

DOI: <https://doi.org/10.32345/2664-4738.1-2.2019.02>  
 УДК 616-092[616-008+616-003]

## РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ ТА НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ У ЗАГОЄННІ ОПІКОВОЇ РАНИ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

*Мироненко О.І.* (<https://orcid.org/0000-0001-5221-7218>)

*Натрус Л.В.* (<https://orcid.org/0000-0002-0416-2600>)

*Панова Т.І.* (<https://orcid.org/0000-0002-0298-802X>)

*Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна*  
*om.ua.md@gmail.com*

**Актуальність.** Ризик розвитку синдрому діабетичної стопи складає 25% протягом життя у пацієнтів із цукровим діабетом. Пригнічення загоєння виразок при цьому пов'язують з порушенням поляризації макрофагів, зменшенням біодоступності факторів росту, посиленою активацією матриксних металопротеїназ, що може бути пов'язано не тільки з вираженістю оксидативного стресу, але й нітрозативного.

**Мета.** Дослідити показники нітрозативного стресу в регенераті сполучної тканини шкіри під час загоєння опікової рани у щурів із модельованим цукровим діабетом, у порівнянні зі щурами без цукрового діабету.

**Матеріали та методи.** Використано дві групи лабораторних щурів лінії Wistar: в експериментальній групі (n=24) було змодельовано цукровий діабет та термічні опіки, у контрольній групі (n=24) – тільки опіки. Цукровий діабет було відтворено шляхом введення щурам експериментальної групи стрептозотоцину в дозі 50 мг/кг. Термічні опіки загальною площею 18–20% поверхні тіла були відтворені шляхом прикладання до шкіри щурів мідних пластинок, розігрітих у воді до 100 °С. Тварини були виведені з експерименту шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом по 6 щурів у кожній групі на 3, 7, 14 та 21 добу спостереження. У зразках тканинного регенерату методом Вестерн-блот аналізу вимірювалися показники індукцибельної NO-синтази (iNOS), 3-нітротирозинових протеїнів та судинного ендотеліального фактору росту (VEGF). Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали у сироватці крові щурів шляхом реакції з тіобарбітуровою кислотою та наступним спектрофотометричним аналізом. Вимірювані показники виражали в умовних одиницях оптичної густини (arbitrary units, a.u.).

**Результати.** Показано, що експресія індукцибельної NO-синтази (iNOS) суттєво зменшувалася під час загоєння опікової рани при цукровому діабеті порівняно з контрольною групою на 7 та 14 добу загоєння опікової рани. Так, на 7 добу рівень iNOS складав  $1,24 \pm 0,05$  a.u. в контрольній групі та  $0,72 \pm 0,03$  a.u. в експериментальній, а на 14 добу –  $0,93 \pm 0,08$  a.u. та  $0,32 \pm 0,02$  a.u., відповідно.

Статистично значущі відмінності рівня 3-нітротирозинових сполук між контрольною та експериментальною групами виявлені тільки на 3 добу спостереження:  $1,0 \pm 0,05$  та  $0,69 \pm 0,04$  a.u., відповідно.

Рівень малонового діальдегіду суттєво зростає в експериментальній групі з 3 по 14 добу спостереження, від  $0,77 \pm 0,01$  a.u. до  $8,17 \pm 0,07$  a.u., що свідчить про вираженість пероксидного окиснення ліпідів при цукровому діабеті. Статистично значуща різниця рівня МДА між контрольною та експериментальною групою спостерігалася в усі терміни спостереження: від  $4,13 \pm 0,09$  та  $0,77 \pm 0,01$  a.u., відповідно, на 3 добу до  $4,18 \pm 0,09$  та  $3,46 \pm 0,25$  a.u., відповідно, на 21 добу.

Описано позитивний кореляційний зв'язок між рівнем малонового діальдегіду та 3-нітротирозиновими сполуками ( $R=0,647$ ;  $p<0,05$ ) при цукровому діабеті. Коли в групі без цукрового діабету він був негативний ( $R=-0,528$ ,  $p<0,05$ ).

Виявлено зменшення рівня VEGF у тканинному регенераті при цукровому діабеті порівняно з контрольною групою на 3, 7 та 21 добу спостереження, що корелювало з порушеною експресією саме iNOS ( $R=-0,703$ ;  $p<0,05$ ) при цукровому діабеті. Так, на 3 добу спостереження рівень VEGF складав  $1,0 \pm 0,06$  a.u. у контрольній групі та  $0,4 \pm 0,03$  a.u. в експериментальній групі; на 7 добу –  $2,76 \pm 0,05$  та  $1,46 \pm 0,08$  a.u., відповідно; на 21 добу –  $2,61 \pm 0,09$  та  $1,26 \pm 0,06$  a.u., відповідно.

**Висновки.** При цукровому діабеті під час загоєння опікової рани відбувається локальне зменшення рівня експресії iNOS, що призводить до пригнічення утворення NO та його фізіологічних ефектів. Посилений оксидативний стрес при цьому додатково зменшує біодоступність NO через утворення пероксинітритів. Одним з важливих ефектів NO під час загоєння рани є посилення утворення VEGF. Показане нами зменшення рівня NO (через зменшену експресію iNOS) корелює зі зниженням рівня VEGF у тканинному регенераті при цукровому діабеті, що є одним з важливих факторів порушеного загоєння рани.

