

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

---

*Биологический факультет*  
*кафедра клеточной биологии и гистологии*

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАНЕВОГО**  
**ЗАЖИВЛЕНИЯ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ NO-**  
**СОДЕРЖАЩИХ ГАЗОВЫХ ПОТОКОВ И ДОНОРА NO**

Выпускная квалификационная работа студента 4 курса:

**Ашниева Генриха Альфредовича**

Научные руководители:

**проф., д-р. мед. наук. зав. лаборатории экспериментальной морфологии**

**Шехтер А.Б.;**

**доц., канд. биол. наук. каф. клеточной биологии и гистологии**

**Биологического факультета МГУ им М.В. Ломоносова,**

**Липина Т.В.;**

Место выполнения работы:

**Первый Московский Государственный Медицинский Университет им.**

**И.М. Сеченова, «Институт регенеративной медицины»;**

**Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,**

**Биологический факультет.;**

Москва

2021 год

## СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	3
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
2.1 Характеристика процесса ранозаживления.....	9
2.1.1. Острые раны .....	10
2.1.2. Хронические раны .....	17
2.2. Оксид азота. Синтез и роль в организме. ....	18
2.2.1. NO как сигнальные молекулы .....	21
2.2.2. Оксид азота в физиологии и патологии клетки .....	23
2.3. Воздействие NO на процессы воспаления и ранозаживления .....	33
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	35
3.1. Плазмогенератор.....	35
3.2. Получение и характеристика раствора и аэрозоля ДНКЖ с глутатионовым лигандом .....	37
3.3. Исследования на животных .....	39
3.4. Обработка ран.....	40
3.5. Процедура нанесения полнослойной кожной раны.....	41
3.6. Измерение площади полнослойной ран .....	44
3.7. Гистологический анализ.....	44
3.8. Цитологическое исследование.....	45
3.9. Изучение процесса ранозаживления иммуногистохимическим методом .....	45
3.10. Статистический анализ .....	47
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	48
4.1. Изучение воздействия NO-содержащего газового потока на процесс ранозаживления у крыс ...	48
4.1.1 Макроскопическое описание .....	48
4.1.2.Площадь ран .....	49
4.1.3. Гистологическое исследование процесса заживления ран .....	49
4.1.4. Морфометрический анализ .....	55
4.1.5. Сравнительный анализ числа клеточных форм в мазках экссудата ран .....	57
4.1.6. Иммуногистохимическое изучение процесса заживления ран. ....	59
4.2. Изучение воздействия аэрозоля ДНКЖ на процесс ранозаживления у крыс .....	62
4.2.1 Макроскопическое описание .....	62
4.2.2. Площадь ран .....	63
4.2.3. Гистологическое исследование процесса заживления ран .....	63
4.2.4. Морфометрический анализ .....	69
4.2.5. Сравнительный анализ числа клеточных форм в мазках экссудата ран .....	71
4.2.6. Иммуногистохимическое изучение процесса заживления ран .....	73
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	76
6. ВЫВОДЫ.....	79
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	80

## 1. ВВЕДЕНИЕ

В общей структуре хирургических заболеваний хирургическая инфекция наблюдается у 35 – 45% больных и протекает в виде острых и хронических болезней или нагноения посттравматических и послеоперационных ран. [4]. По данным ВОЗ (2016 год) в США из-за хирургических инфекций сроки пребывания в стационаре увеличиваются до 400 000 дней в год, при этом в год материальные затраты возрастают на 900 миллионов долларов США [22]. Таким образом, поиск наиболее эффективных и недорогих стимуляторов раневого заживления является важной задачей, над которой работают ученые всего мира.

Оксид азота (NO), является одним из универсальных регуляторов физиологических и патологических процессов в организме и играет важную роль на всех этапах раневого заживления. Снижение концентраций эндогенного NO приводит к нарушению процессов регенерации, поэтому применение экзогенного оксида азота является перспективным направлением терапии ран [81, 99, 105]. Лечебная эффективность экзогенного оксида азота (NO) основана на свойствах эндогенного NO как полифункционального физиологического регулятора (Нобелевская премия по медицине за 1998 год) и заключается в следующем:

- нормализации микроциркуляции за счет вазодилатации, антиагрегантного и антикоагулянтного действия NO;
- бактерицидном действии как собственным, так и опосредованным пероксинитритом, образующимся в тканях при взаимодействии NO с супероксид-анионом ( $\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$ );
- индукции фагоцитоза бактерий нейтрофилами и макрофагами;
- активации антиоксидантной защиты;

- усилении секреции противовоспалительных и прорегенеративных цитокинов и факторов ангиогенеза;
- улучшении нервной проводимости (нейротрансмиссии);
- регуляции специфического и неспецифического иммунитета;
- прямой индукции пролиферации фибробластов, роста сосудов, синтеза коллагена, образования и созревания грануляционной ткани, пролиферации эпителия;
- регуляции апоптоза и предотвращении патологического рубцевания.

Таким образом, важнейшим преимуществом NO-терапии в отличие от большинства физических и медикаментозных лечебных факторов является воздействие полифункционального NO на все фазы единого воспалительно-регенераторного процесса, что и обуславливает высокую эффективность лечения в различных областях медицины.

Другим достоинством NO-терапии является возможность локального воздействия на патологический очаг, что позволяет избежать нежелательных общих эффектов как при использовании нитропрепаратов - медикаментозных доноров NO. Присоединяя манипулятор аппарата к эндоскопическим приборам, пункционным иглам и дренажным трубкам, можно обрабатывать не только открытые раневые или язвенные поверхности, но и глубокие раневые карманы, очаги в плевральной и брюшной полостях, в просвете полых органов. Ещё одним преимуществом NO-терапии является способность экзогенного NO диффундировать не только через раневую поверхность, но и через неповрежденную кожу и слизистые оболочки, т.е. возможность неинвазивного воздействия на глубокие очаги и сосудисто-нервные пучки.

Наконец, важным достоинством является возможность сочетания теплового воздействия на ткани воздушной плазмой с последующей NO-терапией. Высокотемпературные воздушно-плазменные потоки

непосредственно используются для коагуляции раневой поверхности с одновременной её стерилизацией, а также гемо-, лимфо-, аэро- и холестаазом, деструкции (испарения) новообразований и больших масс некротизированных тканей.

Метод теплового воздействия и NO-терапии вследствие технической простоты, высокой надежности и небольших габаритов аппарата «ПЛАЗОН» может использоваться в учреждениях практического здравоохранения разного уровня - от муниципальной поликлиники до больниц, госпиталей и крупных медицинских центров. Учитывая эффективность использования NO-содержащего газового потока (NO-СГП) в различных областях медицины, метод NO-терапии может стать высокорентабельным, т.к. один аппарат может использоваться в разных отделениях.

Таким образом, полифункциональность и универсальность лечебной технологии на основе оксида азота и воздушной плазмы, широта спектра заболеваний, при которых данная технология показана, делают ее незаменимой в деятельности врачей общей практики первичного звена системы медицинской помощи населению.

Существующие доноры NO разделяются на две группы естественные и синтетические. Среди естественных доноров NO чаще всего используются динитрозильные комплексы железа и S-нитрозоитол. В нашей работе мы используем первый из них - (ДНКЖ) так как он является наиболее представленным в живых организмах среди эндогенных производных оксида азота. Также низкомолекулярные формы с тиолсодержащими лигандами являются достаточно стабильными комплексами, которые легко синтезируются и могут быть представлены моноядерной (M-DNIC) или биядерной формой (B-DNIC), которая образуется в организме млекопитающих в результате связывания двух железо-динитрозильных  $[\text{Fe} 2 (\text{NO}) 2]$  фрагментов ДНКЖ с мостиковыми тиоловыми атомами серы  $[(\text{RS}) 2 \text{Fe} 2 (\text{NO}) 4]$ .

Более 15 лет изучается возможность применения ДНКЖ в широком спектре медицинских областей: от кардиологии до онкологии. Тем не менее, несмотря на доказанную эффективность, в литературе нет указания наиболее эффективной дозы ДНКЖ для заживления ран кожи.

В ранних исследованиях было показано, что ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами, образуются в тканях животных и представлены биядерной формой [97]. В физиологических условиях они образуются из относительно низких концентраций эндогенно синтезируемого NO (около 50 нМ). Интеграция NO в ДНКЖ защищает его от окисления, обеспечивает транспорт и взаимодействие с различными мишенями. К тому же, входящие в состав ДНКЖ NO-молекулы способствуют его окислению до катиона нитрозония (NO<sup>+</sup>), который сохраняется в комплексе и принимает участие в S-нитрозилировании тиолов (RSNO), которые также выполняют роль эндогенных сигнальных молекул [66].

Таким образом ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами в соответствии с их резонансными структурами  $[(RS-)2Fe2+(NO+)(NO)]^+$  и  $[(RS-)2Fe2+2(NO+)2(NO)2]^{4+}$ , характерными соответственно для M- и B-DNIC могут выступать как в качестве доноров молекул NO, так и катионов нитрозония [90].

Первые, как правило, оказывают положительное – регуляторное действие на живые организмы, тогда как вторые - негативное, цитотоксическое действие. ДНКЖ оказывают гипотензивный и сосудорасширяющий эффекты [104], снижают агрегацию тромбоцитов [105], способствуют защите миокардиоцитов от гипоксического повреждения [106, 107], стимулируют длительную эрекционную активность [108], ингибируют рост эндометриоидных опухолей в экспериментах на животных [109, 110], индуцируют апоптоз в различных опухолевых клеточных линиях потенцируют цитотоксический эффект лучевой терапии [100, 45].

Фибробласты являются основным типом клеток дермы. Эти клетки отличны от фибробластов тем, что могут более активно синтезировать внеклеточный матрикс (коллаген, фибронектин). Также синтезируют мощные пучки стресс-фибрилл из белка гладкомышечного актина  $\alpha$ SMA (Smooth Muscle alpha-Actin). Фибробласты играют важную роль в заживлении ран. Когда возникает рана, фибробласты мигрируют в область раны, дифференцируются в миофибробласты и активно откладывают компоненты внеклеточного матрикса, которые способствуют формированию рубца в месте ранения. Благодаря стягивающему эффекту стресс-фибрилл фибробластов, они также ускоряют процесс заживления. Когда рана зажила, миофибробласты дедифференцируются обратно в фибробласты или уходят в апоптоз [16, 66, 104].

В практике зарубежной медицины метод не применяется, т.к. подобный аппарат в мире отсутствует. В литературе сведений об использовании газообразного экзогенного NO для лечения раневой и воспалительной патологии не обнаружено. Ингаляция газообразного NO из баллона применяется только при неотложных состояниях.

В литературе приводятся свидетельства благоприятного воздействия оксида азота на процесс заживления ран, однако сравнительные исследования эффективности разных методов введения NO отсутствуют [34, 74, 82]. Также практически отсутствуют данные, отражающие зависимость доза – эффект, что создает сложности применения NO-терапии в клинической практике. Недостаточно отражены морфологические аспекты NO-терапии и механизмы воздействия экзогенного оксида азота и доноров NO на раневые ткани.

## **Цель и задачи работы**

**Цель** настоящей дипломной работы заключалась в том, чтобы, изучить особенности воздействия оксида азота на раневые ткани и клеточные элементы в динамике процесса ранозаживления, сравнить различные способы доставки NO к участку повреждения.

Для достижения указанной цели нами были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Провести экспериментальное моделирование полнослойных асептических кожных ран и сравнительное исследование применения NO-СГП и ДНКЖ.
- 2) Провести морфологическое и морфометрическое изучение ран из опытных и контрольных групп на разных сроках.
- 3) Изучить морфологию клеток раневой ткани и состояние межклеточного матрикса в опытных и контрольных группах на разных стадиях заживления.
- 4) Проанализировать полученные данные, сделать вывод о наиболее эффективном способе доставки оксида азота.



## **2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **2.1 Характеристика процесса ранозаживления**

Рана - это нарушение анатомической целостности кожи, которое сопровождается повреждением глубжележащих тканей или органов, вызванное механическим воздействием. По длительности существования, раны классифицируются на два основных типа – хронические и острые. Хронические раны характеризуются нарушением репаративных процессов, что увеличивает период их заживления. Острые раны претерпевают комплекс процессов с участием множества типов клеток, обеспечивающих ранозаживление [67]. Нормальный процесс заживления ран можно разделить на 4 перекрывающиеся фазы: гемостаз (0– несколько часов после травмы), воспаление (1–3 дня), пролиферация (4–21 день) и ремоделирование (21 день – 1 год) [24, 38, 85]. Нарушение регулирования любой из них приводит к нарушению процесса заживления, что может проявляться хроническими язвами или избыточным образованием рубцовой ткани [84, 85]. Во время гемостаза происходит свертывание крови, которое предотвращает чрезмерное кровотечение и обеспечивает временную защиту раненой области. Развитие воспалительной фазы приводит к накоплению лейкоцитов: нейтрофилов и макрофагов, которые выделяют факторы роста, активируют дермальные и эпидермальные клетки. В завершающей пролиферативной фазе ранозаживления активно образуется внеклеточный матрикс, васкуляризируется грануляционная ткань. Последующее ремоделирование внеклеточного матрикса и апоптоз клеток приводят к образованию рубцовой ткани схожей по физическим свойствам с неповрежденной кожей [75].

### 2.1.1. Острые раны

Заживление острой раны представляет собой тонкорегулируемый и многофакторный процесс, в котором принимают участие множество местных и системных факторов. Это динамический процесс, который включает в себя чередование с взаимным перекрыванием процессов гемостаза, воспаления, клеточной миграции и пролиферации, синтеза компонентов межклеточного матрикса и ремоделирования новообразованной соединительной ткани [60].

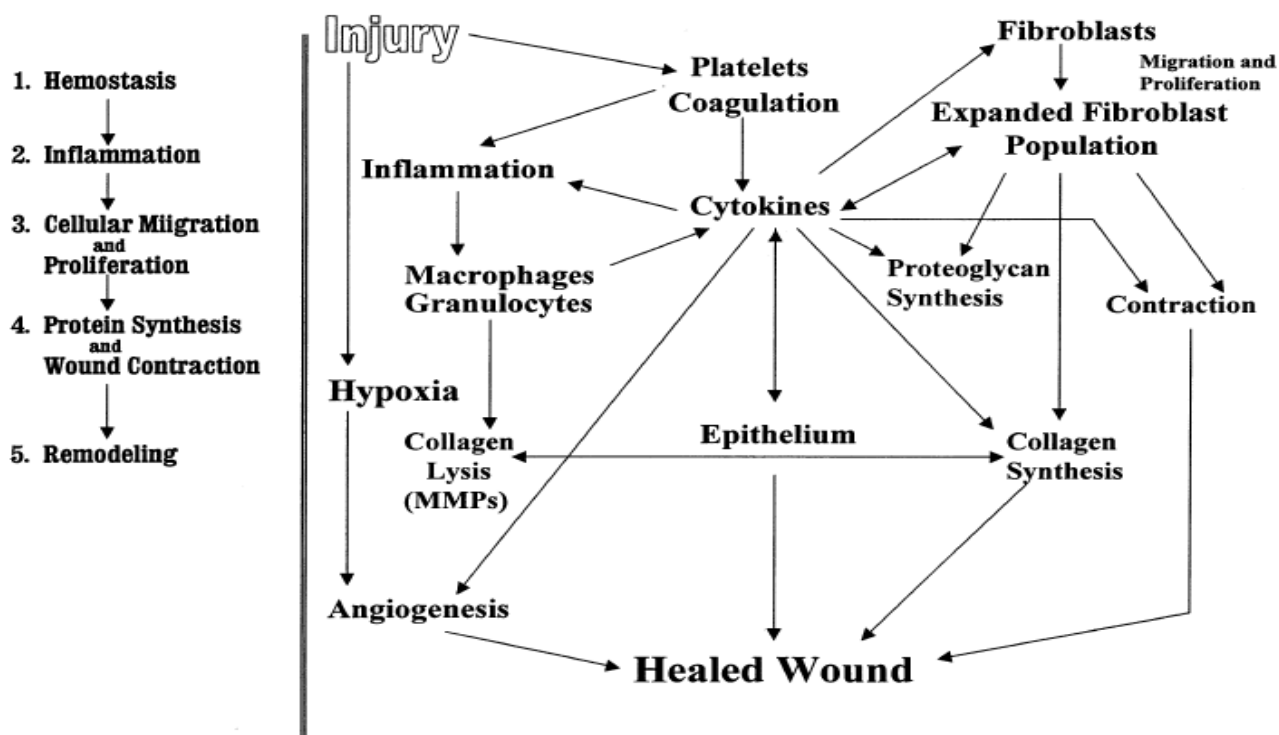


Рис.1. Каскадные процессы при ранозаживлении. (Monaco JL, Lawrence WT, 2003)

Прогрессия заживления начинается с гемостаза и кончается ремоделированием ткани, которое зависит от комплексных взаимодействий различных регуляторов заживления. Цитокинез служит центральным элементом сигналинга для большинства участников ранозаживления.

## Гемостаз

В первые минуты после повреждения кожных покровов, обрывки коллагеновых волокон в поврежденных сосудах инициируют внутренние и внешние каскады процесс гемостаза, включая агрегацию тромбоцитов и отложение фибрина, вазоконстрикцию.

Агрегация тромбоцитов стимулируется различными тканевыми факторами, образующимися при повреждении. В этом процессе участвуют такие специализированные белки, как фибриноген и фактор Фон-Виллербранта, а также белки ламинин, витронектин и тромбоспондин. При агрегации тромбоциты выделяют компоненты  $\alpha$ -гранул, плотных телец, лизосом. Они включают в себя факторы, активирующие систему комплемента.  $\alpha$ -гранулы содержат множество иммуномодулирующих и белковых факторов: factor VIII, PDGF (Platelet-derived Growth Factor), TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor beta), TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor alpha), EGF-2 (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor). В плотных тельцах тромбоцитов содержатся ионы кальция, серотонин, АТР, АDP. Эти вещества способствуют процессу заживления ран и участвуют в инициации каскада коагуляции. В недавних исследованиях было показано что дегрануляция тромбоцитов стимулирует экстравазацию нейтрофилов и их миграцию к очагу повреждения [15, 16, 17, 32, 85]. Важную роль в хемотаксисе нейтрофилов играет рецептор хемокина CXС 2 (CXCR2), так как опосредует их рекрутирование на ранней стадии заживления ран (до суток) посредством взаимодействия со множеством лигандов, включая CXС-хемокиновый лиганд (CXCL). В недавних исследованиях было показано, что при отсутствии этого рецептора моноциты появляются в ране на более поздние сроки, а также снижается секреция IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 beta), скорость миграции и пролиферации кератиноцитов [60].

При повреждении дермы высвобождаются вазоактивные амины, инициирующие процесс вазоконстрикции. Также происходит выброс

норадреналина нервными окончаниями и адреналина в периферическую кровь [67]. Локализованные вдоль сосуда тучные клетки высвобождают гранулы гистамина, которые также способствуют процессу вазоконстрикции[43]. Происходящие процессы агрегации тромбоцитов и вазоконстрикция, приводят к снижению рН и гипоксии, формированию сгустка, заполняющего дно раны.

Каскад коагуляции кровеносных сосудов состоит из внутреннего и внешнего компонента, которые запускаются независимо друг от друга. Причем необходимым для осуществления нормального ранозаживления является только внешний компонент. Внешний компонент каскада ранозаживления инициируется тканевым фактором Tf (Tissue Factor) (на поверхности клеток сосудов и на фибробластах адвентиции), который взаимодействует с факторами VII или VIIa. Внутренний компонент инициируется при активации фактора XII, что происходит при попадании в кровь инородных частиц.

Воздействие внешнего и внутреннего компонентов каскада коагуляции приводит к образованию тромбина, который способствует превращению фибриногена в фибрин. Сформировавшаяся фибриновая сеть стабилизирует тромб из тромбоцитов и сам становится частью провизорного (раннего) матрикса, который образуется в ране вскоре после повреждения. Фибрин покрывается сывороточным и тромбоцитарным витронектином. Это ускоряет связывание фибронектина, синтезируемого фибробластами и эпителиальными клетками. Фибронектин является важным элементом провизорного матрикса. Он создает сайты связывания для, мигрирующих по раннему матриксу, фибробластов и других клеток при ранозаживлении. Фибрин-фибронектиновый матрикс также улавливает и связывает цитокины для использования их на дальнейших стадиях заживления [67].

В конце гомеостаза формируется струп, состоящий из фибриновой сети, агрегировавших тромбоцитов и других элементов крови. Он осуществляет временную барьерную функцию, закрывая дефект в коже до завершения репаративных процессов [63].

## **Воспаление**

Согласно современным данным, повреждение ткани запускает несколько типов сигналов, активирующих воспалительный процесс. Разрушенные клетки высвобождают продукты тканевого распада и патоген-ассоциированные молекулы во внеклеточное пространство, стимулируя TLR (Toll-like Receptor), индуцируя активацию внутриклеточных сигнальных путей, включая NF-κB (Nuclear factor-κB) и MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), которые инициируют экспрессию большого количества генов и биологически активных молекул, стимулирующих воспалительный ответ [16, 81, 83].

Важно отметить, что в первые часы воспалительной реакции в очаг воспаления поступают именно нейтрофилы, которые активируясь, образуют различные цитокины и хемокины. Они начинают экспрессировать VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ключевой регуляторный фактор ангиогенеза, который избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и моноцитов, увеличивает сосудистую проницаемость, что облегчает миграцию клеток эндотелия, индуцирует и стабилизирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и синтез NO [1]. В результате происходит вазодилатация и активация экспрессии протеаз, разрушающих связи между эндотелием и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток. Вазодилатация наступает вслед за вазоконстрикцией через 10-15 минут повреждения. Между эндотелиальными клетками, выстилающими капилляры в раны, образуются просветы, что способствует утечке плазмы крови из сосудистого во внесосудистое пространство и ведет к развитию отёка. Переход от

вазоконстрикции к вазодилатации обеспечивается большим количеством факторов. Этому способствует факторы тучных клеток, такие как лейкотриены и простагландины, в частности, гистамин, а так же кинины, образующиеся в плазме крови при активации калликреина. Также на этот процесс влияют тромбин и система комплемента. Так, факторы комплемента C3a и C5a значительно способствуют увеличению проницаемости капилляров [55,67]. Нейтрофилы фагоцитируют и уничтожают внедрившиеся микроорганизмы. Хотя нейтрофилы необходимы для заживления ран, их постоянное присутствие ассоциировано с длительно незаживающими ранами, трудно поддающимися терапии [55]. Считается, что в неинфицированной ране нейтрофилы могут сохраняться в течение 2–5 дней [35].

Примерно через 3 дня после повреждения в ране появляются моноциты. Дифференцируясь в макрофаги, наряду с нейтрофилами уничтожают внедрившиеся микроорганизмы путем фагоцитоза и секреции токсичных для них ROS (Reactive Oxygen Species), RNS (Reactive Nitrogen Species) и катионных белков [69], способствуют распаду внеклеточного матрикса, высвобождая коллагеназу и эластазу [67], фагоцитируют разрушенные компоненты внеклеточного матрикса, гибнущие нейтрофилы и другие продукты разрушения ткани. Моноциты, которые под действием провоспалительных цитокинов, IFN (Interferon) и продуктов тканевого распада дифференцируются в макрофаги провоспалительного фенотипа M1. Они осуществляют фагоцитоз микробов и погибших клеток и продуцируют IL-1, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , iNOS и хемокины для рекрутирования лейкоцитов. По мере уменьшения провоспалительных стимулов макрофаги переходят в репаративный фенотип M2, экспрессируя противовоспалительные медиаторы, например, антагонист IL-1R, IL-10, факторы роста TGF- $\beta$ , VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) и IGF1 (Insulin Like Growth Factor 1), которые стимулируют пролиферацию фибробластов, синтез компонентов ECM (Extracellular Matrix) и ангиогенез. Этот переход M1 – M2 имеет

решающее значение для разрешения воспаления и обеспечения восстановления тканей [16, 83, 101].

Макрофаги также участвуют в реакциях приобретенного иммунитета, выполняя роль APC (Antigen-Presenting Cell), [69]. Моноциты/макрофаги секретируют значительное число факторов, регулирующих процесс ранозаживления. Цитокины, образуемые макрофагами вовлечены в такие процессы, как ангиогенез, миграцию и пролиферацию фибробластов и сокращение раны. Наиболее важными для осуществления ранозаживления, выделяемыми макрофагами цитокинами, являются TGF- $\beta$ , IL-1, IGF-1, FGF-2, PDGF. Известно, что удаление макрофагов в отличие от нейтрофилов из области ранозаживления, значительно нарушает этот процесс.

CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты присутствуют в ране в максимальных количествах на 6-7-е сутки после повреждения и являются важным источником цитокинов, включающих IL-1, IL-2, TNF $\alpha$ , EGF, TGF- $\beta$ , а также участвуют в реакциях клеточного иммунитета. Число эозинофилов и базофилов достигает максимального значения в ране, через 24-48 часов. В частности, эти клетки являются источником TGF- $\alpha$  [67].

### **Клеточная миграция и пролиферация**

Процессы клеточной миграции и пролиферации сопровождают рост сосудов, эпителизацию и репопуляцию раны фибробластами и ведут к восстановлению эпителия и образованию молодой соединительной (грануляционной) ткани, богатой клетками крови и формирующимися капиллярами. Капилляры располагаются перпендикулярно поверхности кожи и образуют аркадообразные петли (грануляции) [18].

По классификации И. В. Давыдовского различают заживление ран первичным и вторичным натяжением. Небольшие раны, края которых сходятся - заживают первичным натяжением, а раны с разошедшимися краями вторичным натяжением.

Первичное натяжение - процесс замещения соединительной тканью содержимого раны, состоящего из сгустка крови и некротических масс. Отёк стенок раны сближает края, а фибрин кровяных сгустков склеивает их. Уже на 1-2-е сутки среди волокон фибрина обнаруживаются тяжи из фибробластов, которые в скором времени вытесняются коллагеновыми и аргирофильными волокнами. Эпителизация раны идёт быстро вследствие того, что дефект в пласте невелик.

Вторичное натяжение в заживлении ран происходит при большой площади повреждения. Обширный травматический отек в области раны сменяется нагноением с обильной экссудацией белков крови и лейкоцитов. Рана наполняется, как и в предыдущем случае, грануляционной тканью. Далее под струп из некротизированных тканей, прорастает пласт клеток эпителия с краев раны, что приводит к его отторжению [75].

После закрытия раны тонким пластом эпителия начинается увеличение в нем числа слоёв и ороговение. Часто на месте раны появляется даже больше слоёв клеток, чем в неповрежденной области. При регенерации, не осложненной инфекцией, может происходить в какой-то мере восстановление волос, потовых и сальных желёз. Однако появление этих структур в области раны в значительной степени связано с явлением смещения неповрежденного эпителия на раневую поверхность и размножения в нём клеток на некотором расстоянии от раны [75]. Главными факторами, стимулирующими реэпителизацию, являются HGF (Hepatocyte Growth Factor), FGF-7, FGF-10, TGF- $\alpha$ , HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor) [63]. Также в этом процессе участвует KGF (Keratinocyte Growth Factor) [48].

Таким образом, в фазу пролиферации временный матрикс раны, представленный сгустком крови, образовавшимся во время гемостаза, заменяется грануляционной тканью, состоящей из фибробластов, гранулоцитов, макрофагов, кровеносных сосудов и пучков коллагеновых



волокон. Фибробласты мигрируют в рану в ответ на присутствие PDGF, трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$  и bFGF (FGF2), которые продуцируются тромбоцитами и макрофагами [16, 36]. Они пролиферируют и продуцируют протеиназы для деструкции временного матрикса, а также компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, протеогликаны, гиалуроновую кислоту и т.д), образуя грануляционную ткань, которая заполняет раневой промежуток и обеспечивает основу для адгезии, миграции и дифференцировки клеток. Из разрушенной протеолитическими ферментами базальной пластинки сосудов эндотелиальные клетки под влиянием фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF) мигрируют к источнику ангиогенного стимула и пролиферируют, формируя новые капилляры [6, 17, 75].

### **2.1.2. Хронические раны**

В клинических условиях незаживление ран может приводить к серьёзным осложнениям, требующим длительного лечения, ампутации поврежденной области или даже приводящим к гибели пациента. При таких состояниях, как диабет, голодание, старение, иммуносупрессия, ранозаживление замедляется по ряду причин. Нарушение заживления ран при диабете может быть вызвано недостаточным или несвоевременным образованием ростовых факторов в раневых тканях [37, 67, 76]. При старении нарушается образование коллагена, в том числе и новообразование коллагена при ранозаживлении, что ведёт к нарушению процессов репарации и уменьшению прочности раны на разрыв [76]. Известно также, что при старении увеличивается продолжительность воспалительной стадии ранозаживления, что задерживает начало образования коллагена [49, 57]. Кроме того, нарушение воспалительной реакции при иммуносупрессии также приводит к затягиванию процесса ранозаживления [76].

## 2.2. Оксид азота. Синтез и роль в организме.

Оксид азота (NO) – уникальная газовая молекула, которая образуется из концевой атома азота гуанидино L-аргинина при участии NO-синтаз (NOS). Малые размеры и отсутствие заряда обеспечивают ему высокую проницаемость через мембраны клеток и субклеточных структур.

В настоящее время известно, что NOS представлены тремя изоферментами, которые кодируются различными генами, имеют разную локализацию и участвуют в разнообразных физиологических и патологических процессах (табл.1) [14, 46]. Два изофермента – нейрональная NO-синтаза I типа (nNOS) и эндотелиальная NO-синтаза III типа (eNOS) - являются конститутивными, они обеспечивают непрерывное образование низких концентраций NO через циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) в эндотелиальных клетках сосудов и нейронах, соответственно [51, 65, 81, 85, 105]. Индуцибельная NO-синтаза II типа (iNOS) вырабатывается только в ответ на действие патогенов (липополисахариды (ЛПС) и провоспалительных цитокинов (например, интерферон, INF- $\alpha$  и фактор некроза опухоли (ФНО)), которые генерируются нейтрофилами и макрофагами при повреждении [90]. При этом ЛПС-опосредованная активация Toll-подобного рецептора (TLR-4) приводит к повышению уровня NO приблизительно в 10 раз больше, чем при активации iNOS цитокинами [77].

**Таблица 1.** Клетки содержащие NO-синтазу. (Saifutdinov, R.G The role of nitric oxide in pathology of internal diseases. 2009).

Тип I(nNOS)	Тип II(iNOS)	Тип III(eNOS)
Нейроны	Макрофаги	Эндотелий
Эпителий бронхов	Кардиомиоциты	
Эпителий желудка	Гладкомышечные элементы сосудов	
Скелетные мышцы человека	Гепатоциты (кальмодулинзависимая)	
Фоторецепторы	Эпителий кишечника	
	Мегакариоциты, кератиноциты	

Синтазы оксида азота обладают различными прямыми и опосредованными функциями. Они активируются или ингибируются в зависимости от природы агентов, действующих на клетки (табл. 2) [14, 23, 86]. NO может оказывать эффекты, что определяется концентрациями оксида азота в тканях (табл.3). Физиологические механизмы действия NO осуществляются при низких (наномолярных) концентрациях оксид азота и заключаются в непосредственной реакции с радикалами или с комплексами металлов, в основном содержащих железо. Таким образом, оксид азота регулирует тонус сосудов и функции железосвязывающих белков [58, 84]. При низких концентрациях NO (<30 нМ) через cGMP-зависимый путь происходит активация растворимой гуанилилциклазы (sGC) и запускается каскад реакций, который проявляется сосудорасширяющим и ангиогенным эффектами. При повышении концентрации до 30-60 нМ, NO способствует фосфорилированию протеинкиназ и каспазы 6, что обеспечивает защиту клеток от апоптоза. В частности, при фосфорилировании проапоптотического белка Bad наступает его секвестрация, что предотвращает связывание с генами-мишенями в ядре и снижает частоту возникновения Bad-ассоциированного апоптоза [78, 84, 89].

**Таблица 2.** Агенты, влияющие на экспрессию индуцибельной NO-синтазы. (Saifutdinov, R.G The role of nitric oxide in pathology of internal diseases. 2009).

Индукторы	Активаторы	Ингибиторы
IL-1 $\beta$ TNF- $\alpha$ IFN- $\gamma$ LPS	cAMP EGF Basic FGF Плазмин	TGF $\beta$ PDGF IGF Тромбин Дексаметазон, гидрокортизон SNAP HGF Белок p53

**Таблица 3.** Регуляция активности NO-синтаз. (Saifutdinov, R.G The role of nitric oxide in pathology of internal diseases. 2009).

Регуляция	I типа (нейроны)	II типа (макрофаги)	III типа(эндотелий)
<b>Экспрессия:</b> постоянная повышается снижается мутация	Да При воспалении IFN- $\gamma$ , LPS Делеции	Нет IFN- $\gamma$ , LPS IL-1,2 Глюкокортикоиды ?	Да Shear stress TNF- $\alpha$ ?
<b>Посттрансляционные модификации:</b> димеризации фосфорилирование миристилирование связывание с кальмодулином	Да Да Нет Обратимое (Ca <sup>2+</sup> )	Да (кофакторзависима) ? Нет Необратимое	? Да Да Обратимое (Ca <sup>2+</sup> )
<b>Регуляция активности:</b> при повышении Ca <sup>2+</sup> MeArg аутоингибирование (NO) внутриклеточное pH	Существенно Ингибирует Нет/да ?	Нет эффекта Ингибирует Нет ?	Существенно Ингибирует ? Модулируется

### 2.2.1. NO как сигнальные молекулы

Предполагается, что NO является повсеместной молекулой-посредником, которая действует паракринным/аутокринным способами регуляции (рис.2) [28, 107].

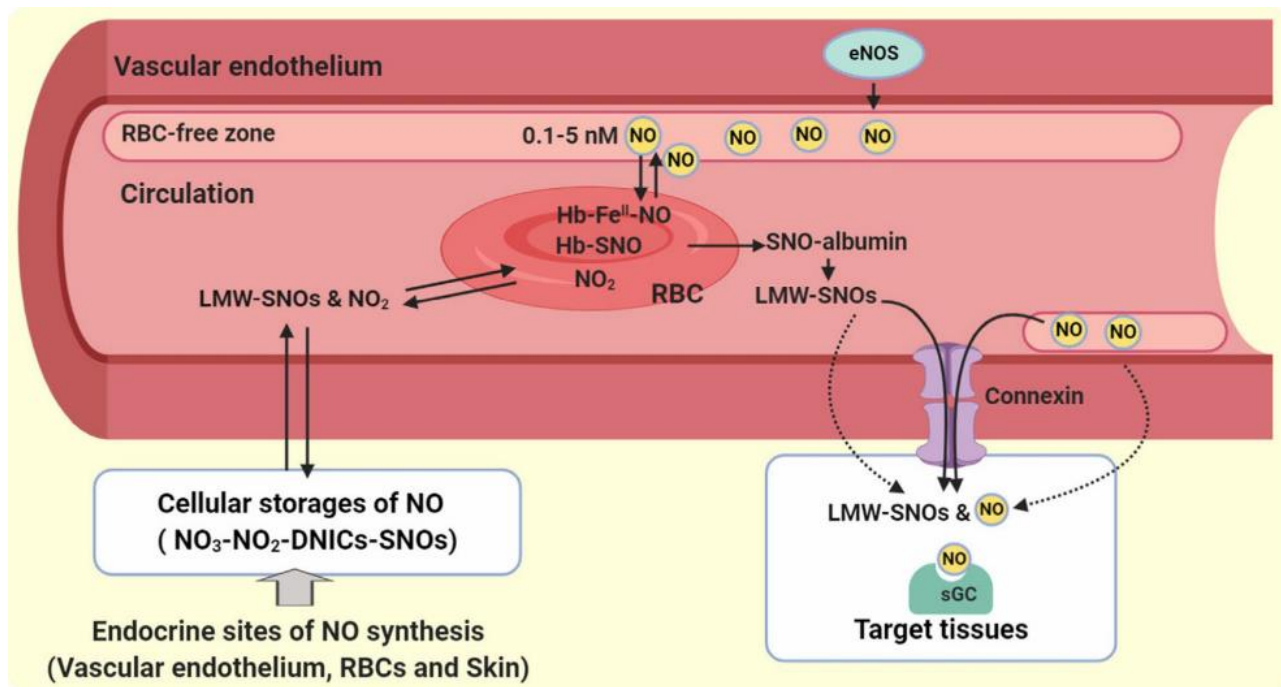
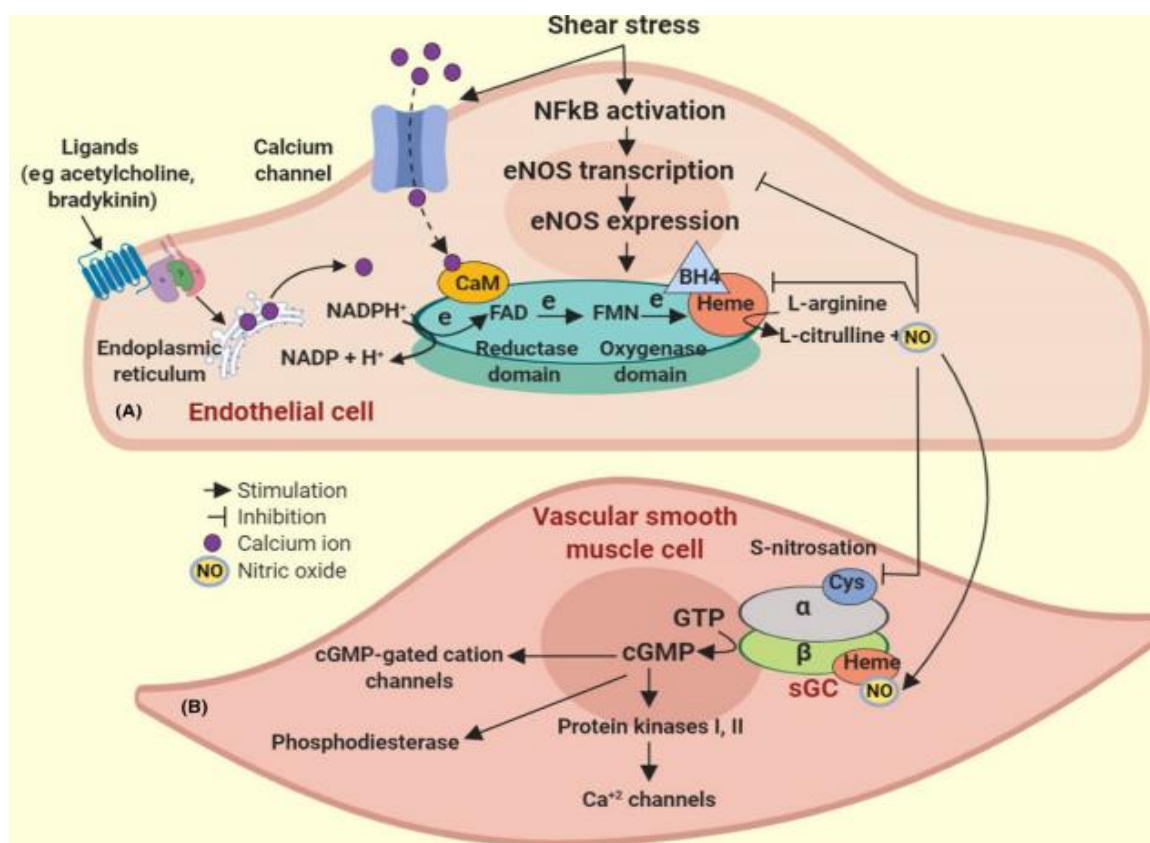


Рис.2. Сигнальные каскады с участием NO. (Bahadoran Z. et al., Nitric oxide: To be or not to be an endocrine hormone. 2020)

В первые минуты после повреждения ткани оксид азота, генерируемый конститутивной eNOS, связывается с рецептором растворимой гуанилатциклазы (sGC), который при стимуляции продуцирует внутриклеточный мессенджер цГМФ, активирующий систему G-киназ Ca<sup>2+</sup>-каналов эндоплазматического ретикулума, и таким образом снижает концентрацию внутриклеточного кальция, предотвращая адгезию тромбоцитов к стенкам сосудов [39, 70].

Эндотелий сосудов, эритроциты и кожа потенциально важные сигнальные участки продукции NO. Наиболее физиологически значимыми формами депонирования NO являются нитрат (NO<sub>3</sub>), нитрит (NO<sub>2</sub>), S-нитрозо соединения, N-нитрозо-формы и динитрозильные комплексы железа. Некоторые из этих соединений, например, S-нитрозотиолы(SNO) также действуют как буферная и транспортная система для NO. NO транспортируется в кровотоке в виде свободных и связанных форм, доставляется путем пассивной или облегченной диффузии к ткани-мишени, где активирует рецептор растворимой гуанилатциклазы (sGC). LMW-SNO - низкомолекулярные SNO; Hb, гемоглобин; eNOS, эндотелиальная NO-синтаза; Hb-NO, железо-нитрозил-Hb; Hb-SNO, S-нитрозогемоглобин; ДНКЖ.



**Рис.3. Синтез эндотелиального NO и отрицательная регуляция синтеза.** (Bahadoran Z. et al., Nitric oxide: To be or not to be an endocrine hormone. 2020)

NO, наряду с перекисью водорода активирует растворимую гуанилатциклазу, что играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса и других физиологических процессах [94]. Большое число физиологических функций контролируется редокс чувствительными сигнальными путями. Эти функции включают: редокс-регулируемое образование NO, образование АФК NADH-оксидазой фагоцитов (респираторный взрыв, образование АФК NADH-оксидазой других клеток, регуляцию сосудистого тонуса, образование АФК в качестве сенсора изменения концентрации кислорода, редокс регуляцию клеточной адгезии [38].

### **2.2.2. Оксид азота в физиологии и патологии клетки**

В 1998 году вышло исследование объясняющее роль оксида азота [NO] в качестве сигнальной молекулы в сердечно-сосудистой системе [54]. На данный момент накоплен большой объем экспериментальной и клинической информации по метаболизму NO. Установлены тканеспецифические ферменты, изоферменты и субстраты, участвующие в его биосинтезе, а также элементы физиологического и патофизиологического механизма действия NO. Однако, несмотря на большое число исследований, истинное назначение оксида азота в системной регуляции гомеостаза клеток и тканей до сих пор вызывает вопросы.

#### ***Роль оксида азота в физиологии***

В физиологических условиях биосинтез NO осуществляется преимущественно конститутивной NO-синтазой. Неспаренный электрон на внешней орбитали придает молекуле оксида азота, свойства свободного радикала: высокую химическую реактивность и короткий полупериод жизни. За время своего существования происходит взаимодействие оксид азота со своими мишенями: тиолами и переходными металлами, окисляется цитохром-С-оксидазой до неактивных форм нитрата и нитрита или образует активные формы азота (нитроксил, нитрозоний, пероксинитрит). Известно, что в условиях гипоксии активируются процессы свободнорадикального

окисления, которые способствуют возникновению дефицита эндогенной формы NO за счет деградации активными формами кислорода [7].

Оксид азота может вызывать как активацию, так и ингибирование различных метаболических процессов в человеческом организме. С его помощью регулируется множество сигнальных путей, которые обеспечивают компенсаторно-приспособительную реакцию клеток на различные экстремальные воздействия, а также запрограммированную гибель клеток [5, 12]. Роль NO в физиологии определяется его участием в регуляции тонуса сосудов, сократимости скелетных мышц и миокарда, тонуса бронхов и моторику желудочно-кишечного тракта. Оксид азота в качестве сигнальной молекулы модулирует процессы ангиогенеза и регенерации, ингибирует адгезию форменных элементов крови к эндотелию, участвует в процессах высшей нервной деятельности, регулирует активность митохондрий и является эффектором иммунных реакций [44, 90, 91].

NO играет существенную роль в функционировании нейронов головного мозга и в потенцировании долговременной памяти. Оксид азота выполняет регуляторную роль в обмене важных нейротрансмиттеров центральной и периферической нервной системе, регулируя секрецию возбуждающих аминокислот (глутамата и аспартата) и важнейших нейромедиаторов (гамма-аминомасляной кислоты, дофамина, норадреналина, серотонина, ацетилхолина). [3, 50, 88].

Ввиду высокой аффинности NO к железосодержащей цитохромоксидазе - ключевому акцептору в электронтранспортной цепи митохондрий, оксид азота может влиять на процесс митохондриального дыхания [19, 47]. К сожалению, физиологические последствия и особенности взаимодействия цитохромов митохондриальной цепи электронного транспорта с оксидом азота еще до конца не изучены.

Синтезированный в специализированных клетках эндогенный оксид азота способен влиять на метаболические процессы соседних клеток. Преимущественно NO действует на внутриклеточные структуры, в том числе



и на митохондрии, и вызывает развитие адаптивных реакций и каскадов, запускающие патологические изменения в клетке.

Оксид азота, синтезированный eNOS эндотелиоцитов, положительно влияет на течение сердечно-сосудистых заболеваний. Молекулярные механизмы этих благоприятных эффектов объясняются стимуляцией NO цитозольного фермента гуанилатциклазы, которая диффундирует в гладкомышечные клетки легких, стимулирует выработку цГМФ, активирует связанные протеинкиназы, что активирует фосфорилирование калиевых и кальциевых каналов сарколеммы и опосредует расслабление гладкой мускулатуры, расширение сосудов и антиагрегантное действие оксида азота [102]. Также имеются данные о способности NO ингибировать пролиферацию гладкомышечных клеток и замедлять ремоделирование сосудов. Эффекты NO инактивируются в реакциях с оксигемоглобином, в результате которой образуется метгемоглобин и нитрат, либо в реакции с дезоксигемоглобином, продуктами которой является нитрозил-Нв железо. В то же время дезоксигемоглобином обладает нитритредуктазной активностью, которая наиболее активна при гипоксии, что приводит к образованию NO из нитратных ( $\text{NO}^{3-}$ ) и нитритных ( $\text{NO}^{2-}$ ) анионов и проявляется сосудорасширяющим эффектом [20].

Оксид азота является важным регулятором ангиогенеза. Он предотвращает развитие воспалительной реакции в поврежденных стенках облитерирующих артерий нижних конечностей. Этот эффект объясняется снижением адгезии лейкоцитов к эндотелию и активации системы обратной отрицательной связи в ответ на действие провоспалительных медиаторов, стимулирующих экспрессию iNOS макрофагами и синтез NO [71].

Роль оксида азота в дыхательной системе проявляется в его связывании с гемовым железом фермента гуанилатциклазы, что обуславливает снижение уровня внутриклеточного кальция и обуславливает регуляцию проницаемости капилляров, скорости кровотока, а также релаксацию

гладкомышечных клеток сосудов, бронхов и трахеи [25]. За рубежом оксид азота применяется преимущественно ингаляторно для лечения синдрома легочной гипертензии и острого респираторного дистресс синдрома (РДС) у детей и взрослых. Ингаляционное применение оксида азота является достаточно эффективным в отношении взрослых пациентов с синдромом легочной гипертензии однако до сих пор продолжаются дискуссии об относительной безопасности данного метода терапии [79].

Оксид азота синтезируется всеми видами NO-синтаз в нефроне: eNOS в эндотелии сосудов, эпителии восходящей части петли Генле и собирательных трубочек проток; nNOS в плотном пятне, афферентных артериолах, капсуле Боумена, некоторых клетках корковой части петли Генле и собирательных трубочек. Экспрессия iNOS наблюдается в медуллярном отделе собирательных трубочек в норме и при воспалении. При ингибировании NOS синтаз наблюдается снижение общего почечного кровотока, давления интерстициальной жидкости, уменьшение объема мочи и экскреции натрия без значительного изменения скорости клубочковой фильтрации, фракционной экскреции натрия и воды, артериального давления или осмоляльности мочи. NO, синтезируемый в плотном пятне при участии nNOS, является важным модулятором TGF-опосредованных эффектов. Было показано, что ингибирование nNOS приводит к повышению чувствительности к TGF, сужению сосудов почек, задержке натрия и артериальной гипертензии. NO ингибирует стимулированную вазопрессином осмотическую проницаемость воды в кортикальном отделе собирательных трубочек, посредством активации цГМФ и ингибирования цАМФ и снижает транспорт мочевины во внутреннем медуллярном отделе [29].

