, которое проявляется в 16-18% случаев хроническими раневыми дефектами, не заживающими в течение длительного периода времени. Доминирующей тенденцией в

современных раневых повязках является использование композитных коллагеновых матриц на основе биосовместимых, биоразлагаемых природных полимеров с добавлением биологически активных соединений.[8, 9].

В медицине рыбий коллаген и продукты его гидролиза широко применяются в виде различных пленок, губок, нитей, трубок, повязок, пластырей и других препаратов для лечения ран, ожогов, трофических язв, пульпитов, остеоартрозов и мочевыводящих путей.

Частота заживления ран очень высока и может сопровождаться длительным болевым синдромом и раневой инфекцией.[10, 11, 12]. Раны могут стать резистентными к лечению, что приводит к снижению качества жизни пациентов и повышению риска полной ампутации. Очень важно предотвратить хирургическое вмешательство, даже если это радикальное лечение, однако медикаментозное лечение является длительным и требует времени медицинского персонала и больших финансовых затрат государства. Обычно в клинической практике склонность к заживлению диабетических хронических ран оценивают по сформированной грануляционной ткани, которая недостаточна и приводит к ошибкам лечения или рецидивам диабетических ран. Морфологическую характеристику раневого дефекта у лабораторных животных без нарушений углеводного обмена оценивают по грануляционному процессу.[13, 15]. На сегодняшний день малоизученными остаются показатели роста, уровень грануляции, скорость неоваскулогенеза, протеолитическая активность, основной источник факторов роста - количество макрофагов.

Разработаны различные средства на основе коллагена для быстрой остановки кровотечений (местный гемостаз), диабетических ран, ожогов, трофических ран, пролежней, а также лекарственные формы (мягкие и жидкие), специальные пластыри и губки (кровоостанавливающие коллагеновые губки - коллагеновые с метилурациловой губкой) , коллагеновая губка из сангвиритрин и др.)[16, 17].

Появление продуктов, растворяющих коллаген, расширило возможности широкого применения коллагена в различных областях медицины. Очевидным преимуществом коллагена и полученных из него коллагеновых материалов для медицины является отсутствие токсических и канцерогенных свойств, слабая антигенность, высокая механическая прочность и устойчивость к тканевым ферментам, скорость лизиса в организме, способность образовывать комплексы с биологически активными веществами. вещества [18, 19]. Одно из главных мест в комплексном подходе к проблеме местного лечения диабетических ран и ожогов занимает лечение с помощью раневых повязок, составляющее основу современной медицины.

Содержание коллагена обогащено аминокислотами, что гарантирует быстрое восстановление и укрепление тканей. Но есть некоторые особенности: белок коллаген плохо усваивается организмом человека, особенно в его модифицированной форме [20].

«Активный» гидролизированный коллаген можно создать только путем расщепления молекулы коллагена, и он максимально усваивается организмом. Благодаря этому методу появляется самый сбалансированный комплекс аминокислот, которые участвуют в росте и регенерации тканей. Препараты на основе гидролизованного

коллагена принимают активное участие в таких важных процессах, как кратковременное заживление хронических трофических ран, улучшение иммунной системы, выведение токсинов, регенерация тканей.

В качестве полимерной основы раневой повязки мы выбрали коллаген. Алкалоиды, выделенные из растения *Convolvulus*, были протестированы в качестве адъюванта. Благодаря пролиферативной активности и малой токсичности алкалоидов, выделенных из растений выюнка, обладающих противомикробным действием, их применение при различных раневых дефектах высокоэффективно. 5% раствор конволамина, активного соединения растения выюнок, широко применяется против стафилококков, стрептококков и сине-зеленого гноя. Было обнаружено, что он эффективен против грибов *E. coli* и *Candida*. Мы выделили из этого растения еще одно алкалоидное соединение, соединение кверцетина, и объединили это соединение с коллагеном с помощью биоинженерной технологии, чтобы создать препарат коллагена с кверцетином (рис. 1-2). Мы добавляли различные концентрации этих алкалоидов на основе очищенного коллагена и формировали раневые повязки в виде тонких пленок.



Рисунок 1. Внешний вид коллагена с кверцетином.

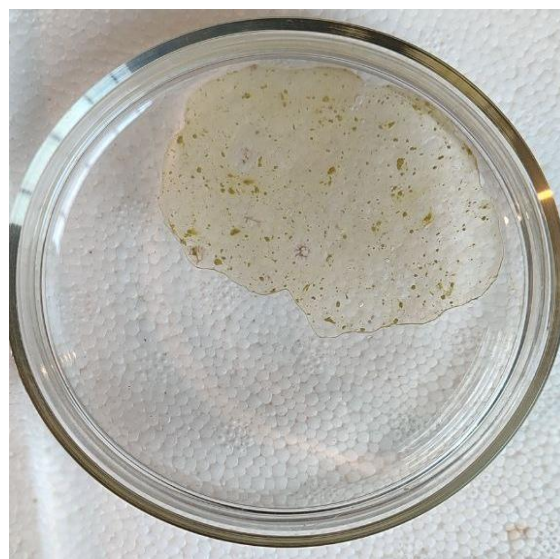


Рисунок 2. Появление пленки коллагена с кверцетином после механического воздействия.

Представлены результаты экспериментального применения биоинженерной конструкции из коллагена с добавлением кверцетина (сафора японская) для оптимизации восстановления глубоких дефектов мягких тканей. Данные объективного изучения местного состояния мягких тканей и общего состояния экспериментальных животных показывают положительное влияние тканеинженерной структуры для оптимизации лечения глубоких дефектов мягких тканей. Результаты морфологического исследования показали, что тканеинженерная структура на основе коллагена и кверцетина полностью рассасывалась в течение 10 дней и не образовывала фиброзную капсулу.

Мы также обнаружили, что созданный нами коллаген с кверцетином оказывает сильное стимулирующее воздействие на тканевые факторы. Мы наблюдали, что при сильной стимуляции сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF), влияющего на процесс ангиогенеза, он формирует соединительнотканые элементы в раневом дефекте. В ходе нашего наблюдения также были выявлены антиоксидантные и гипогликемические свойства этого препарата. В основной группе нашего исследования по сравнению с остальными группами мы обнаружили, что уровень глюкозы в крови крыс снизился, а количество VEGF увеличилось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

«Характеристика экспериментального материала и описание методов исследования» дано общее описание изучаемого материала и прикладных методов исследования. Исследование носит проспективный рандомизированный характер и основано на современных гематологических, биохимических и морфологических методах исследования.

