

УДК 616.379-008.64:617.586-001.4-06

Є. А. Лікутов

Буковинський державний медичний  
університет, м. ЧернівціМОДЕЛЮВАННЯ ГНІЙНО-  
НЕКРОТИЧНОГО ПРОЦЕСУ ПРИ  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АЛОКСАН-  
ІНДУКОВАНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

**Ключові слова:** модель синдрому  
стопи діабетика, алоксановий  
діабет

**Резюме.** Проведене порівняльне дослідження експериментальних моделей синдрому стопи діабетика (методів С. С. Казакова, М. Д. Абдулаєва, скарифікаційного методу та скарифікаційно-сорбційного методу). На основі аналізу існуючих моделей і врахуванням їх недоліків, патогенетичних та етіологічних чинників еталонного процесу створено власні моделі патологічного стану. Досліджено патоморфологічну адекватність клінічному прототипу розробленої удосконаленої моделі, що полягає у відповідності ангіопатичних змін та процесів реваскуляризації у гнійно-некротичних вогнищах.

**Вступ**

Для України, як і для інших країн світу, цукровий діабет є не тільки медичною, а й соціальною проблемою. Згідно з даними статистики, 50-70% усіх випадків ампутацій ніг нетравматичного характеру проводиться у хворих на цукровий діабет (ЦД), а ризик ампутацій нижніх кінцівок у таких пацієнтів при виникненні синдрому діабетичної стопи у 25 разів вищий, ніж у загальній популяції [8, 12]. За різними даними, у хворих на ЦД кожного року проводиться від 7 до 206 ампутацій на 100 тис населення [4]. Тривале спостереження за хворими, які перенесли ампутацію, показало, що післяопераційна смертність серед них сягає 6%, а протягом перших 5 років після ампутації – 39–68%. Після перенесеної ампутації однієї ноги у 42% осіб протягом перших 3 років доводиться здійснювати ампутацію другої ноги, а 56% пацієнтів потребують ампутації іншої кінцівки впродовж 3–5 років [8].

Експериментальне моделювання синдрому стопи діабетика націлене на відтворення патологічного процесу у тварин з наступними завданнями: 1) змодельовати характерний клінічно-анатомічний комплекс симптомів, етіологічно відтворити хворобу (анаеробно-аеробна асоціація мікроорганізмів що містить від 2 до 10 видів з деякими варіаціями в різних популяціях [1, 9, 14], з переважанням *Staphylococcus aureus* (59%), *Staphylococcus epidermidis* (19%); *Bacteroides fragilis* (21%), *Peptococcus spp.* (19%) та *Fusobacterium spp.* (12%); 2) відтворити її патогенез (мікроциркуляторну недостатність як наслідок тривалої гіперглікемії та діабетичної нейропатії внаслідок

пошкодження *vasa nervorum* [10, 13, 14]); 3) створити умови для дослідження ефективності подальшого лікування.

У переважній більшості випадків модель на експериментальних тваринах (щурах) відображає тільки окремі етіо-патогенетичні чинники, зокрема гіперглікемію та контамінацію мікроорганізмів [3], а також має низку суттєвих технічних недоліків (зокрема високу смертність, частий відсоток розвитку міжм'язових флегмон або, на противагу, самовільне загоєння рани).

**Мета дослідження**

Розробити ефективну та адекватну клінічному прототипу експериментальну модель синдрому стопи діабетика.

**Матеріал і методи**

Робота виконана на 156 статевозрілих білих щурах лінії *Wistar* масою тіла 150±20г. Дослідження проведено з дотриманням основних положень наказу МОЗ України № 66 від 13.02.2006 р., GLP (1981 р.), Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин (1977 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р.

Перед початком моделювання гнійно-некротичного процесу у всіх тварин моделювали цукровий діабет шляхом підшкірного уведення 5% розчину алоксану в дозі 170 мг/кг маси тіла після 24-х годинного голодування. Перебіг розвитку

діабету контролювали за допомогою визначення рівня глюкози в крові, виявлення глюкози в сечі, за збільшенням споживання води, зниженням маси тіла. У дослід брали щурів з рівнем глікемії понад 16 ммоль/л. Гнійно-запальне вогнище моделювали на 13-й добу.

Тварини, методом випадкової рандомізації (MS Excel 2007) поділені на 4 групи: 1-ша (n=19) моделювання гнійної рани за методом С.С. Казакова [2], 2-га (n=22) моделювання гнійної рани за розробленою методикою (скарифікаційний метод [6]), 3-тя (n=18) моделювання гнійної рани методом М.Д. Абдулаєва [5], 4-та (n=28) моделювання гнійної рани за розробленою методикою (скарифікаційно-сорбційний метод) [7].

