

УДК 616-003.93

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-72-80

ИВАНОВ А. Н., ПОПЫХОВА Э. Б., СТЕПАНОВА Т. В.,
ПРОНИНА Е. А., ЛАГУТИНА Д. Д.

Изменение показателей микроциркуляции при аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута на фоне экспериментального сахарного диабета у крыс

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, г. Саратов, Россия
410012, Россия, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112
e-mail: lex558452@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 12.04.19; принята к печати 18.10.19

Резюме

Введение. Микро- и макроангиопатии существенно снижают продолжительность и качество жизни пациентов с сахарным диабетом, что определяет актуальность разработки новых способов их коррекции, включая немедикаментозные. Одним из таких методов является аутотрансплантация полнослойного кожного лоскута (АТПКЛ), оказывающая дистантный стимулирующий эффект на микроциркуляцию. **Цель** – изучение влияния АТПКЛ на микроциркуляцию при аллоксановой инсулиновой недостаточности у белых крыс. **Материал и методы.** Исследования проводились на 60 самцах белых беспородных крыс, разделенных на следующие группы: контрольная, группа сравнения (крысы с аллоксановым диабетом), опытная группа, состоящая из животных с аллоксановым диабетом, которым выполнялась АТПКЛ. Микроциркуляцию кожи тыльной поверхности стопы изучали методом лазерной доплеровской флоуметрии. **Результаты.** Аллоксановая инсулиновая недостаточность вызывала нарушение микроциркуляции у крыс, что проявлялось снижением перфузии кожи тыльной поверхности стопы в ассоциации с уменьшением амплитуд эндотелиальных и нейрогенных колебаний. У животных, которым выполнялась АТПКЛ на фоне аллоксанового диабета, на 42-е сутки эксперимента наблюдалось статистически значимое ($p=0,000001$) увеличение показателя перфузии относительно группы сравнения на 43 %, что свидетельствовало об улучшении состояния микроциркуляции. При этом отмечалась нормализация механизмов модуляции кровотока в микроциркуляторном русле, что проявлялось статистически значимым повышением нормированных амплитуд эндотелиальных (на 44 %, $p=0,000047$) и нейрогенных (на 20 %, $p=0,019515$) колебаний относительно группы сравнения. **Выводы.** Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что АТПКЛ оказывает положительный эффект на состояние микроциркуляции в конечности при нарушениях углеводного обмена у крыс за счет улучшения тканевой перфузии и активности ее модуляции.

Ключевые слова: микроциркуляция, лазерная доплеровская флоуметрия, аллоксановый диабет, аутотрансплантация полнослойного кожного лоскута

Для цитирования: Иванов А. Н., Попыхова Э. Б., Степанова Т. В., Пронина Е. А., Лагутина Д. Д. Изменение показателей микроциркуляции при аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута на фоне экспериментального сахарного диабета у крыс. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2019;18(4):72–80. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-72-80.

UDC 616-003.93

DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-72-80

IVANOV A. N., POPYHOVA E. B., STEPANOVA T. V.,
PRONINA E. A., LAGUTINA D. D.

Changes in microcirculation induced by autotransplantation of skin flaps in experimental diabetes mellitus rats

Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Russia, Saratov
112 Bolshaya Kazachya street, Saratov, Russia, 410012
e-mail: lex558452@rambler.ru

Received 12.04.19; accepted 18.10.19

Summary

Introduction. Micro- and macroangiopathies significantly reduce the duration and quality of life for diabetes mellitus (DM) patients, which determines the relevance of developing new ways to treat them, including non-drug ones. One of such methods is the autotransplantation of full-thickness skin flap providing a distant stimulating effect on microcirculation. The **aim** of the study was to investigate the influence of skin flap autotransplantation on microcirculation at alloxan insulin deficiency in white rats. **Material and methods.** The studies were carried out on 60 male scrub rats divided into the following groups:

the control group, the comparison group (alloxan diabetes rats), the experimental group consisting of alloxan diabetes animals which had skin flap autotransplantations performed on them. Skin microcirculation (MC) of the dorsum of the feet was studied by laser Doppler flowmetry. **Results.** Alloxan insulin deficiency caused a violation of the MC in rats which manifested by a decrease in perfusion of the skin of the dorsum of the foot in association with a decrease in the amplitudes of endothelial and neurogenic oscillations. On the 42nd day of the experiment in alloxan diabetes animals which had skin flap autotransplantations performed on them the statistically significant increase ($p=0.000001$) in the perfusion index by 43 % was observed attesting to microcirculation improvment. This was accompanied by an increase in the normalized amplitudes value of endothelial (by 44 %, $p=0.000047$) and neurogenic (by 20 %, $p=0.019515$) perfusion fluctuations relative to rats of the comparison group. **Conclusions.** It can be concluded that skin flap autotransplantation has a positive effect on the state of MC in the feet in experimental diabetes rats due to the improvement of tissue perfusion and modulation of its activity.

Keywords: microcirculation, laser Doppler flowmetry, alloxan diabetes, skin flap autotransplantation

For citation: Ivanov A. N., Popyhova E. B., Stepanova T. V., Pronina E. A., Lagutina D. D. Changes in microcirculation induced by autotransplantation of skin flaps in experimental diabetes mellitus rats. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2019;18(4):72–80. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-4-72-80.