Для эксперимента были отобраны здоровые крысы. Экспериментальные исследования проведены на 155 белых стерильных крысах-самцах массой 150-200 г, содержащихся в виварии ТМА. Крыс содержали в оптимальных условиях: все крысы жили в помещении с круглосуточным освещением и постоянной температурой 22-25°C, со свободным доступом к воде. Всех крыс кормили *ad libitum* - достаточным количеством обычного рациона грызунов. (рацион для грызунов ГОСТ Р50258-92) и питьевую воду давали ежедневно. Все операции и манипуляции с животными проводились под общим наркозом, следуя гуманным принципам Руководства Европейского сообщества (86/609/EES) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: 1-я группа — неизменная (интактная); 2 группа – создание экспериментальной модели аллоксанового диабета; 3-я контрольная группа - традиционное комплексное лечение (Левомеколь - «НИЖФАРМ», Россия) на фоне создания экспериментальной модели диабетической стопы; 4-я экспериментальная группа - на экспериментальной модели диабетической стопы - традиционное лечение и лечение с применением коллагена с кверцетином. Через 24 часа голодания крыс взвешивали и внутрибрюшинно вводили животным 2% раствор аллоксана, разведенный в 0,9% физиологическом растворе, в виде однократной дозы, соответствующей дозе 20, 15, 12 мг аллоксана на 100 г животного. масса. Корм и воду животным давали через 30 минут после введения препарата. Уровень глюкозы в крови оценивали в течение 3 дней. В ходе длительных наблюдений и предыдущих научных работ оптимальная доза аллоксана для крыс была определена на уровне 12 мг/г.

Определение концентрации глюкозы в периферической крови животных. Диабет был подтвержден через 3 дня после определения концентрации глюкозы в крови. Концентрацию глюкозы в периферической крови измеряли с помощью глюкометра «Сателлит Экспресс» («ЭЛТА», Россия), линейный диапазон измерения 0,6 – 35,0 ммоль/л, по принципу электрохимического измерения. Точность соответствует

международному стандарту ISO 15197:2013. Кровь брали из хвоста крысы для проверки уровня гликемии. Получена экспериментальная модель диабета (СД I типа). День обследования на диабет считался нулевым днем его развития

Хирургическая практика. На 3-и сутки наблюдения провели первичную хирургическую обработку кожи правой задней конечности крысы с использованием антисептического аппарата. Затем острым скальпелем делаем на коже небольшую колотую ранку. Затем мы используем одноразовый аортальный перфоратор-“Aortal ranch”, чтобы создать раневой дефект на дорсальной коже правой задней ноги крыс (рис. 3). Наш метод предотвращает образование боковых трещин в окружающих тканях, а рана имеет ровные, четкие контуры, легко поддающиеся измерению. Предназначен для создания точного, последовательного, надежного и неповторимого разреза круглого отверстия. В инструментах Perfect Cut и Clean Cut используется вращающийся самоцентрирующийся режущий механизм, позволяющий проделать одинаковые отверстия в коже, поэтому требуется меньше усилий и экономится время. (Рационализаторское предложение «Способ моделирования раневого дефекта при экспериментальном синдроме диабетической лапы». №1399. ТТА, 2023).



Рисунок 3. Внешний вид инструмента Perfect Cut и создание раневого дефекта на коже крыс

Методы гематологического исследования. Исследование периферической крови проводилось в гематологическом анализаторе с подсчетом лейкоформулы. На

основании полученных результатов рассчитывали лейкоцитарный индекс интоксикации согласно рекомендациям Kalf-Kalif . На основании гематологических показателей рассчитывали индекс сдвига (ИС), индекс лейкоцитарной интоксикации (ИЛИ) и реактивный нейтрофильный ответ (РОН).

Биохимические исследования. Активность ферментов общего белка, глюкозы, креатинина, мочевины, АЛТ и АСТ определяли с использованием набора химических реагентов, выпускаемых биохимическим анализатором-фотометром Mindray BS-380 (Германия). По современным представлениям с целью определения параметров ранозаживления на анализаторе "Rayt" от фирмы "Elabscience" (США) определяли фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста гранулоцитарно-макрофагальных колоний (GM-CSF). Статистическую обработку числовых данных проводили с использованием SPSS 16.0 и Windows Statistica 6.0 для прикладных программ. Определяли средние значения и стандартные отклонения, медианы и интерквартильные размахи, а также непараметрическими методами (t-Student, Mann-Uitni).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Начальные симптомы сахарного диабета проявлялись в виде резкого увеличения суточного потребления воды на 70-80 мл, полифагии, полиурии, гипергликемии, резкого снижения массы тела, выпадения шерсти. Кроме того, в наших экспериментальных исследованиях при аллоксан-индуцированном диабете у животных отмечали вялость, апатию, низкую активность, снижение тургора и бледность кожи, похудание, помутнение зрачков и склер, хвоста и конечностей. Небольшие точечные эрозии.

При динамическом наблюдении за крысами с СДС, получавшими Левомеколь, к 7-м суткам состояние и аппетит животных постепенно улучшались, они становились более активными, сохранялась некоторая агрессивность, увеличивался объем шерсти, начинались ранки на поверхности кожи. исчезнуть, а полиурия и полидипсия стали уменьшаться. В контрольной группе раны на поверхности кожи редко заживали, но объем шерстяного покрова не восстанавливался, сохранялась их агрессивность, а рана на дорсальной части ноги не заживала. К 10-м суткам у крыс, получавших Левомеколь и коллаген Кверцитин, объем шерстного покрова постепенно восстанавливался, эрозии на теле исчезали. В контрольной группе до конца эксперимента сохранялась апатия и вялость, они предпочитали больше держаться в углу клетки, а при отлове животные оставались агрессивными, объем шерстяного покрова полностью не восстанавливался. У крыс контрольной группы наблюдалась тенденция к увеличению массы тела по сравнению с показателями интактных животных. Диурез, прибавка массы тела и полиурия увеличились на 6,38 ($P<0,001$) по сравнению с показателями неизмененных крыс на 10-е и 14-е сутки эксперимента; достоверно увеличилось в 1,14 ($P<0,001$) и 4,69 ($P<0,001$) раза (табл. 1).

В группе сравнения (Левомеколь) снижения веса не наблюдалось, но наблюдался прирост веса. К концу эксперимента значения полиурии, полидипсии и полифагии постепенно снижались: на 14-е сутки полиурия, вес и полидипсия составляли 3,85

($P<0,001$), 1,06 ($P<0,001$) и 3,04 ($P<0,001$).) раз уменьшилось, но все же выше, чем в неизменной группе.

Никакой потери массы не наблюдалось при обработке основной группой (коллаген с кверцетином) на дорсальной части задней ноги крысы (основная группа). На 10-е сутки эксперимента полиурия, масса тела и полидипсия были достоверно ниже, чем в сравнительной группе в 1,94 ($P<0,05$), 1,016 ($P<0,05$) и 2,13 ($P<0,05$) раза. На 14-е сутки эксперимента она почти не отличалась от не измененной группы.