NO играет важную роль как в центральной, так и в периферической нервной системе. Он участвует в антероградной и ретроградной передаче нервных импульсов, что, как полагается, служит важным механизмом обратной связи, лежащим в основе долговременной потенциации и обработке

сигналов страха. NO-опосредованный путь сGMP / протеинкиназа G может модифицировать другие важные сигнальные пути, например, MAP-киназы, приводя к усилению ERK-опосредованной транскрипции. Также известно, что при продолжительном нарушении синтеза NO через ингибирование эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) или нейрональной NOS (nNOS), например при табакокурении, происходит нарушение мозгового кровотока и метаболизма глюкозы в головном мозге, повышается продукция кислородных радикалов. В результате происходит не только снижение трофики, но и подавление функции нервных волокон. Нарушение церебрального кровоснабжения потенцирует синтез амилоида  $\beta$ , при накоплении которого развивается клиническая картина болезни Альцгеймера [101].

В умеренных количествах NO оказывает иммуномодулирующее действие, ингибируя секрецию IL-12 и IL-17 [16]. Также имеются данные, что индукция iNOS или пероральный прием нитритов уменьшает повреждение слизистой оболочки и улучшает регенерацию тканей при колите [16].

Стоит также упомянуть об исследованиях, показавших, что оксид азота может препятствовать репарации ДНК опухолевых клеток после радио- и химиотерапии, тем самым повышая эффективность противоопухолевого лечения. В них рассматриваются несколько способов NO-терапии онкологических процессов [35, 75]. Традиционная лучевая терапия индуцирует синтез NO NOS2, который активирует IL10, что приводит к образованию иммуносупрессивного микроокружения опухоли и дифференцировку моноцитов в опухолево-ассоциированные макрофаги (TAM) [103]. Некоторые виды иммунотерапии, например, с использованием IL12 и IL2 или IL2 и антител к CD40, также способны индуцировать дифференцировку TAM через NO-зависимые механизмы. В то же время известна ангиогенная роль NO, реализуемая благодаря стимуляции синтеза

VEGF, что способствует росту опухоли и метастазированию. Также известно, что некоторые виды иммунной терапии успешны ввиду ингибирования NO-зависимых механизмов распространения метастазов, например, терапия IL2 / анти-CD40 активирует IFN $\gamma$ , который модулирует активность TIMP1 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloprotease-1), уменьшая количество MMP (Matrix Metalloprotease) и опосредованной оксидом азота миграции опухолевых клеток. Основным компонентом иммунного ответа на проводимую противоопухолевую терапию является эффективное привлечение полиморфноядерных лейкоцитов. В начале 1990-х годов было обнаружено, что рекрутирование лейкоцитов через взаимодействие с эндотелиальными клетками (аберрантной сосудистой сети) отсутствует при раковых состояниях, что также может быть причиной иммунного ускользания. Позже было показано, что активация эндотелия напрямую регулируется местным внутриклеточным уровнем NO [61].

### ***Роль оксида азота в патологии***

Зная физиологические функции NO в организме, становится ясно, что в случае развития заболеваний радикал NO будет вовлечен в формирование множества патологических реакций. На данный момент выделяют группы заболеваний, развитие которых обеспечивается выраженными изменениями в обмене NO. Изменения активности NO-синтаз и генерации NO отмечаются прежде всего при аутоиммунных заболеваниях и диабете, остром и хроническом воспалении различных органов и тканей, онкологических заболеваниях, болезнях почек, легких и др. Выделяют особую роль оксида азота в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и болезнях сердечно-сосудистой системы, в том числе гипертония, инфаркт миокарда, легочная гипертензия, атеросклероз, инсульты [21, 42, 72].

Ввиду многофункциональности оксида азота биологический ответ клетки на его молекулу нельзя сводить только к «положительному» или только «отрицательному». Повышение активности NO-синтазы может

выполнять как положительную роль, так и оказывать повреждающее действие в клетке. Это связано с условиями генерации NO (при каких параметрах и в каком количестве продуцируется), а также разнонаправленным действием механизмов с участием NO, в результате чего клеточный ответ на один стимул может быть принципиально разным [15].

При больших концентрациях NO, образующихся iNOS, оксид азота может вызывать токсический эффект, связанный как с прямым воздействием на железосодержащие ферменты клетки, так и при взаимодействии с супероксидным радикалом ( $O_2^-$ ) с образованием очень реакционноспособного и токсичного соединения пероксинитрита ( $ONOO^-$ ). Токсический эффект NO и  $NOO^-$  ингибирует митохондриальные ферменты, что приводит к потере функциональных митохондрий, а значит к снижению продукции АТФ [13, 72]. Возможно, этот токсический эффект обуславливает нарушения процессов окислительного фосфорилирования и энергетического обмена в мозговой ткани в динамике черепно-мозговой травмы [15].

Оксид азота является одним из ключевых факторов в патофизиологии окислительного стресса. При таких патологических состояниях как гипоксия, стресс, ишемия и др. сопутствующая гиперпродукция ROS и их взаимодействие с NO обеспечивает образованием свободного радикала пероксинитрита [12, 13]. Он подавляет активность ферментов, участвующих в репликации ДНК, а также индуцирует процесс повреждение ДНК и способствует возникновению мутаций в генетическом материале, что является одной из причин развития апоптоза [27]. Было показано, что большое содержание в клетке NO и  $NOO^-$  стимулирует синтез белка p53, который в свою очередь индуцирует экспрессию апоптогенных белков Bax, Fas, p53AIP (Apoptosis Inducing Protein) [2].

Стоит отметить, что действие ряда факторов (липопротеины низкой плотности, высокая концентрация глюкозы, ишемия) может вызывать снижение продукции NO как за счет ингибирования NO-синтаз, так и за счет

снижения их экспрессии. При этом низкий уровень оксида азота приводит к повышению тонуса сосудов, свертываемости крови и снижению иммунитета, тем самым, способствуя развитию гипертензии, атеросклероза, тромбозов, ишемической болезни сердца, инфекционных заболеваний и опухолевого роста [2, 15].

### ***Перспективы фармакологической регуляции NO***

Изучение роли оксида азота делает возможным модулирующее воздействие на процесс генерации NO для усиления защитного и физиологического действия NO и ограничения его токсических эффектов. Причем следует принимать во внимание, что эффекты оксида азота зависят от концентрации и места его продукции, а также от способности к диффузии в клетках и тканях, и взаимодействия с ROS и другими факторами. Показано, что разные концентрации NO активирует различные сигнальные пути [8, 106] и вызывают различные эффекты .

В наши дни открываются перспективные возможности фармакологической регуляции содержания оксида азота в организме. Биологические свойства NO и его участие в различных физиологических и патофизиологических процессах подтверждены множеством данных научных исследований, основываясь на которых можно говорить о целесообразности и эффективности разработки способов фармакологической регуляции уровня оксида азота в профилактических и терапевтических целях. На данный момент известны следующие способы изменения концентрации NO в клетках и тканях: активация/индукция или ингибирование изоформ NO-синтазы, регуляция уровня субстрата (L-аргинина), применение доноров NO или инактивация NO.

В клинической практике наиболее перспективными представляются способы регуляции NO с помощью специфических ингибиторов конкретных изоформ NO-синтазы. Ингибиторы NOS имеют практическое значение в лечении патологических состояний опосредованных избыточной продукцией

NO (воспалительные и дегенеративные заболевания, сепсис) и могут проявлять широкий спектр фармакологических свойств, в том числе оказывать нейро- и кардио-протекторное воздействие [21, 72]. Под влиянием оксида азота происходит регулировка тонуса сосудистого русла. Происходит резкая вазодилатация, последующее увеличение проницаемости сосудов, формирование отека и развитие воспалительной реакции [9].

Изоформы NO-синтазы, продуцирующие NO в тканях организма, существенно отличаются участием в физиологических и различных патологических процессах [72, 93]. Синтезируемые специфические ингибиторы NOS, например N<sup>5</sup>-(1-имно-3-бутенил)-L-орнитин, не обладают исключительной избирательностью действия. Таким образом резкое изменение генерации оксида азота может привести к нарушению функциональной активности многих биосистем, поскольку NO является полиорганным медиатором метаболизма.

В лечебной практике возможно применение доноров NO, которые могут увеличивать концентрацию оксида азота и избирательно воздействовать на клетки и ткани. Такой подход особенно актуален при ишемии и гипоксии. В настоящее время показана возможность для некоторых доноров NO (S-нитрозо-N-ацетил-D,L-пеницилламин, S-нитрозоглутатион) индуцировать накопление и активность фактора адаптации к гипоксии (HIF-1), что делает эти соединения перспективными в лечении ишемических заболеваний. Также выявлено, что доноры NO повышают активность HIF-1, через активацию фосфатидилинозитол-3-киназного сигнального пути (PI3K/AKT/mTOR(mammalian Target of Rapamycin)), который контролирует ключевые функции клетки (метаболизм, апоптоз, рост и пролиферация). NO может связываться с железом HIF-гидроксилаз, блокировать связывание с ними кислорода и тем самым подавлять реакцию гидроксирования фактора адаптации к гипоксии [68, 106].

С участием NO регулируется большое количество сигнальных путей, обеспечивающих как компенсаторно-приспособительную реакцию клеток организма на экстремальные воздействия и запрограммированную гибель клеток. Оксид азота синтезируется несколькими изоформами NO-синтазы, имеющими тканевую специфичность. Эффекты NO зависят от места синтеза, концентрации и отличаются разнообразием проявлений, что не всегда позволяет предположить результат такого воздействия. Это, в свою очередь, затрудняет возможность фармакологической регуляции метаболизма NO и повышает требования к разработке и применению лекарственных веществ подобного действия.

Наличие NOS в нескольких тканеспецифических изоформах позволяет использовать каждую из них в качестве специфической мишени для фармакологического воздействия. Лекарственные препараты могут по-разному влиять на активность NOS и стимулировать либо ингибировать продукцию NO. Для клинической медицины сегодня актуальна разработка селективных ингибиторов индуцибельной формы NO-синтазы, так как ее активация значительно повышает уровень NO и имеет существенное значение в патогенезе сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, воспалительных и других заболеваний, в регенеративных процессах, а также в патогенезе многих экстремальных состояний. Поиск лекарственных средств, селективно влияющих на активность NOS и генерацию оксида азота, открывает новые возможности эффективной фармакотерапии широкого круга заболеваний путем направленного регулирования синтеза эндогенного NO.

Разработка фармакологических соединений, для воздействия на патофизиологические и физиологические процессы в которых оксид азота выступает ключевым звеном, приведет к прогрессу создания эффективных терапий и многих распространенных заболеваний.



### 2.3. Воздействие NO на процессы воспаления и ранозаживления

Как уже ранее упоминалось, оксид азота играет роль на всех этапах раневого заживления, его концентрация прогрессивно растет, начиная с первых часов после повреждения тканей и достигает пика на 2 сутки. Основными эффектами являются, вазодилатация, бактерицидное действие, способность к активации нейтрофилов и макрофагов, индукция пролиферации фибробластов, потенцирование синтеза коллагена, регуляторное действие на апоптоз при ремоделировании грануляционно-фиброзной ткани, активация пролиферации кератиноцитов и ускорение эпителизации раневого дефекта, способность к инактивации свободных радикалов. Важно, что нейтрофилы на ранних стадиях раневого заживления начинают экспрессировать VEGF – важнейший регуляторный фактор ангиогенеза, который избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и моноцитов, а также увеличивает проницаемость сосудов, что облегчает миграцию клеток эндотелия, индуцирует и стабилизирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и синтез NO [1]. В результате происходит вазодилатация и активация экспрессии протеаз, разрушающих связи между эндотелием и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток. Хотя нейтрофилы необходимы для заживления ран, их постоянное присутствие ассоциировано с длительно незаживающими ранами, трудно поддающимися терапии [55].

Также NO регулирует различные внутриклеточные сигнальные молекулы, включая MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), JAK-киназу, NF-κB и белок-активатор-1 (AP-1) через S-нитрозилирование и денитрозилирование остатков цистеина. Более того, известны как минимум четыре разных сайта, где NO может напрямую модулировать активацию NF-κB в клетках [52]. Предполагается, что именно посредством модификации структур ДНК NF-κB небольшими концентрациями оксида азота, происходит стимуляция выработки макрофагами и моноцитами хемокинов для

полиморфноядерных лейкоцитов MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) и MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), тогда как при высоких концентрациях NO ингибирует NF- $\kappa$ B и тем самым уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов [20].

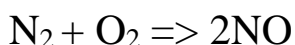
Исследования воздействия различных концентраций NO, синтезируемого NOS при ранозаживлении показали, что при уровне NO выше 100 нМ происходит стабилизация индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF-1 $\alpha$ . Он в свою очередь может стимулировать высвобождение фактора VEGF и новообразование капилляров [87]. На ранних стадиях заживления NO способствует ускоренному очищению раны, а в стадию пролиферации, усиливает ангиогенез и ускоряет созревание грануляционной ткани [29, 78, 84]. При больших концентрации NO инициируются реакции с супероксид-радикалом O<sup>2-</sup>, запуская механизмы оксидативного и нитрозивного стресса. По какому пути пойдет реакция в каждом случае определяется условиями окружающей среды и зависит от образовавшихся промежуточных соединений RNOS.

Главными последствиями оксидативного/нитрозивного стресса являются повреждения оснований нуклеиновых кислот, липидов и белков, что может значительно влиять на жизнеспособность клетки и вызывать большое количество внутриклеточных реакций, которые в конечном итоге могут привести к клеточной гибели путем некроза или апоптоза [40].

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Плазмогенератор

Терапевтический газовый поток NO частиц генерировался плазмогенератором «Плазон»(Рис.1), разработанный в Московском Государственном Техническом Университете имени Н.Э. Баумана. При дуговом электрическом разряде на манипуляторе создается высокотемпературная плазма до 4000°C, которая инициирует химическую реакцию синтеза частиц NO из атмосферного азота и кислорода:



Любой манипулятор может быть установлен в специальное гнездо лабиринтного охладителя, расположенное в верхней части аппарата. В результате охлаждения во встроенном охладителе температура потока, генерируемого манипулятором, снижается до комнатной.

Молекула оксида азота обладает активным окислительным потенциалом и в

воздушной среде вступает в реакцию с молекулярным кислородом с образованием химически устойчивого соединения - двуокси азота (NO<sub>2</sub>), которое присутствует в NO-содержащем газовом потоке. Содержание NO в



Рис.1. Плазмогенератор «Плазон».

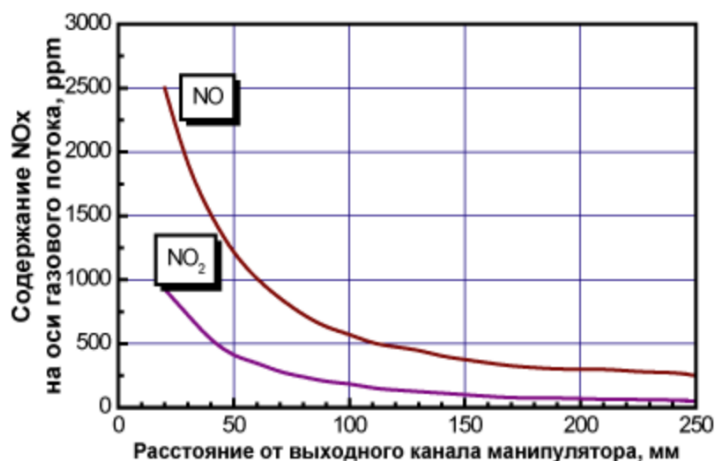


Рис.2. Зависимость концентрации NO от расстояния

газовом потоке в зависимости от расстояния до раны и закономерно уменьшается (Рис.2).

### 3.2. Получение и характеристика раствора и аэрозоля ДНКЖ с глутатионовым лигандом

ДНКЖ с глутатионовым лигандом получали в ходе реакции аэрозольной  $\text{Fe}^{2+}$  с глутатионом (GSH) и газообразным NO при давлении 150 мм рт. ст. и в молярном соотношении  $\text{Fe}^{2+} : \text{GSH} 1: 3$  в аппарате Тунберга [97]. Газообразный оксид азота был получен в результате реакции ферросульфата с нитритом натрия в 0,1 М HCl с последующей очисткой путем низкотемпературной сублимации в вакуумированной стеклянной системе. После растворения сульфата двухвалентного железа (0,5 мл) в дистиллированной воде и добавления раствора GSH (4,5 мл) в 15 мМ HEPES с pH 7,4 в верхнюю и нижнюю камеры аппарата Тунберга, из трубки откачивали воздух и добавляли газообразный NO. Растворы смешивали в присутствии NO и встряхивали в течение 5 мин, после чего NO удаляли из аппарата.

Концентрацию ДНКЖ определялась по количеству железа (5 мМ), использованного в синтезе комплексов. Также концентрацию полученного ДНКЖ определяли оптическим методом по интенсивности характеристических полос поглощения при 310 и 350 нм с коэффициентами экстинкции, равными 4600 и 3700  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (в расчете одного атома железа на динитрозильный фрагмент ДНКЖ) [97]. Оптические измерения проводили при комнатной температуре на спектрофотометре UV-2501PC (Shimadzu Europa GmbH, Германия) в кварцевой кювете с оптическим путем 10 мм.

Приготовление растворов проводились путем растворения лиофилизированного порошка ДНКЖ с глутатионом в стерильном PBS при комнатной температуре. Концентрация раствора составляла 0,00005 г/л. Таким образом при однократном распылении ДНКЖ на рану животных площадью 3  $\text{cm}^2$ , доза с действующим веществом в раневой ткани составляла 50 мкг соответственно. Таким образом, при орошении раны с расстояния 1 см от поверхности раны на 1  $\text{cm}^2$  раневой поверхности приходилось 16,6 мкг

активного вещества. Оценка деградации раствора с массовой долей ДНКЖ 100 мкг в *in vitro* условиях проводилась с помощью Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, USA) на длине волны 310 нм при 37°C.

### **3.3. Исследования на животных**

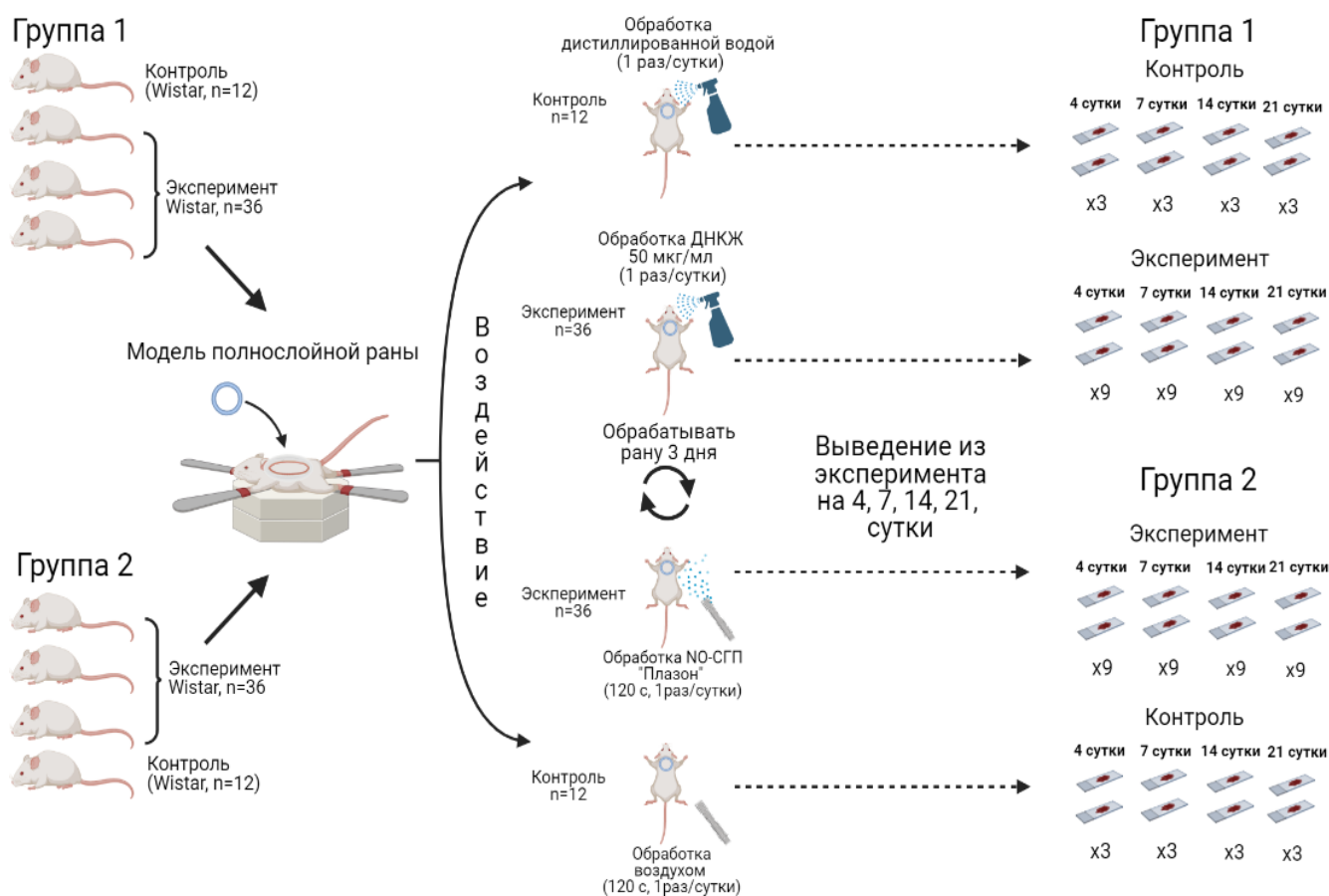
В исследовании были использованы самцы крыс линии Wistar (n=96), которые были выведены в филиале «Андреевка» ФГБУН "НЦБМТ" ФМБА России. Животные содержались в стандартных условиях Центрального вивария «ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)» в соответствии с ГОСТ №33215-2014 от 09 ноября 2015 г, «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными, правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ 33216- 2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

В качестве подстилки использовали мелкую стружку из экологически чистой древесины лиственных пород (ТУ 5313-001-1897639-92). Крысы имели свободный доступ к воде и корму. В состав корма в дополнение к стандартному гранулированному корму для грызунов (комбикорм полнорационный экструдированный для лабораторных животных – мышей, крыс, хомяков; стандарт РООС ПР98 В01220, удостоверение о качестве от 10.07.08), входили сырая морковь, капуста, отварное мясо. Световой день составлял 12 часов (с 7:00 до 19:00). Освещенность в светлый период цикла составляла 70-90 лкс. Температура в помещении постоянного содержания была 22°C.

Манипуляции с подопытными крысами проводились с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными, руководствуясь принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (Страсбург, 1986) и директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза (Страсбург, 2010). На проведение эксперимента было получено разрешение этического комитета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (протокол № 15-19 от 25.11.2019)

### 3.4. Обработка ран

В качестве экспериментальной модели использована модель полнослойной плоскостной раны крыс самцов линии Wistar (n=96) (Л.И.Слущкий, 1969, А.В.Шехтер et al., 2005). Перед экспериментальным вмешательством использовался комбинированный наркоз: золетил (Virbac 990мг) + ксилавет (Xylavet professional) активного ингредиента в дозе 6 мг на 1 кг массы тела животного.



**Рис.3: Схема эксперимента.** Экспериментальная работа включала в себя 2 направления: определение эффективности применения NO-содержащих газовых потоков и ДНКЖ с глутатионовым лигандом на раневое заживление. Ранее были проведены пилотные эксперименты для определения оптимальной дозы или режима обработки ран для стимуляции регенерации с контрольной точкой 4 суток. В каждом эксперименте было по 3 экспериментальные группы (n=36) и по 1 контрольной группе (n=12). В основных сериях экспериментов было 4 экспериментальные и 4 контрольные группы по одной на каждую временную точку: 4-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки после моделирования раны.



### 3.5. Процедура нанесения полнослойной кожной раны

Крыса фиксировалась на операционном столике для удаления волос в межлопаточной области спины (рис.1). Далее иссекали концентрический (диаметром  $\approx 10 - 15$  мм) лоскут кожи с подкожной клетчаткой вплоть до собственной фасции (рис.2-3). В образовавшийся разрез вводили муфтообразное тефлоновое кольцо (рис.4), имеющее по нижнему срезу развальцованный бортик шириной до 3 мм, так, чтобы последний заходил под кожу, а цилиндрическая часть кольца, высотой 10 мм, выступала над кожей (рис.5). Таким образом, у всех животных рана была стандартного размера площадью  $300 \text{ мм}^2$ . По верхнему срезу цилиндрической части кольца фиксировали предварительно перфорированную, целлофановую пленку (рис.6). Последнее необходимо для предотвращения высыхания и внешнего загрязнения раны.