Введение

Ключевой функцией микроциркуляторного русла является обеспечение трофики тканей за счет реализации трансапикалярного обмена. Функционирование микроциркуляции тесно сопряжено с метаболической активностью клеток и динамически изменяется, обеспечивая гомеостатические приспособительные реакции. Кроме того, микроциркуляторные нарушения являются неотъемлемым патогенетическим звеном в возникновении и развитии различных заболеваний, а также играют решающую роль для саногенеза, обеспечивая трофическую поддержку репаративных процессов. Системные дисметаболические нарушения, такие как нарушение толерантности к глюкозе и сахарный диабет, оказывают выраженное негативное влияние на состояние микроциркуляторного русла, что, в свою очередь, приводит к усугублению метаболических нарушений в органах и тканях. Индуцированные гипергликемией нарушения микроциркуляции у пациентов с сахарным диабетом лежат в основе развития ретинопатии, нефропатии, быстрого прогрессирования атеросклероза с поражением коронарных, церебральных и периферических сосудов [1, 2]. Кроме того, было продемонстрировано, что ранние нарушения углеводного обмена, в частности, нарушение толерантности к глюкозе, является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Профилактика ангиопатий требует разработки дополнительных методов коррекции кровотока при сахарном диабете, а учитывая большое число фармакологических препаратов, которые данная категория пациентов получает в связи с основным и сопутствующими заболеваниями, особую актуальность приобретают исследования возможностей немедикаментозных методов регуляции микроциркуляции.

В физиологических и патологических условиях в качестве основного локального регулятора кровотока выступают собственные ткани организма, которые выделяют большое количество биологически активных веществ, регулирующих микроциркуляцию. Попадание этих соединений в системный кровоток в ряде случаев способно оказывать выраженное влияние на микроциркуляцию в других областях сосудистого русла. На этом принципе, в частности, основаны технологии дистантного preconditionирования миокарда [3].

Регенерация тканей представляет собой сложный комплекс процессов, координация которых происходит за счет большого числа гуморальных факторов,

многие из которых имеют и ангиотропные эффекты [3, 4]. Регенераторный потенциал и, соответственно, интенсивность продукции вазоактивных веществ у разных тканей организма различны. Так, было продемонстрировано ускорение репаративных процессов под влиянием препаратов на основе плаценты [4]. Аллотрансплантация других тканей организма, таких как бесклеточная амниотическая мембрана, печень, кожа, костный мозг, стекловидное тело, также обладает способностью стимулировать репаративные процессы [5]. В некоторых случаях при аллотрансплантации тканей наблюдаются не только локальные, но и системные стимулирующие эффекты, связанные с выделением биологически активных веществ из зоны активной регенерации в системный кровоток [5].

Использование аллотканей связано с необходимостью проведения соответствующей предварительной обработки, консервации, а также риском развития инфекционных и иммунных осложнений. В связи с этим более перспективным методом является биостимуляция аутоканями, так как она позволяет избежать указанных недостатков. В литературе имеются сведения о том, что аутоотрансплантация жировой ткани оказывает выраженный стимулирующий эффект на кровоток в микроциркуляторном русле, в частности, известны методики аутоотрансплантации большого сальника при ишемических поражениях сосудов конечностей [6]. Аутоотрансплантаты жировой ткани способны оказывать влияние не только на микроциркуляцию, но и вызывать системные изменения метаболических процессов. Так, в эксперименте на крысах было показано, что аутоотрансплантация невисцерального жира защищает от снижения толерантности к глюкозе и резистентности к инсулину и предотвращает накопление триацилглицерина в печени. При этом гистологические изменения трансплантированной ткани, проявляющиеся снижением размеров адипоцитов, инфильтрацией клетками макрофагального ряда и ее васкуляризацией, сопровождаются изменением концентрации в крови провоспалительных цитокинов [7, 8].

Ткани всех слоев кожи, включая жировую ткань подкожной клетчатки богаты различными биологически активными веществами, обладают высоким регенераторным потенциалом и способны оказывать биостимулирующее действие [9, 10]. Кроме того, в состав клеточных популяций различных слоев кожи входят различные виды лейкоцитов, являющиеся

продуцентами широкого спектра различных регуляторов регенерации [11]. В условиях эксперимента был продемонстрирован дистантный стимулирующий эффект аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута (АТПКЛ) в межлопаточной области на микроциркуляцию конечности в условиях сохраненной иннервации и при перерезке седалищного нерва у белых крыс [12]. Необходимо отметить, что аутотрансплантация кожного лоскута, ввиду его поверхностного расположения, имеет меньший риск развития побочных эффектов по сравнению с приведенными выше методами биостимуляции. Реализация эффекта АТПКЛ на микроциркуляцию в конечности при перерезке седалищного нерва у крыс ассоциирована с клеточными реакциями зоны трансплантации, пролонгацией продукции ростовых факторов и изменением баланса в крови вазоактивных биогенных аминов [13].

Учитывая патогенетическую значимость микроциркуляторных нарушений при сахарном диабете и социальную значимость его осложнений, не только научный, но и практический интерес представляет собой возможность реализации дистантного стимулирующего эффекта АТПКЛ на микроциркуляцию в условиях системных нарушений углеводного обмена.

В связи с этим **целью** исследования было изучить влияние аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута на микроциркуляцию при аллоксановой инсулиновой недостаточности у белых крыс.

Материал и методы исследования

Исследования проводили на 60 самцах белых беспородных крыс, массой 200–250 г, разделенных случайным образом на следующие группы: контрольная, которая включала 20 интактных крыс; группа сравнения – 20 животных с аллоксановым диабетом; опытная группа, состоящая из 20 животных, которым на фоне аллоксанового диабета выполняли АТПКЛ. На протяжении эксперимента животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении, свободном доступе к воде и пище. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Исследование выполнено в соответствии с рекомендациями Этического комитета СГМУ (протокол № 1 от 05 февраля 2019 г.).