Таблица1 Результаты физиологических показателей аллоксановых крыс диабетом

Группы	Диурез , мл/день	масса, г	Объем воды, мл/день
Не изменено	9,6±0,50	215,7±2,9	15,6±0,79
Контрольная группа			
1-день	44,0±1,4***	229,4±2,7	45,0±1,7***
3-день	50,6±1,2	231,4±1,3	55,3±1,4***
7-день	56,1±1,0	235,8±1,7	62,5±1,7***
10-день	61,3±2,4	245,2±1,5	69,2±1,8***
14-день	73,3±1,6	235,2±1,8	73,2±1,4***
Сравнительная группа			
1-день	24,1±0,9****^	231,1±1,8	24,5±0,7****^
3-день	24,5±0,8****^	235,3±1,3	29,2±0,8****^
7-день	23,1±1,9****^	230,6±1,5	27,3±1,4****^
10-день	22,5±0,5****^	226,4±0,5	25,1±0,6****^
14-день	19,0±0,4****^	221,8±1,6	21,5±1,2****^
Основная группа			
1-день	13,6±0,35^^^&&	231,4±1,5^^&	13,8±0,75^^^&&
3-день	14,4±0,65^^^&&	237,6±1,6^^&	15,2±0,85^^^&&
7-день	12,6±1,03^^^&&	234,1±1,6^^&	12,8±1,53^^^&&
10-день	10,8±0,45^^^&&	225,6±1,1^^&	11,2±0,33^^^&&
14-день	9,8±0,45^^^&&	218,2±1,3^^&	10,1±0,63^^^&&

Примечание: * - достоверно по сравнению с показателями неизменной группы (*- $p<0,05$); ** - $P<0,01$; *** - $P<0,001$; ^ - достоверно выше, чем в контрольной группе (^- $P<0,05$); ^^ - $P<0,01$; ^^ ^ - $p<0,001$); & - достоверно по сравнению с группой сравнения (&- $P<0,05$; && - $p<0,01$; &&& - $p<0,001$).

Определение биохимических показателей исследования.

Моделирование диабета привело к значительным изменениям ключевых биохимических параметров. В 1-е сутки аллоксановой модели диабетической стопы у крыс повышался уровень глюкозы, уровень глюкозы в 1-е сутки составил в неизменной группе крыс 14,3 ммоль/л, в контрольной группе и в основной группе - 15,1 ммоль/л. В группе интактных наблюдалось более высокое состояние в 1,12 раза и составило $16,3 \pm 0,49$ ммоль/л ($p < 0,001$) ($4,63 \pm 0,39$ ммоль/л в неизменной группе). Уровень глюкозы в крови у крыс с диабетом, получавших аллоксан, в дальнейшем имел тенденцию к снижению, но был повышен на 14-е сутки, что было в 1,53 ($p < 0,001$) раза выше, чем у нелеченых крыс, и составило $7,1 \pm 0,11$ ммоль/л (рис. 4).

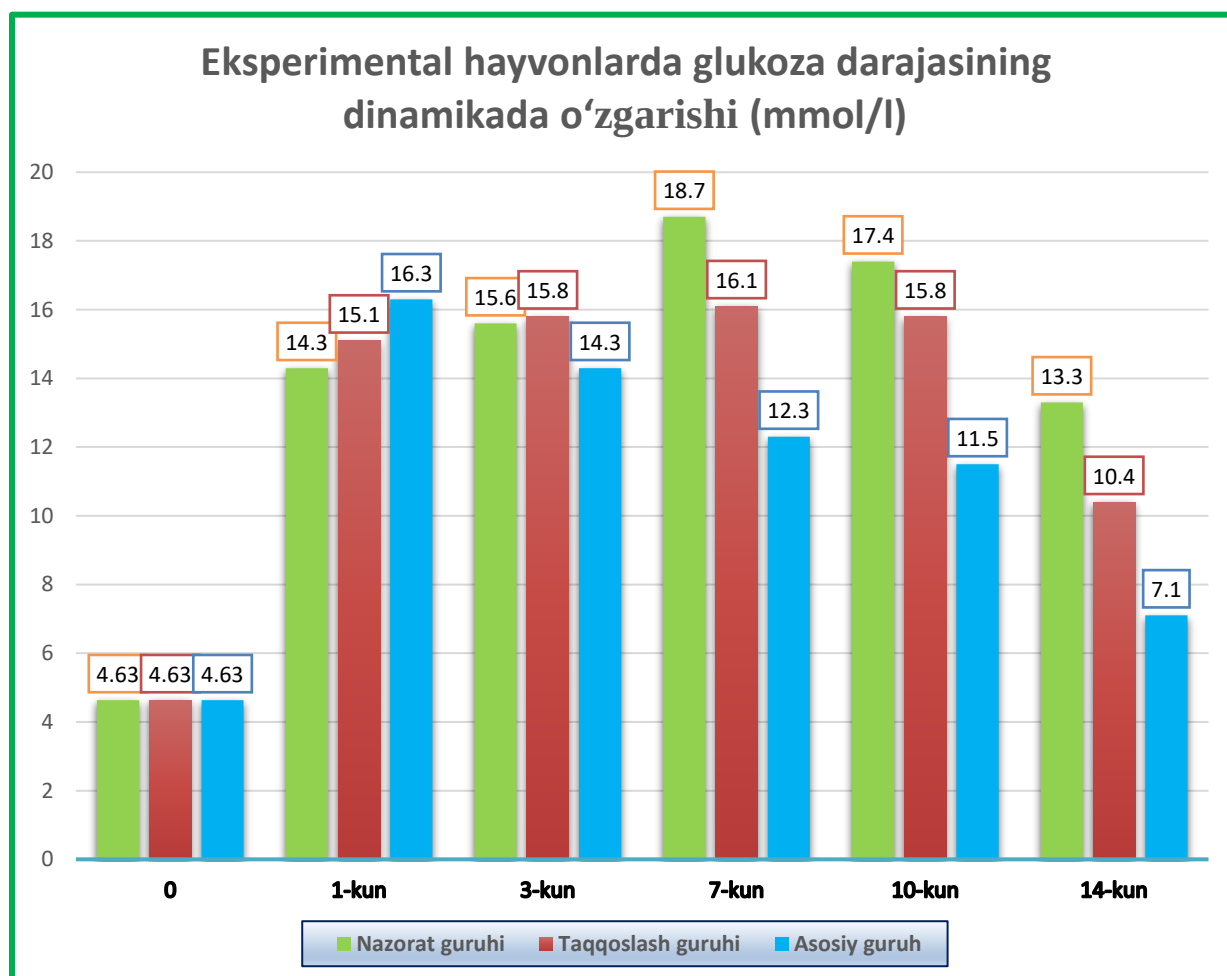


Рисунок 4. Изменение динамики показателя глюкозы.