**Ключові слова:** цукровий діабет, загоєння рани, нітрозативний стрес, індукцибельна NO-синтаза, пероксинітрит.

**Актуальність.** Оксид азоту (\*NO) є важливим ендогенним газотрансмітером та регулятором клітинних функцій, який у дозозалежний спосіб може обумовлювати низку як фізіологічних, так і патологічних ефектів. За своєю хімічною природою, ця сполука є вільнорадикальною молекулою, що утворюється з L-аргініну за допомогою ферменту NO-синтази (NOS), є стабільною протягом лише кількох секунд, після чого у присутності молекулярного кисню зазнає перетворення в нітрит (NO<sub>2</sub>)

[1]. Існує три форми NO-синтази: ендотеліальна (eNOS), нейрональна (nNOS), а також індукцибельна (iNOS), що відіграє провідне значення при запальній реакції та експресується переважно макрофагами, нейтрофілами та епітеліальними клітинами внаслідок активації ядерного транскрипційного фактору NF-κB під дією флогенів в осередку запалення [2].

Конститутивні eNOS та nNOS генерують низькі внутрішньоклітинні концентрації молекул NO, що

опосередковують цГМФ-залежний сигналінг – як от релаксація гладеньких м'язів при вазодилатації. Більші рівні оксиду азоту продукуються переважно iNOS (меншою мірою – eNOS) під час запального процесу при загоєнні рани та забезпечують стимуляцію ангіогенезу, міграцію фібробластів, кератиноцитів та антимікробний ефект. Високі концентрації NO, що спостерігаються при деяких патологічних станах, наприклад, при цукровому діабеті, призводять до нітрозативного стресу з утворенням азотних вільних радикалів (reactive nitrogen species, RNS) – переважно шляхом їхньої взаємодії з кисневими (reactive oxygen species, ROS) – та чинять власне ушкоджувальну дію на клітинні структури [3]. Серед головних RNS виділяють  $N_2O_3$ ,  $NO_2^-$ ,  $HNO_2$ ,  $ONOO^-$ , провідним механізмом дії яких є нітрозилювання амінокислотних залишків внутрішньоклітинних поліпептидів та компонентів екстрацелюлярного матриксу з утворенням 3-нітротирозинових сполук, S-нітрозотіолів (приєднання нітрогрупи до цистеїнових амінокислотних залишків), що може призвести до активації чи інгібування функцій певних білків [4]. Варто зазначити, що 3-нітротирозин також розцінюється як гаптен, що обумовлює його потенційну роль в імунних механізмах пошкодження клітин під час хронічного запалення [5].

При багатьох патологічних процесах нітрозативний стрес тісно пов'язаний з оксидативним (дисбаланс між ROS та антиоксидантними системами): так, молекули NO взаємодіють з  $O_2^{*-}$  (супероксидними аніон-радикалами), утворюючи пероксинітрид ( $ONOO^-$ ), який є одним з найнебезпечніших метаболітів [6]. Він активує полі(АДФ-рибозо)полімеразу-1 (PARP-1), наслідком чого є пошкодження ДНК, мітохондріальна дисфункція, активація NF- $\kappa$ B та metalloпротеїназ, пригнічення антиоксидантних систем, що може негативно вплинути на процес загоєння рани та сприяти хронічному перебігу запалення [7].

Саме оксидативно-нітрозативний стрес (ROS/RNS) на тлі хронічної гіперглікемії є характерною інтегральною ланкою патогенезу діабетичної полінейропатії, мікро- та макроангіопатії судин нижніх кінцівок, що сприяє розвитку синдрому діабетичної стопи з формуванням хронічних виразок та ран, що погано загоюються [8].

**Метою** дослідження було вивчення показників нітрозативного стресу в регенераті сполучної тканини шкіри під час загоєння опікової рани у щурів із модельованим цукровим діабетом, у порівнянні зі щурами без цукрового діабету.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження процесу загоєння опікової рани при цукровому діабеті проводили на тваринній моделі з оцінкою показників нітрозативного стресу в

тканинному регенераті шкіри на 3, 7, 14 та 21 добу спостереження. Було використано 48 статевозрілих щурів-самців лінії Wistar, вагою 180-220 г, без видимої соматичної патології.

Усі маніпуляції з піддослідними тваринами проводилися з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних положень стосовно проведення експериментів із залученням тварин: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986); «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2001 р.); Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (Україна, 2006 р.); «Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах», затверджений Наказом Міністерства освіти і науки від 1 березня 2012 р. № 249; засідання Комісії з Біоетики НМУ імені О.О. Богомольця, протокол № 94 від 16 березня 2016 р.

Лабораторні тварини були розділені на дві групи: експериментальна (n=24) – з моделюванням цукрового діабету, та контрольна (n=24) – без цукрового діабету. Кожну з цих груп було поділено на 4 підгрупи (по n=6) – відповідно до терміну спостереження і виведенням з експерименту (3, 7, 14, 21 доба).

В експериментальній групі цукровий діабет викликали інтраперитоніальним введенням тваринам стрептозотину (одноразово в дозі 50 мг/кг). Через місяць в обох групах лабораторних тварин під ефірним наркозом моделювали опік шкіри шляхом накладання (з експозицією 10 секунд) на симетричні оголені частини тіла щурів двох мідних пластин у вигляді еліпсу (площею 0,0052 м<sup>2</sup>), витриманими попередньо у воді за температури 100°C протягом 10 хвилин (метод за Regas F.C., з модифікацією Gunas I., 1997 р.). Загальна площа опіку шкіри складала 18-20% поверхні тіла, що є достатнім для формування опіку II ступеня (дермального).

Після спостереження за тваринами, у вказані вище терміни (на 3, 7, 14, 21 добу) щурам одноразово інтраперитоніально робили ін'єкцію летальної дози тіопенталу натрію і виводили з експерименту шляхом декапітації.