За 10 мин до проведения манипуляций животных наркотизировали путем внутримышечного введения препаратов «Телазол» (*Zoetis Inc*, Испания) в дозе 0,1 мл/кг и «Ксиланит» (ООО «Нита-Фарм», Россия) в дозе 1 мг/кг веса животного.

Для моделирования нарушений углеводного обмена у крыс был использован аллоксан, введение которого позволяет формировать нарушения углеводного обмена, характерные для пациентов с сахарным диабетом I типа [14]. Диабет у крыс вызывали подкожным введением натошак 5 %-м раствора аллоксана в 9 %-м растворе NaCl в дозе 100 мг/кг веса животного [15].

АТПКЛ выполняли после достижения стойких нарушений углеводного обмена на 21-е сутки после

введения аллоксана. Так как, по данным литературы [16] стабилизация нарушений углеводного обмена у крыс с аллоксановым диабетом отмечается в период 10–21 суток.

При выполнении АТПКЛ в межлопаточной области на депилированном участке кожи иссекали полнослойный кожный лоскут размером 0,1 % от площади поверхности тела. Площадь поверхности тела рассчитывали по формуле, предложенной М. Lee (1929) в модификации Н. И. Кочетыгова (1964): $S = K \cdot W^{0,66}$, где S – поверхность тела, см²; K – 9,1 (постоянный коэффициент); W – масса тела животного в граммах. Средняя площадь кожного лоскута у животных опытной группы составила 30 (25; 37) мм². Для удаления разрушенных клеток и дезинфекции кожный лоскут последовательно обрабатывали в 3 %-м растворе перекиси водорода, 70 %-м этиловом спирте и физиологическом растворе. В межлопаточной области в ране, образованной при иссечении лоскута, между кожей и собственной фасцией формировали карман. Обработанный лоскут помещали в сформированный карман. Рану ушивали послойно наглухо [17].

Микроциркуляцию исследовали методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с использованием анализатора «ЛАКК-ОП» (НПП «Лазма», Россия). Регистрацию ЛДФ-грамм проводили у животных опытной группы на 21-е сутки после АТПКЛ (42-е сутки эксперимента), в связи с тем, что ранее был выявлен дистантный стимулирующий эффект на микроциркуляцию в условиях нормальной иннервации в течение 2 недель, а в условиях нарушенной – в течение 3 недель [17]. Для получения сопоставимых результатов в группе сравнения регистрацию ЛДФ-грамм осуществляли так же, как и в опытной группе, на 42-е сутки эксперимента. В качестве контроля использованы 20 ЛДФ-грамм интактных животных. Запись ЛДФ-грамм осуществляли путем фиксации световодного зонда на коже тыльной поверхности стопы (дистального отдела задней конечности) животного. Длительность регистрации сигнала составляла 8 мин. Определяли показатель перфузии M в перфузионных единицах (пф. ед.) и его среднеквадратическое отклонение. С помощью вейвлет-анализа определяли нормированные по СКО амплитуды (A) эндотелиальных (0,01–0,076 Гц), нейрогенных (0,076–0,2 Гц), миогенных (0,2–0,74 Гц), дыхательных (0,74–2,0 Гц) и пульсовых (2,0–5,0 Гц) колебаний. Расчет нормированных амплитуд колебаний в каждом диапазоне проводили по формуле: $(A/3СКО) \cdot 100$ [18].

Для установления диабетического статуса у животных определяли в сыворотке концентрацию глюкозы, а в цельной крови – уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) с использованием реактивов фирмы *Diagnostic Systems GmbH* (Германия) на анализаторе *Sapphire 400 (Hirose Electronic System, Япония)*.

Проявление хронического воспаления оценивали по концентрации в сыворотке крови С-реактивного (СРБ), который определяли с помощью наборов реактивов фирмы *DiaSys Diagnostic Systems GmbH* (Германия) на анализаторе *Sapphire-400 (Hirose Electronic System, Япония)*.

Таблица 1

Изменения перфузии и нормированных амплитуд колебаний кровотока у животных при аутотрансплантации полнослойного кожного лоскута на фоне экспериментального диабета

Table 1

Changes in perfusion and normalized amplitudes of blood flow oscillations in animals during autotransplantation of a skin graft on the background of experimental diabetes

Показатель	Контроль	Группа сравнения (СД)	Опытная группа (СД + АТПКЛ)
М, пф. ед.	12,7 (12,0; 13,0)	9,6 (9,1; 10,1) $p_1=0,000120$	13,7 (13,0; 14,4) $p_1=0,001728$, $p_2=0,000001$
А/ЗСКОэ, усл. ед.	17,7 (14,0; 20,0)	9,5 (8,5; 10,9) $p_1=0,001931$	13,7 (12,3; 15,4) $p_1=0,144869$, $p_2=0,000047$
А/ЗСКОн, усл. ед.	11,2 (10,3; 14,3)	10,0 (7,7; 11,3) $p_1=0,042626$	12,0 (10,1; 14,7) $p_1=0,982640$, $p_2=0,019515$
А/ЗСКОм, усл. ед.	10,3 (9,9; 10,5)	10,3 (8,0; 12,2) $p_1=0,905072$	11,3 (6,7; 13,1) $p_1=0,586447$, $p_2=0,987659$
А/ЗСКОд, усл. ед.	8,8 (7,7; 11,5)	6,7 (4,5; 9,0) $p_1=0,152407$	8,3 (4,8; 10,0) $p_1=0,446305$, $p_2=0,467252$
А/ЗСКОс, усл. ед.	6,6 (5,5; 9,3)	5,8 (3,9; 6,9) $p_1=0,371094$	6,6 (4,0; 7,5) $p_1=0,429757$, $p_2=0,792595$

Примечание: здесь и далее в каждом случае приведены медиана и интерквартильный размах; p_1 – по сравнению с контролем; p_2 – относительно группы сравнения.