В литературе масса тела животных со временем имела тенденцию к появлению чувствительности к интоксикации аллоксаном, что повышало их смертность на 12% по сравнению с 9% в нашем исследовании по сравнению с нелечеными крысами. Введение аллоксана вызывало повышение уровня глюкозы в крови на 37% у не измененной группы, у сравнительной группы на 31%, и только 12% в основной группе. После введения аллоксана на 3-е сутки эксперимента у большинства животных

изменений не произошло, а в контрольных группах развилась стойкая гипергликемия. По истечении двухнедельного периода как в сравнительной, так и в основной группах уровень глюкозы в крови снизился благодаря нашей терапии.

Будут рассмотрены механизмы, приводящие к возникновению эндотелиальной дисфункции при сахарном диабете - гипергликемии, окислительному стрессу, рассмотрена роль конечных продуктов гликолиза в эндотелиальных изменениях. Эндотелиальная дисфункция при сахарном диабете оказывает негативное влияние на работу антиоксидантной системы и ее значение в развитии. Окислительный стресс эндотелиальных клеток и развитие сосудистых осложнений, способствующих развитию эндотелиальной дисфункции, например, при сахарном диабете и заболеваниях обмена веществ, вызывают дисбаланс между свободнорадикальной системой и антиоксидантной защитой. Многие аспекты многокомпонентных регуляторных реакций в патогенезе развития эндотелиальной дисфункции при сахарном диабете до сих пор недостаточно изучены.

В настоящее время выделяют 4 типа эндотелиальной дисфункции: вазомоторную, гемостатическую, адгезивную и ангиогенную. В то же время случаи изолированной, т. е. отдельного вида эндотелиальной дисфункции, редки и, как правило, при большинстве заболеваний, например, при сахарном диабете, наблюдается совместное нарушение функции эндотелия [3, 6]. У больных сахарным диабетом наблюдается снижение синтеза основных вазодилаторов, таких как оксид азота (NO) и простациклин, а также увеличение вазоконстрикторов, в первую очередь эндотелина-1, что отражает вазомоторную функцию, приводя к эндотелиальной вазомоторной эндотелиальной недостаточности. дисфункция [2, 8]. При диабете наблюдаются: увеличивается экспрессия молекул адгезии, селектинов и иммуноглобулинов, а также молекул адгезии тромбоцитов и/или эндотелиальных клеток (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1), эндотелиальных тромбогенных биомаркеров - тканевого фактора. (tissue factor, TF), повышенное количество активатора плазминогена-1 (plasminogen activator and inhibitor-1, PAI-1) вызывает дисфункцию эндотелиальной адгезии. Гипергликемия является одним из факторов изменения гликогенеза эндотелиальных клеток, что сопровождается нарушением барьерной функции сосудистой стенки и увеличением адгезионных свойств ее стенки, в частности, гиперэкспрессией молекул сосудистой адгезии на поверхность эндотелиальных клеток (vascular cell adhesion molecule1, VCAM-1) и отсутствие обнаружения Р- и Е-селектинов, контролирующих уровень глюкозы в крови. В большинстве случаев эндотелиальная дисфункция возникает за несколько лет до развития диабета, о чем свидетельствует увеличение PAI-1 и факторов Виллебранда (рис. 5). Появление сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) при диабете связано с тем, что глюкоза влияет на слой эндотелия сосудов и участвует в регуляции пролиферации эндотелиальных клеток. При гипергликемии экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) наблюдается в почках под влиянием высокого фильтрационного давления и медиаторов воспаления – цитокинов. Синтез VEGF контролируется другими факторами роста, в том числе инсулиноподобным фактором роста (IGF-γ), трансформирующим фактором роста бета (TGF-β), фактором роста тромбоцитов (фактором роста тромбоцитов, TGF) и другими, оказывающими

негативное влияние на стимуляцию. Недавние исследования показали, что нарушение ангиогенной функции эндотелия при диабете напрямую индуцирует экспрессию и дифференцировку эндотелиальных клеток.

