

УДК 617.51/53-089-003.92

С.О. Ставицький, К.С. Непорада, Д.С. Аветіков, А.А. Сухомлин
ВНІЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

NO-ЕРГІЧНА СИСТЕМА РУБЦЕВОЗМІНЕНОЇ ТА НЕПОШКОДЖЕНОЇ ШКІРИ ГОЛОВИ ТА ШІЇ

Визначали вплив активності NOS та концентрації нітрит-аніонів на рубцевозмінені тканини. Під спостереженням знаходилося 92 пацієнта, 43 у першій та 49 у другій групі дослідження. Активність NO-синтез визначали по різниці концентрацій нітритів. Концентрацію нітрит-аніонів визначали шляхом утворення діазосполучень в реакції із сульфаніловою кислотою. У пацієнтів першої групи (келоїдні рубці) активність NO-синтаз та вміст нітрит-аніонів достовірно збільшилось. Саме це сприяє активності колагеногенезу.

Ключові слова: гіпертрофічні рубці, келоїди, NO-синтаза, нітрит-аніони, фібробласти.

Робота є фрагментом науково-дослідних робіт Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України: «Оптимізація консервативного та хірургічного лікування хворих, що мають дефекти та деформації тканин щелепно-лицевої ділянки», номер державної реєстрації 0110U004629.

Будь який дефект цілісності шкірного покриву людського тіла призводить до виникнення рубцевої тканини. Регуляція даного процесу залежить від багатьох, як ятрогенних, так і загальносоматичних факторів. Ятрогенні фактори обумовлені глибиною та площею пошкодження, терміном перебігу ранового процесу, причиною виникнення травматичного агента. До загальносоматичних чинників відносять: зниження імунітету, ендокринопатії, анемії різного генезу, гіпо-та авітамінози, порушення асоціативної мікрофлори, зниження мікроциркуляції та місцевої гемодинаміки тощо [1-4, 11].

Утворення рубцевої тканини, як і загоювання рани, процес специфічний та для кожного конкретного випадку носить індивідуальний характер. Всі ці процеси на кожній із стадій регулюються множинними чинниками. Відхилення від будь-якої із стадій формування може викликати аномальний тип загоювання рани, що визначає в майбутньому характер та вид рубцевої тканини [1, 12, 14].

Гіповаскулярна будова – характерна морфологічна ознака келоїдних та гіпертрофічних рубців. Доведено, що капіляри рубцевої тканини регресують, а їх ендотеліоцити трансформуються в фібробласти та інші клітинні диферони. Дане клітинне перетворення пояснює збільшення клітинних елементів у тканині патологічних рубців [1]. У наслідок постійної регресії капілярів зменшується трофічне забезпечення тканин, що погіршує гіпоксичний стан.

Просвіт більшості функціональних капілярів звужений або взагалі obtурований. Ендотеліоцити капілярів келоїдних рубців максимально контактують. Це пояснює зменшення місцевої гемодинаміки. Ультраструктура регресуючи ендотеліальних клітин аналогічна будові поліобластів, котрі локалізовані в «зоні росту» рубцевої тканини. Відмічається збільшення об'єму та кількості мітохондрій [1,3,4].

Відомо, що основним етіологічним фактором у розвитку кисневодифіцитних станів є вплив основного міжклітинного посередника ендогенного оксиду азоту та продуктів його надлишкового синтезу – пероксинітрити (ONOO). Після відкриття ролі оксиду азоту в розвитку багатьох захворювань людини в науковців не викликає сумніву його участь у процесах регенерації та репарації. Загально відомо, що монооксид азоту є потужним вазодилататором, запобігає адгезії тромбоцитів, володіє імунomodуючою дією та виконує нейротрансмітерні функції. В останні роки з'явилися поодинокі наукові роботи про NO-терапію за допомогою плазмено-повітряного апарату „Плазмон”, який генерує NO-вмістний газовий потік для прискорення загоєння ран різного генезу.

Суперечливим є роль оксиду азоту в келоїдогенезі. З одного боку недостатність продукції NO конститутивними ізоформами NO-синтаз сприяє порушенню кровопостачання та розвитку гіпоксії у пошкодженій ділянці шкіри, з іншого боку – надмірне утворення оксиду азоту індукційною NO-синтазою призводить до утворення цитотоксичного пероксинітрити та створює умови для активації колагеногенезу за рахунок активації експресії трансформуючого фактору-бета [6-8, 10, 13, 14].