Состояние ангиогенеза оценивали по концентрации в сыворотке крови фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), определяемой методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов «VEGF Rat» (*RnD Systems*, США), регистрацию показателей осуществляли на автоматическом микропланшетном спектрофотометре «EpochBioTek Instruments» (*Bio-Tek Instruments*, Inc., США).

Для оценки морфологических изменений зоны АТПКЛ мягкие ткани, включая кожу, подкожную клетчатку и трансплантированный лоскут, иссекали единым блоком и фиксировали в 10 %-м растворе нейтрального формалина. Ткани подвергали спиртовой гистологической проводке и заливали в парафин. Срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия). Микроскопию препаратов проводили при помощи микровизора проходящего света серии μ Vizo-103 (ООО «ЛОМО ФОТОНИКА», Россия).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы «Statistica 10» (*StatSoft*, США). Большинство данных не соответствовали закону нормального распределения, поэтому рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили. Для сравнения полученных показателей использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что у животных группы сравнения на

42-е сутки эксперимента наблюдалось статистически значимое снижение М по сравнению с животными в контрольной группе (табл. 1), что свидетельствовало о снижении тканевого кровотока. Это сопровождалось перераспределением вклада активных механизмов модуляции микроциркуляции. Нормированные амплитуды колебаний, обусловленные действием активных механизмов, вызывающих вазомоции, а именно – эндотелиальных и нейрогенных – на 42-е сутки эксперимента значимо снижались. Значения амплитуды миогенных осцилляций, а также параметров пассивных колебаний (дыхательных и сердечных) статистически значимо не изменялись (табл. 1).

Результаты биохимических исследований свидетельствуют, что уровень глюкозы в крови у животных с аллоксановым диабетом на 42-е сутки эксперимента имел тенденцию к увеличению, которая, однако, не достигала статистической значимости. При этом отмечался значимо увеличенный уровень гликированного гемоглобина у животных данной группы по сравнению с интактными крысами группы контроля (табл. 2). Уровень СРБ в сыворотке крови животных группы сравнения на 42-е сутки эксперимента был выше, чем в контрольной группе (табл. 3). При иммуноферментном анализе выявлено, что введение аллоксана вызывает у крыс статистически значимое увеличение концентрации в крови VEGF (табл. 3).

У животных, которым выполняли АТПКЛ на фоне аллоксанового диабета, на 42-е сутки эксперимента наблюдалось статистически значимое увеличение показателя перфузии М относительно группы срав-

Таблица 2

Изменение показателей гликемии при немедикаментозной коррекции экспериментального СД

Table 2

Changes in blood glucose indices during non-pharmacological correction of experimental diabetes mellitus

Показатель	Контроль	Группа сравнения (аллоксановый СД)	Опытная группа (СД + АТПКЛ)
Глюкоза, ммоль/л	15,7 (14,2; 17,4)	16,5 (15,8; 17,8) $p_1=0,068896$	13,0 (11,8; 21,3) $p_1=0,238030$, $p_2=0,086732$
HbA1c, %	5,5 (5,4; 6,0)	9,3 (8,0; 10,7) $p_1=0,000061$	6,7 (5,2; 7,1) $p_1=0,190228$, $p_2=0,000426$

нения на 43 % (табл. 1), что свидетельствовало об улучшении состояния микроциркуляции. При этом отмечалась нормализация механизмов модуляции кровотока в микроциркуляторном русле, что проявлялось статистически значимым повышением нормированных амплитуд эндотелиальных (на 44 %) и нейрогенных (на 20 %) колебаний относительно группы сравнения. Статистически значимых отличий величин нормированных амплитуд колебаний во всех регуляторных диапазонах у животных опытной группы на 42-е сутки эксперимента от контроля не выявлено (табл. 1).

На 42-е сутки эксперимента у животных опытной группы уровень глюкозы в сыворотке крови имел тенденцию к снижению относительно группы сравнения, однако его высокая вариабельность во всех группах животных не позволяла констатировать статистическую значимость различий (табл. 2). Вместе с тем концентрация HbA1c в крови у животных опытной группы на 42-е сутки эксперимента была значимо ниже, чем у крыс группы сравнения, и не имела различий с контролем (табл. 2). АТПКЛ вызывала снижение содержания СРБ в крови у животных к 42 суткам эксперимента, однако его концентрация оставалась высокой по сравнению с группой контроля (табл. 3). У животных опытной группы также наблюдалась повышенная относительно контрольных значений концентрация VEGF, которая не имела значимых различий с таковой у животных группы сравнения (табл. 3).

В ходе морфологического анализа препаратов было обнаружено, что в перифокальной зоне ауто-трансплантата сосуды артериального и венозного русла полнокровны. Ауто-трансплантат был окружен рыхлой соединительной тканью с большим числом фибробластических элементов. Соединительная ткань, окружающая ауто-трансплантат, содержала множество тонкостенных полнокровных сосудов, в ее составе обнаруживались располагающиеся диффузно небольшие скопления лейкоцитов. Лейкоцитарная инфильтрация перифокальной зоны трансплантата была представлена преимущественно лимфоцитами, гистиоцитами и макрофагами. В отдельных полях зрения отмечались единичные эозинофилы.