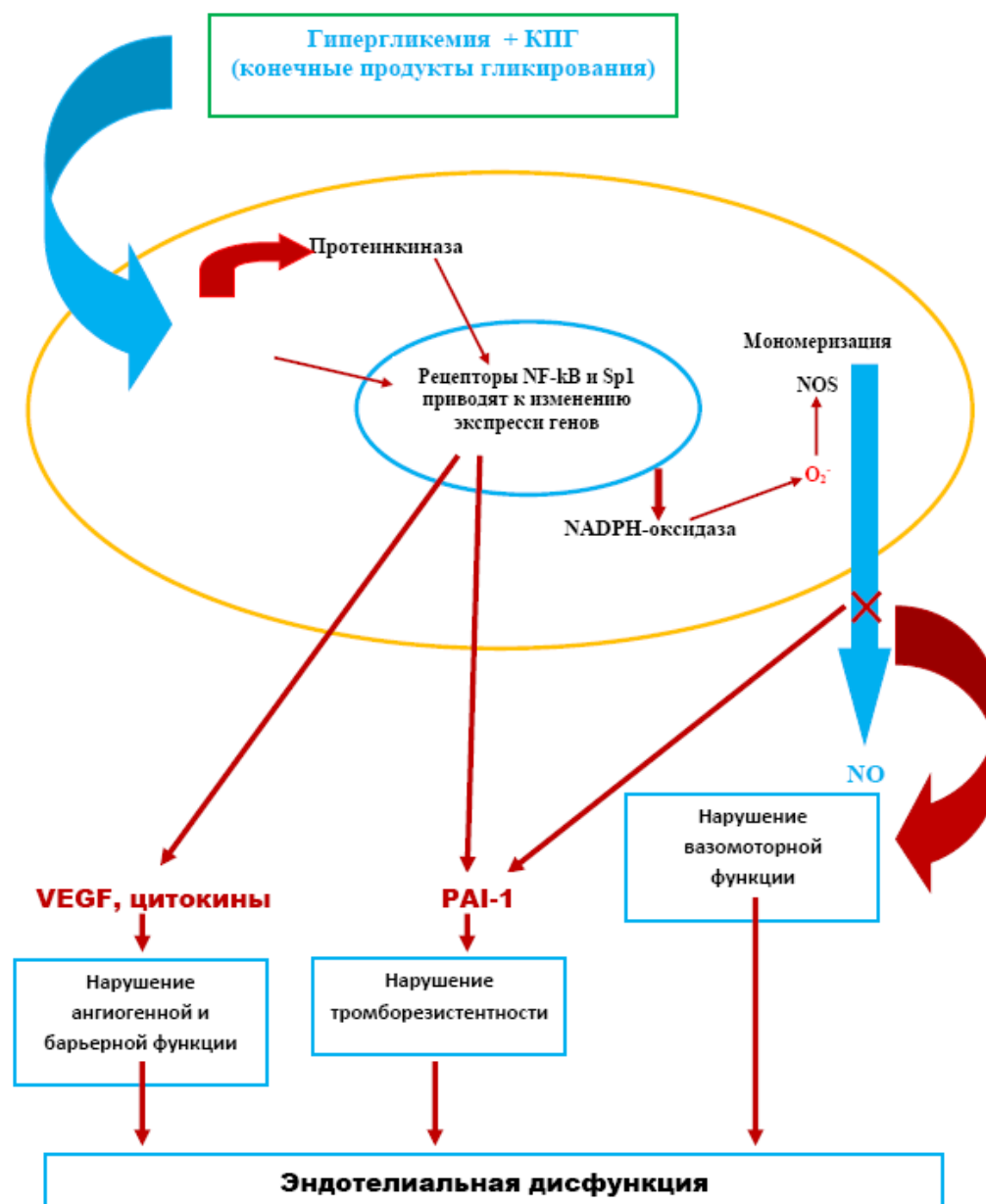


Рисунок 5. Образование фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) при сахарном диабете.

В наших исследованиях фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) индуцировался у всех групп крыс после введения аллоксана в дорсальную часть правой задней конечности на 3-е сутки после использования инструмента «Aortal punch», круглой формы, диаметром 2,0 мм., с четкой границей и гладкой поверхностью, рану делают поверхностно. В ходе нашего наблюдения стало ясно, что наш анализ фактора роста эндотелия сосудов играет

важную роль в заживлении ран.

Со дня травмирования, VEGF в крови начинает увеличиваться. VEGF обладая сильной митогенной активностью, он не влияет на другие типы клеток. VEGF участвует в деградации межклеточного матрикса, активирует протеиназные каскады. Он взаимодействует с эндотелиальными клетками сосудов и индуцирует фосфорилирование активаторов и ингибиторов плазминогена, урокиназных рецепторов, желатиназы А и коллагеназы, FAK (Focal adhesion kinase), тогда как металлопротеиназа снижает количество ингибиторов матриксной ткани.

VEGF стимулирует эндотелиальные клетки, принимает активное участие в миграции и мобилизации эндотелиоцитов из костного мозга в центр ангиогенеза, повышает проницаемость сосудов, тормозит дифференцировку дендритных клеток, в результате активирует миграцию моноцитов и тканевых факторов.

Показатели тканевого фактора VEGF при аллоксановом диабете.

В нашем наблюдении в контрольной группе количество VEGF в крови дало низкие значения по сравнению с группой сравнения и основной группой. Это указывает на то, что имеет важное значение первичная хирургическая обработка раны, и какой препарат мы используем, всасываясь из раны этот препарат стимулирует факторы VEGF, которые появляются в костном мозге. В результате, чем выше количество VEGF в крови, тем выше степень повреждения. Но не следует забывать, что гипергликемия в крови вызывает дисфункцию эндотелия, что снижает выработку VEGF. С этой целью мы контролировали уровень глюкозы в крови крыс 2 раза в день - утром и вечером после еды.

В 1-е сутки контрольной группы количество VEGF было в 1,34 раза выше нормы ($P < 0,005$). На 3-й день среднее значение глюкозы составило 15,6 ммоль/л, а количество VEGF практически не изменилось по сравнению с 1-м днем. На 7-е сутки уровень глюкозы в крови составил 18,7 ммоль/л, а показатель VEGF снизился в 1,1 раза по сравнению с 1-ми сутками ($P < 0,005$). К 10-м суткам отмечено постепенное заживление раны по контурным показателям. К 14-м суткам травма полностью зажила, а количество VEGF в крови снизилось в 1,26 раза ($P < 0,005$) за счет снижения уровня глюкозы.

Таблица 2 Показатели VEGF (фактора роста эндотелия сосудов) у экспериментальных животных

VEGF-A, pg/ml				
Дни	Группы			
	Контрольная группа	Сравнительная группа	Основная группа	Норма , пг/мл
1-день	206,4±0,8***	215,5±1,5 ^{^^^}	212,4±1,2 ^{&&&}	153,6±0,6
3-день	208,3±1,1***	223,6±1,7 ^{^^^}	238,6±1,7 ^{&&&}	
7-день	186,1±1,6***	231,1±0,8 ^{^^^}	254,5±0,6 ^{&&&}	
10-день	175,4±1,2***	212,6±0,7 ^{^^^}	208,1±1,3 ^{&&&}	
14-день	163,7±0,3***	203,8±1,2 ^{^^^}	178,6±1,8 ^{&&&}	
Примечание : p<0.005				

Примечание: * - достоверно по сравнению с показателями неизменной группы (*- $p < 0,05$); ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$; ^ - достоверно выше, чем в контрольной группе (^- $P < 0,05$); ^^ - $P < 0,01$; ^^ ^ - $p < 0,001$; & - достоверно по сравнению с группой

сравнения (&- $P < 0,05$; && - $p < 0,01$; &&& - $p < 0,001$). В группе сравнения количество VEGF увеличилось практически без изменений по сравнению с основной группой в 1-е сутки за счет более низкого уровня глюкозы в крови. К 7-му дню было обнаружено увеличение VEGF на 1,25 ($P < 0,005$) по сравнению с контрольной группой из-за относительно низкого уровня глюкозы в крови. К 10-м суткам по планиметрическим показателям определили, что рана закрылась, а количество VEGF в крови оставалось в 1,38 раза выше нормы ($P < 0,005$). Мы установили, что это связано со стимуляцией Левомеколом роста тканей.