Рис. 1. Депилированный участок спины крысы

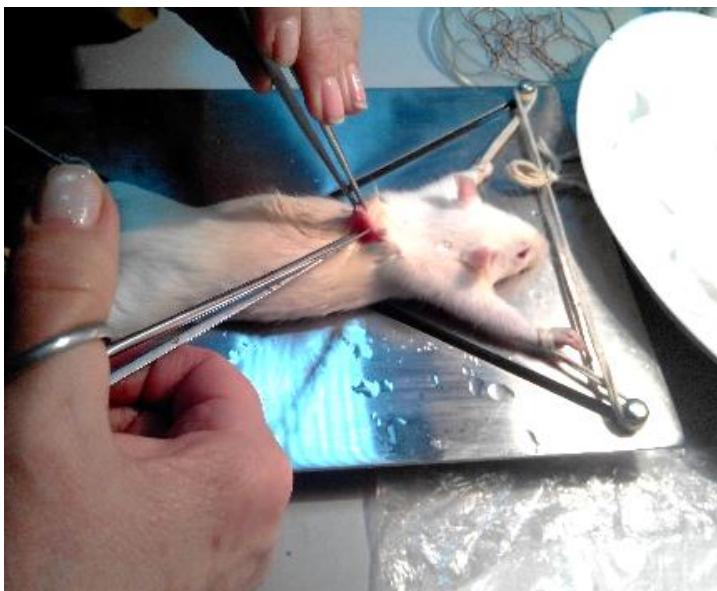


Рис.2. Иссечение межлопаточного участка спины крысы



Рис.3. Рана после иссечения



Рис.4. Тефлоновые кольца

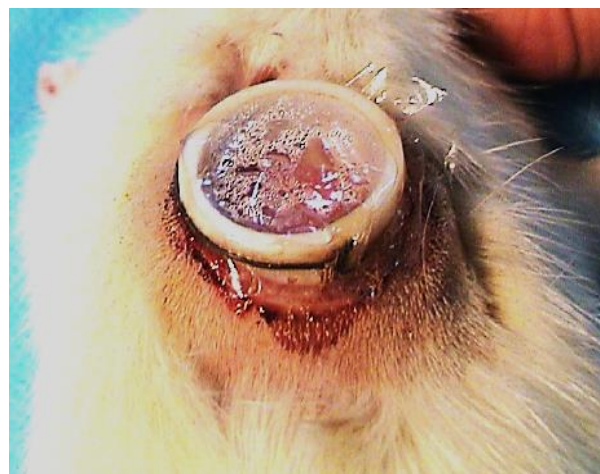


Рис.5. Тефлоновые кольца с перфорированной пленкой на кольце



Рис.6. Общий вид раны с кольцом



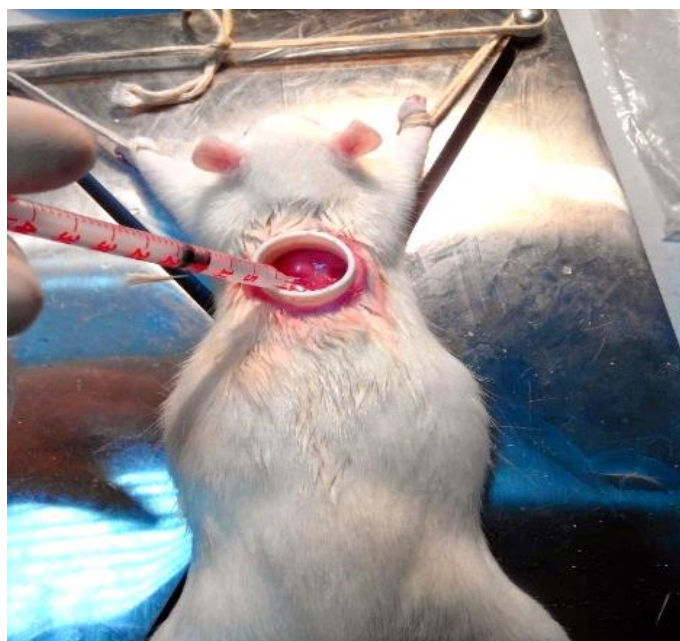


Рис.7 .Введение лекарственного средства ДНКЖ



Рис.8. Обработка NO-CGP аппарата Плазон

На 4-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки после нанесения раны, в течение которых проводили различные лечебные воздействия на рану (рис.7-8), животных выводили из эксперимента (внутрибрюшным введением 2,0 мл 25% раствора сернокислой магнезии). Кольца из ран удаляли и полностью иссекали ткань, заполняющую рану на всю глубину до собственной фасции, без кожи (рис.9-10). Изъятый материал помещали в 10% растворе нейтрального формалина.

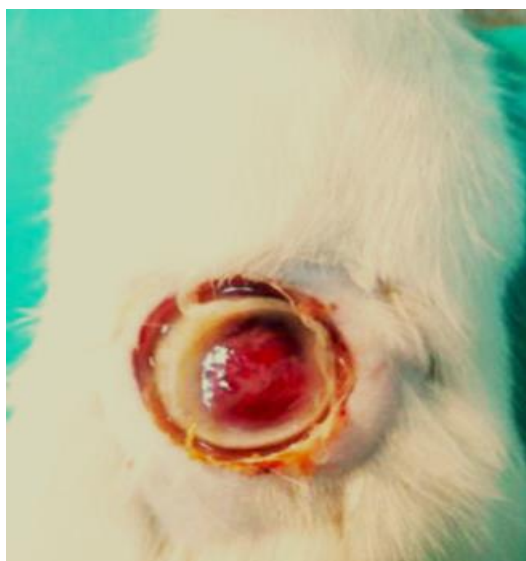


Рис.9. Рана после удаления тефлонового кольца



Рис.10. Иссечение тканей раны

### **3.6. Измерение площади полнослойной ран**

После каждой процедуры раны снова закрывали перфорированной полиэтиленовой пленкой. На 4-й день после нанесения раны животным удаляли тefлоновое кольцо и оставляли раны для самопроизвольного заживления. На 7-е, 14-е, 21-е сутки от начала эксперимента раны, предварительно седатированных раствором ZOLETIL 100 (VIRBAC, Франция) животных, обводили по контуру перманентным маркером на полиэтиленовой плотной пленке. Далее к образцам прикладывали стандартную линейку и переводили их в цифровой вид. Измерение площади ран проводилось в микрометрах с использованием программы Leica Application Suite, version 4.9.0 (Build 129) (Switzerland), полученные значения пересчитывались в см<sup>2</sup>, используя линейный масштабный отрезок.

### **3.7. Гистологический анализ**

Животных выводили из эксперимента в сроки, обозначенные в планах соответствующих экспериментов (4-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки). Раневые ткани забирали для последующего гистологического исследования. Биологический материал фиксировали в нейтральном 10 процентном формалине и заливали парафином. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия), пикросириусом красным («БиоВитрум», Россия), толуидиновым синим («БиоВитрум», Россия), Маллори («БиоВитрум», Россия). Полученные микроскопические препараты исследовали с использованием универсального микроскопа LEICA DM4000 B LED (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой видеокамерой LEICA DFC7000 T (Leica Microsystems, Германия). Была проведена стандартная световая и фазово-контрастная микроскопия. Срезы, окрашенные пикросириусом красным, исследовали в режиме поляризационной микроскопии.

### **3.8. Цитологическое исследование.**

На 3-и и 4-е сутки после операции раневой экссудат забирали шприцом и наносили на предварительно обезжиренное предметное стекло и равномерно распределяли его по поверхности при помощи другого предметного стекла со шлифованным краем. После этого стекла помещали в ламинарный шкаф для просушки. Мазки окрашивали по Романовскому-Гимзе («БиоВитрум», Россия). Подсчет количества нейтрофилов и макрофагов в мазках производили с использованием микроскопа LEICA DM4000 В LED (Leica Microsystems, Германия) в 10 полях зрения при увеличении 400х.

### **3.9. Изучение процесса ранозаживления иммуногистохимическим методом**

Имуногистохимическое окрашивание (ИГХ) клеток толщи дна раны на 7, 14, 21 сутки набором антител (табл.1) проводили по следующей методике:

- 1) Образцы тканей для ИГХ исследований фиксировали в 10%-ном забуференном формалине (рН - 7,2), после чего обезвоживали по стандартной методике, и заливали в парафин.
- 2) Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм наносили на стекла с адгезивным (полилизинным) покрытием.
- 3) Срезы проводили по батарее ксилолов и спиртов с убывающей концентрацией.
- 4) Троекратно помещали в PBS-буфер на 5 минут.
- 5) Переносили срезы в 5% раствор Trilogy 20x (Cell Marque) и помещали в водяную баню на 30 минут при температуре 80°C.
- 6) Отмывали стекла в PBS-буфере в течение 5 минут

- 7) Для ингибирования активности эндогенной пероксидазы срезы обрабатывали 3% раствором перекиси водорода в течении 30 минут.
- 8) Далее на срезы двукратно наносили по 150 мкл PBST на 5 минут.
- 9) Для уменьшения неспецифической сорбции первичных антител на стекла наносили 150 мкл раствора UltraVision Protein Block (PBQ160415, ThermoFisher Scientific) на 15 минут
- 10) Добавляли первичные антитела в соответствующем разведении(табл.1) и инкубировали срезы 12 часов при температуре 4°C во влажной камере.
- 11) На следующий день стекла троекратно промывали 150 мкл раствора PBST и добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (31464, ThermoFisher Scientific) на 30 минут.
- 12) Троекратно промывали срезы по 150 мкл раствора PBST и визуализировали продукт реакции, нанося на них диаминобензидин (34002, ThermoFisher Scientific) разведенный в пероксидажном буфере (34062, ThermoFisher Scientific) на 15 секунд.
- 13) Отмывали дистиллированной водой 5 минут.
- 14) Докрашивали препараты гематоксилином (BioVitrum, Россия) в течение одной минуты, промывали в дистиллированной воде 5 минут.
- 15) Срезы обезвоживали по стандартной методике и заключали в полистирол.

**Таблица 3.** Антитела для ИГХ

Название	Разведение	Производитель, артикул
Vimentin	1:200	Abcam, ab 92547
$\alpha$ -SMA	1:400	Abcam, ab 5694
iNOS	1:200	VG 3035554

В качестве негативного контроля использовали те же срезы, на которые вместо первичных антител наносили раствор UltraVision Protein Block.

Полученные микроскопические препараты исследовали с использованием универсального микроскопа LEICA DM4000 B LED (Leica Microsystems, Германия), оснащенного цифровой видеокамерой LEICA DFC7000 T (Leica Microsystems, Германия). Для оценки количества миофибробластов в ранах, производили их подсчет на 10 полей зрения с использованием объектива x40 и окуляра x10 на участке новообразующей соединительной ткани между краями раны. Миофибробласты идентифицировали как фибробластоподобные клетки (вытянутой формы со слабоконденсированным хроматином, зачастую с двумя ядрышками.) и экспрессирующие  $\alpha$ -гладкомышечный актин.

### **3.10. Статистический анализ**

Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием стандартного пакета программы GraphPad Software Prism, версия 8.00 для Windows. Для определения распределения полученных данных использовался непараметрический Mann – Whitney U тест.

Результаты статистической обработки нормально распределенных данных были представлены в виде ящиков с усами. Уровень статистической значимости был установлен при  $p < 0,05$ .

## **4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **4.1. Изучение воздействия NO-содержащего газового потока на процесс ранозаживления у крыс**

#### **4.1.1 Макроскопическое описание**

В этой части эксперимента проводили макроскопическую оценку процесса заживления ран с помощью макрофотосъемки. Изучение полученных фотоснимков показало, что на 4-е сутки после операции у половины животных, которые не получали терапию NO-СГП, дно раны было покрыто плотным слоем экссудата серо-зеленого цвета. У большинства крыс экспериментальной группы характеризовалось умеренным гиперемированием, периферическим расположением фибринового слоя. На 7-е сутки в обеих группах наблюдали плотно связанным с подлежащими тканями струп красноватого цвета. На 14-е сутки в одном из случаев наблюдения в группе, где применялся NO-СГП, размер раны был меньше 0,4 см<sup>2</sup>. К 21-м суткам в экспериментальной группе раны были полностью покрыты эпителием, в группе, в которой раны обдували потоком теплого воздуха, такой результат был достигнут только в 2 случаях.



#### 4.1.2. Площадь ран

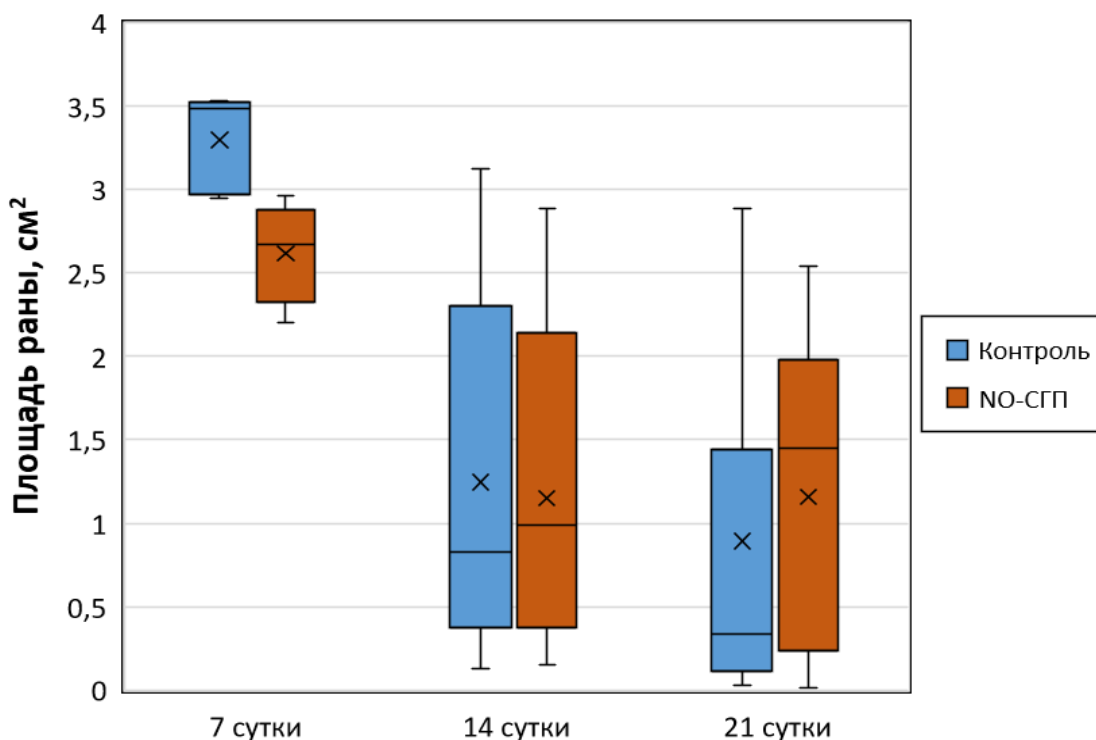


Рис.11. Изменение площади раневой поверхности.

На 7-е и на 14-е сутки площадь ран в экспериментальной группе была меньше, чем в контрольной. В группе контроля такие результаты наблюдались только к 14 суткам. К 21-м суткам раны полностью затянулись у большинства животных экспериментальной группы, в то время как в группе контроля эпителизация отсутствовала у трети животных, но статистически значимые различия между группами на этом сроке не выявлено (рис.11).

#### 4.1.3. Гистологическое исследование процесса заживления ран

Микроскопические исследования гистологических срезов позволило провести сравнительный анализ клеточных реакций, характеризующих процесс заживления ран у опытных и контрольных групп животных.

На 4-е сутки (рис. 12) фибринозно-лейкоцитарный слой был выражен у всех животных исследуемых групп. Он состоял из сети фибрина и большого

числа нейтрофильных лейкоцитов. В половине случаев контрольные группы имели признаки бактериальной контаминации. Под фибринозно-лейкоцитарным слоем в контрольной группе определялись островки незрелой грануляционной ткани, которая характеризовалась пролиферацией фибробластов, увеличенным количеством новообразованных сосудистых элементов и выраженной лимфо-макрофагальной инфильтрацией. При помощи фазово-контрастной микроскопии этих участков отмечалось преобладание волокон фибрина. При поляризационной микроскопии определялась анизотропия ярко-красного цвета коллагеновых волокон. В экспериментальной группе на этом сроке слой грануляционной ткани был довольно тонкий. Он состоял из неупорядоченно расположенных пролиферирующих фибробластов и капилляров, а также характеризовался прорастанием в подлежащую подкожно-жировую клетчатку. При фазово-контрастной микроскопии выявлялись тонкие коллагеновые и фибриновые волокна. При поляризационной микроскопии помимо волокон красного цвета выявлялись зелено-желтые волокна, что демонстрирует присутствие новообразованного коллагена в этих районах раны.

На 7 сутки раны всех животных покрыты плотным и толстым слоем фибрина. У большинства животных слой грануляционной ткани был представлен активно пролиферирующими фибробластами и множеством капилляров. У остальных животных грануляционная ткань была более зрелой: Фибробласты приобретали веретенообразную форму, коллагеновые волокна располагались параллельно. В экспериментальной группе к этому сроку фибринозно-лейкоцитарный слой, так же как и в контроле, был достаточно толстым. У половины животных в центральной части слоя грануляционной ткани капилляры имели вертикальную ориентацию, однако фибробласты и новообразованные коллагеновые волокна располагались хаотично. В периферических участках и у другой половины животных капилляры, пучки коллагеновых волокон и веретеновидные фибробласты

принимали продольную ориентацию, что хорошо выявлялось при фазово-контрастной микроскопии.

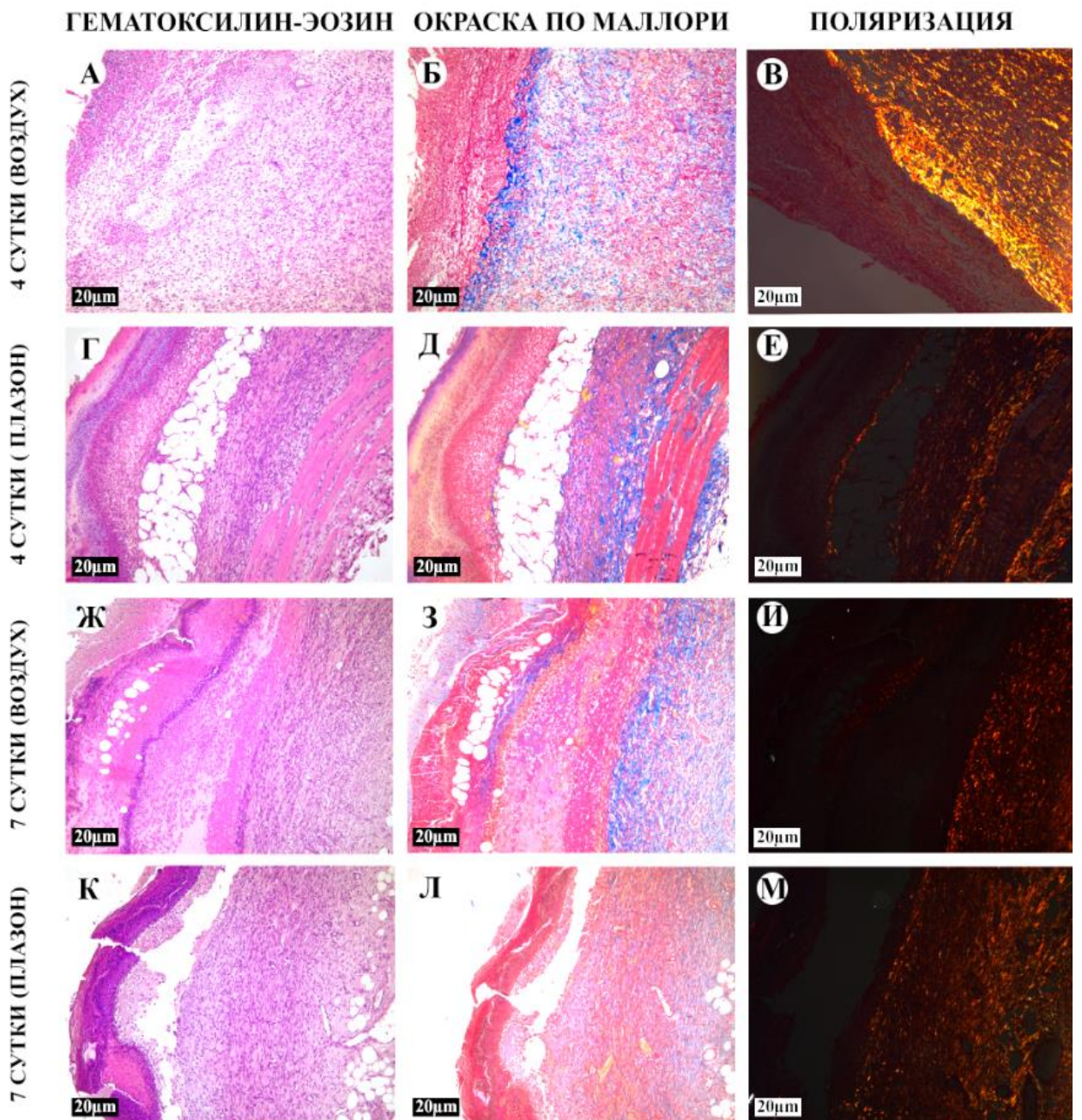


Рис.12. Морфология кожных ран на 4, 7, 14, 21 сутки группы «Плазон».

Через 14 суток после операции (рис.13) в контрольной группе, в которой раны обрабатывали потоком теплого атмосферного воздуха, фибринозно-лейкоцитарный слой был четко отграничен от подлежащих тканей лейкоцитарным валом, содержал обширные участки скопления эритроцитов. Грануляционная ткань была относительно зрелая, отмечалась диффузная инфильтрация лимфоцитами и макрофагами, большое количество вертикально ориентированных капилляров. В экспериментальной группе поверхность раны была полностью эпителизирована высокодифференцированным эпителием у половины животных. У других в центральной части она была покрыта тонким фибринозно-лейкоцитарным слоем. В одном случае слой грануляционной ткани был практически полностью фиброзирован. У других животных в центре раны грануляционная ткань зрелая, по периферии отмечались участки фиброзирования, представленные разнонаправленными толстыми пучками коллагеновых волокон и умеренным числом фибробластов.

На 21-е сутки (рис.13) у половины животных контрольной группы дно раны покрылось плотным фибринозно-лейкоцитарным слоем, отграниченным от подлежащей грануляционной ткани лейкоцитарным валом. Грануляционная ткань характеризовалась умеренной степенью зрелости, незначительной лимфо-макрофагальной инфильтрацией. При фазово-контрастной микроскопии определялись упорядоченные пучки коллагеновых волокон, которые обладали анизотропией желто-зеленого цвета в поляризованном свете. У другой половины животных, которых лечили NO-СГП, раны были полностью покрыты многослойным плоским неороговевающим эпителием. Центральная часть ран была представлена упорядоченными коллагеновыми волокнами и веретеновидными фибробластами со множеством пролиферирующих капилляров. При поляризационной микроскопии преобладали волокна с анизотропией оранжевого и желтого цвета.