Через 21 сутки после оперативного вмешательства (к 42-м суткам эксперимента) ауто-трансплантат истончился. У 20 % животных данной группы в нем от-

сутствовал эпидермис. У 80 % животных эпидермис ауто-трансплантата был сохранен, но резко истончен. Толщина гиподермы резко сокращалась у всех животных. Толщина дермы ауто-трансплантата в препаратах значительно варьировала. В дерме и гиподерме наблюдались полнокровные сосуды артериального и венозного русла. В составе дермы обнаруживались дегенерирующие или неизменные волосные фолликулы. Дерма ауто-трансплантата содержала большое число фибробластов, в отдельных участках была умеренно инфильтрирована лейкоцитами. В составе лейкоцитарной инфильтрации преобладали лимфоциты, клетки макрофагального ряда. В гиподерме ауто-трансплантата также отмечалось увеличение числа фибробластов, и лейкоцитарная, в основном лимфоцитарная, инфильтрация.

Полученные данные свидетельствуют, что АТПКЛ способна оказывать дистантный стимулирующий эффект на микроциркуляцию в условиях развития нарушений углеводного обмена. Это соответствует ранее полученным данным, характеризующим дистантное стимулирующее влияние ауто-трансплантата на кровоток в микроциркуляторном русле в условиях нормального углеводного обмена при сохраненной и нарушенной иннервации [17]. Полученные данные, касающиеся изменения механизмов модуляции микроциркуляции, свидетельствуют о выраженном влиянии АТПКЛ на нейрогенный компонент сосудистого тонуса, что согласуется с ранее полученными результатами, характеризующими нейропротекторные эффекты АТПКЛ, а также ее влияние на активность симпатoadренальной системы [19]. Вместе с тем отмечаются различия в реализации вазодилатирующего эффекта АТПКЛ. Так, влияния АТПКЛ на эндотелийзависимый компонент тонуса сосудов микроциркуляторного русла не наблюдалось у интактных животных и крыс с нейрорафией, выполненной непосредственно после перерезки седалищного нерва [17]. Данные настоящего исследования свидетельствуют, что при аллоксановом сахарном диабете АТПКЛ восстанавливает нарушенную эндотелийзависимую дилатацию сосудов микроциркуляторного русла, оказывая эндотелийпротекторный эффект.

Сопоставляя результаты гистологического исследования у животных с аллоксановым диабетом с полученными ранее данными [13], следует отметить, что общими чертами структурных изменений зоны

Таблица 3

Изменение показателей воспаления и ангиогенеза при немедикаментозной коррекции экспериментальной модели сахарного диабета

Table 3

Changes in the indices of inflammation and angiogenesis in non-pharmacological correction on the background of an experimental model of diabetes mellitus

Показатель	Контроль	Группа сравнения (аллоксановый СД)	Опытная группа (СД + АТПКЛ)
СРБ, мг/л	18,6 (18,5; 19,3)	20,6 (19,9; 22,0) $p_1=0,000600$	19,3 (19,3; 20,4) $p_1=0,025348$, $p_2=0,043976$
VEGF, пг/мл	9,4 (7,3; 15,7)	85,2 (79,6; 97,5) $p_1=0,000453$	83,3 (78,9; 86,3) $p_1=0,001033$, $p_2=0,286423$

АТПКЛ являются деградация эпидермиса, истончение дермы и гиподермы аутоотрансплантата, умеренная лейкоцитарная инфильтрация с преобладанием лимфоцитов и макрофагов. Деградация отдельных компонентов аутоотрансплантата и лейкоциты, его инфильтрирующие, могут обуславливать выделение в кровоток широкого спектра биологически активных веществ, обладающих вазомоторной активностью [20]. Вместе с тем у животных с аллоксановым сахарным диабетом не выявлено большого числа эозинофилов в дерме аутоотрансплантата, как было обнаружено в предыдущих исследованиях [13]. При этом следует отметить, что накопление эозинофилов в аутоотрансплантате, с одной стороны, представляет собой источник ростовых факторов и, в частности, VEGF [21], с другой – является индикатором дегрануляции тучных клеток, которые выделяют различные вазоактивные соединения [11]. Было продемонстрировано, что введение аллоксана крысам значительно снижает число тучных клеток в коже [22]. В этой связи, вероятно, что малое число эозинофилов в составе аутоотрансплантата у крыс с аллоксановым диабетом обусловлено снижением интенсивности дегрануляции тучных клеток.

В качестве механизма реализации дистантного стимулирующего действия в условиях нормального углеводного обмена ранее была описана способность АТПКЛ пролонгировать продукцию ростовых факторов, в частности, VEGF, выделяемого различными клетками, включая эозинофилы [20]. В настоящем исследовании не выявлено значимых изменений концентрации VEGF в крови у животных, что согласуется с особенностями клеточных реакций аутоотрансплантата. Также следует отметить высокий уровень данного фактора в крови у животных группы сравнения, обусловленный, вероятно, системной альтерацией эндотелия гипергликемией [23, 24]. В этой связи, вероятно, по механизму отрицательной обратной связи происходит блокирование его продукции клетками аутоотрансплантата.

Таким образом, механизм реализации дистантного стимулирующего действия аутоотрансплантации на микроциркуляцию в условиях аллоксанового диабета у крыс имеет особенности, которые связаны с регуляцией эндотелийзависимого компонента тонуса

сосудов, клеточным составом и выделением биологически активных веществ аутоотрансплантата. Комплекс процессов, лежащих в основе дистантного стимулирующего действия АТПКЛ на микроциркуляцию в условиях нарушенного углеводного обмена, требует дальнейшего изучения.