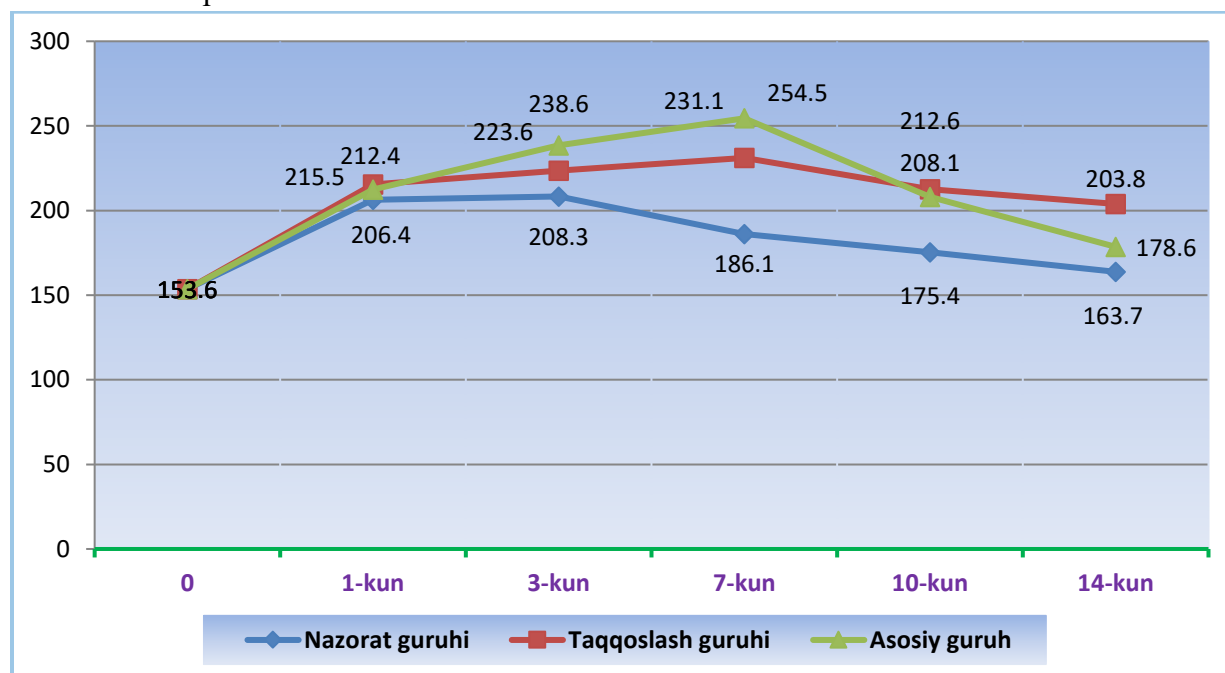


Рисунок 6. Линейное представление фактора VEGF.

В основной группе за счет применения коллагена с кверцетином уровень глюкозы снизился в 2,3 раза с 1 по 14 день, а количество VEGF в крови снизилось в 1,2 раза (Рисунок 6). К 7-м суткам количество VEGF достигло максимального уровня по сравнению с остальными группами, а это означает, что коллаген с кверцетином сильно стимулирует фактор VEGF, что приводит к полному заживлению ран в основной группе к 7-м суткам.

Исследование влияния коллагена с кверцетином на показатели эндогенной интоксикации у крыс с диабетической стопой.

Известно, что тяжесть ЭИ косвенно отражает тяжесть общего состояния больных СДС. Для оценки уровня ЭИ широко используются лейкоцитарные показатели, основанные на математическом расчете гематологических показателей. Они отражают выраженность воспалительного процесса при СД и метаболических заболеваниях, а также эффективность терапии.

По показателям ЛИИ, рассчитанным Кальф-Калифом (рис. 7) и Островским (рис. 8), их значения увеличивались у СДС-инфицированных крыс на 1-3-е сутки эксперимента, а затем постепенно снижались на 14-е сутки по сравнению с интактными крысами. Местное

лечение СДС левомеколем и особенно коллагеном с кварцетином приводило к снижению значений ЛИИ по сравнению с необработанными крысами. При применении левомеколя снижение ЛИИ по Островскому было показано в 1,22 ($P<0,01$) и 1,31 ($P<0,001$) раза на 3 и 7 сутки, а при применении коллагена с кварцетином - в 1,39 ($P<0,001$) и снизилось в 1,64 ($P<0,001$) раза. Если его значения были значительно выше, чем у нелеченных крыс при применении Левомеколя, то стандартные значения были достигнуты при использовании коллагена с Кварцетином.

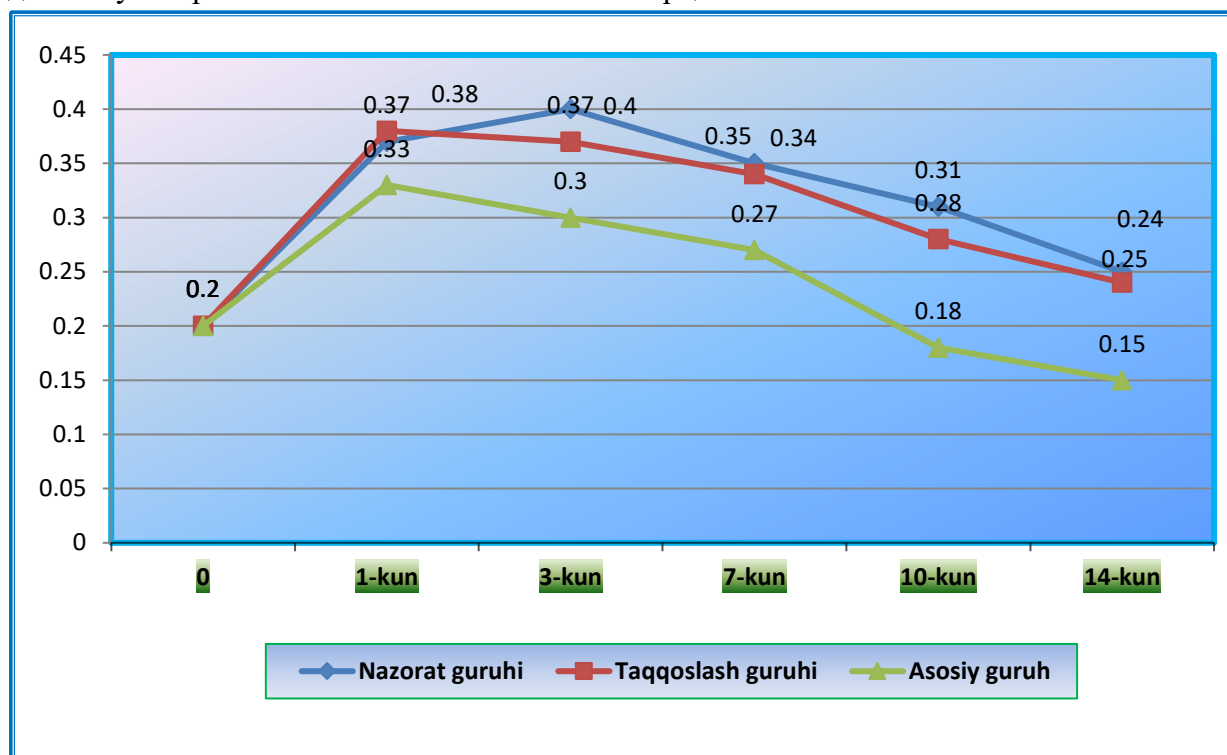


Рисунок 7. Изменение динамики показателей ЛИИ по Кальф-Калифу.