Метою роботи було дослідження показників загальної активності NO-синтаз та концентрації нітрит-аніонів у гомогенатах рубцевозмінених тканин та непошкодженої шкіри.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження базується на вивчені висічених тканин келоїдних (1 група) та гіпертрофічних (2 група) рубців. У групах, що досліджувались, діагноз було верифіковано на основі скарг, анамнезу життя та захворювання, об'єктивного обстеження та морфометричного аналізу. До контрольної групи відносили пацієнтів із непошкодженою шкірою, яка забиралась після місцевопластичних операцій (n=15). Вік пацієнтів варіював від 18 до 42 років. Всього досліджувалось 92 пацієнти, перша група становила 43 особи, друга 49 пацієнтів відповідно. Власне дослідження виконувалось згідно всіх біоетичних норм Європейської конвенції. Згода хворих на дослідження отримана.

Для визначення концентрації [NO⁻2] до гомогенату тканин, що вивчалися додавали 1,8 мл H₂O та 0,2 мл 1% сульфанілової кислоти в 5% розчині H₃PO₄. Потім залишали на 7 хв. У темному місці при кімнатній температурі. Далі добавляли 0,2 мл 1% водного розчину α-нафтилетилендіаміну. Після матеріал, що вивчався перемішувався та залишався в темному місці при кімнатній температурі на 10 хв. По завершенню проводили калібровку NaNO₂ різними концентраціями, при довжині хвилі (λ=539 нм.)

Активність NOS визначалась наступним чином [9]. В інкубаційному середовищі знаходилось 2,5 мл 0,1М три-НСІ, рН=7,4, що містить 10мМ СаСІ2, потім добавляли 0,3 мл 320 мМ водного розчину НАДФН+Н*. Реакцію запускали шляхом внесення 0,5 мл гомогенату тканин, що досліджувались. Проба активно перемішувалась та негайно відбиралась аликвота 0,2 мл для визначення вмісту продуктів аеробного окислення NO. Залишок проб інкубували при 37°C на 30 хв. Реакцію зупиняли шляхом внесення 0,02 мл, 0,02% водного розчину азиду натрія.

Для визначення продуктів аеробного окислення NO відібрану аликвоту вносили в Н2О, потім додавали 0,2 мл 1% розчину сульфанілової кислоти в 5% розчині Н3РО4. Залишали на 7 хв. у темному місці при кімнатній температурі. Після вище перерахованого додавали 0,2 мл 1% водного розчину α -нафтилетилендіаміну, перемішували та залишали в темному місці при кімнатній температурі на 10 хв. Після цього визначали концентрацію при $\lambda=539$ нм. Отримані цифрові дані статистично обґрунтовано за допомогою базових програм Microsoft Excel. Вірогідність відмінностей для різних груп визначали за допомогою непараметричного критерія Уїлкоксона – Манна – Уїтні.

Результати дослідження та їх обговорення. Для оцінки NO-системи шкіри нами визначалась загальна NO-синтаза, активність та вміст нітрит-аніонів, як стабільних кінцевих продуктів метаболізму оксиду азота. Аналіз результатів біохімічних показників, отриманих у результаті власних досліджень, дозволив установити активацію NO-ергічної системи, як рубцевозміненої, так і непошкодженої шкіри.

Нами було встановлено, що в гомогенаті келоїдного рубця активність загальної NO-синтази достовірно в 2,9 (296%) рази вище в порівнянні з контрольною групою пацієнтів. Даний показник у зразках гіпертрофічних рубців істотно не відрізняється від контрольної групи пацієнтів. Аналізуючи загальну активність NO-синтази рубцевих змін шкіри, нами було отримано достовірне збільшення її в зразках келоїдних рубців у порівнянні з гіпертрофічними рубцевими змінами (табл.).

Таблиця

Вміст нітрит-аніонів та активність NOS у досліджуваних зразках шкіри пацієнтів

Показники	Група пацієнтів	Контрольна група (n=15)	Пацієнти з келоїдним рубцями (n=43)	Пацієнти з гіпертрофічними рубцями (n=49)
Вміст нітрит-аніонів мкмоль/г		0,066±0,029	0,125±0,006	0,075±0,028
p		P _{1,2} ≤0,05; P _{1,3} ≥0,05; P _{2,3} ≥0,05.		
Загальна активність NO-синтаз мкмоль/г\хв		3,121±0,960	8,937±0,661	3,630±0,770
p		P _{1,2} ≤0,05; P _{1,3} ≥0,05; P _{2,3} ≤0,05.		

Таким чином, активність NO-синтази достовірно збільшується в гомогенаті келоїдних рубців у порівнянні з контрольною групою та пацієнтами з гіпертрофічними рубцями. Нами встановлено, що достовірне підвищення в 1,9 рази (192,3%) вмісту нітрит-аніонів спостерігалось у пацієнтів із келоїдними рубцями в порівнянні з групою контролю. Проаналізувавши даний показник у хворих із гіпертрофічними рубцями, було отримано не достовірні зміни в порівнянні з контрольною групою людей та пацієнтів із келоїдними рубцями (табл.).