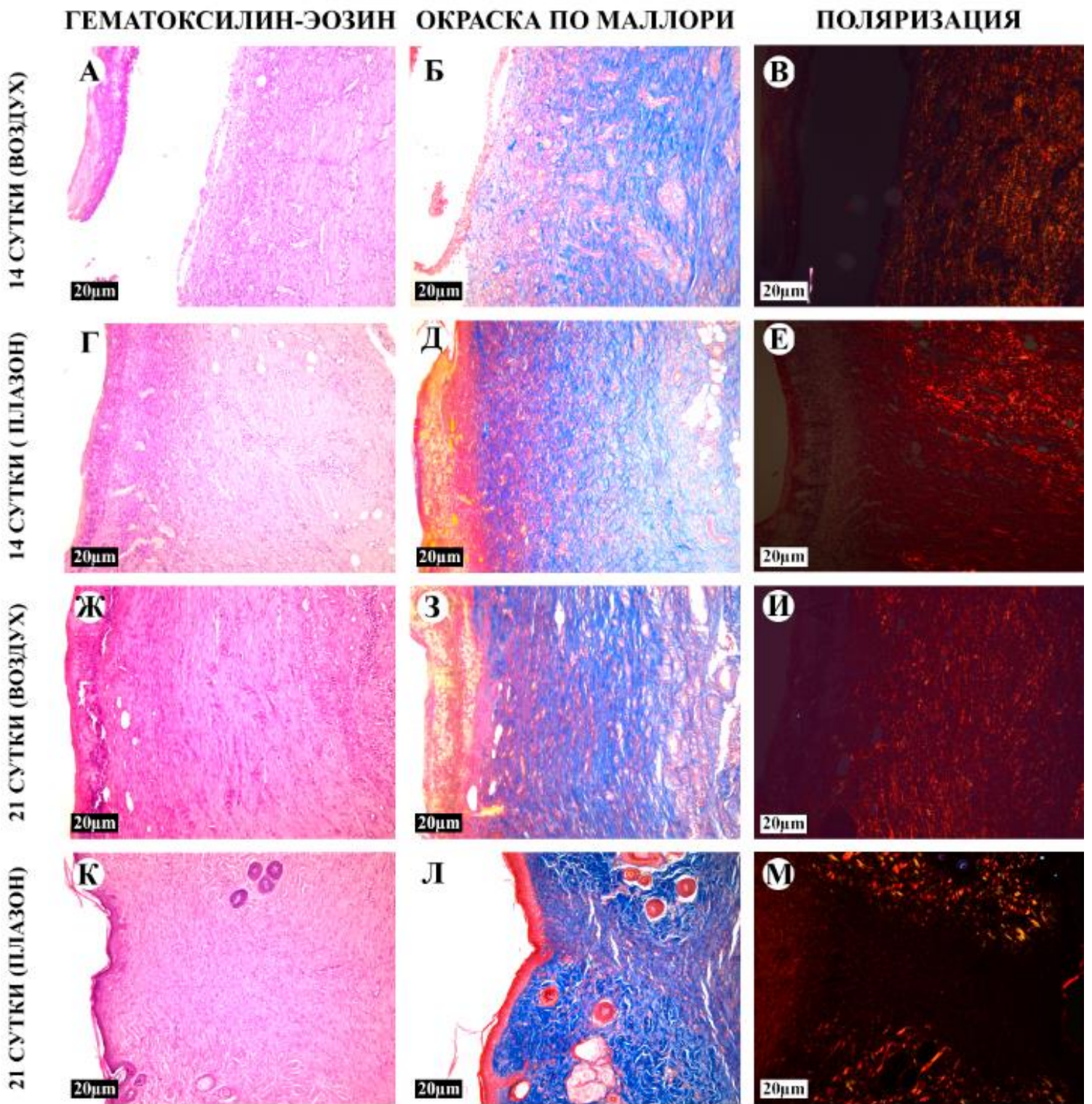


Рис.13. Морфология кожных ран на 4, 7, 14, 21 сутки группы «Плазон».

#### 4.1.4. Морфометрический анализ

В период с 4 по 7 сутки нарастание толщины слоя грануляционной ткани в экспериментальной группе происходило интенсивнее, чем в контрольной (рис.14). К 7 суткам этот показатель в основной группе был на 30% больше, чем в группе, где раны обдували потоком теплого воздуха. На более поздних сроках статистически достоверных различий между группами выявлены не были. К 21-м суткам грануляционная ткань созревала, пучки коллагеновых волокон уплотнялись, и поэтому толщина грануляционной ткани резко уменьшалась по сравнению с предыдущими контрольными точками.

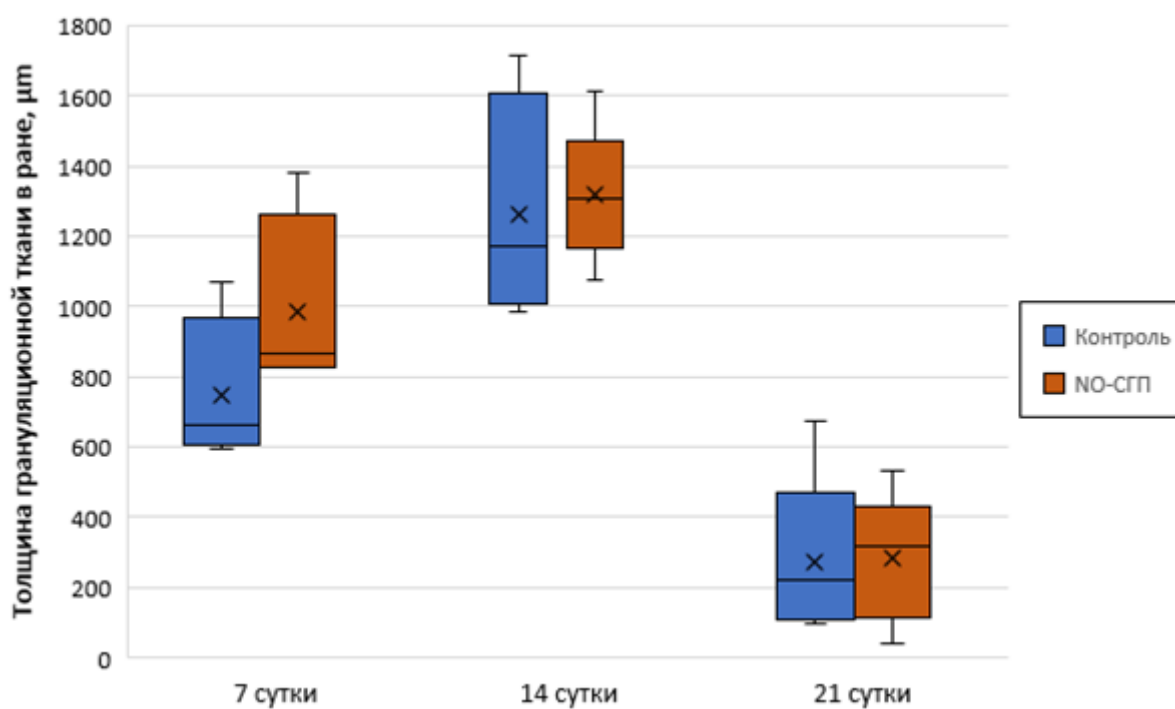


Рис.14. Толщина слоя грануляционной ткани в ране крысы на 7, 14, 21 сутки.

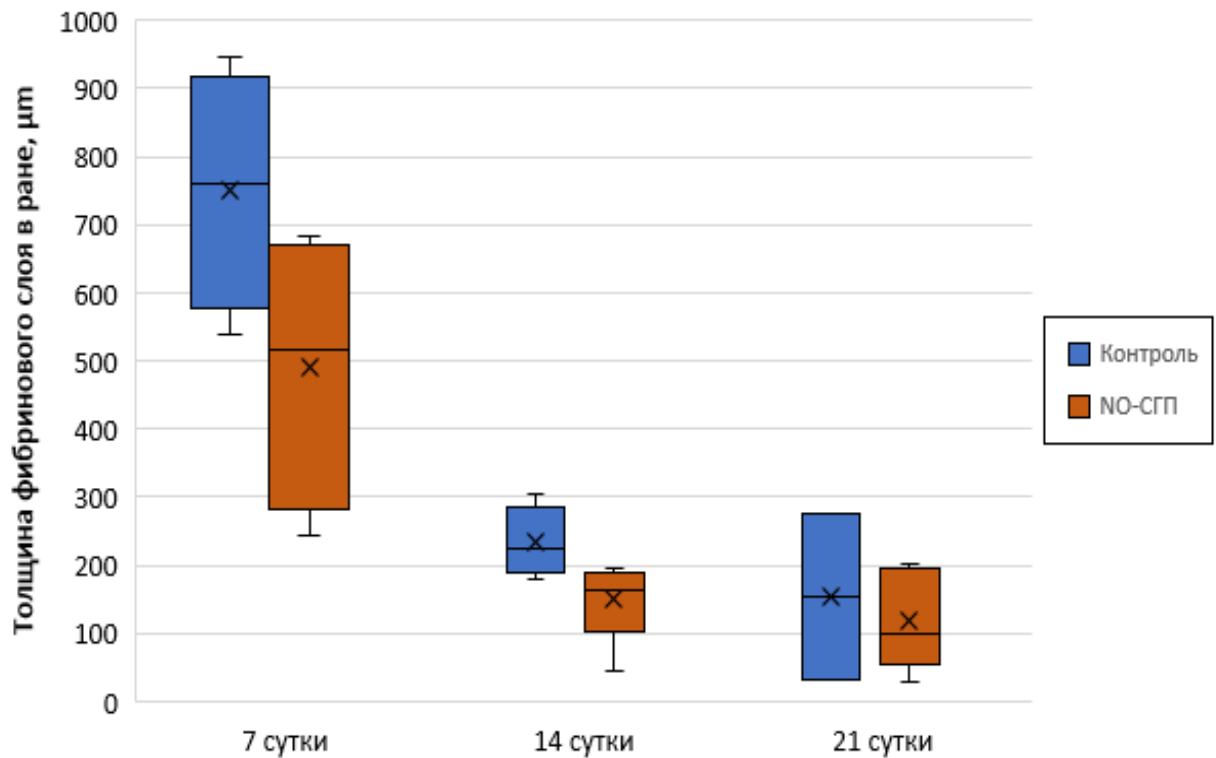


Рис.15. Толщина фибринового слоя раневой ткани крысы на 7, 14, 21 сутки.

Толщина фибринозно-лейкоцитарного слоя в ране прогрессивно снижается. На протяжении всего процесса ранозаживления толщина фибринового слоя в экспериментальной группе почти в два раза тоньше, чем в контрольной группе (рис. 15).



#### 4.1.5. Сравнительный анализ числа клеточных форм в мазках экссудата ран

Подсчет количества нейтрофилов и макрофагоподобных клеток в мазках экссудата на всех сроках ранозаживления позволяет оценить характер процесса новообразования соединительной ткани в области раны.

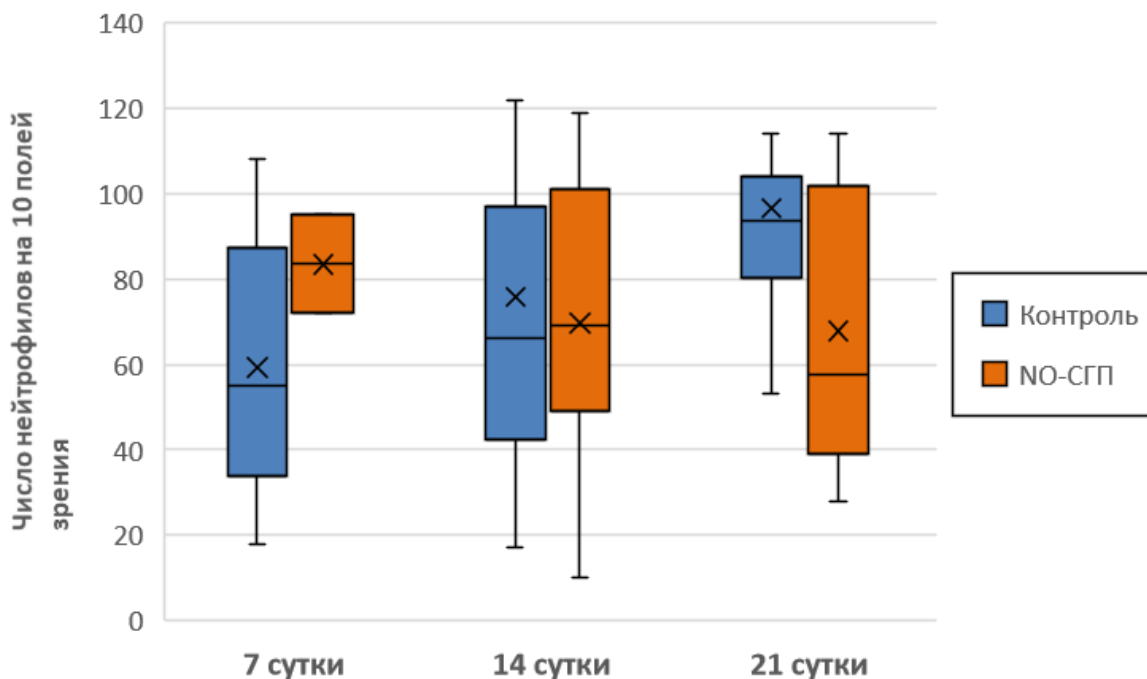


Рис.16. Изменение числа нейтрофилов в ранах крыс на разные сроки ранозаживления.

Подсчет количества нейтрофилов показал, что на 7-е сутки наблюдалось почти двукратное превосходение числа нейтрофилов в опытной группе по сравнению с контрольной группой (рис.16). На 14-е сутки достоверных отличий по количеству нейтрофилов между опытной и контрольной группой выявлено не было. На 21-е сутки нейтрофилов в опытной группе было в два раза меньше нейтрофилов ( $p < 0,05$ ), чем в опытной группе.

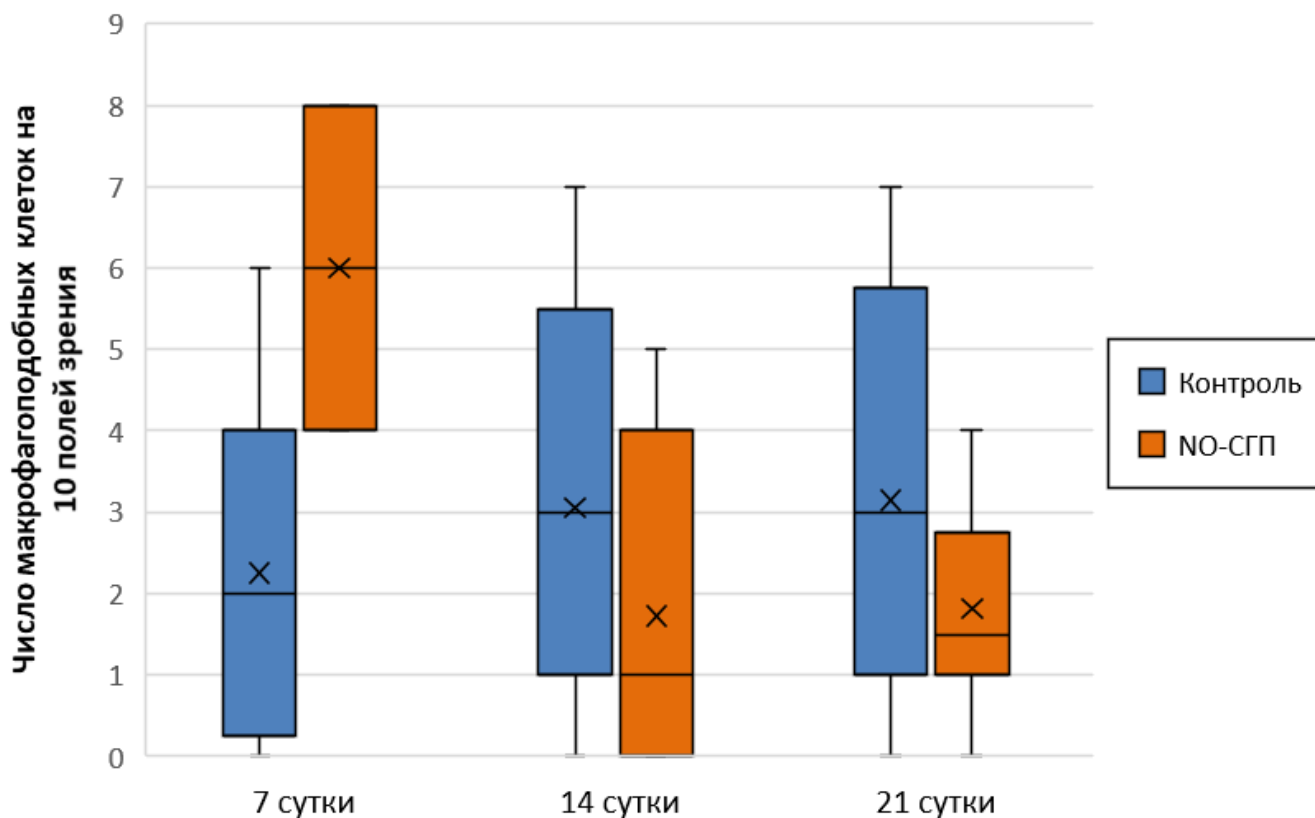


Рис.17. Изменение числа макрофагоподобных клеток в ранах крыс на разные сроки ранозаживления.

Подсчет количества макрофагоподобных клеток выявил, что их количество в контрольной группе почти не менялось в течении всего процесса ранозаживления (рис.17). Количество макрофагоподобных клеток в опытной группе через 7 суток после операции было достоверно ( $p < 0,05$ ) в среднем в два раза больше, чем в контрольной группе. На 14-е и 21-е сутки разницы между опытом и контролем почти нет.

#### 4.1.6. Иммуногистохимическое изучение процесса заживления ран.

Одной из наиболее значимых клеточных форм, характеризующих развитие пролиферативной фазы воспаления и способствующих формированию соединительнотканного матрикса, а также обеспечивающих контракцию раны, служит одна из разновидностей фибробластов – миофибробласты. Чтобы оценить синтетическую и миграционную активность клеток в районе раны, мы провели иммуногистохимическое выявление маркеров этих клеток – гладкомышечного  $\alpha$ -актина и виментина.

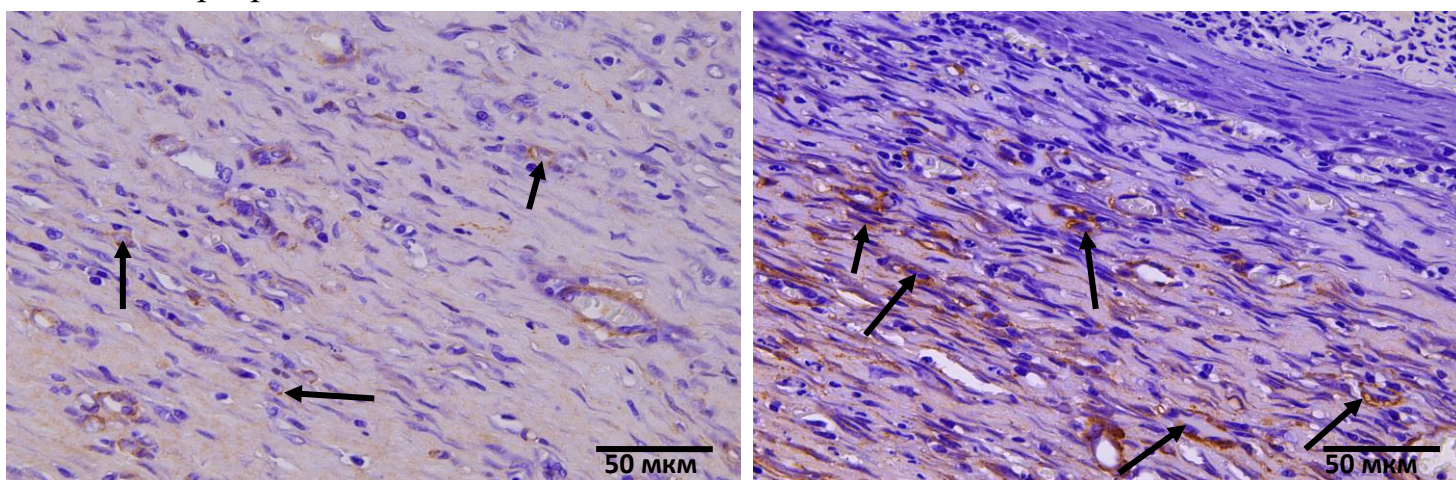


Рис.18. Выявление миофибробластов в раневой ткани после операции у контрольной группы (слева) и группы обработанной NO-СГП (справа) на 7-е сутки. Стрелочками указаны фибробластоподобные клетки экспрессирующие  $\alpha$ -гладкомышечный актин.

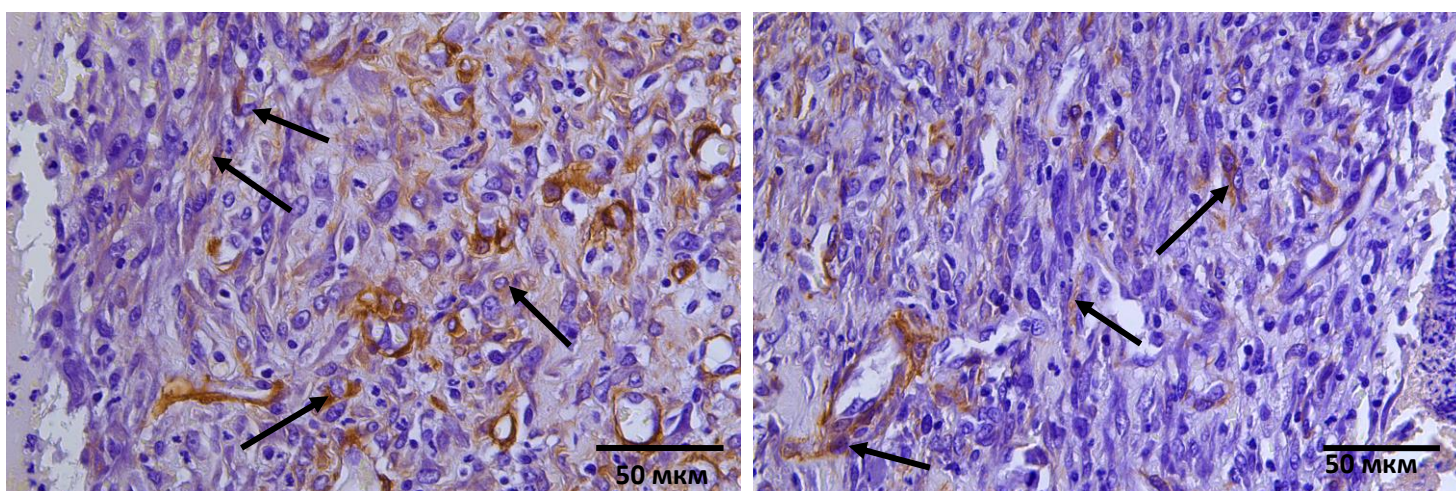


Рис.19. Выявление миофибробластов в раневой ткани после операции у контрольной группы (слева) и группы обработанной NO-СГП (справа) на 14-е сутки. Стрелочками указаны фибробластоподобные клетки экспрессирующие  $\alpha$ -гладкомышечный актин.

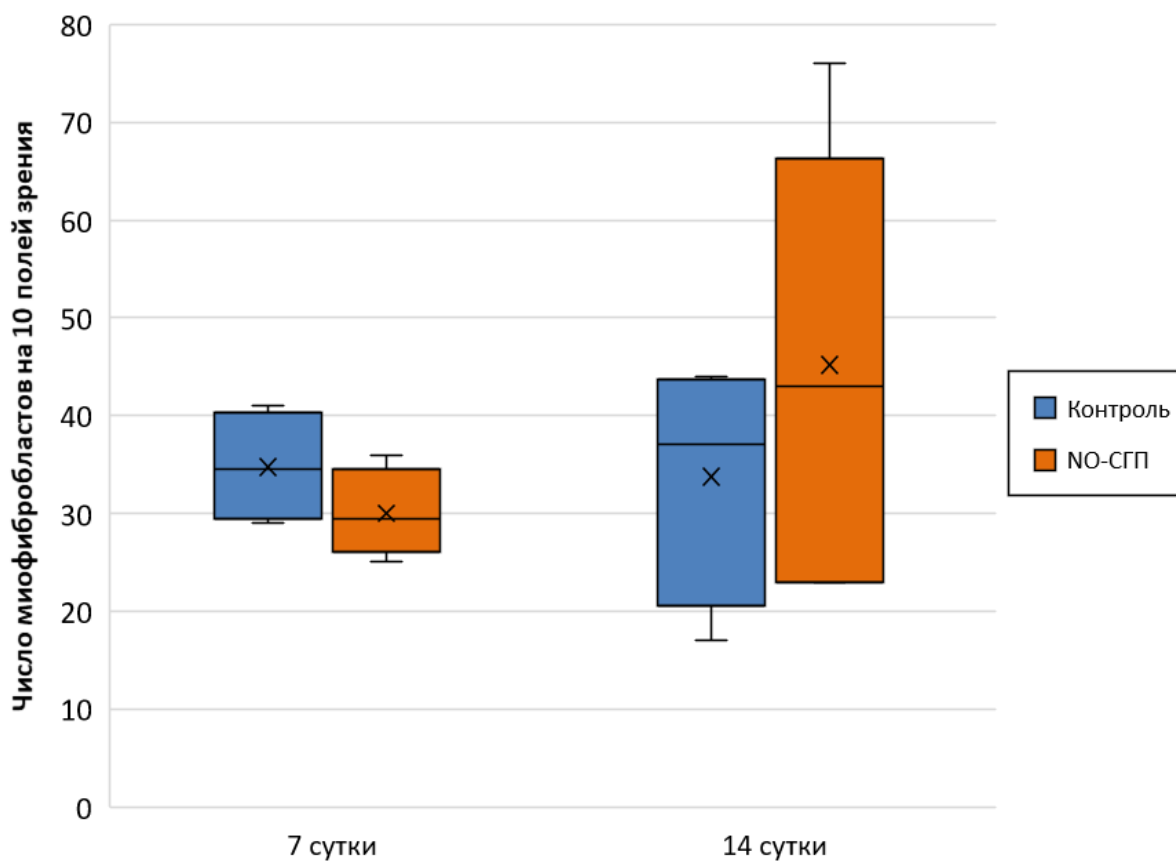


Рис.20. Иммуногистохимическое выявление гладкомышечного  $\alpha$ -актина на поперечных гистологических срезах ран на 7-е и 14-е сутки после операции у животных контрольной и экспериментальной групп.