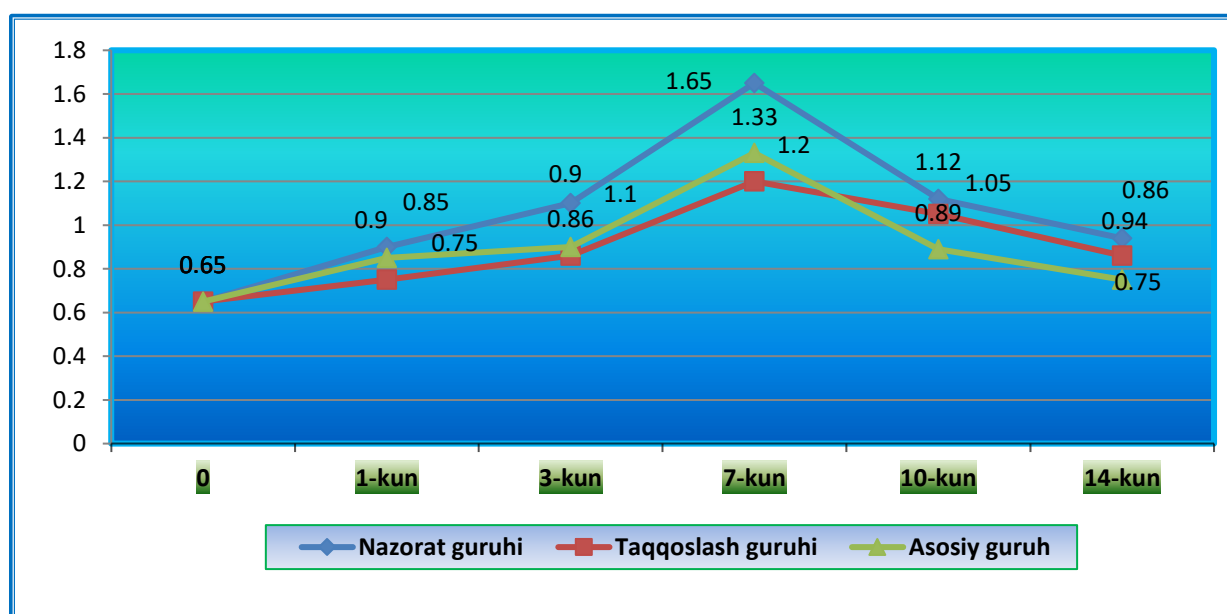


Рисунок 8. Изменение динамики показателя ЛИИ по Островскому.

Эндогенная интоксикация, как звено синдрома общей интоксикации, также является составной частью синдрома общей воспалительной реакции.

Влияние левомеколя и коллагена с кверцетином на контурные и морфологические изменения раны.

Проанализировано влияние левомеколя и а кверцитинового коллагена на контурные характеристики крыс с диабетической стопой.

Исследование показало, что в контрольной группе крыс через 24 часа после травмы размер раны увеличивался по мере дальнейшего раздвигания краев раны за счет отека, а также распространения отека по всей ноге. На 3-е сутки после формирования модели поверхность раневого дефекта покрывается тонким струпом, образующимся за счет тканевой жидкости, оболочка легко повреждается, из нее вытекает прозрачный экссудат. Отмечались явные признаки воспаления: края раны отечны с участками некроза, нижняя часть раны покрыта участками фибрина.

Таким образом, гипергликемия индуцирует микрососудистые осложнения вследствие нарушения ангиогенеза, что приводит к воспалению ран и удлинению сроков заживления.

Мы не обнаружили существенных различий в группе сравнения первого дня по сравнению с контрольной группой. Морфологические исследования показали, что отек и слизистый секрет эпидермиса и дермы сохранены. В эпидермисе обнаружены дистрофические и деструктивные изменения. На 7-е сутки эксперимента площадь раневого дефекта составляла около $1,2 \pm 0,03$ мм², коэффициент регенерации - $9,5 \pm 0,15\%$, что в 1,82 ($P < 0,001$) раза превышало показатели контрольной группы крыс (рис. 5). Морфологически ниже и вокруг диабетической раны сохранилась некробиотическая ткань, а ее периферия была инфильтрирована лейкоцитарными клетками.

В основной группе в 1-й день эксперимента мы не обнаружили достоверных различий с контрольной группой. На 3-и сутки эксперимента сохраняется раневой дефект площадью около $1,0 \pm 0,05$ мм² по сравнению с контрольной группой, что в 1,92 ($P < 0,001$) раза выше, а коэффициент регенерации составляет $10,5 \pm 0,21\%$. Благодаря сильной стимуляции сосудисто-эндотелиального фактора роста кверцетин-энхансированным коллагеном деструктивно-некротические процессы на раневой поверхности практически исчезли на 7-е сутки после лечения СДС. (Рисунок 9). При этом эпидермальная ткань вокруг раны увеличилась и можно сказать, что рана полностью зажила.