Порівняння експериментальної моделі відповідно клінічному прототипу відбувалося шляхом візуальної оцінки трофічної виразки, патоморфологічних і гістологічних змін у ній. Візуально адекватними клінічному прототипу вважались такі гнійно-некротичні зміни, при яких на 24-26 добу в експериментальних тварин відзначались ознаки в'ялості, неактивної грануляції (дно рани представлено сірватими тканинами з невеликими ділянками скупчення червонуватих зерен, утворених судинами), гіпореактивність оточуючих тканин (незначний набряк та гіперемія) та відсутність крайової епітелізації, виділення густого сморідного гною, але в той самий час без ознак швидкого розповсюдження процесу по м'язово-фасціальних просторах з утворенням флегмон.

Із метою встановлення відповідності клінічному прототипу розробленої вдосконаленої методики забирали біоптати з ділянок гнійно-некротичного вогнища на 14 та 26 добу для подальшого гістологічного дослідження в порівнянні з двома групами контролю: 20 піддослідних тварин з гнійно-некротичними змінами шкіри на фоні нормоглікемії та 10 біоптатів з ампутованих нижніх кінцівок з приводу гангрені при синдромі стопи діабетика. Шматочки тканин фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, заливали в парафін. Парафінові зрізи забарвлювали гематокси-

лін-созином. Статистичне опрацювання матеріалу проводили за допомогою програмного забезпечення STATISTICA V.6.0 та MS Excel 2007 з використанням методів варіаційної статистики з обчисленням t-критерію Стьюдента.

### Обговорення результатів дослідження

За результатами наших досліджень із застосування моделей синдрому стопи діабетика ми виявили статистично вірогідну більшу чутливість самців до алоксан-індукованого діабету ніж самок (табл. 1). Кількість експериментальних щурів, що загинули на етапі формування гіперглікемії, склала 33 тварин (24,3%), кількість тварин, в яких не розвинувся ЦД – 16 (11,7%). Гнійно-запальне вогнище на фоні гіперглікемії було сформоване у 87 тварин (64,0%).

Метод моделювання гнійної рани за методом С.С. Казакова – гнійно-запальне вогнище моделювали на попередньо поголеній міжлопатковій ділянці введенням підшкірно 0,5 мл скипидару та за 15-25 хвилин в окремому шприці *S. aureus* 0,1 мл ( $10^7$ - $10^9$  мікробних одиниць). Через 48-72 год. розвивались ознаки, притаманні некротичним змінам при ЦД. Проте в багатьох випадках (26%) ми спостерігали розвиток міжм'язової флегмони, або навпаки, відсутність некротичних змін (рис.1) (16,0%). Однією з модифікацій метода С.С.Казакова є уведення підшкірно 10% розчин калової суспензії у дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла.

Суть моделювання гнійної рани за методом М.Д.Абдулаєва полягає у висіченні шкірно-фасціального клаптя в ділянці міжлопаткової зони у вигляді квадрата 2x1,5 см<sup>2</sup>, з наступним роздушуванням м'язового дна затискачем Kocher та контамінацією розчином мікроорганізмів. При цій методиці відзначалася висока летальність та висока частота розвитку поширених флегмон (рис. 2) (50%).

Враховуючи вище перераховані недоліки та позитивні моменти попередніх моделей нами запропонована власна скарифікаційна модель діабетичної стопи [6]. Вона відрізняється тим, що власне гнійно-запальне вогнище моделювали не одним видом мікроорганізмів, а анаеробно-аеро-

Таблиця 1

Характеристика чутливості піддослідних тварин до алоксан-індукованої гіперглікемії (n=136)

Піддослідні тварини	Всього тварин в експерименті	Кількість тварин в яких сформовано стаціонарну гіперглікемію	Кількість тварин в яких гіперглікемія не індукована	Кількість тварин які загинули на етапі формування гіперглікемії
Самці	72 (52,9%)	49 (36,0%)	6 (4,4%)	21 (15,5%)
Самки	64 (47,1%)	38 (28,0)	10 (7,3%)	12 (8,8)
Всього	136 (100%)	87 (64,0%)	16 (11,7%)	33 (24,3)