Согласно данным литературы [25, 26] патофизиологическое воздействие аллоксана определяется, с одной стороны, диабетогенным влиянием на β -клетки поджелудочной железы, а с другой – токсическим, вызывающим их дегенеративное повреждение и гибель. Белок – переносчик глюкозы GLUT2 воспринимает аллоксан как аналог глюкозы и транспортирует его через мембрану в цитоплазму β -клеток, где он накапливается и оказывает токсическое действие, способствуя образованию активных форм кислорода и свободных радикалов. Диабетогенный эффект аллоксана связан с его способностью ингибировать, стимулированную глюкозой, секрецию инсулина, что обусловлено окислением тиоловой группы глюкокиназы – фермента, участвующего в превращении глюкозы. Аллоксан широко используется для индукции экспериментального сахарного диабета различной степени тяжести у животных, таких как кролики, крысы, мыши и собаки [27]. Тяжесть развивающегося диабета зависит от дозы аллоксана. Используемая в нашей работе дозировка 100 мг/кг вызывает среднюю степень тяжести нарушений углеводного обмена, что позволяет избежать гибели животных [27]. Развитие аллоксанового диабета характеризуется фазными колебаниями уровня глюкозы в раннем периоде, а стабильность нарушений углеводного обмена достигается в период 10–21 суток [16]. В этой связи для оценки нарушений углеводного обмена был использован уровень HbA1c в крови, который у человека характеризует уровень гликемии за последние 2–3 месяца и коррелирует с развитием осложнений сахарного диабета [28]. Учитывая, что продолжительность жизни эритроцитов крысы по сравнению с человеком вдвое меньше и составляет, по разным данным, от 49 до 55 дней [29], то период гликемии, характеризуемый HbA1c в крови, также сокращается до 1–1,5 месяцев и соответствует общей продолжительности эксперимента. При этом нами выявлены значимые различия в концентрации HbA1c в крови

у животных опытной и сравнительной групп. Нормализация концентрации HbA1c в крови у животных опытной группы характеризует уменьшение уровня и периода гипергликемии, что позволяет выделить метаботропный эффект АТПКЛ. Данный эффект АТПКЛ может обуславливать восстановление кровотока в микроциркуляторном русле, то есть ее дистантное стимулирующее действие.

Аллоксановая модель диабета, согласно данным литературы, характеризуется развитием обратимых нарушений углеводного обмена. Так, показано, что через 2 месяца после индукции диабета средней дозой аллоксана секреция инсулина восстанавливается примерно на 45,4 %, а иммуномодуляция фталгидразидом натрия способна значительно улучшить результат – до 59,5 % [30]. Ранее были описаны прорегенеративные эффекты АТПКЛ [19], поэтому механизм метаботропного антигипергликемического действия может быть связан со стимуляцией восстановления островкового аппарата поджелудочной железы. Наличие иммуномодулирующего действия АТПКЛ подтверждает обнаруженное в данной работе снижение концентрации СРБ в сыворотке крови у животных опытной группы относительно группы сравнения.

Ограничения настоящего исследования касаются однократной регистрации ЛДФ-грамм у животных на 42-е сутки эксперимента, так как реализация метода у крыс сопряжена с введением наркоза, а многократная наркотизация животных и увеличение дозы для более продолжительной анестезии могут оказать влияние на показатели кровотока в микроциркуляторном русле. Кроме того, для оценки развития аллоксанового диабета обычно используют уровень глюкозы, однако это требует 12-часового голодания, что сопровождается дополнительным стрессом у животных, ассоциированным с неизбежной активацией симпатoadреналовой оси, оказывающей выраженное влияние на состояние микроциркуляции, нежелательное при проведении данной работы. Представленные данные свидетельствуют, что отсутствие 12-часового периода голодания перед забором крови характеризуется значительной вариабельностью уровня глюкозы во всех группах, включая интактных животных, поэтому мониторинг концентрации глюкозы в сыворотке крови при проведении настоящей работы менее информативен по сравнению с определением уровня HbA1c.

Таким образом, реализация дистантного стимулирующего действия АТПКЛ на микроциркуляцию взаимосвязана с ее метаботропным эффектом, проявляющимся снижением уровня и продолжительности гипергликемии. Дальнейшее исследование метаботропного и иммуномодулирующего эффектов АТПКЛ при нарушениях углеводного обмена обуславливает новые перспективы развития терапевтических стратегий, направленных на сохранение остаточной секреции инсулина у больных сахарным диабетом I типа, а также у лиц с нарушением толерантности к глюкозе.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» МЗ РФ «Разработка технологий медикаментозной и немедикаментозной коррекции микроциркуляторных нарушений при сахарном диабете, сопровождающемся абсолютной недостаточностью инсулина, в условиях эксперимента» (регистрационный номер АААА-А19-119021190053-0).

Acknowledgements

The study was performed in the framework of the state assignment of the «Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky» Ministry of Health of Russia «Development of technologies for drug and non-drug correction of microcirculatory disorders in diabetes mellitus, accompanied by absolute insulin deficiency, in experimental conditions» (registration number АААА-А19-119021190053-0).