В течение 14 суток число миофибробластов в контрольной группе почти не изменялось (рис.20). В раневой ткани после обработки NO-СГП число миофибробластов к 14-ым суткам ранозаживления возросло на треть по сравнению с ранами, обработанные воздухом.

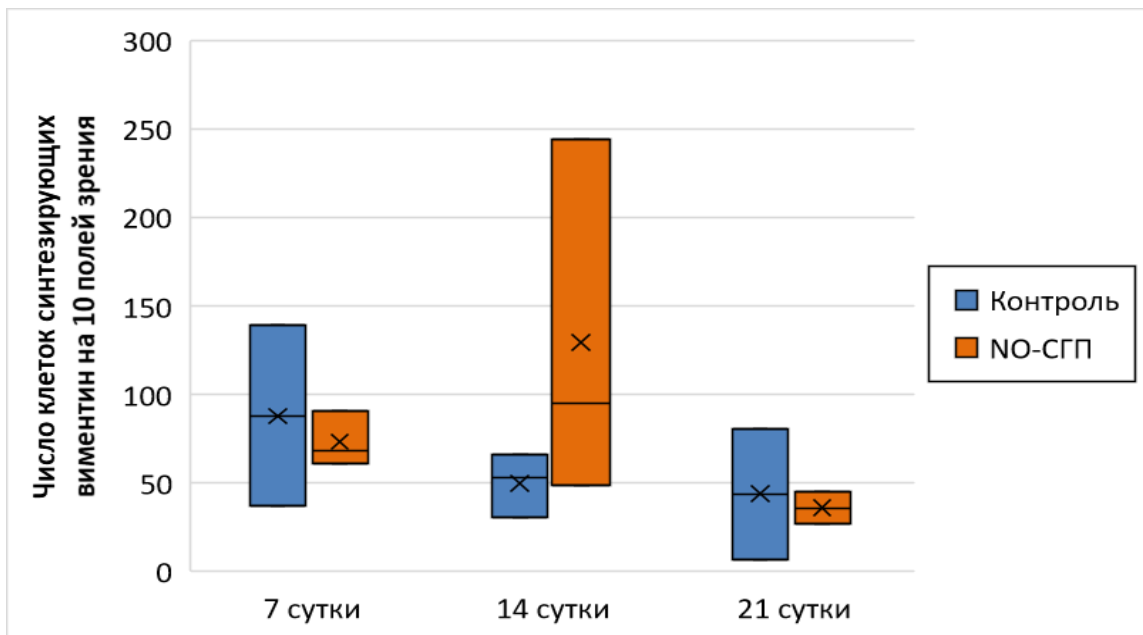


Рис.21. Иммуногистохимическое выявление виментина на поперечных гистологических срезах ран на 7-е , 14-е и 21-е сутки после операции у животных контрольной и экспериментальной групп.

В течение всех этапов ранозаживления количество мигрирующих клеток в контрольной группе постепенно снижалось, причем разницы на 14-е и 21-е сутки почти нет. Опытная группа демонстрировала стремительный рост количества мигрирующих клеток уже на 14 сутки, а затем резкое снижение их количества (рис.21).

## **4.2. Изучение воздействия аэрозоля ДНКЖ на процесс ранозаживления у крыс**

### **4.2.1 Макроскопическое описание**

На 4-й день после операции у животных контрольной группы на поверхности ран определялся толстый слой фибрина сероватого цвета, а у остальных - незначительный мутный экссудат. В экспериментальной группе к этому сроку большинство ран имели чистое, блестящее дно с незначительным количеством опалесцирующего экссудата без запаха. На 7-е сутки раны всех животных были покрыты струпом темно-бордового цвета с шероховатой поверхностью, который был плотно сращен с подлежащими тканями. На 14-е сутки в экспериментальной группе наблюдалась выраженная краевая эпителизация и резкое сокращение размеров ран до 0,7 см<sup>2</sup>. В контрольной группе к этому сроку размеры ран были значительно больше, хотя большинство животных имели чистое, гладкое дно. В одном из случаев данной группы рана все еще была покрыта струпом, не плотно прикрепленным к раневой поверхности, окружающие ткани были отечны и гиперемированы, при пальпации из-под струпа выделялся густой гной желто-зеленого цвета. К 21-м суткам в исследуемых группах полная эпителизация наблюдалась у 2 животных экспериментальной группы, у других площадь ран составляла менее 0,3 см<sup>2</sup>, что было намного меньше, чем в группе контроля.



#### 4.2.2. Площадь ран

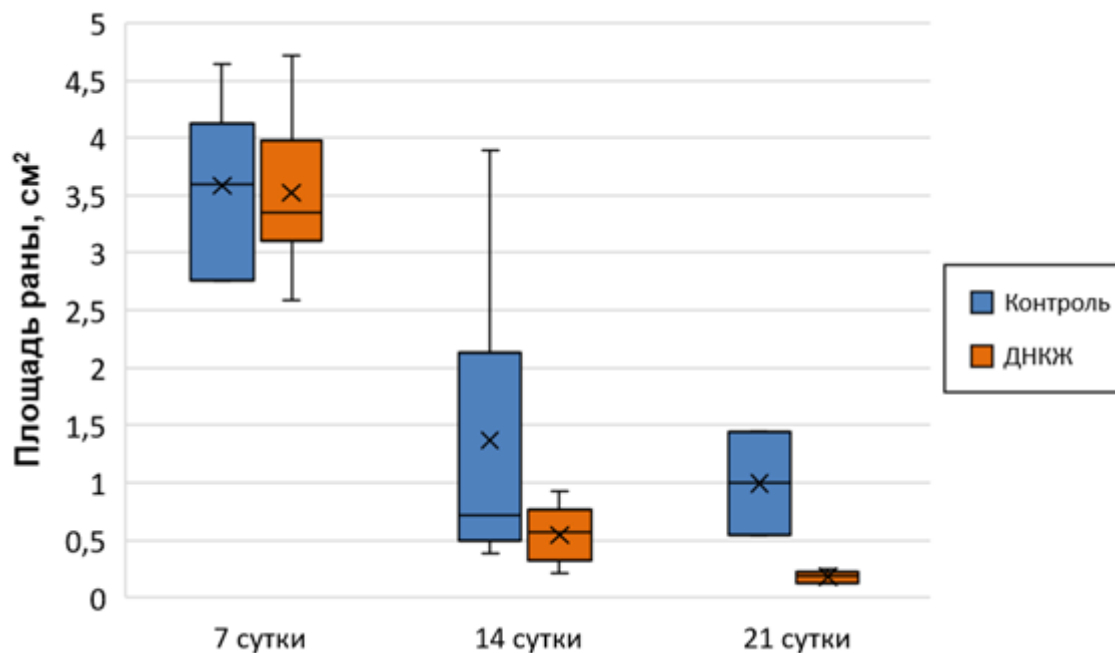


Рис.22. Изменение площади раневой поверхности.

На 7-е сутки после операции площадь ран у животных экспериментальной группы была значительно меньше, чем в группе контроля. К 14-м суткам сократилась в 2 раза относительно значений в более ранний срок ( $p < 0,05$ ). К 21-м суткам раны большего числа из животных, которых лечили аэрозолем с содержанием 50 мкг ДНКЖ, были полностью эпителизированы, в то время как в контрольной подгруппе площадь ран была больше, чем в экспериментальной группе на 14-е сутки (рис.22).

#### 4.2.3. Гистологическое исследование процесса заживления ран

На 4-е сутки раны практически всех животных контрольной группы имели признаки бактериальной контаминации, воспалительные изменения были выражены умеренно и характеризовались лейкоцитарным валом и диффузной лимфо-макрофагальной инфильтрацией. Микроциркуляторные нарушения были представлены слабо. Грануляционная ткань характеризовалась крайне низкой степенью зрелости, у половины животных она присутствовала только в виде отдельных островков, при этом

фибриновые волокна значительно преобладали над коллагеновыми, что подтверждалось при фазово-контрастной микроскопии. В экспериментальной группе на этом сроке фибринозно-лейкоцитарный слой был тоньше, чем в группе контроля. Он состоял из рыхлой сети фибриновых волокон, умеренной лейкоцитарной инфильтрации. Микробные колонии встречались реже, в просвете сосудов не визуализировались иммунные клетки. Грануляционная ткань имела достаточно большой объем и признаки созревания: вертикальную ориентацию сосудов, продольное расположение веретеновидных фибробластов и новообразование коллагеновых волокон.

На 7-е сутки в контрольной группе фибринозно-лейкоцитарный слой был выражен умеренно, однако в нем определялось достаточно большое количество микробных колоний. Подлежащая ткань была диффузно инфильтрирована полиморфно-ядерными лейкоцитами, лимфоцитами, макрофагами и немногочисленными плазматическими клетками.

В большинстве случаев практически не наблюдалось новообразования капилляров, пролиферация фибробластов была умеренной, что характерно для крайне незрелой грануляционной ткани. В других случаях параллельно ориентированные веретеновидные фибробласты выстраивались вдоль волокон фибрина, постепенно замещая их тонкими волокнами коллагена, что видно при фазово-контрастной микроскопии. При поляризационной микроскопии в глубоких слоях раны отмечалась анизотропия красного цвета волокон коллагена, разделяющих подкожно-жировую клетчатку, в более поверхностных слоях анизотропия практически отсутствовала. В более глубоких слоях кровеносные сосуды характеризовались резким полнокровием с признаками лейкостаза, их стенки были инфильтрированы нейтрофилами и утолщены за счет плазматического пропитывания, отмечалась пролиферация эндотелиальных клеток. У половины животных выявлялся лимфостаз (рис.23).

В экспериментальной группе на 7-е сутки фибринозно-лейкоцитарный слой был достаточно толстый, как и в контрольной группе, выявлялись



признаки бактериальной контаминации, однако выраженность воспалительной инфильтрации и микроциркуляторных нарушений была значительно меньше. Грануляционная ткань характеризовалась небольшим объемом, но достаточно высокой степенью зрелости. В ней определялась выраженная лимфо-макрофагальная инфильтрация, многочисленные полнокровные капилляры. Фибробластов располагались параллельно друг другу, они активно пролиферировали и синтезировали коллагеновые волокна, что подтверждается фазово-контрастной микроскопией (рис.23).

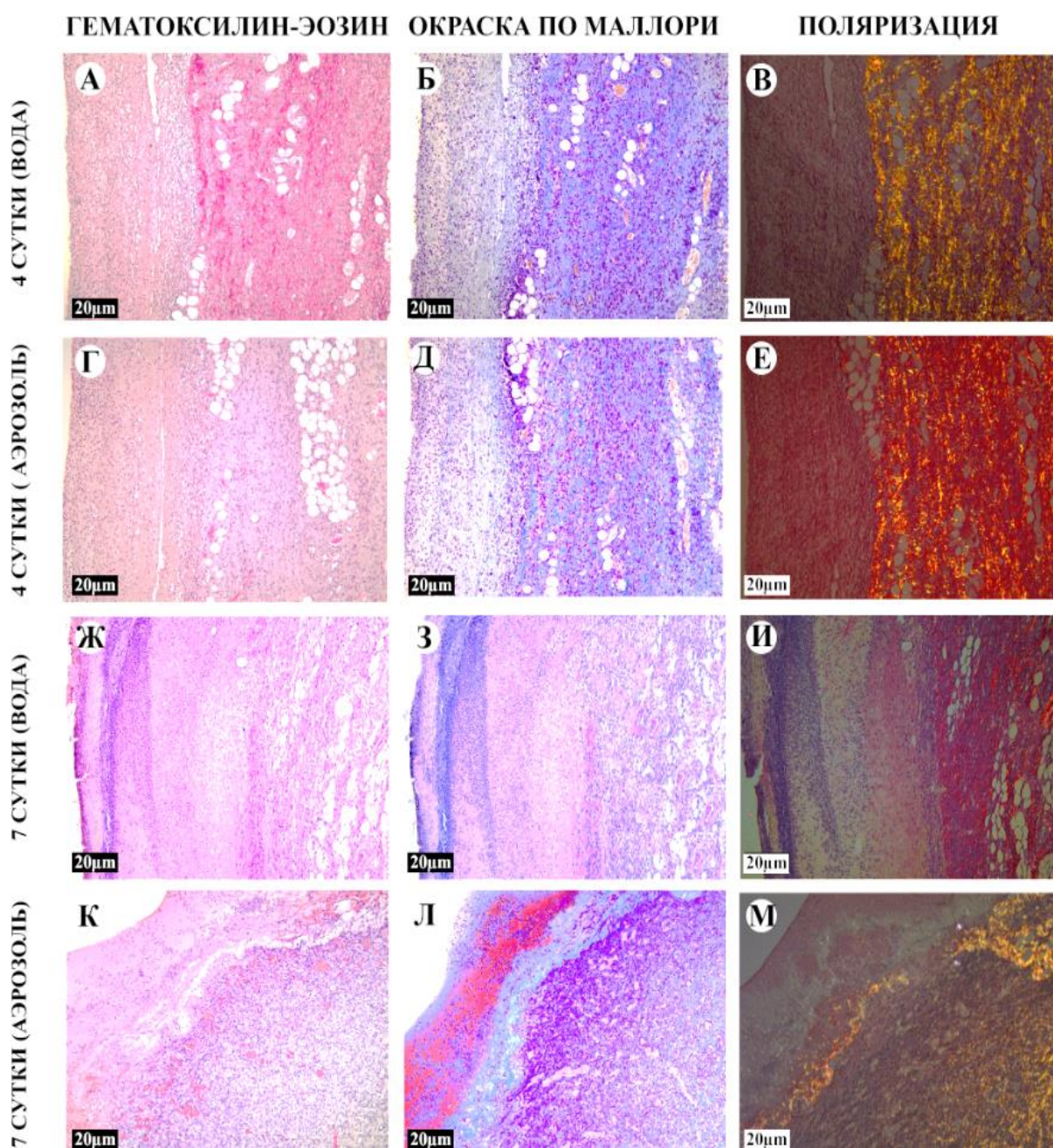


Рис.23. Морфология кожных ран на 4, 7, 14, 21 сутки группы «Плазон».

На 14 сутки раны всех животных контрольной группы были покрыты достаточно толстым фибринозно-лейкоцитарным слоем (рис.24), в котором определялись скопления погибших микроорганизмов. В одном из случаев наблюдений отмечалась резко выраженная нейтрофильная инфильтрация подлежащей ткани и лейкостаз. У других животных воспалительная инфильтрация была умеренной, микроциркуляторные нарушения выявлялись только у нескольких животных. Они представляли собой небольшие очаговые кровоизлияния. Слой грануляционной ткани был относительно тонкий, он характеризовался умеренной пролиферацией фибробластов и неоангиогенезом, тем не менее в половине случаев отмечалась эпителизация краев раны под струпом.

В опытной группе, в которой применяли аэрозоль с 50 мкг ДНКЖ, на этот срок наблюдалась краевая эпителизация, дно раны было покрыто тонким фибринозно-лейкоцитарным слоем, у одного животного выявлялись признаки контаминации. В остальных случаях рана была полностью покрыта дифференцированным эпителием. Грануляционной ткани имела достаточно большой объем, она состояла из параллельно ориентированных фибробластов, синтезирующих коллагеновые волокна и капилляров, часть которых располагалась перпендикулярно поверхности раны. При фазово-контрастной микроскопии выявлялись достаточно толстые пучки волокон коллагена. При поляризационной микроскопии преобладала анизотропия красного цвета по периферии раны и выраженная анизотропию желто-оранжевого и зеленого цвета в центральной части раны, что свидетельствует о созревании коллагеновых волокон.

В контрольной группе на 21-е сутки у большинства животных отсутствовал струп и определялась интенсивная эпителизация, однако ни у одного животного дно раны не затягивалось полностью. Грануляционная ткань была диффузно инфильтрирована макрофагами (рис.24), лимфоцитами и единичными нейтрофилами, она имела достаточно большой объем и была



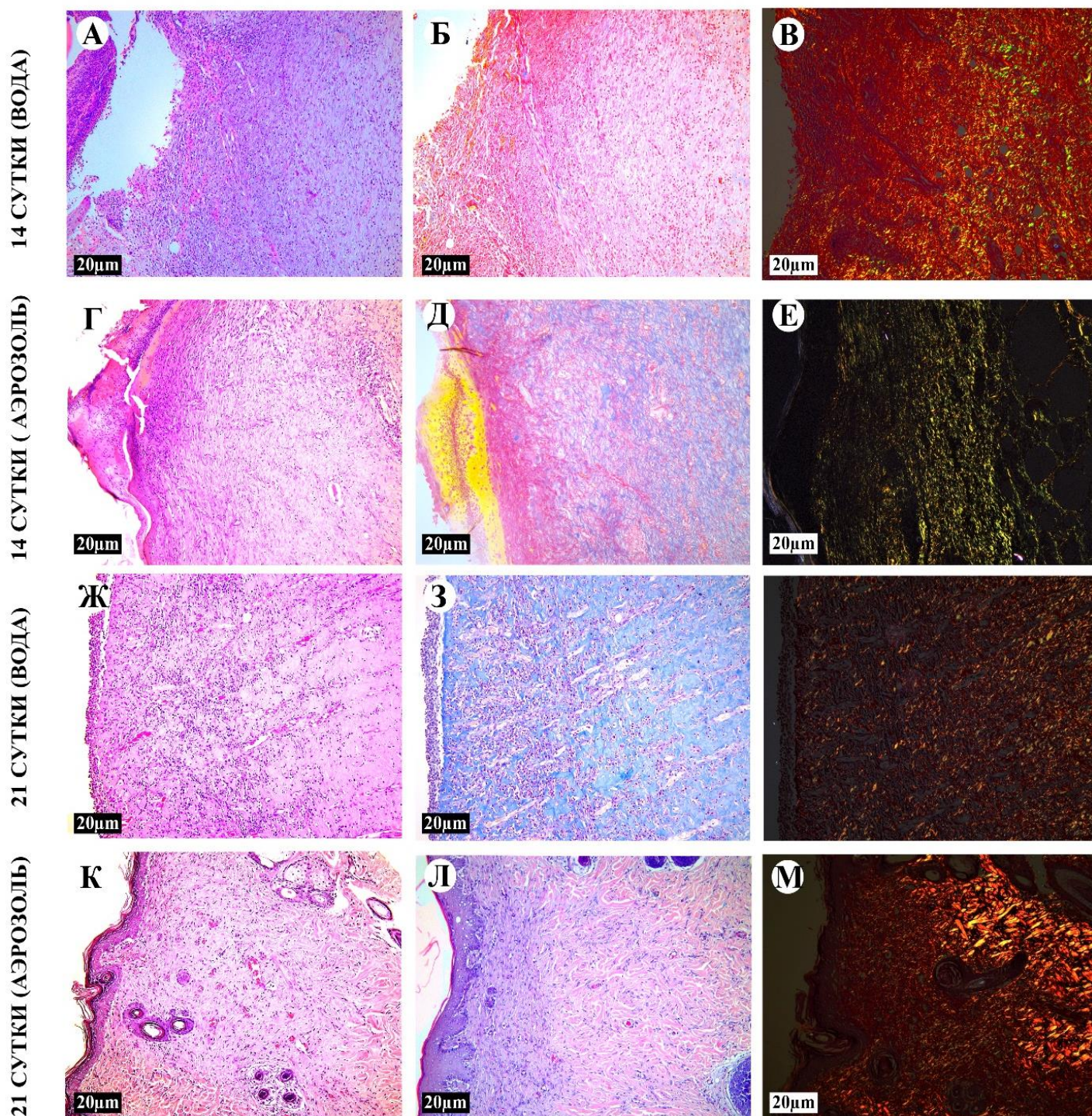


Рис.24. Морфология кожных ран на 4, 7, 14, 21 сутки группы «Плазон».

представлена вертикально ориентированными капиллярами и, преимущественно, периваскулярно расположенными толстыми волокнами коллагена. При фазово-контрастной микроскопии часть этих волокон имели фибриллярную структуру, другие - гомогенизированную. При поляризационной микроскопии анизотропия зеленого и желтого цвета выявлялась в основном в глубоких слоях раны, в поверхностных была представлена слабо.



В экспериментальной группе на 21-е сутки во многих случаях определялась полная эпителизация ран, в половине из них дерма полностью регенерировала к данному сроку. У остальных животных грануляционная ткань имела большой объем и состояла из толстых, параллельно организованных коллагеновых волокон и немногочисленных веретеновидных фибробластов, что подтверждалось выявлением толстых пучков коллагеновых волокон при фазово-контрастной микроскопии. При поляризационной микроскопии волокна регенерирующей дермы характеризовались выраженной анизотропией красного цвета, в небольших участках оставшейся грануляционной ткани - желто-оранжевого цвета. Только в нескольких случаях выявлялась слабо выраженная лимфо-макрофагальная инфильтрация.

#### 4.2.4. Морфометрический анализ

Толщина слоя грануляционной ткани достигала максимума уже на 7-е сутки после операции, после чего оставалась практически неизменной до 14 суток. В период с 14 по 21 сутки этот слой уменьшился почти в 2 раза, однако достоверно не отличался от показателя в группе контроля (рис.25).

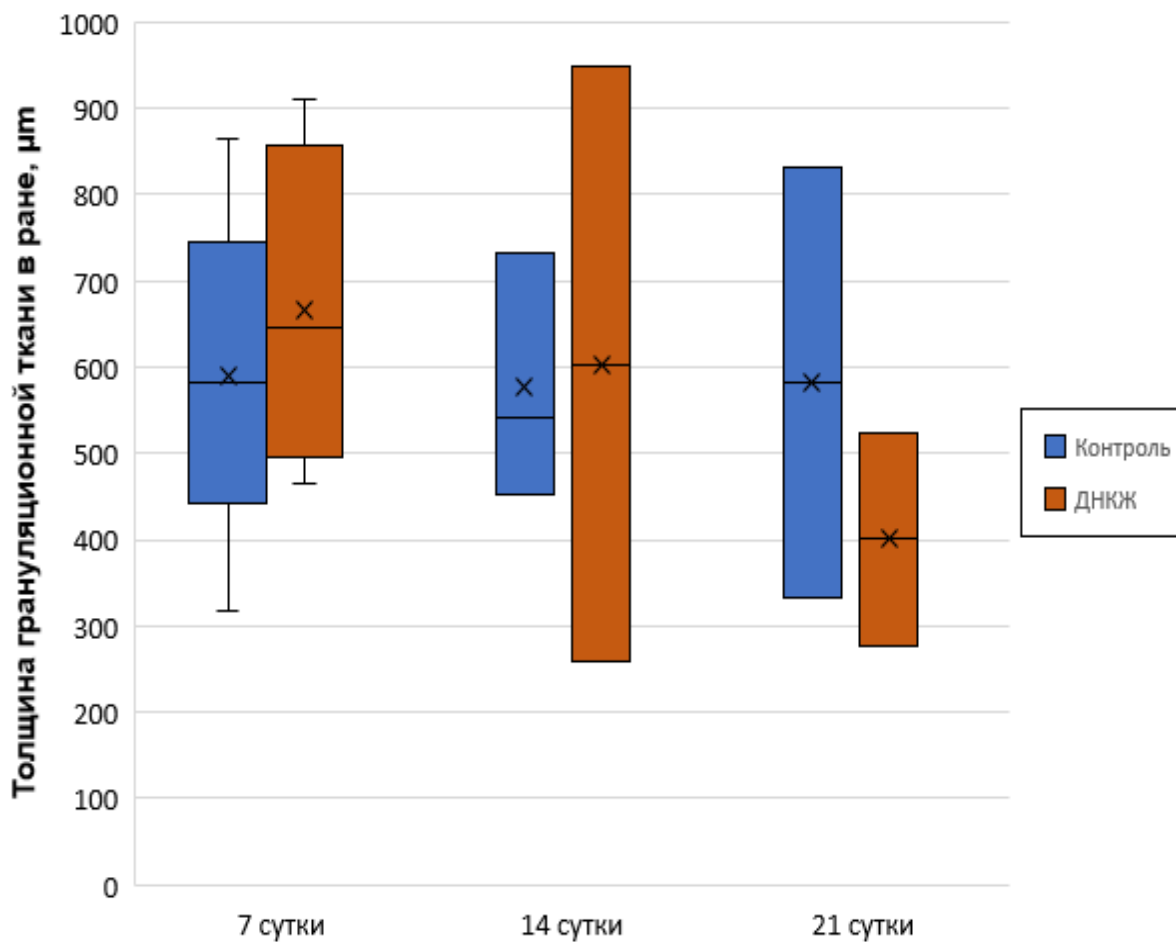


Рис.25. Толщина слоя грануляционной ткани раны крысы на 7, 14, 21 сутки.