Показниками вираженості нітрозативного стресу (RNS) у тканинному регенераті є рівень експресії iNOS та 3-нітротирозинові пептиди [9]. Показником оксидативного (ROS) стресу є накопичення продуктів пероксидного окислення ліпідів – малонового діальдегіду. Оскільки васкуляризація тканинного регенерату є вкрай важливою умовою для утворення грануляційної тканини, то VEGF обрано загальним біомаркером процесу загоєння рани [10].

У тканинному регенераті методом Вестерн-блот аналізу визначали вміст судинного ендотеліального

фактору росту VEGF, iNOS, 3-нітротирозинових протеїнів. Для приготування зразків фрагменти шкіри (200-250 мг) подрібнювали у порцеляновому тиглі і розтирали за присутності рідкого азоту до гомогенного стану. Концентрацію загального протеїну вимірювали спектрофотометрично за методом Stoscheck з модифікаціями, використовуючи спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр», РФ). Електрофоретичне розділення протеїнів зразків шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE електрофорез) проводили у вертикальній камері BioRad (США). Для ідентифікації молекулярних мас протеїнів використовували суміш забарвлених протеїнових маркерів (PageRuler, кат. № 26616, Fermentas, Литва).

Перенесення протеїнів з гелю до нітроцелюлозних мембран (діаметр пор 0.45 мкм, GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) проводили у трансфербуфері. Після блокування мембрани інкубували зі специфічними антитілами проти VEGF, iNOS, 3-нітротирозинових протеїнів (Merck, ФРН, кат. № 05-1117, 1:2000 у PBST). Детекцію комплексів антиген-антитіло проводили за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL). Візуалізацію специфічного забарвлення здійснювали на рентгенівських плівках Konica Minolta (Medical & Graphic, Inc, Японія). Отримані плівки сканували для проведення кількісного денситометричного аналізу з використанням програми TL-120 (TotalLab Ltd., США). Відносний вміст VEGF, iNOS та 3-нітротирозинових протеїнів виражали в умовних одиницях оптичної густини (arbitrary units).

Рівень 3-нітротирозину визначали за допомогою імуоферментного методу з використанням стандартного набору «Nitrotyrosine» (Голландія). Визначення вмісту малонового діальдегіду відбувалося за його реакцією з тіобарбітуровою кислотою – спектрофотометрично в довжині хвилі 523 нм.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою статистичного пакету IBM SPSS Statistics 22. Для перевірки розподілу на нормальність кількісних показників використано критерій Шапіро-Уїлка. Для перевірки статистичних гіпотез при нормальному законі розподілу було використано метод багатфакторного дисперсійного аналізу: застосовано критерій множинного порівняння непов'язаних між собою вибірок – критерій Шеффе. Цей критерій використано, тому що необхідно було порівняти експериментальну й контрольну групи тварин на всіх термінах спостереження (по 4 підгрупи в кожній групі). Для виявлення кореляційних зв'язків між кількісними ознаками було використано метод лінійної регресії з розрахунком коефіцієнту Пірсона (R), з 95% довірчим інтервалом ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Обрані періоди для дослідження (і, відповідно, поділ експериментальної та контрольної групи на 4

підгрупи в кожній) відповідали сучасним уявленням процесу загоювання рани, коли на 3 добу припадає завершення стадії запалення та розпочинається проліферація, на 7 добу – на тлі проліферації розпочинається стадія ремоделювання, на 14 добу – стадія проліферації добігає кінця, а процес відновлення архітекtonіки тканини набуває активності, на 21 добу – завершується активне ремоделювання тканини з формуванням щільного сполучнотканинного рубця.

Вивчено динаміку рівня індукбельної NO-синтази (iNOS) (рис.1) у тканинному регенераті у процесі загоювання опікової рани у шурів контрольної групи: максимальний рівень спостерігався на 7 добу, що в 1,2 та 1,3 рази перевищувало показники, на 3 та 14 добу, але, за критерієм Шеффе, ця відмінність не була статистично значущою ( $p > 0,05$ ); при множинних порівняннях середніх значень лише показник 21 доби достовірно відрізнявся від усіх інших підгруп і майже втричі був меншим, ніж показник 7 доби ( $p < 0,05$ ).

При аналізі динаміки рівня індукбельної NO-синтази (iNOS) у тканинному регенераті у процесі загоювання опікової рани у шурів експериментальної групи, шляхом множинних порівнянь підгруп (сформованих за часом спостереження), статистично значущою була відмінність лише між 7 та 14 добою, а також між 7 та 21 добою, коли рівень iNOS знизився майже вдвічі на 14 та 21 добу, порівняно із 7 добою ( $p < 0,05$ ).

При порівнянні між собою відповідних підгруп (3, 7, 14, 21 доба) контрольної та експериментальної груп тварин концентрація iNOS достовірно майже вдвічі була меншою в експериментальній групі порівняно з контрольною лише на 7 та 14 добу спостереження ( $p < 0,05$ ). Відмінність вмісту iNOS між контрольною та експериментальною групами на 3 та 21 добу спостереження не була статистично значущою ( $p > 0,05$ ).

Дослідження рівня 3-нітротирозинових пептидів в підгрупах контрольної групи (рис. 2), за критерієм Шеффе, показало, що вміст цих сполук на 3 добу майже вдвічі перевищував рівень 14 доби ( $p < 0,05$ ), а потім майже в 1,5 рази збільшився на 21 добу ( $p < 0,05$ ). Відмінність вмісту 3-нітротирозинових сполук між 3 та 7 добою, 7 та 14 добою не була статистично значущою ( $p > 0,05$ ).

Множинні порівняння рівня 3-нітротирозинових пептидів у підгрупах експериментальної групи тварин показали, що відмінності показників всіх підгруп між собою статистично не значущі ( $p > 0,05$ ), тобто суттєвих коливань протягом усього терміну спостереження не зареєстровано.