Литература / References

1. Hammes H-P. Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. *J Diabetes and its Complications*. 2003; 17(2):16–19.
2. Huang Y, Cai X, Mai W, Li M, Hu Y. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2016;23(355):i5953. Doi: 10.1136/bmj.i5953.
3. Феномены пре- и посткондиционирования: от старого принципа к новой стратегии терапии / С. Г. Журавский, М. М. Галагудза, М. С. Просвирина, С. А. Иванов // Бюл. федер. центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова. – 2012. – № 5. – С. 17–29. [Zhuravsky SG, Galagudza MM, Prosvirina MS, Ivanov SA. Pre- and postconditioning phenomena: from old principle to a new therapeutic strategy. *Byulleten' federal'nogo centra serdca, krovi i endokrinologii im. V. A. Almazova*. 2012;5:17–29. (In Russ.)].
4. Громова О. А., Торишин И. Ю., Волков А. Ю. и др. Элементный состав препарата Лаеннек и его ключевая роль в фармакологическом воздействии препарата // Пласт. хир. и косметология. – 2010. – № 4. – С. 1–7. [Gromova OA, Torshin IYu, Volkov Ayu et al. The elemental composition of the drug Laennec and its key role in the pharmacological effects of the drug. *Plastic surgery and cosmetology*. 2010;4:1–7. (In Russ.)].
5. Галимова В. У., Камилов Ф. Х., Газдалиева Л. М. Влияние хирургического лечения посттравматической субатрофии глаза на уровень оксида азота в плазме крови и слезной жидкости // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. – 2007. – № 78. – С. 58–60. [Galimova VU, Kamilov FH, Gazdaliev LM. Influence of surgical treatment of post-traumatic subatrophy of the eye on the level of nitric oxide in the plasma of the tear and tear fluid. *Vestnik Orenburgskogo gos. un-ta*. 2007;78:58–60. (In Russ.)].
6. Султанов Д. Д., Каримов Т. Н. Реваскуляризация при дистальных поражениях артерий верхних конечностей // Вестн. Авиценны. – 2012. – № 2 (51). – С. 167–173. [Karimov TN, Sultanov DD. Revascularization in distal lesions of upper extremities arteries. *Vestnik Avicenny*. 2012;2(51):167–173. (In Russ.)].
7. Foster MT, Shi H, Softic S et al. Transplantation of non-visceral fat to the visceral cavity improves glucose tolerance in mice: investigation of hepatic lipids and insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2011;54(11):2890–2899. Doi: 10.1007/s00125-011-2259-5.
8. Hocking SL, Stewart RL, Brandon AE. Subcutaneous fat transplantation alleviates diet-induced glucose intolerance

and inflammation in mice. *Diabetologia*. 2015;58(7):1587–1600. Doi: 10.1007/s00125-015-3583-y.

9. Гистофармакологические исследования кожи (наш опыт) / В. И. Ноздрин, Т. А. Белоусова, В. И. Альбанова, О. И. Лаврик. – М., 2006. – 376 с. [Nozdryn VI, Belousova TA, Albanova VI, Lavrik OI. *Histopharmacological studies of the skin (our experience)*. Moscow, 2006:376. (In Russ.)].

10. Park D, Kim Y, Kim H. Hyaluronic Acid Promotes Angiogenesis by Inducing RHAMM-TGF β Receptor Interaction via CD44-PKC δ . *Mol Cells*. 2012;33(6):563–574. Doi: 10.1007/s10059-012-2294-1.

11. Храмова Ю. С., Арташян О. С., Юшков Б. Г. и др. Влияние тучных клеток на репаративную регенерацию тканей с разной степенью иммунологической привилегированности // Цитология. – 2016. – № 58 (5). – С. 356–363. [Khramtsova YS, Artashyan OS, Yushkov BG, Volkova YL, Nezgovorova NY. *The influence of mast cells on reparative regeneration of tissues characterized by various degrees of immune privilege*. *Cell and Tissue Biology*. 2016;10(5):378–386. (In Russ.)]. Doi: 10.1134/S1990519X16050060.

12. Методы диагностики эндотелиальной дисфункции / А. Н. Иванов, А. А. Гречихин, И. А. Норкин, Д. М. Пучиньян // Регионар. кровообращение и микроциркуляция. – 2014. – № 13 (4). – С. 4–11. [Ivanov AN, Grechikhin AA, Norkin IA, Puchinyan DM. *Methods of endothelial dysfunction diagnosis*. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2014;13(4):4–11. (In Russ.)]. Doi: 10.24884/1682-6655-2014-13-4-4-11.

13. Клеточные механизмы дистантного стимулирующего влияния аутоотрансплантационного кожного лоскута на микроциркуляцию / А. Н. Иванов, О. В. Матвеева, И. Е. Шутров, Д. Д. Лагутина // Вестн. новых мед. технологий. – 2016. – Т. 23, № 2. – С. 72–78. [Ivanov AN, Matveeva OV, Shutrov IE, Lagutina DD. *Cellular mechanisms of the distant stimulating effect of an autografted skin flap on microcirculation*. *Bulletin of new medical technologies*. 2016;23(2):72–78. (In Russ.)]. Doi: 10.12737/20428.

14. Гвазава И. Г., Роговая О. С., Борисов М. А. Патогенез сахарного диабета 1 типа и экспериментальные модели на лабораторных грызунах // ACTA NATURAE. – 2018. – Т. 10, № 1 (36). – С. 25–35. [Gvazava IG, Rogovaya OS, Borisov MA. *Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and experimental models in laboratory rodents*. *ACTA NATURAE*. 2018;10(1):25–35. (In Russ.)].

15. Бухтиярова И. П., Дрогозов С. М., Щекина Е. Г. Исследование гипогликемических свойств ралейкина на модели аллоксанового диабета у крыс // Вестн. КазНМУ. – 2014. – № 4. – С. 301–304. [Buxtiyarova IP, Drogovoz SM, Shhekina EG. *The study of the hypoglycemic properties of raleukin on the model of alloxan diabetes in rats*. *Vestnik KazNMU*. 2014;4:301–304. (In Russ.)].