Висновки

- У хворих із келоїдними рубцями достовірно збільшувалась активність NO-синтаз та вміст нітрит-аніонів, що за нашими переконаннями сприяє активації колагеногенезу за рахунок індукції експресії трансформуючого фактору росту – бета (ТФР- β). Цей фактор стимулює синтез фібробластами колагену, фібронектину та протеогліканів. Також, вищезазначений фактор зменшує синтез колагенази та збільшує продукцію її інгібіторів, цим самим уповільнює руйнування тимчасового матриксу.
- Відомо, що ТФР- β 1 відповідає за стійкість келоїдних фібробластів до апоптозу. При загоюванні рани генетично запропонована гибель клітин бере участь у заміні грануляційної тканини на рубцеву. При цьому даний процес характерний для деяких основних клітинних диферонів, таких як фібробласти, клітини запалення, ендотелій та міофібробласти. Фібробласти, які були отримані з келоїдних рубців зазнають впливу апоптозу в меншій мірі в порівнянні з фібробластами інтактної шкіри [6-8].
- Для медикаментозного лікування та провілактики надлишкового колагеногенезу при рубцевих змінах шкіри доцільно використовувати селективні інгібітори індукційної NO-синтази, що в майбутньому буде предметом наших експериментальних та клінічних досліджень.

Література

- Белюсов А.Е. Заживление раны и оптимальный рубец. В кн.: «Пластическая реконструктивная и эстетическая хирургия». / А.Е. Белюсов, П.Е. Куприн - СПб.:1998.- С.106-122.
- Мишалов В.Г. Проблемы диагностики и лечения патологических рубцов / В.Г. Мишалов, В.В.Храпач, И.А.Назаренко [и др.] // Хирургия Украины. – 2008. - №. 4 (28). – С.109-114.
- Фисталь Н.Н. Рубцовые деформации и контрактуры / Э.Я. Фисталь, Г.Е. Самойленко // Пластическая хирургия. – Донецк: «Вебер», 2008.- С.136-162.
- Alster T.S. Gypertrophic scars and Keloids: etiology and management / T.S. Alster, E.L. Tanzi // Am. J. Clin. Dermat. – 2003. – N4. – P. 235-243
- Manuskiatti W. Treatment response of keloidal and hypertrophic scars / W.Manuskiatti, R.E. Fitzpatric // Archives of dermatology. -2002. – V.138 (9). – P. 1149-1155.
- Hsu Y.C. Induction of TIMP-1 and HSP47 synthesis in primary keloid fibroblasts by exogenous nitric oxid / Y.C. Hsu, L.F. Wang, Y.W. Chien, W.R. Lee // J Dermatol Sci. – 2007. – 45(1) –P.37-44.
- Hsu Y.C. Exogenous nitric oxide stimulated collagen type I expression and TGF-beta1 production in keloid fibroblasts by a cGMP-dependent manner / Y.C Hsu., M.Hsiao, Y.W. Chien, W.R.Lee // J. Nitric Oxide: bijlogy and chemistry. – 2007. – 16(2) – P. 258-265.
- Hsu YC. Nitric oxide produced by iNOS is associated with collagen synthesis in keloid scar formation / Y.C. Hsu, M .Hsiao, Y.W. Chien, W.R. Lee. // J. Nitric Oxide: bijlogy and chemistry. – 2006. – 14(4) – P. 327-334.

9. Hevel J.M. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase // J. Biol. Chem. – 1991. – V.266, №34 – P.22.
10. Kuhn M.A. Silicone sheeting decrease fibroblast activity / M.A. Kuhn // Int J Surg Invest. – 2001. – V. – 36(1).- P.113-118.
11. Kwon S.D. Treatment of scars with a pulsed Er: IAG / S.D. Kwon, I.C. Kye // J. Cutan Laser Ther. – 2000. - №2(1). – P.27-31.
12. Lee J.H. Effects of interferon- α on keloid treatment/ J.H. Lee, S.E.Kim, A.V. Lee // Int J Dermatol. – 2008. – V.47(2). – P.183-186.
13. Puzey G. The use of pressure garment on hypertrophic scars / G.J.Puzey // Tissue Viability. – 2002. – V.12(1). – P.11-15.
14. Rusciani L. Cryotherapy in the treatment of keloids / L. Rusciani // J Drug Dermatol. – 2006. – V.5(7). – P.591-595.

Реферати

NO-ЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА РУБЦОВОИЗМЕНЕННОЙ И НЕ ПОВРЕЖДЕННОЙ КОЖИ

Ставицкий С.А., Непорада К.С., Аветиков Д.С., Сухомлин А.А.

Определяли влияние активности NOS и концентрации нитрит-анионов на тип рубцовой ткани. Под наблюдением находилось 92 пациента, 43 в первой и 49 во второй группе исследования. Активность NO-синтаз определяли по разнице концентраций нитритов. Концентрацию нитрит-анионов определяли путем образования диазосоединений в реакции с сульфаниловой кислотой. У пациентов первой группы (келоидные рубцы) активность NO-синтаз и содержание нитрит-анионов достоверно увеличивалась. Именно это способствует активности коллагеногенеза.