При порівнянні між собою відповідних підгруп (3, 7, 14, 21 доба) контрольної та експериментальної груп вміст 3-нітротирозинових пептидів у тканинному регенераті шкіри тварин достовірно зменшу-

вався в 1,5 рази на 3 добу в експериментальній групі порівняно з контрольною ( $p < 0,05$ ). Статистично значущих відмінностей вмісту вказаних сполук між контрольною та експериментальною групами на 7, 14, 21 добу не виявлено ( $p > 0,05$ ).

При множинних порівняннях за критерієм Шеффе вміст малонового діальдегіду (МДА) (рис. 3) у всіх підгрупах контрольної групи достовірно відрізнявся й мав хвилеподібну динаміку: його концентрація зменшувалася в 2,5 рази на 7 добу порівняно з 3 добою, на 14 добу вміст МДА зростав майже в 1,8 рази відносно 7 доби, а на 21 добу знову зменшувався в 1,4 рази порівняно з 14 добою спостереження ( $p < 0,05$ ).

Аналіз показників вмісту малонового діальдегіду (МДА) також достовірно відрізнявся між усіма підгрупами (в усі терміни спостереження) експериментальної групи: на 7 добу вміст МДА у тканинному

регенераті зростав у 6 разів відносно 3 доби; на 14 добу він збільшився в 1,3 рази порівняно з 7 добою; але на 21 день спостерігалось зменшення вмісту МДА в 2,2 рази відносно 14 доби спостереження ( $p < 0,05$ ).

При порівнянні між собою відповідних підгруп (3, 7, 14, 21 доба) контрольної та експериментальної груп вміст МДА достовірно відрізнявся у кожний період спостереження: на 3 добу був у 4 рази менше в експериментальній групі відносно контрольної; на 7 добу вміст МДА в експериментальній групі в 4 рази перевищував показник контрольної групи; на 14 добу вміст вказаної сполуки в експериментальній групі всього в 1,2 рази перевищував показник контрольної групи; на 21 добу вміст МДА в експериментальній групі в 1,3 рази знизився відносно показника контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

При множинних порівняннях показник VEGF (рис. 4) у тканинному регенераті у підгрупах конт-

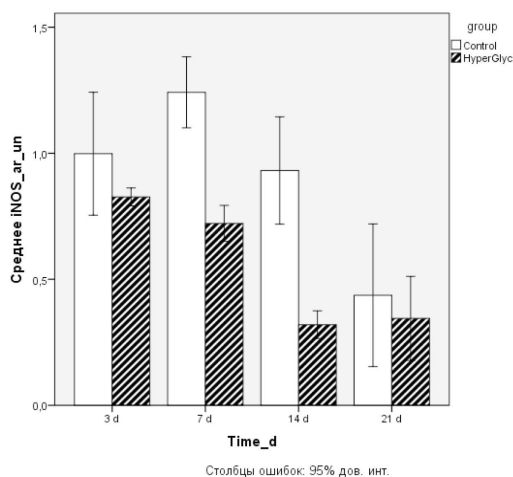


Рис. 1. Рівень індукцибельної NO-синтази (iNOS) у тканинному регенераті опікової рани щурів контрольної та експериментальної груп на 3, 7, 14 та 21 добу, в ум.од.

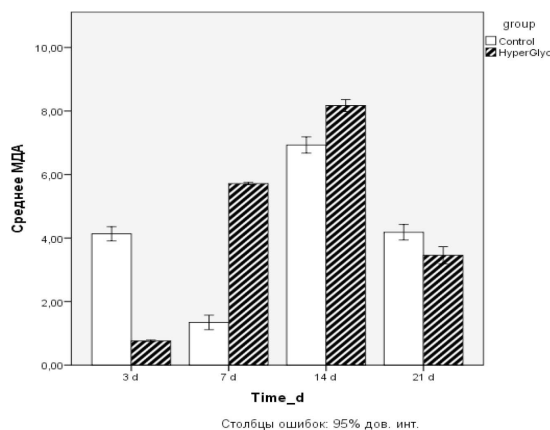


Рис. 3. Рівень малонового діальдегіду (МДА) у тканинному регенераті опікової рани щурів контрольної та експериментальної груп на 3, 7, 14 та 21 добу, в ум.од.

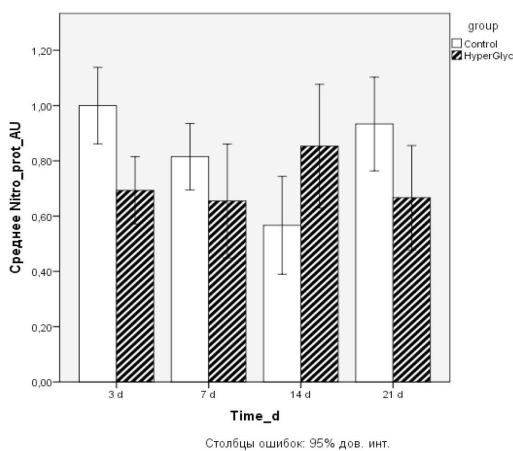


Рис. 2. Рівень 3-нітротирозинових сполук у тканинному регенераті опікової рани щурів контрольної та експериментальної груп на 3, 7, 14 та 21 добу, в ум.од.