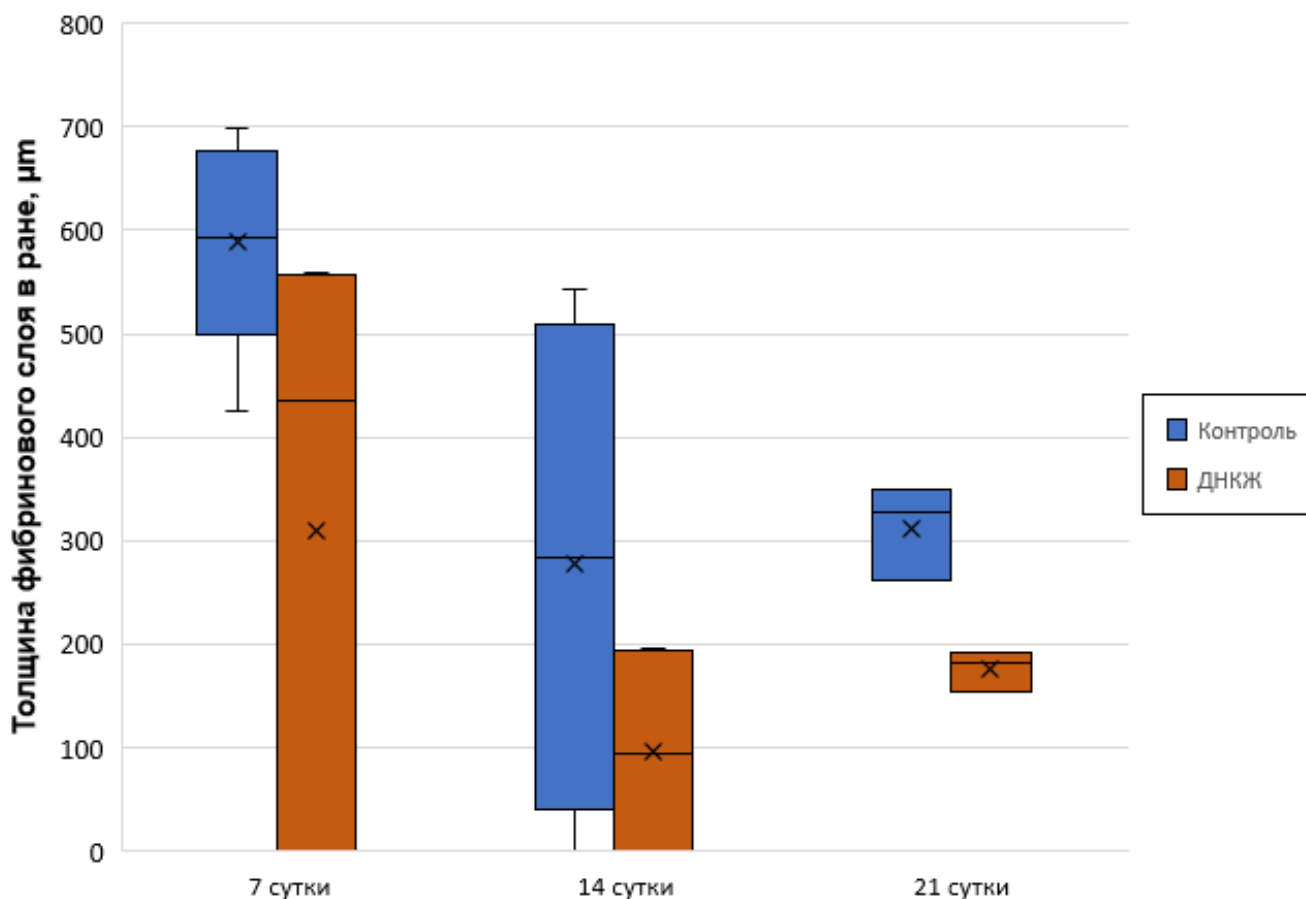


Рис.26. Толщина фибринового слоя раневой ткани крысы на 7, 14, 21 сутки.

Фибриновый слой в ране после обработки ДНКЖ заметно уменьшается с течением процесса заживления. В период 7 - 14 суток фибриновый слой в экспериментальной группе утончается более чем в 2,5 раза. В контроле же такой результат достигается лишь к 21 суткам (рис.26).

#### 4.2.5. Сравнительный анализ числа клеточных форм в мазках экссудата ран

Подсчет количества нейтрофилов на всех сроках ранозаживления показал, что в контроле .как и в эксперименте наибольшее количество нейтрофилов наблюдается на 7 сутки, причем в опытной группе нейтрофилов на 33% больше чем в контрольной группе. На 14- и 21-е сутки достоверных отличий по количеству нейтрофилов в ране между опытной и контрольной группами выявлено не было (рис.27).

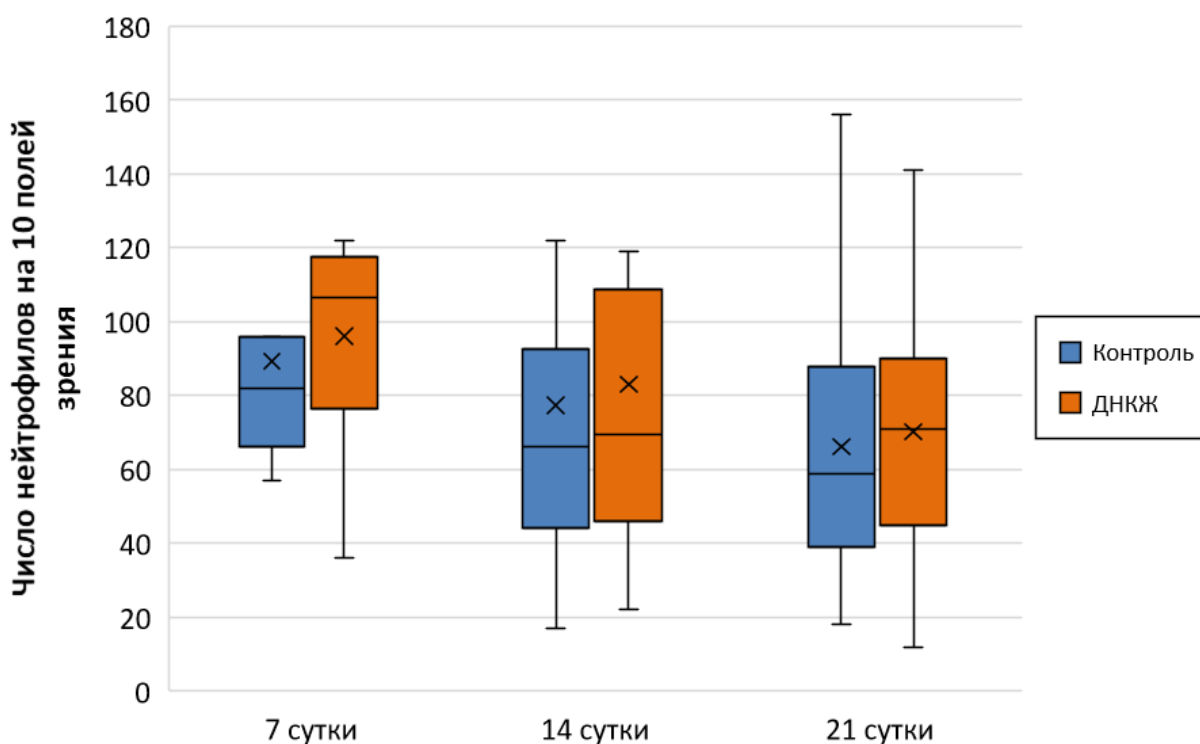


Рис.27. Изменение числа нейтрофилов в ранах крыс на разные сроки ранозаживления.

Подсчет количества макрофагоподобных клеток на ранних сроках процесса ранозаживления выявил, что их количество в контрольной группе на 14-сутки возросло почти в два раза, однако на 21-е сутки вернулось на уровень 7-х суток. В группе, обработанных ДНКЖ, было достоверно больше) в два раза чем в контроле ( $p < 0,05$ ). Однако на 7-е и 21-е сутки отличий между исследуемыми группами по количеству макрофагоподобных клеток обнаружено не было (рис.28).

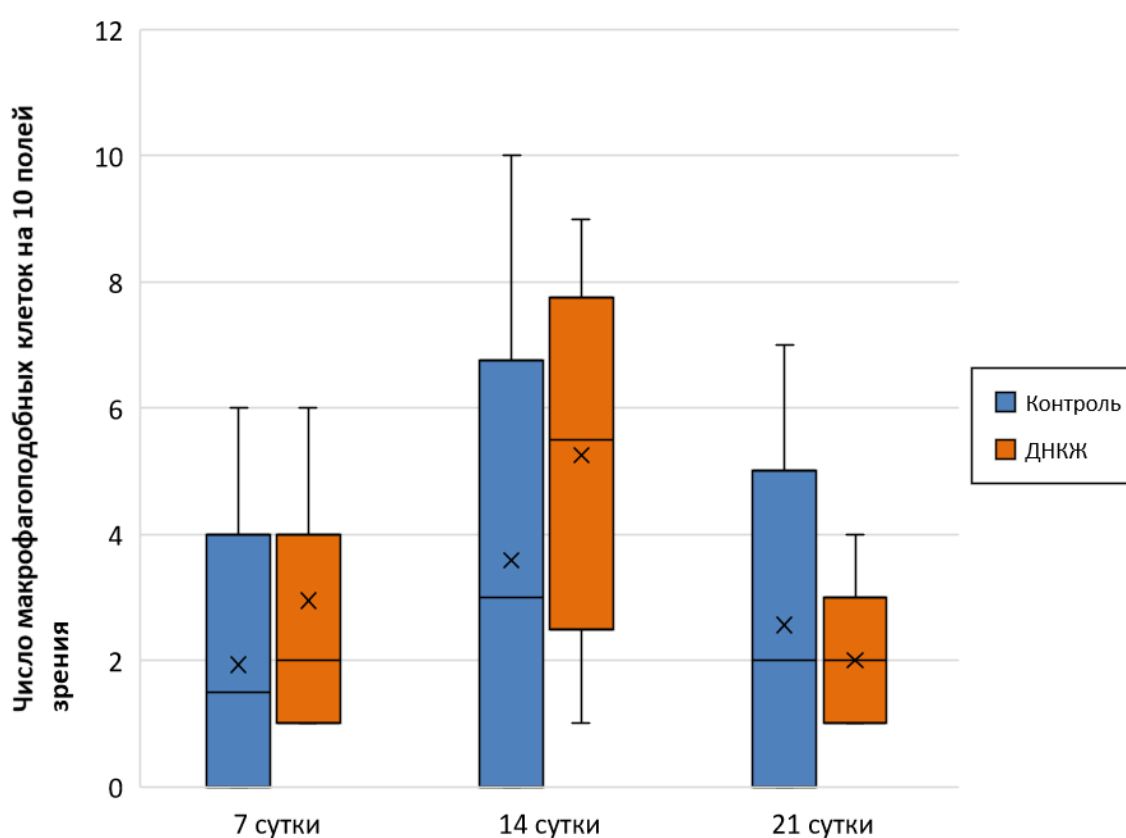


Рис.28. Изменение числа макрофагоподобных клеток в ранах крыс на разные сроки ранозаживления.



#### 4.2.6. Иммуногистохимическое изучение процесса заживления ран

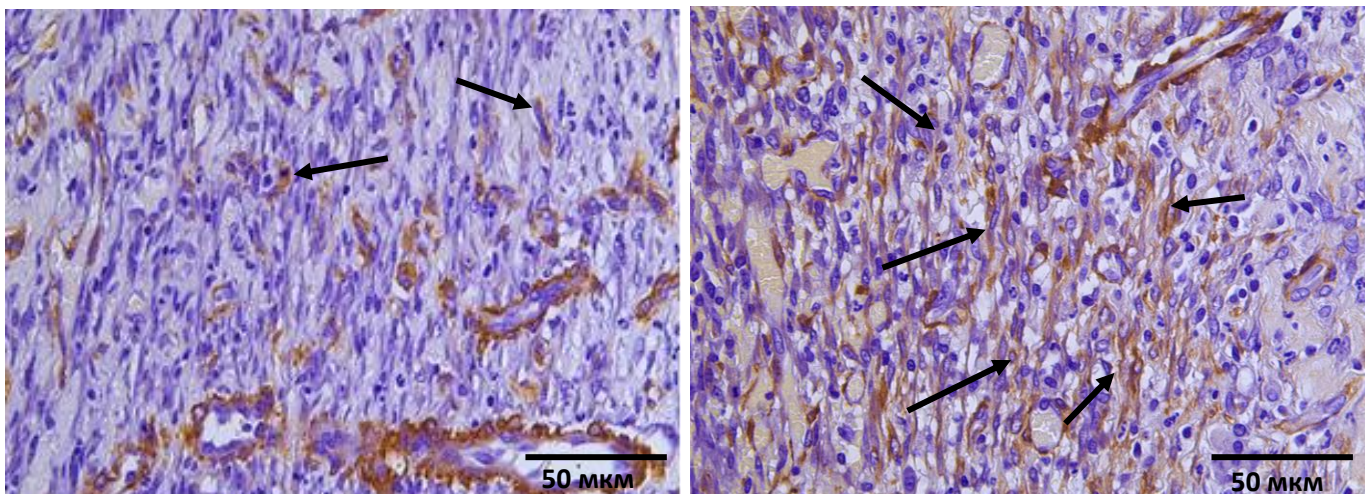


Рис.29. Выявление миофибробластов в раневой ткани после операции у контрольной группы (слева) и группы обработанной ДНКЖ (справа) на 7-е и 14-е сутки. Стрелочками указаны фибробластоподобные клетки экспрессирующие  $\alpha$ -гладкомышечный актин.

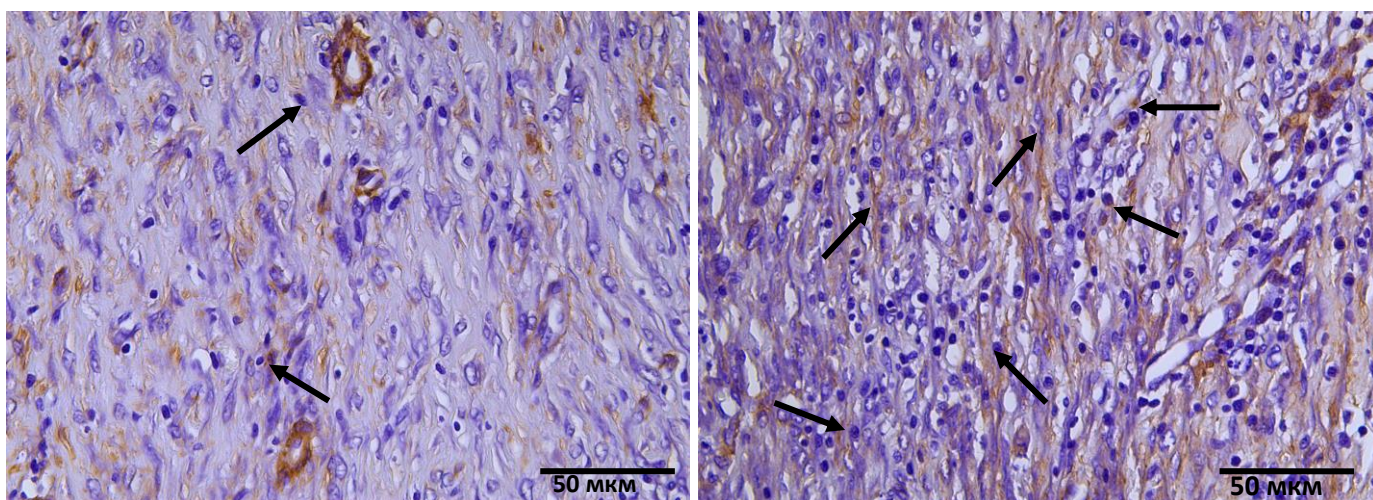


Рис.30. Выявление миофибробластов в раневой ткани после операции у контрольной группы (слева) и группы обработанной ДНКЖ(справа) на 14-е сутки. Стрелочками указаны фибробластоподобные клетки экспрессирующие  $\alpha$ -гладкомышечный актин.

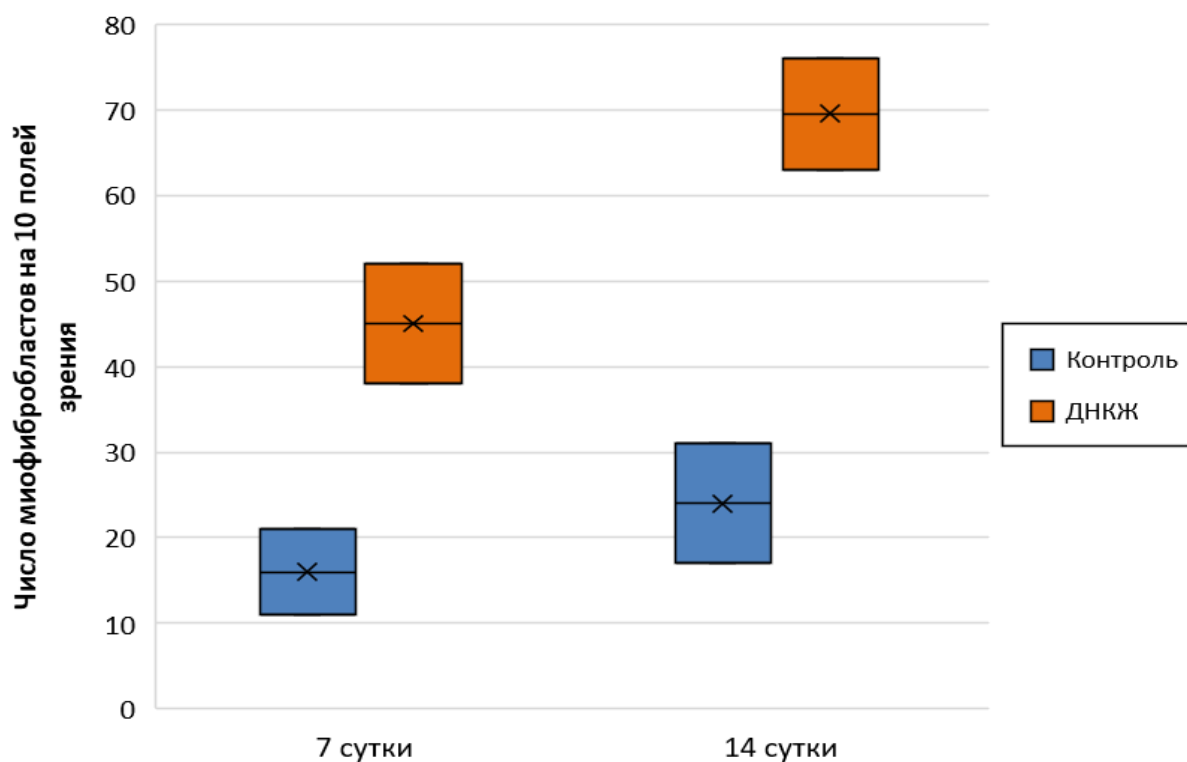


Рис.31. Иммуногистохимическое выявление гладкомышечного  $\alpha$ -актина на поперечных гистологических срезах ран на 7-е и 14-е сутки после операции у животных контрольной и экспериментальной групп.

В ранах крыс  $\alpha$ -актин-положительные фибробластоподобные клетки. Которые идентифицировали как миофибробласты, были выявлены на 7-е и 14-е сутки у обеих групп. Подсчет числа этих клеток показал их трехкратное увеличение в экспериментальной группе по сравнению с контролем (рис.31).

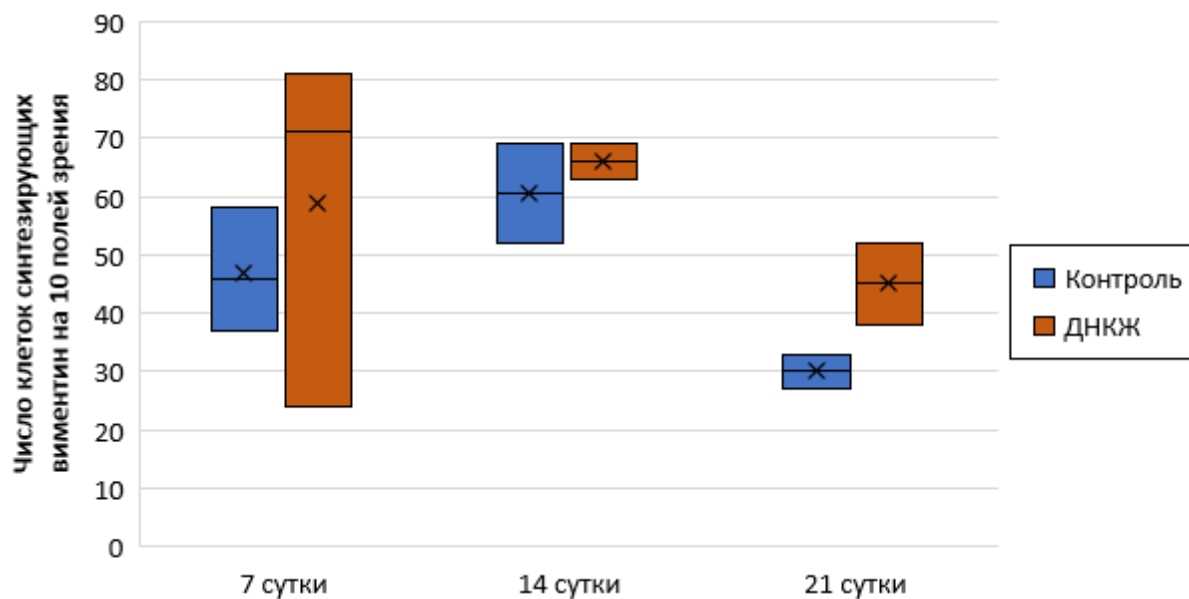


Рис.32. Иммуногистохимическое выявление виментина на поперечных гистологических срезах ран на 7-е , 14-е и 21-е сутки после операции у животных контрольной и экспериментальной групп.

На всех этапах ранозаживления в экспериментальной группе количество виментин-экспрессирующих клеток было больше, чем в контрольной группе, особенно на 7-е и 21-е сутки (рис.32).

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучая воздействие какого-либо вещества на процесс ранозаживления необходимо подобрать наиболее эффективный способ его доставки в область раны. Ввиду разных способов доставки исследуемого вещества, помимо основного терапевтического действия, на рану могут воздействовать косвенные факторы.

В связи с этим, в нашей работе используется два способа доставки NO в рану: газовый и аэрозольный. Оба этих способа обладают свойствами обеспечивающими легкость и эффективность нанесения доноров оксида азота на раневую ткань, а затем их доставку в межклеточное пространство раны.

Клинические данные свидетельствуют об эффективности применения аппарата Плазон в лечении раневых и гнойных процессов, при терапии травматических и рубцовых поражений, в том числе в пластической хирургии и в других областях медицины [35, 53, 95, 101]. В первой части нашего исследования мы изучали эффективность воздействия NO-содержащего газового потока, генерируемого аппаратом «Плазон», на полнослойную рану, что позволило ответить на вопросы о влиянии газовой молекулы на различные процессы протекающие в процессе ранозаживления.

Нами было выявлено, что наиболее заметные положительные эффекты ранозаживления приходятся на 7-е сутки после обработки раны NO-СГП. Это связано с ранними отторжением струпа и контракцией краев раны в группе, где применяли NO-СГП. Иммуногистохимическое выявление клеток экспрессирующих  $\alpha$ -гладкомышечный актин и виментин показало, что на 7-е сутки приходится аналогичный контракцию раны, скачок количества миофибробластов, а также виментин-экспрессирующих клеток в ране.