16. Джафарова Р. Э. Сравнительное исследование различных моделей аллоксан-индуцированного сахарного диабета // Казан. мед. журн. – 2013. – Т. 94, № 6. – С. 915–919. [Jafarova RE. *A comparative study of various models of alloxan-induced diabetes mellitus*. *Kazan Medical Journal*. 2013;94(6):915–919. (In Russ.)].

17. Иванов А. Н., Шутров И. Е., Норкин И. А. Аутоотрансплантация полнослойного кожного лоскута как способ биостимуляции микроциркуляции в условиях нормальной и нарушенной иннервации // Регионар. кровообращение и микроциркуляция. – 2015. – № 14 (3). – С. 59–65. [Ivanov AN, Shutrov IE, Norkin IA. *Skin flap autografting as a method of microcirculation biostimulation in the conditions of normal and impaired innervation*. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2015;14(3):59–65. Doi: 10.24884/1682-6655-2015-14-3-59-65. (In Russ.)].

18. Humeau A, Koïtka A, Abraham P. Time-frequency analysis of laser Doppler flowmetry signals recorded in response to a progressive pressure applied locally on anaesthetized healthy rats. *Phys Med Biol*. 2004;49(5):843–857. Doi: 10.1088/0031-9155/49/5/014.

19. Влияние аутоотрансплантации кожного лоскута и прямой электростимуляции седалищного нерва на регенерацию нервных волокон / А. Н. Иванов, И. Е. Шутров, В. Г. Нунель, Г. А. Коршунова // Цитология. – 2017. – Т. 59, № 7. – С. 489–497. [Ivanov AN, Shutrov IE, Ninel VG, Korshunova GA. *The effect of autotransplantation of the skin flap and direct electrical stimulation of the sciatic nerve on the regeneration of nerve fibers*. *Cell and Tissue Biology*. 2017;59(7):489–497. (In Russ.)].

20. Иванов А. Н., Лагутина Д. Д., Гладкова Е. В. и др. Механизмы дистантного стимулирующего действия аутоотрансплантации кожного лоскута при повреждении периферического нерва // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2018. – Т. 104, № 11. – С. 1313–1324. [Ivanov AN, Lagutina DD, Gladkova EV, Matveeva OV, Mamonova IA, Shutrov IE, Andronova TA, Ulyanov VYu, Norkin IA. *Mechanisms of distant stimulatory action of skin autotransplantation in cases of peripheral nerve injury*. *Rus J Physiol*. 2018;104(11):1313–1324. (In Russ.)]. Doi: 10.1134/S0869813918110055.

21. Guo LB, Liu S, Zhang F, Mao GS, Sun LZ. The role of eosinophils in stroke: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(19):3643–3648.

22. Carvalho VF de, Campos LV, Farias-Filho FA, Florim LT. Suppression of allergic inflammatory response in the skin of alloxan-diabetic rats: relationship with reduced local mast cell numbers. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147(3):246–254. Doi: 10.1159/000142049.

23. Mironidou-Tzouveleki M, Tsartsalis S, Tomos C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of diabetic nephropathy of type 1 diabetes mellitus. *Curr Drug Targets*. 2011;12(1):107–114. Doi: 10.2174/138945011793591581.

24. Mahdy RA, Nada WM, Hadhoud KM, El-Tarhony SA. The role of vascular endothelial growth factor in the progression of diabetic vascular complications. *Eye*. 2010;24:1576–1584. Doi: 10.1038/eye.2010.86.

25. Можейко Л. А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета. Ч. I. Аллоксановый диабет // Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. – 2013. – № 3. – С. 26–29. [Mozheyko LA. *Experimental models for studying diabetes mellitus. Part I. Alloxan diabetes*. *Zhurn. Grodnenskogo gos. med. un-ta*. 2013;3:26–29. (In Russ.)].

26. Ighodaro OM, Akinloye OA. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina*. 2017;53:365–374. Doi: 10.1016/j.medici.2018.02.001.

27. Tripathi V, Verma J. Different models used to induce diabetes: a comprehensive review. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6(6):29–32.

28. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, Sakharkar MK. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights*. 2016;11:95–104. Doi: 10.4137/BMI.S38440.

29. Belcher EH, Harriss EB. Studies of red cell life span in the rat. *J Physiol*. 1959;146(2):217–234. Doi: 10.1113/jphysiol.1959.sp006190.

30. Danilova IG, Bulavintceva TS, Gette IF, Medvedeva SY. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;95:103–110. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.117.

Информация об авторах

Иванов Алексей Николаевич – д-р мед. наук, зав. отделением лабораторной диагностики, главный научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований НИИТОН ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» МЗ РФ, зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» МЗ РФ, e-mail: lex558452@rambler.ru.

Попыхова Эра Борисовна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» МЗ РФ, e-mail: PopyhovaEB@mail.ru.

Степанова Татьяна Вячеславовна – младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» МЗ РФ, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru.

Пронина Елена Александровна – д-р мед. наук, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» МЗ РФ, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru.

Лагутина Дарья Дмитриевна – лаборант-исследователь Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» МЗ РФ, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru.

Authors information

Ivanov Alexey N. – Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Laboratory Diagnostics, Leading Researcher of the Department of Fundamental and Clinical Experimental Research of Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Head of the Central Scientific Research Laboratory of Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: lex558452@rambler.ru.

Popyhova Era B. – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Central Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: PopyhovaEB@mail.ru.

Stepanova Tat'yana V. – Research Assistant of the Central Research Laboratory Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru.

Pronina Elena A. – Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher of the Central Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail:cnil-sgmu@mail.ru

Lagutina Darya D. – Laboratory Assistant of the Central Research Laboratory, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: cnil-sgmu@mail.ru.