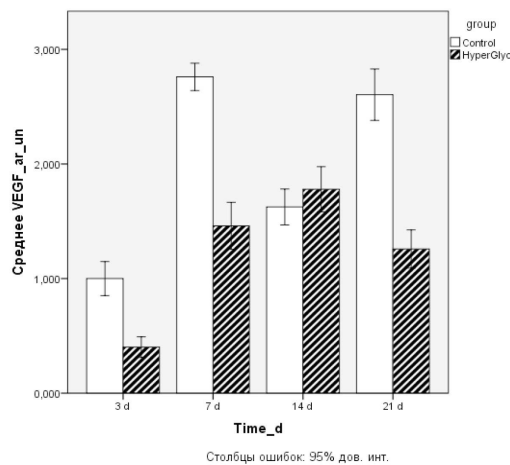


Рис. 4. Рівень судинного ендотеліального фактору росту VEGF у тканинному регенераті опікової рани щурів контрольної та експериментальної груп на 3, 7, 14 та 21 добу, в ум.од.

рольної групи мав хвилеподібну динаміку із статистично значущими коливаннями: зростав в 2,7 разів на 7 добу відносно 3 доби; на 14 добу майже вдвічі зменшувався відносно 7 доби; на 21 добу знову зростав в 1,4 рази відносно 14 доби спостереження ( $p < 0,05$ ).

В експериментальній групі статистично достовірні ( $p < 0,05$ ) відмінності між показниками VEGF серед підгруп спостерігалися тільки між показниками 3 та 7 доби (коли рівень цього фактору на 7 добу зростав майже втричі відносно 3 доби); 3 та 14 доби (зростав в 3,5 рази на 14 добу відносно 3 доби); 14 та 21 доби (в 1,4 рази зменшився на 21 добу відносно 14 доби). Відмінності показників 7 та 14 доби не були статистично значущими ( $p > 0,05$ ).

При порівнянні між собою відповідних підгруп (3, 7, 14, 21 доба) контрольної та експериментальної груп показники VEGF статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) відрізнялися на 3, 7 та 21 добу спостереження: на 3 добу показник експериментальної групи в 2,2 рази був меншим за показник контрольної групи; на 7 та 21 добу показник VEGF в експериментальній групі був удвічі меншим за показник контрольної. На 14 добу спостереження показники цього фактору росту статистично не відрізнялися ( $p > 0,05$ ).

Наступним етапом було проведено кореляційний аналіз із застосуванням коефіцієнта Пірсона при 95% довірчому інтервалі ( $p < 0,05$ ) для виявлення взаємозв'язків між наведеними вище показниками нітрозативного стресу, продуктами ПОЛ та VEGF контрольної та експериментальної груп під час загоєння опікової рани (табл. 1).

Як показали наші дослідження, рівень експресії індукцибельної NO-синтази в тканинному регенераті під час загоєння рани на 3 добу після моделювання опіків достовірно не відрізняється в експериментальній групі (з цукровим діабетом) та контрольній групі (без діабета). А от на 7 та 14 добу спостерігалася зменшення вмісту iNOS в обох групах, але значення цього показника в експериментальній групі майже вдвічі менше від значення в контрольній групі. На нашу думку, такі відмінності можна пояснити тим, що у щурів контрольної групи на 3 добу загоєння рани вже завершується нормергічне гостре

запалення й починається проліферація, коли в тканинному регенераті прозапальні M1-макрофаги, що здатні синтезувати NO за рахунок активації iNOS, будуть поляризуватися в протизапальний M2-фенотип. Для цукрового діабету характерне уповільнення стадій загоювання рани, їхнє «розтягнення» у часі, тому на 3 добу в тканинному регенераті буде переважати еміграція нейтрофілів, які за рахунок мієлопероксидази будуть генерувати кисневі вільні радикали (ROS). Цим можна пояснити й менший майже вдвічі рівень iNOS у тканинному регенераті в експериментальній групі порівняно з контрольною: хронічне запалення при цукровому діабеті супроводжується постійною еміграцією нейтрофілів, які значно поступаються макрофагам у здатності генерувати NO й активно продукуватимуть ROS, що підтверджується майже 6-разовим збільшенням рівня малонового діальдегіду (як показника пероксидного окиснення ліпідів) на 7 день спостереження в експериментальній групі порівняно з контрольною.

Як було показано, зниження рівня VEGF в експериментальній групі на 3, 7, 21 добу після моделювання опіку, порівняно з контрольною групою, корелює саме з порушеною експресією iNOS ( $R = -0,703$ ;  $p < 0,05$ ). Це може пояснюватися тим, що NO може нітрозилувати HIF-пролілгідроксилазу, що призводить до стабілізації гіпоксіє-індуцибельного фактора (HIF), який і регулює експресію VEGF [18].

Наявність помірного негативного кореляційного зв'язку ( $R = -0,528$ ;  $p < 0,05$ ) між iNOS та МДА (маркер оксидативного стресу і наявності вільних кисневих радикалів) в експериментальній групі говорить про те, що нормальний механізм активації iNOS під дією ROS порушений, адже відомо, що саме під дією ROS виникає гіперфосфорилування I $\kappa$ B, її убіквітізація – і, як наслідок, активація прозапального транскрипційного NF- $\kappa$ B з експресією iNOS [11].

За даними літератури, при цукровому діабеті підвищена експресія iNOS спостерігається в тканинах нирок, серця та сітківці [12]. Але при цьому, у процесі загоєння рани при цукровому діабеті, незважаючи на хронічне запалення та закономірну активацію NF- $\kappa$ B, експресія iNOS макрофагами, кератиноцитами та фібробластами, як було показано раніше, пригнічена [13]. Інгібування iNOS і зменшення продукції NO призведе до таких ефектів, як порушений рекрутинг макрофагів, зменшення антимікробних властивостей тканинного регенерату, пригнічення ре-епітелізації та проліферації кератиноцитів. Фібробласти з пригніченою iNOS, швидко старішають, не продукують колаген та гинуть апоптозом, що унеможливує процес загоєння.