Ключевые слова: гипертрофические рубцы, келоиды, NO-синтаза, нитрит-анионы, фибробласты.

NO-ERGIC SCARS SYSTEM AND IS NOT DAMAGED SKIN

Stavitskiy S.A., Neporada K.S., Avetikov D.S., Sukhomlin A.A.

We determined the influence of NOS activity and concentrations of nitrite-anions on the type of scar tissue. We observed 92 patients, 43 and 49 in each study group. NO-synthase activity was determined by the difference in the concentrations of nitrite. The concentration of nitrite anions was determined by the formation of diazo compounds in the reaction with sulfanilic acid. Patients of the first group (keloid scars), the activity of NO-synthase and nitrite anion content significantly increased. That UTB promotes collagen activity.

Key words: hypertrophic scars, keloids, NO-synthase, nitrite anions, fibroblasts.

Стаття надійшла 01.01.2003 р.

Рецензент проф. Костенко В.О.

УДК 616.316-092.9 : 615.916'175

О.А. Ставицкий, В.О. Костенко

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

РОЛЬ ИЗОФОРМ NO-СИНТАЗИ У МЕХАНІЗМАХ ПОРУШЕНЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У СЛИННИХ ЗАЛОЗАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СПІЛЬНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ НІТРАТУ ТА ФТОРИДУ НАТРІЮ

У експерименті на 50 білих щурах досліджена роль ізоформ NO -синтази в механізмах порушень окислювальних процесів в тканинах піднижньощелепних слинних залоз (СЗ) в умовах поєднаного надмірного надходження нітрату і фториду натрію. Виявлено, що введення селективного інгібітору індукбельної NO -синтази (iNOS) аміногуанідину на тлі хронічної інтоксикації нітратом і фторидом натрію зменшує продукцію в тканинах СЗ супероксидного аніон-радикала мікросомальної і мітохондріальної електронно-транспортними ланцюгами, обмежує в них інтенсивність пероксидного окислення ліпідів, підвищує антиоксидантний потенціал, активність антиоксидантних ферментів - супероксиддисмутази і каталази, що вказує на роль NO ендogenous походження, що виробляється за участю iNOS, в активації вільнорадикальних процесів і пригніченні системи антиоксидантної захисту в СЗ. Введення селективного інгібітору нейрональної NOS 7-нитроіндазола і субстрату NOS L -аргініну, навпаки, знижує антиоксидантний потенціал.

Ключові слова: оксид азоту, NO -синтаза, інтоксикація, нітрат натрію, фторид натрію.

Робота є фрагментом науково-дослідної роботи ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» «Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція фізіологічно активними речовинами» (№ держреєстрації 0108U010079).

Комбінована дія на організм людини та тварин неорганічних азотовмісних сполук та фторидів є значною проблемою особливо у аграрно-промислових регіонах України. Залишаються недостатньо з'ясованими закономірності сукупної дії нітратів і фторидів на організм ссавців. Інтерес викликає дослідження, насамперед, механізмів метаболічних змін у слинних залозах (СЗ), оскільки останні тісно взаємопов'язані з іншими відділами травлення, органами серцево-судинної, видільної систем тощо [4].

В останні роки СЗ розглядаються як важливий орган регуляції утворення NO у кількості, необхідній для нормального функціонування протективних систем слизової оболонки органів шлунково-кишкового тракту, підтримання її цілісності [9]. Кількість NO, що надходить у організм із слиною, контролюється механізмом ауторегуляції, відомим як цикл оксиду азоту [5]. Поряд з NO-синтазним шляхом в СЗ оксид азоту утворюється через нітрат- та нітритредуктазні реакції [9]. Вважається, що саме ця складова циклу оксиду азоту є фізіологічно необхідною за умов зниження активності NO-синтаз (NOS), наприклад, за умов гіпоксії [5]. У той же можна припустити здатність фторид-іонів втручатися у функціонування циклу оксиду азоту, оскільки ці сполуки відомі як пригнічувачі альтернативного щодо NO-синтазного – аргіназного (неокисного) шляху метаболізму L-аргініну [15]. Повідомляється, що фторид-іон здатний активувати конституційні та індукбельну NOS [8]. Можна припустити, що введення надлишкової кількості попередників NO (нітратів і нітритів), а також інших токсичних агентів, що втручаються у функціонування циклу оксиду азоту та сполученого з ним циклу супероксидного аніон-радикала може істотно змінювати рівень продукції NO, сприяти утворенню його високотоксичних метаболітів (наприклад, пероксинітриту). За цих умов можна очікувати змін активності NO-