Миофибробласты ответственны за стягивание краев раны, так как способны к сокращению [96]. Действительно, обнаруженное нами на 7-сутки после операции уменьшение площади раны в экспериментальной группе,

обусловлено увеличением количества миофибробластов, виментин-экспрессирующих клеток и толщины слоя грануляционной ткани почти на треть, по сравнению с контролем.. Известно, что трансдифференцировка фибробластов в миофибробласты под действием NO индуцируется TGF-  $\beta$ 1 [98]. Возможно именно на TGF-  $\beta$ 1 усиленно влияет NO в культуре фибробластов и в новообразующейся соединительной ткани. В дальнейших исследованиях целесообразно изучить влияние NO-СГП на TGF-  $\beta$ 1 в клеточной культуре *in-vitro*.

Особый интерес среди существующих доноров NO представляют эндогенные молекулы, которые, помимо непосредственного выделения оксида азота в ткани могут играть роль сигнальных молекул в процессе регенерации и метаболизма в тканях. Опубликованные ранее работы свидетельствуют о благоприятном влиянии ДНКЖ на раневое заживление [14, 61, 102]. Однако описанные в статьях способы локальной доставки заключаются в обкалывании дна раны, что способствует избыточной травматизации и гидратизации тканей ран, а значит ввиду непредсказуемости побочных эффектов не является оптимальным. Во второй части нашей работы мы исследовали влияние на ранозаживление эндогенного донора NO - динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) в аэрозольной форме.

В этой части эксперимента нам удалось выявить, что обработка раны ДНКЖ замедляет процесс стягивания раны по сравнению с NO-СГП экспериментом. Замедление контракции раны может объясняться избыточной гидратацией ткани при обработке раствором ДНКЖ.

Выявление высокого содержания  $\alpha$ -актин- и виментин позитивных фибробластоподобных клеток при их, а также большой толщины слоя гран.ткани и достаточно тонкого фибринозно-лейкоцитарного слоя при морфометрическом анализе свидетельствуют о том, что в группе где применяли раствор ДНКЖ происходит более интенсивное созревание грануляционной ткани в ранах по сравнению с контрольной группой на 7

сутки. Также в группе ДНКЖ миофибробластоподобных клеток больше, чем в группе NO-СГП

При гистологическом исследовании ран после применения ДНКЖ, содержащих молекулы NO, мы обнаружили эффект усиления отложения коллагеновых волокон в новообразовавшейся соединительной ткани на 14-е сутки после операции. Этот эффект сопровождался присутствием большого количества миофибробластоподобных клеток, а также клеток экспрессирующих виментин. Таким образом в эксперименте с ДНКЖ, как и с NO-СГП происходит увеличение числа миофибробластов в новообразующейся соединительной ткани.

Известно, что миофибробласты в области раны активно образуют компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген и фибронектин, виментин, а также различные цитокины способствующие развитию фиброза в ткани [43]. Кроме того, миофибробласты присутствуют в большом количестве в фибропролиферативных гипертрофических рубцах [100] Беря во внимание литературные данные и результаты первой части исследования, мы не можем исключить, что увеличенное отложение компонентов внеклеточного матрикса и присутствие большого количества миофибробластов в раневой области, вызывается газовым потоком содержащим NO и при не соблюдении рекомендуемых временных значений для обработки раны NO-СГП, может приводить к формированию гипертрофических рубцов.

Таким образом, полученные нами данные говорят о перспективности использования доноров оксида азота NO-СГП, генерируемый аппаратом «Плазон», и ДНКЖ аэрозоль для профилактики и ускоренной терапии заживления ран.

## 6. ВЫВОДЫ

1. Воздействие NO-СГП на раневую поверхность полнослойной кожной раны у крыс вызывает:

- увеличение формирующегося слоя грануляционной ткани и истончение фибринового слоя в ране на 7-е и 14-е сутки ранозаживления, а также увеличение нейтрофильной инфильтрации на 7-е сутки заживления раны.
- увеличение числа миофибробластов и клеток экспрессирующих виментин в грануляционной ткани на 14-е сутки, что сопровождалось прогрессивным затягиванием раны

2. Нанесение ДНКЖ на раневую поверхность полнослойной кожной раны у крыс вызывает:

- формирование тонкого фибринозно-лейкоцитарного слоя на 7-е, 14-е, 21-е сутки после нанесения раны
- усиленное отложение коллагеновых волокон на 7-е и 14-е сутки ранозаживления, которое сопровождалось присутствием большого числа миофибробластов и клеток экспрессирующих виментин

3. Изученные параметры раневого заживления доказали благоприятное терапевтическое воздействие обоих изученных доноров NO у крыс на 4-е – 21-е сутки. При этом наиболее выражены положительные эффекты обоих доноров NO были выявлены на 7-е сутки ранозаживления.

Автор выражает огромную благодарность Бутенко Александре Валерьевне - аспирантке «Института регенеративной медицины» Первого Московского Государственного Медицинского Университета им. И.М. Сеченова.



## 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арустамова А. А., Покровский М. В., Покровская Т. Г., Якушев А. А., Гудырев В. И., Барсук О. С., Корокин М. В. Белоус А. С., Влияние фактора роста эндотелия сосудов *vegf* на выработку *no* // Актуальные проблемы медицины. 2011. №4 (99).
2. Беленичев И. Ф., Черний В. И. и др. Рациональная нейропротекция // 2009.
3. Воронцова О.Н., Бондаренко Н.А. Участие оксида азота в механизмах быстрого изменения состояния центральных дофаминовых рецепторов. *Нейрохимия*. 2003. Т. 20. С. 206-211.
4. Ивануса С.Я., Рисман Б.В., Литвинов О.А., Зубарев П.Н. Современные принципы лечения гнойных ран: Учебное пособие для слушателей факультета подготовки врачей и ординаторов по специальности «Хирургия»/С.Я. Ивануса, П.Н. Зубарев, Б.В. Рисман, О.А. Литвинов— СПб.: «Онли-Пресс», 2017.—36 с.,
5. Левченкова О.С., Новиков В.Е. Индукторы регуляторного фактора адаптации к гипоксии // *Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова*. 2014. №2.
6. Мартусевич, А. К., Ашихмин, С. П., Давыдюк, А. В. Перетягин, С. П., (2014). Депонированные формы оксида азота: биомедицинские аспекты. *Вятский медицинский вестник*, (3-4), 18-24.
7. Новиков В. С., Пожилова Е. В., Левченкова О. С., Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция // *Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии*. 2014. №4. – С.13-21.

8. Новиков. В. Е., Левченкова О. С. Новые направления поиска лекарственных средств с антигипоксической активностью и мишени для их действия // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. - №5(51). – С. 132-138.
9. Новиков В. Е., Илюхин С. А, Влияние гипоксена на эффективность кислоты ацетилсалициловой при остром воспалении // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т.76, №4. – С. 32-35.
10. Новиков В. Е. Возможности фармакологической нейропротекции при черепно-мозговой травме // ПФБН. 2007. – Т.7, №2. – С. 1500-1509.
11. Новиков В. Е., Климкина Е. И. Фармакология гепатопротекторов // Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии. 2005. – Т.4, №1. – С. 2-20.
12. Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Левченкова О. С., Регуляторная роль митохондриальной поры и возможности её фармакологической модуляции // Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии. 2014. №3. – С.13-19.
13. Пожилова Е.В., Новикова А.В., Новиков В.Е., Фармакодинамика и клиническое применение препаратов на основе гидроксипиридина // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2013. Т.12, №3. – С. 56-66.
14. Сайфутдинов Р. Г., Роль оксида азота при заболеваниях внутренних органов Вестник современной клинической медицины. 2009. №3.
15. Серая И.П. Современные представления о биологической роли оксида азота / И.П. Серая, Я.Р. Нарциссов // Успехи совр. биологии. 2002. -Т. 122, №3.-С. 249-258.
16. Свистунов А.А., Будник И.А., Литвицкий П.Ф., Цымбал А.А., (2017). Экспериментальное и клиническое обоснование применения

электромагнитных волн терагерцевого диапазона на частотах излучения и поглощения оксида азота и кислорода при различных формах патологии. Вестник Российской академии медицинских наук, 72 (5), 365-374.

17. Цымбал, А. А., Андронов Е. В., Киричук, В. Ф., Смышляева, И. В., Антипова, О. Н., (2012). Влияние электромагнитного излучения терагерцевого диапазона на частотах оксида азота на показатели газового и электролитного состава крови при стрессе. Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке», 14 (12), 385-386.

18. Эпителиальные ткани: учебник / Е.А. Шубникова. –М.: Изд-во МГУ, 1996

19. Образование динитрозильных комплексов железа в митохондриях сердца / К. Б. Шумаев и др. // Биофизика. - 2010. - Т : 55, N 3. - С. 460-466.

20. Юрьева, О. В., Дубровина, В. И. (2012). Роль сигнальных систем циклических нуклеотидов в регуляции патогенеза. Acta Biomedica Scientifica, 159-163.

21. Экспериментальное исследование противоопухолевой активности ингибитора синтаз оксида азота T1023 // Молекулярная медицина. – 2015. - №1. - С. - 61-64.

22. 29 рекомендаций ВОЗ по профилактике хирургических инфекций и возникновения микроорганизмов, устойчивых к противомикробным препаратам [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/03-11-2016-who-recommends-29-ways-to-stop-surgical-infections-and-avoid-superbugs>.

23. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. Lancet. 1994 May 14; 343(8907):1199-206. doi: 10.1016/s0140-6736(94)92405-8.

24. Andreyev-Andriyevsky, A.A., et al., Penile erectile activity of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*, 2011 24(4): p. 217-223.
25. Andreas F. N., Englert NO-sensitive guanylyl cyclase in the lung. doi.org/10.1111/bph.15345
26. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 2013, Mark Allen Group. doi: 10.12968/jowc.2013.22.8.407
27. Bernhard Brüne, Jie, Andreas. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis, *Kidney International*, Volume 63, Supplement 84, 2003,. doi.org/10.1046/j.1523-1755.63.s84.6.x
28. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radical Res.* 1999;
29. Barraud, N., Kelso, M., Kjelleberg, S., Rice, S., 2014. Nitric Oxide: A Key Mediator of Biofilm Dispersal with Applications in Infectious Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 31–42. doi:10.2174/1381612820666140905112822
30. Burgova, E.N., et al., Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress experimental endometriosis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 2014 727: p. 140-147.
31. Burgova, E.N., et al., The inhibiting effect of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands on the growth of endometrioid tumors in rats with experimental endometriosis. *Cell biochemistry and biophysics*, 2019 77(1): p. 69-77.

32. Cañedo-Dorantes, L., Cañedo-Ayala, M. 2019. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*, 2019, 1–15. doi:10.1155/2019/3706315
33. Carpenter, A. W., Schoenfisch, M. H. (2012). Nitric oxide release: Part II. Therapeutic applications. *Chemical Society Reviews*, doi:10.1039/c2cs15273h
34. Coneski P.N, Schoenfisch M.H. Nitric oxide release: part III. Measurement and reporting. *Chem Soc Rev*. 2012; 41(10):3753-8.
35. Chertok V.M., Zenkina V.G., Chertok A.G., Endotelial-dependent of the regulation of angiogenesis. *Tsitologiya*. 2017; 59(4):243-58.
36. Cañedo-Dorantes, L., Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*, 2019, 1–15. doi:10.1155/2019/3706315
37. Danon D., et al., Treatment of human ulcers by application of macrophages prepared from a blood unit. *Exp. Ger.* 1998. doi.org/10.1016/S0531-5565(97)00094-6
38. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan; 82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
39. Daiber, A., Xia, N., Oelze, M., Hanf, A., Steven, S., Li, H. Kröller-Schön, S., (2019). New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 187. doi:10.3390/ijms20010187.
40. Dalle-Donne I, Colombo R, Rossi R, Milzani A., Giustarini D., Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006 Apr; 52(4):601-23. doi: 10.1373/clinchem.2005.061408.

41. Demidova-Rice T. N., Herman I. M., Hamblin M. R., Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012; 25(7):304-314. doi:10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0
42. Dedkova E. N., Blatter L. A., Seidlmayer L. K., Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Jun; 59:41-54. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.016.
43. Ding Q, Olman M. A., Gladson C. L., Hayasaka H., Wu H., Focal adhesion kinase (FAK)-related non-kinase inhibits myofibroblast differentiation through differential MAPK activation in a FAK-dependent manner. *J Biol Chem*. 2008 doi: 10.1074/jbc.M803645200.
44. Förstermann U., Sessa W. C., Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr; 33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
45. Giliano, N.Y., et al., Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and apoptosis: studies with HeLa cell cultures. *Nitric Oxide*, 2011 24(3): p.151.
46. Fitzsimmons, R.J., A pulsing electric field (PEF) increases human chondrocyte proliferation through a transduction pathway involving nitric oxide signaling / R.J. Fitzsimmons, S.L. Gordon, J. Kronberg et al. // *J. Orthop. Res.* — 2008. — Vol. 26. — P.854—859.
47. Giulivi C., Mitochondria as generators and targets of nitric oxide. *Novartis Found Symp*. 2007; 287:92-100; discussion 100-4.
48. Gurtner GC, Longaker M. T., Werner S, Barrandon Y., Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15; 453(7193):314-21. doi: 10.1038/nature07039.

49. Gosain A, DiPietro L. A., Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004 Mar; 28(3):321-6. doi: 10.1007/s00268-003-7397-6.
50. Hanania T, Johnson K. M., Regulation of neurotransmitter release by endogenous nitric oxide in striatal slices. *Eur J Pharmacol.* 1998 Oct 23; 359(2-3):111-7. doi: 10.1016/s0014-2999(98)00636-0.
51. Han, G., Macherla, C., Friedman, J. M., Nguyen, Martinez, L. R., L. N., Chi, Y., Nosanchuk, J. D., (2012). Nitric Oxide–Releasing Nanoparticles Accelerate Wound Healing by Promoting Fibroblast Migration and Collagen Deposition. *The American Journal of Pathology*, 180(4), 1465–1473. doi:10.1016/j.ajpath.2011.12.013
52. Hossain, S., Boon, E. M., Nisbett, L. M., (2017). Discovery of Two Bacterial Nitric Oxide-Responsive Proteins and Their Roles in Bacterial Biofilm Regulation. *Accounts of Chemical Research*, 50(7), 1633–1639. doi:10.1021/acs.accounts.7b00095
53. Hrabie J. A., Wink D. A., Keefer L. K., Klose J. R., New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem.* 1993; 58:1472–1476.
54. Jack R., Lancaster Jr. Historical origins of the discovery of mammalian nitric oxide (nitrogen monoxide) production/physiology/pathophysiology. 2020. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113793.
55. Jorch S. K., Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.* 2017. 7; 23(3):279-287. doi: 10.1038/nm.4294.
56. Kaplani, K., Skondra, F. G., Armenis, V., Champeris Tsaniras, S., Taraviras, S., Koutsis, S., Karantzelis, N., 2018. Wound healing related agents: Ongoing research and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 129, 242–253. doi:10.1016/j.addr.2018.02.007

57. Keylock KT, Wallig M. A., DiPietro L.A., Woods J.A., Vieira V.J., Schrementi M., Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Jan; 294(1): R179-84. doi: 10.1152/ajpregu.00177.2007.
58. Kobayashi, Y., The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2010. 88(6), 1157–1162. doi:10.1189/jlb.0310149
59. Kapelko, V.I., et al., Protective effects of dinitrosyl iron complexes under oxidative stress in the heart. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017
60. Larouche J, Martino M. M., Maruyama K, Sheoran S, Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2018 Jul 1; 7(7):209-231. doi: 10.1089/wound.2017.0761.
61. Landén N. X., Stahle M., Li D., Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(20):3861-3885. doi:10.1007/s00018-016-2268-0
62. Liu, T., et al., Hemodynamic effects of glutathione-liganded binuclear dinitrosyl iron complex: evidence for nitroxyl generation and modulation by plasma albumin. *Molecular pharmacology*, 2018 93(5): p. 427-437.
63. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997 Apr 4; 276(5309):75-81. doi: 10.1126/science.276.5309.75.
64. Morris M., Daintree C., Hanna S., Edixomed's Nitric Oxide Generating Dressing Achieves Significant Improvement in Healing Diabetic Foot Ulcers. *Cision PR Nesware*; 10 June 2015. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.prnewswire.co.uk/news-releases/edixomeds-nitric-oxide-generating->



dressing-achieves-significant-improvement-in-healing-diabetic-foot-ulcers-506792211.html.

65. Malone-Povolny, M. J., Schoenfisch, M. H., Maloney, S. E., (2019). Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 1801210.doi:10.1002/adhm.201801210

66. Mikoyan, V.D., et al., The binuclear form of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands in animal tissues. *Nitric Oxide*, 2017 62: p. 1-10.

67. Monaco J. L., Lawrence W.T., Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg*. 2003 Jan; 30(1):1-12. doi: 10.1016/s0094-1298(02)00070-6.

68. Nagle D. G., Zhou Yu-Dong. - Natural Product-Derived Small Molecule Activators of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) // *Current Pharmaceutical Design*. -2006. – Vol.12, N21. – P. 2673-2688.

69. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002 Dec 19-26; 420(6917):846-52. doi: 10.1038/nature01320.

70. Neufeld, B. H., Reynolds, M. M. (2016). Critical nitric oxide concentration for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm reduction on polyurethane substrates. *Biointerphases*, 11(3), 031012. doi:10.1116/1.4962266

71. Nyström, A., Bruckner-Tuderman, L. (2018). Matrix molecules and skin biology. 2020. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. doi:10.1016/j.semcd.2018.07.025

72. Omar S. A., Webb A.J., Nitrite reduction and cardiovascular protection. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Aug; 73:57-69. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.012.

73. Pisarenko, O., et al., Protective efficacy of dinitrosyl iron complexes with reduced glutathione in cardioplegia and reperfusion. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2019 471(4): p.583-593.

74. Pekshev A.V., Shekhter A.B., Sharapov N.A., Vagapov A.B., Vanin A.F. Study of plasma-chemical NO-containing gas flow for treatment of wounds and inflammatory processes. 2018. Nitric Oxide, 73, 74-80.  
doi:10.1016/j.niox.2017.06.002
75. Rodrigues, M., Bonham, C. A., Kosaric, N., Gurtner, G. C., (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. Physiological Reviews, 99(1), 665–706. doi:10.1152/physrev.00067.2017
76. Rasik A. M., Shukla A., Antioxidant status in delayed healing type of wounds. Int J Exp Pathol. 2000 Aug; 81(4):257-63. doi: 10.1046/j.1365-2613.2000.00158. x.
77. Römling, U., Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. Journal of Internal Medicine, 272(6), 541–561. doi:10.1111/joim.12004,
78. Ridnour, L. A., Vitek, M. P., Isenberg, J. S., Thomas, D. D., Yeung, N., Windhausen, A. N., (2007). Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(43), 16898–16903. doi:10.1073/pnas.0702761104
79. Ridnour, L. A., Mancardi, D., Wink, D. A., Espey, M. G., Miranda, K. M., Thomas, D. D., Paolocci, N., 2004. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. Biological Chemistry, 385(1), 1–10.  
doi:10.1515/bc.2004.001
80. Rahban S. R., Garner W. L., Fibroproliferative scars. Clin Plast Surg. 2003 Jan; 30(1):77-89. doi: 10.1016/s0094-1298(02)00069-x.

81. Schwentker A., Weller R., Billiar T. R. Vodovotz Y., Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide* (2002). 7(1), 1–10.  
doi:10.1016/s1089-8603(02)00002-2
82. Shekhter A.B., Rudenko T.G., Serezhenkov V.A., Vanin A.F, Pekshev A.V., Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds, *Nitric Oxide* 12 (2005) 210-219.
83. Sorg, H., Hager, S., Tilkorn, D.J., Hauser, J., Mirastschijski, U. (2016). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, 58(1-2), 81–94. doi:10.1159/000454919
84. Shaw, C. A., Rossi, A. G., Webb, D. J., Megson, I. L. 2009. Cyclic GMP protects human macrophages against peroxynitrite-induced apoptosis. *Journal of Inflammation*, 6(1), 14. doi:10.1186/1476-9255-6-14
85. Schulz, G., Stechmiller, J. (2006). Wound Healing and Nitric Oxide Production: Too Little or Too Much May Impair Healing and Cause Chronic Wounds. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 5(1), 6–8. doi:10.1177/1534734606286633
86. Saifutdinov, R.G. *Electron Pfrfmagnetic Resonance in Biochemistry and Medicine* / R.G. Saifutdinov, L.I. M.G. Voronkov., Larina, T.I. Vakulskaya,— New York, 2000. - 268 p.
87. Shaw, C. A., Webb, D. J., Rossi, A. G., Megson, I. L. (2009). Cyclic GMP protects human macrophages against peroxynitrite-induced apoptosis. *Journal of Inflammation*, 6(1), 14. doi:10.1186/1476-9255-6-14
88. Sequeira S. M., Carvalho A. P., Malva J. O., Carvalho C. M., Presynaptic N-methyl-D-aspartate receptor activation inhibits neurotransmitter release through

- nitric oxide formation in rat hippocampal nerve terminals. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001 Apr 18; 89(1-2):111-8. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00069-9.
89. Thomas, D. D., Cheng, R. Y., Ridnour, L. A., Miranda, K. M., Kesarwala, A. H., Heinecke, J. L., Switzer, C. H., (2015). Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. *Free Radical Biology and Medicine*, 87, 204–225. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.002
90. Tang L, Ziolo M. T., Wang H., Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure. *Pharmacol Ther*. 2014 Jun; 142(3):306-15. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.013.
91. Taylor C. T., Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Apr; 30(4):643-7. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.181628.
92. Timoshin, A.A., et al., The hypotensive effect of the nitric monoxide donor Oxacom at different routes of its administration to experimental animals. *European journal of pharmacology*, 2015 765: p. 525-532.
93. Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2010 Aug 1; 49(3):307-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004
94. Valko M, Moncol J, Leibfritz D, Cronin MT, Telser J., Mazur M., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; . doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
95. Vanin A. F., Adamyan L. V., Burgova E. N., Dinitrosyl iron complexes with glutathione suppress surgically induced experimental endometriosis in rats // *Austin Journal of Reproductive Medicine & Infertility*. – 2015. – T. 2. – №. 4. – C. 1019-1019.

96. Vozenin MC, Ridi R, Lefaix J. L., Martin M., Daburon F., Biard D.S., The myofibroblast markers  $\alpha$ -SM actin and  $\beta$ -actin are differentially expressed in 2 and 3-D culture models of fibrotic and normal skin. *Cytotechnology*. 1998; 26(1):29-38. doi:10.1023/A:1007992824966
97. Vanin, A.F., *Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms*. 2019: Cambridge Scholars Publishing.
98. Wendt, M., Schiemann, W., Smith, J. Transforming growth factor- $\beta$ -induced epithelial–mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene* 29, (2010). doi.org/10.1038/onc.2010.377
- 99 Witte M.B., Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery*, (2002), 183(4), 406–412. doi:10.1016/s0002-9610(02)00815-2
100. Wu, S.C., et al., Water-soluble dinitrosyl iron complex (DNIC): a nitric oxide vehicle triggering cancer cell death via apoptosis. *Inorganic chemistry*, 2016 55(18): p. 9383-9392.
101. Wallace H.A, Basehore B.M, Zito P.M. *Wound Healing Phases*. StatPearls Publishing LLC. 2019
102. Weinberger B., Laskin D. L., Heck D. E., Nitric oxide in the lung: therapeutic and cellular mechanisms of action. *Pharmacol Ther*. 1999 Dec; 84(3):401-11. doi: 10.1016/s0163-7258(99)00044-3.
103. Xue M, Jackson C. J., Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015; 4(3):119–136. doi: 10.1089/wound.2013.0485

104. Yang, T., Chandrawati, R., Zelikin, A. N., 2018. Progress and Promise of Nitric Oxide-Releasing Platforms. *Advanced Science*, 5(6), 1701043.  
doi:10.1002/advs.201701043
105. Ziche M., Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol*. 2000 Oct-Nov; 50(1-2):139-48.
106. Zagórska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol*. 2004; 51(3):563-85.
107. Zhao Y, Marletta M. A., Ballou D. P., Brandish P. E., A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Nat Acad Sci*. 1999; 96(26):14753-14758.