Отримані показники малонового діальдегіду свідчать про наростання активності пероксидного окиснення ліпідів від 3 до 14 доби загоювання рани

**Таблиця 1**  
Значення коефіцієнта кореляції Пірсона для показників тканинного регенерату контрольної та експериментальної груп лабораторних тварин ( $p < 0,05$ )

Діабет	iNOS	3-nitro	МДА	VEGF
Контроль	1	-0,534	-0,593	-0,704
iNOS	1	-0,231	0,647	0,484
3-nitro	-0,231	1	1	0,959
МДА	-0,384	-0,528	1	1
VEGF	-0,155	-0,042	-0,550	1

у експериментальній групі з цукровим діабетом і перевищують ці показники в контрольній групі ( $p < 0,05$ ). Це свідчить про активність оксидативного стресу. Цей процес при цукровому діабеті обумовлений, з одного боку, посиленням утворення ROS, а з іншого – пригніченням антиоксидантних систем (переважно внаслідок неферментативного глікозилювання білків). Утворення кисневих вільних радикалів при цукровому діабеті є прямим наслідком некорегованої гіперглікемії: джерелом ROS є підвищений гліколіз, сорбітоловий шлях утилізації глюкози, аутооксидация глюкози через формування енедіольних таутомерів, активація протеїнази C із залежною активацією НАДФ-оксидази, гексозамінові реакції та неферментативне глікозилювання білків з формуванням AGEs (advanced glycolisation and products) [14].

Описаний позитивний кореляційний зв'язок між МДА та 3-нітротирозиновими сполуками ( $R = 0,647$ ;  $p < 0,05$ ) доводить, що оксидативний стрес пов'язаний з нітрозативним, коли під дією ROS утворюється пероксинітрит та зменшується біодоступність NO з пригніченням усіх його фізіологічних функцій. За сучасними уявленнями, окрім активації PARP-1 (про що згадувалося раніше), пероксинітрит через реакції нітрозилування пригнічує eNOS та простагліциніназу, інгібує синтез колагену фібробластами дерми, інактивує матриксу металопротеїназ-7, яка, відповідно, не вивільнює фактор росту нервів та субстанції P, які сприяють поляризації макрофагів та утворенню грануляційної тканини [15, 16].

## ВИСНОВОК

Таким чином, під час загоєння опікової рани при цукровому діабеті пригнічується експресія iNOS, а оксид азоту, який при цьому в меншій кількості продукується, інактивується кисневими вільними радикалами з утворенням пероксинітриту. Отже, внаслідок хронічної гіперглікемії посилений оксидативний стрес зменшує біодоступність NO, інгібуючи при цьому всі його позитивні ефекти на процес загоєння [17]. Окрім того, пригнічення пероксинітритом ще й eNOS створює вкрай несприятливі умови для процесу загоєння опікової рани. Тому напрямком патогенетичного впливу на процес загоєння рани при цукровому діабеті є не тільки корекція гіперглікемії і зменшення оксидативного стресу, але й посилення біодоступності NO у рані.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють, що не мають конфлікт інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

**Джерело фінансування.** Ця стаття не отримала фінансової підтримки від державної, громадської або комерційної організації.

## REFERENCES

1. Malone-Povolny M.J., Maloney S.E., Schoenfisch M.H. Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing // *Adv. Healthcare Mater.* 2019; 8 (12): e1801210. DOI: 10.1002/adhm.201801210
2. Van Dyke K. New Concepts in Prevention and Treatment of Diabetes 1 and 2 // *Transl Med.* 2016; 6: 3. DOI: 10.4172/2161-1025.1000179
3. Thuyle T.T., Thuy T.T.V., Hai H., Kawada N. Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Hepatic Fibrosis // *Liver Pathophysiology.* 2017: 213-24. DOI: 10.1016/B978-0-12-804274-8.00016-3
4. Tecilazich F., Veves A. Role of Peripheral Neuropathy in the Development of Foot Ulceration and Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus / In: *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome.* 2 ed., Ed. Debasis Bagchi et al. / 2018: 95-104. DOI: 10.1016/B978-0-12-812019-4.00007-6
5. Safia Habibet, Moinuddin, Asif Ali. Role of Nitric Oxide in Sports Nutrition / In: *Nutrition and Enhanced Sports Performance,* 2 ed., Ed. Debasis Bagchi et al. / 2019: 317-25. DOI: 10.1016/B978-0-12-813922-6.00027-8
6. Douglas D. Thomas, Julie L. Heinecke, Lisa A. Ridnour, Robert Cheng, Aparna H. Kesarwala, Christopher H. Switzer, Daniel W. McVicar, David D. Roberts, Sharon Glynn, Jon M. Fukuto, David A. Wink and Katrina M. Miranda. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology // *Free Radical Biology and Medicine.* 2015. 87: 204-225. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.002
7. Bőröny T., Simon A., Szaby G., Benko R. Oxidative Stress-Related Parthanatos of Circulating Mononuclear Leukocytes in Heart Failure // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017; 15: 1-12. DOI: 10.1155/2017/1249614
8. Papatheodorou K., Banach M., Bekiari E., Rizzo M., Edmonds M. Complications of Diabetes 2017 // *Journal of Diabetes Research.* 2018. DOI: 10.1155/2018/3086167
9. Ergul Belge Kurutas. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current status // *Nutrition Journal.* 2016; 15:71. DOI: 10.1186/s12937-016-0186-5
10. Patel S., Maheshwari A., Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation // *Journal of wound care.* 2016; 25 (1): 46-55. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.1.46
11. Dholia N., Ramteke J., Varghese J.F., Rani V., Yadav U.C.S. Oxidative Stress-Induced Molecular and Genetic Mechanisms in Human Health and Diseases / In: *Free Radicals in Human Health and Disease.* 2015; 1: 91-103. DOI: 10.1007/978-81-322-2035-0\_7
12. G. Lucarini, Tirabassi G., Zizzi A., Balercia G. Uncoupling of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Gingival Tissue of Type 2 Diabetic Patients //