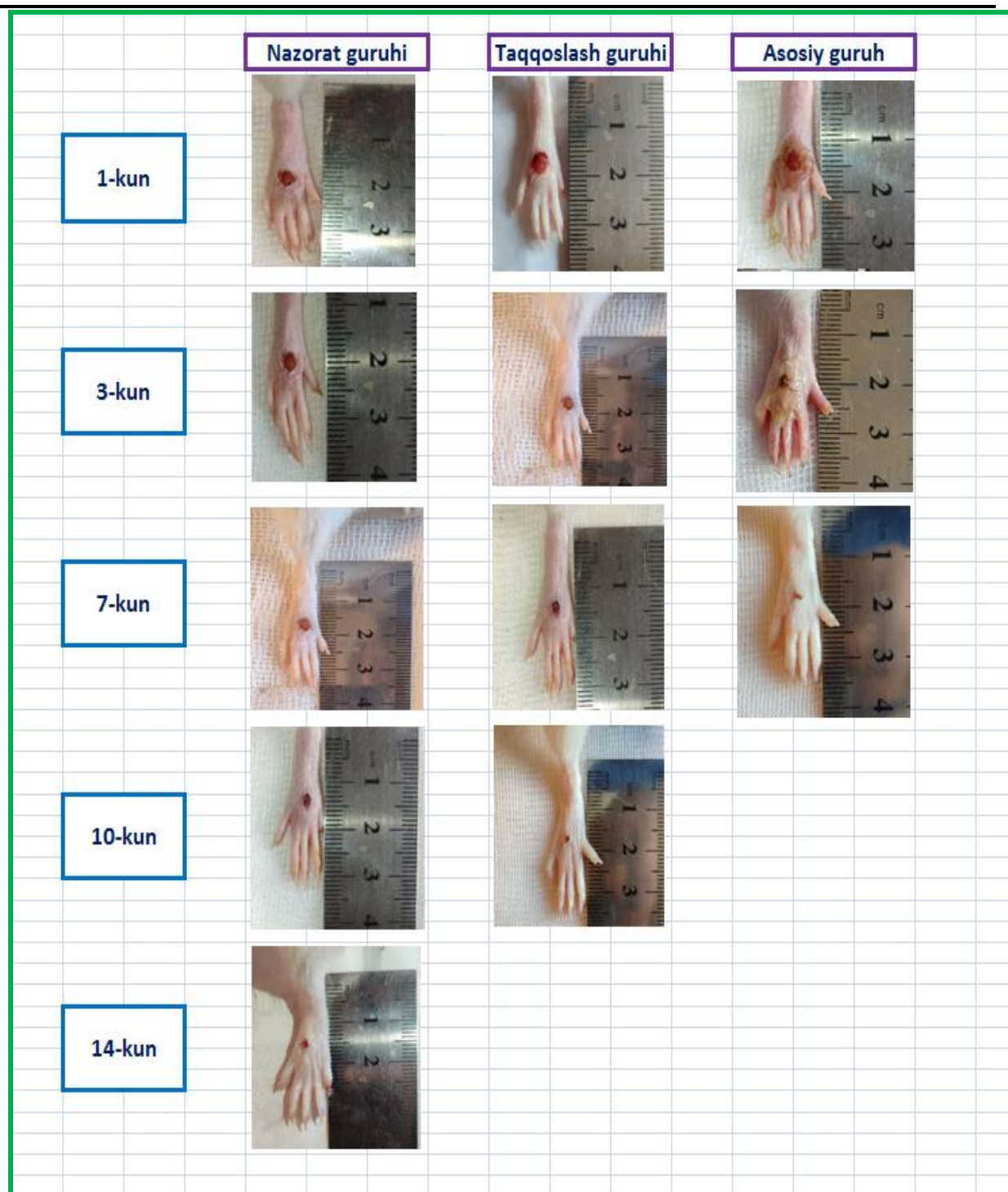


Рисунок 9. Планиметрические изображения экспериментальных лабораторных животных и их результаты.

ВЫВОДЫ

Коллаген с кверцетином помог понять молекулярные факторы развития синдрома диабетической стопы, патогенетические механизмы эндотелиальной дисфункции и процессы неоангиогенеза в нарастании тяжести патологии;

Путем определения вышеизложенного выявлены механизмы влияния VEGF на процесс

ангиогенеза, разработана модель диабетической стопы на мелких лабораторных животных для изучения патогенеза VEGF и разработки эффективных методов консервативного лечения;

Применение коллагена с кверцетином по сравнению с Левомеколем улучшает клинические симптомы диабетических хронических ран, ускоряет заживление этих ран, восстанавливает физиологические функции клеток крыс с синдромом диабетической стопы, а также подтверждена целесообразность его применения при синдроме диабетической стопы;

Использование этого типа коллагена предотвратило эндогенную интоксикацию, а также была доказана высокая эффективность нового местного препарата аллоксан при лечении общей интоксикации и механических травм у крыс с диабетом, что позволило рекомендовать его к использованию в лечении больных . синдромом диабетической стопы;

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Андреев-Андриевский А.А. и др. Механизмы ранозаживляющего действия нативного коллагена I типа в модели ишемизированных полнослойных ран кожи на примере медицинского изделия «Коллост». (Часть I) //Хирургия. Журнал им. НИ Пирогова. – 2020. – №. 10. – С. 79-87.

Блинова М. И., Хотин М. Г., Михайлова Н. А. Роль фиброблатов в регенерации кожной ткани при заживлении ран //Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – №. 3. – С. 45-45.

Маликов Н.М., Якубов Д.Р. Основы пластики раневых дефектов коллагеном и фибробластами. – /Material of International scientific and practical conference" An integrated approach to the treatment of complications of diabetes", 2023.

Образцова А. Е., Ноздревых А. А. Морфофункциональные особенности репаративного процесса при заживлении кожных ран с учетом возможных рубцовых деформаций (обзор литературы) //Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2021. – Т. 15. – №. 1.

Храмова Н., Холматова М., Мунгиев М. К вопросу использования раневых покрытий и клеточных технологий для оптимизации регенерации кожи //Stomatologiya. – 2018. – Т. 1. – №. 4 (73). – С. 57-59.

Эргашев У.Ю., Маликов Н.М. Применение современных ранозаживляющих методов в лечении хронических язв (обзор литературы) //European Journal of Interdisciplinary Research and Development. – 2023. – Т. 11. – С. 181-187.

Abdusalomov B.A. The Role of Collagen in The Mechanisms of Chronic Wound Healing for Diabetic Foot Syndrome //Texas Journal of Medical Science. – 2023. – Т. 26. – С. 86-94.

Azimi K. N. B. Evaluation of the function of connective tissue fibers in the human body //Arch. Int. J. Multidiscip. Trends. – 2020. – Т. 2. – С. 15-19.

Cherim M., Sirbu R. Obtaining of collagen extracts used as biomaterials with applications in the medical field //European Journal of Medicine and Natural Sciences. – 2018. – Т. 2. – №. 3. – С. 13-18.

Ergashev U.Y., Malikov N.M. Assesment of the morphology of the pancreas in diabetic complications //Conferencea. – 2023. – С. 25-31.

Ergashev U.Y., Malikov N.M. Evaluation of the pathomorphology of regeneration in diabetic foot syndrome and determination of its dependence on biochemical processes //World Bulletin of Public Health. – 2023. – T. 19. – C. 66-78.

Ergashev U.Y., Malikov N.M. Modern approach to complex treatment of diabetic foot ulcers //literature review. – 2023.

Ergashev U.Y., Malikov N.M. Use of Collagen and Fibroblasts in Modern Medicine //Eurasian Research Bulletin. – 2023. – T. 17. – C. 78-84.

Ergashev U.Y., Malikov N.M. Violation of the integrity of the foot in patients with diabetic foot syndrome (literature review) //Volume-7 17_Issue-1_November_2022. – C. 7-17.

Ergashev U.Y., Zokhirov A.R. Evaluation of biochemical changes in endogenous intoxication in diabetic complications //Conferencea. – 2023. – C. 109-114.

Ergashev U.Y., Zokhirov A.R. The study of diagnostics and prevention of pathophysiological parameters after modern treatment of purulent-necrotic processes in diabetic. – 2022.

Harsha L., Brundha M. P. Role of collagen in wound healing //Drug Invention Today. – 2020. – T. 13. – №. 1.

Osidak E. O. et al. Collagen—A biomaterial for delivery of growth factors and tissue regeneration //Russian Journal of General Chemistry. – 2014. – T. 84. – C. 368-378.

Shenoy M. et al. Collagen structure, synthesis, and its applications: A systematic review //Cureus. – 2022. – T. 14. – №. 5.

Stupin V. A. et al. Biological mechanisms of chronic wound and diabetic foot healing: the role of collagen //Experimental and Applied Biomedical Research (EABR). – 2018. – T. 19. – №. 4. – C. 373-382.