- Inflammation. 2016; 39 (2). DOI: 10.1007/s10753-015-0288-9
13. Newsholme P. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes // Biochemical Journal. 2016; 473: 4527-50. DOI: 10.1042/BCJ20160503C
  14. Chikezie P.C., Ojiako O., Ogbuj A.C. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus // Int. J. Biol. Chem. 2015; 9 (3): 92-109. DOI: 10.3923/ijbc.2015.92.109
  15. Al-Nimer M.S., Al-Ani F.S., Ali F.S. Role of nitrosative and oxidative stress in neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus // J Neurosci Rural Pract. 2012; 3 (1): 41-4. DOI: 10.4103/0976-3147.91932
  16. Pacher P., Obrosova I.G., Mabley J.G., Szabo C. Role of Nitrosative Stress and Peroxynitrite in the Pathogenesis of Diabetic Complications. Emerging New Therapeutic Strategies // Current Medicinal Chemistry. 2005; 12 (3): 267-75. DOI: 10.2174/092986705336320
  17. Dunnill C., Patton T., Brennan J., Barrett J., Dryden M., Cooke J., Leaper D., Georgopoulos N.T. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process // Int Wound J. 2015; 14 (1). DOI: 10.1111/iwj.12557

Отримано: 02.06.2019

## РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА В ЗАЖИВЛЕНИИ ОЖОГОВОЙ РАНЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

*Мироненко О.И., Натрус Л.В., Панова Т.И.*

*Національний медичинський університет імені А.А. Богомольця, Київ, Україна  
ot.ua.md@gmail.com*

**Актуальность.** Риск развития синдрома диабетической стопы в течение жизни составляет 25% у пациентов с сахарным диабетом. Угнетение заживления язв при этом связывают с нарушением поляризации макрофагов, уменьшением биодоступности факторов роста, усиленной активацией матриксных металлопротеиназ, что может быть связано с выраженностью не только оксидативного, но и нитрозативного стресса.

**Цель.** Изучить показатели нитрозативного стресса в регенерате соединительной ткани кожи во время заживления ожоговой раны у крыс с моделируемым сахарным диабетом, в сравнении с крысами без сахарного диабета.

**Материалы и методы.** Использованы две группы лабораторных крыс линии Wistar: в экспериментальной группе (n=24) были смоделированы сахарный диабет и термические ожоги, в контрольной группе (n=24) – только ожоги. Сахарный диабет был воспроизведен путем введения крысам экспериментальной группы стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг. Термические ожоги общей площадью 18-20% поверхности тела были воспроизведены путем приложения к коже крыс медных пластинок, разогретых в воде до 100°C. Животные были выведены из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом – по 6 крыс из каждой группы на 3, 7, 14 и 21 сутки наблюдения. В образцах тканевого регенерата методом Вестерн-блот анализа измерялись показатели индуцибельной NO-синтазы (iNOS), 3-нитротирозиновых протеинов и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли в сыворотке крови крыс путем реакции с тиобарбитуровой кислотой и последующим спектрофотометрическим анализом. Измеряемые показатели выражали в условных единицах оптической плотности (arbitrary units, a.u.).

**Результаты.** Нами показано, что экспрессия индуцибельной NO-синтазы (iNOS) существенно уменьшалась во время заживления ожоговой раны при сахарном диабете по сравнению с контрольной группой на 7 и 14 сутки наблюдения. Так, на 7 сутки уровень iNOS составлял  $1,24 \pm 0,05$  а.у. в контрольной группе и  $0,72 \pm 0,03$  а.у. в экспериментальной, а на 14 сутки –  $0,93 \pm 0,08$  а.у. и  $0,32 \pm 0,02$  а.у., соответственно.

Статистически значимые различия уровня 3-нитротирозиновых соединений между контрольной и экспериментальной группами обнаружены только на 3 сутки наблюдения:  $1,0 \pm 0,05$  и  $0,69 \pm 0,04$  а.у., соответственно.

Уровень малонового диальдегида существенно возрастал в экспериментальной группе с 3 по 14 сутки наблюдения, от  $0,77 \pm 0,01$  а.у. до  $8,17 \pm 0,07$  а.у., что свидетельствует о выраженности перекисного окисления липидов при сахарном диабете. Статистически значимая разница уровня МДА между контрольной и экспериментальной группой наблюдалась во все сроки наблюдения от  $4,13 \pm 0,09$  и  $0,77 \pm 0,01$  а.у., соответственно, на 3 сутки до  $4,18 \pm 0,09$  и  $3,46 \pm 0,25$  а.у., соответственно, на 21 сутки.

Описаны положительная корреляционная связь между уровнем малонового диальдегида и 3-нитротирозиновыми соединениями ( $R=0,647$ ;  $p<0,05$ ) при сахарном диабете, тогда как в группе без сахарного диабета он был отрицательный ( $R=-0,528$ ,  $p<0,05$ ).

Выявлено снижение уровня VEGF в тканевом регенерате при сахарном диабете по сравнению с контрольной группой на 3, 7 и 21 сутки наблюдения, оно коррелировало с нарушенной экспрессией iNOS ( $R=-0,703$ ;  $p<0,05$ ) при сахарном диабете. Так, на 3 сутки наблюдения уровень VEGF составлял  $1,0 \pm 0,06$  а.у. в контрольной группе и  $0,4 \pm 0,03$  а.у. в экспериментальной группе; на 7 сутки –  $2,76 \pm 0,05$  и  $1,46 \pm 0,08$  а.у., соответственно; на 21 день –  $2,61 \pm 0,09$  и  $1,26 \pm 0,06$  а.у., соответственно.

**Выводы.** При сахарном диабете во время заживления ожоговой раны происходит локальное снижение уровня экспрессии iNOS, что приводит к подавлению образования NO и его физиологических эффектов. Усиленный оксидативный стресс при этом и дополнительно уменьшает биодоступность NO за счёт образования пероксинитрита. Одним из важных эффектов NO во время заживления раны является усиление образования VEGF. Показано нами снижение уровня NO (через уменьшенную экспрессию iNOS) коррелирует со снижением уровня VEGF в тканевом регенерате при сахарном диабете, что является одним из важных факторов нарушенного заживления раны.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, заживление раны, нитрозативного стресс, индуцибельной NO-синтаза, пероксинитрит.

## THE ROLE OF NITROGEN OXIDE AND NITROSATIVE STRESS IN BURN WOUND HEALING IN DIABETES MELLITUS

*Myronenko O.I., Natrus L.V., Panova T.I.*

*Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine  
om.ua.md@gmail.com*

**Relevance.** The risk of developing of diabetic foot ulcers is 25% over the lifetime of patients with diabetes mellitus. Inhibition of wound healing is associated with impaired macrophage polarization, decreased bioavailability of growth factors, enhanced activation of matrix metalloproteinases, which in turn is probably associated with severity of not only oxidative stress, but also nitrosative one.

**Objective.** To investigate the indices of nitrosative stress in connective tissue regeneration in the healing of burn wound in rats with simulated diabetes, compared with rats without diabetes.

**Materials and methods.** Two groups of laboratory rats of the Wistar line were used: diabetes mellitus and thermal burns were simulated in the experimental group (n=24), and only burns were modelled in the control group (n=24). Diabetes mellitus was reproduced by administering of streptozotocin at a dose of 50 mg/kg to rats of the experimental group. Thermal burns with a total area of 18-20% of the body surface were reproduced by applying of copper plates heated in water to 100°C to the skin of rats. Animals were removed from the experiment by decapitation under thiopental anesthesia, 6 rats of each group at a time on 3, 7, 14 and 21 day of observation. Concentration of inducible NO-synthase (iNOS), 3-nitrotyrosine proteins and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured in tissue regenerate samples by Western-blot analysis. The content of malondialdehyde (MDA) was determined in the blood serum of rats by reaction with thiobarbituric acid and subsequent spectrophotometric analysis. The measured values are expressed in arbitrary optical density units (arbitrary units, a.u.).

**Results.** The expression of inducible NO-synthase (iNOS) was shown to be significantly decreased during burn wound healing in diabetes mellitus compared with controls at 7 and 14 day of burn wound healing. Thus, iNOS level was  $1.24 \pm 0.05$  a.u. in the control group and  $0.72 \pm 0.03$  a.u. in the experimental one at 7 day of observation;  $0.93 \pm 0.08$  a.u. and  $0.32 \pm 0.02$  a.u., respectively, at 14 day.

Statistically significant differences in the level of 3-nitrotyrosine compounds between the control and experimental groups were detected only at 3 day of observation:  $1.0 \pm 0.05$  and  $0.69 \pm 0.04$  a.u., respectively.

The level of malondialdehyde (MDA) increased significantly in the experimental group from 3 to 14 day of observation, from  $0.77 \pm 0.01$  a.u. to  $8.17 \pm 0.07$  a.u., which indicates the severity of lipid peroxidation in diabetes. A statistically significant difference in MDA levels between the control and experimental groups was observed at all observation periods: from  $4.13 \pm 0.09$  and  $0.77 \pm 0.01$  a.u., respectively, at 3 day of observation to  $4.18 \pm 0.09$  and  $3.46 \pm 0.25$  a.u., respectively, at 21 day.

A positive correlation between the level of malondialdehyde and 3-nitrotyrosine compounds ( $R=0.647$ ;  $p<0.05$ ) in diabetes mellitus is described, while in the non-diabetic group, it was negative ( $R=-0.528$ ,  $p<0.05$ ).

A decrease in the level of VEGF in tissue regeneration samples in diabetes mellitus was found compared with the control group at 3, 7 and 21 days of observation, which correlated with impaired expression of iNOS ( $R=-0.703$ ;  $p<0.05$ ) in diabetes mellitus. Thus, at 3 day of observation, VEGF level was  $1.0 \pm 0.06$  a.u. in the control group and  $0.4 \pm 0.03$  a.u. in the experimental group; on 7 day –  $2.76 \pm 0.05$  and  $1.46 \pm 0.08$  a.u., respectively; on 21 day –  $2.61 \pm 0.09$  and  $1.26 \pm 0.06$  a.u., respectively.

**Conclusions.** It is shown that in diabetes mellitus during healing of the burn wound, there is a local decrease in the level of iNOS expression, which leads to inhibition of NO formation and its physiological effects. Increased oxidative stress, while further reducing the bioavailability of NO through the formation of peroxynitrite. One of the important effects of NO during wound healing is the enhancement of VEGF formation. Shown reduction of NO (due to the reduced expression of iNOS) is correlated with the decrease of VEGF level in tissue regeneration in diabetes, which is one of the important factors of impaired wound healing.

**Key words:** diabetes mellitus, wound healing, nitrosative stress, inducible NO-synthase, peroxynitrite.