Таблиця 2

## Порівняльна характеристика способу моделювання «стопи діабетика» (n=86)

Прототип	Кількість тварин	Створення візуально адекватної клінічному прототипу моделі *	Загоєння змодельованої рани	Розвиток глибокої міжм'язової флегмони	Кількість тварин, які загинули на етапі формування гнійно-некротичного вогнища
Спосіб М.Д. Абдулаєва	18 (21%)	8 (44,5%)	0 (0%)	10 (55,5%)	6 (33,3%)
Спосіб С.С. Казакова	19 (22%)	11 (58%)	3 (16%)	5 (26%)	2 (10,5%)
Запропонований скарифікаційний спосіб	21 (24,5%)	13 (62%)	7 (33,3%)	1 (4,7%)	0
Запропонований скарифікаційно-сорбційний спосіб	28 (32,5%)	21 (75%)	3 (10,7%)	4 (14,3%)	3 (10,7%)
Всього	86 (100%)	53 (61,5%)	13 (15%)	20 (23,5%)	11 (12,5%)

**Примітка.** \* – наявність в'ялої грануляції, гіпореактивності оточуючих тканин, відсутність крайової епітелізації, виділення густого сморідного гною



**Рис. 1.** Моделювання за методом С.С. Казакова, 6 доба експерименту, ознаки загоєння рани – відсутність гнійно-некротичного вогнища, епітелізація ділянки некрозу. Цифрове фото



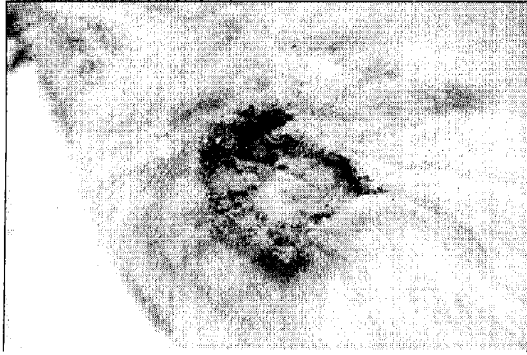
**Рис. 2.** Поширена міжм'язова флегмона при моделюванні за методом М.Д. Абдулаєва, 4 доба експерименту розповсюдження процесу по міжреберних проміжках, наявність гнійних «кишень» в підпапоневротичному просторі спини та грудної клітки. Цифрове фото



**Рис. 3.** Етап моделювання синдрому стопи діабетика скарифікаційним методом (зняття верхніх шарів дерми шляхом скарифікації). Цифрове фото



**Рис. 4.** Етап моделювання синдрому стопи діабетика скарифікаційно-сорбційним методом, 6 доба експерименту - силікогелеві контейнери з сумішшю мікроорганізмів у змодельованому гнійно-некротичному вогнищі – фаза ексудації. Цифрове фото

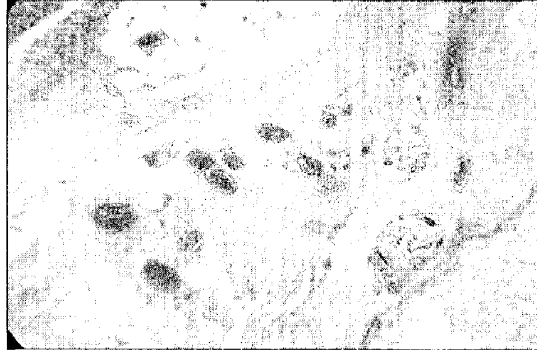


**Рис. 5.** Етап моделювання синдрому стопи діабетика скарифікаційно-сорбційним методом, 20 доба експерименту - в'яла грануляція та виділення незначного гною без ознак перифокального запалення або крайової епітелізації. Цифрове фото

бною сумішшю за допомогою скарифікаційного методу (рис. 3): у міжлопаткову поголену зону (розмір 1,5 см на 2,5 см), за допомогою інсулінового шприца методом скарифікації наносили суміш аеробних і анаеробних мікроорганізмів *S.aureus*, *S.epidermidis*, *B.fragilis*, *Peptococcus spp.* и *Fusobacterium spp.* у кількості  $10^7$ - $10^9$  мікроорганізмів в 1 мл у верхні шари дерми (до появи «кров'янистої роси»). Проте ця методика мала також ряд суттєвих недоліків, а саме: відсутність ішемічного компонента в патогенезі моделювання гнійного вогнища, високу інфекційну дозу агента, що створює передумови для розвитку глибокої флегмони і не відповідає клінічному розвитку процесу (хронічне інфікування малими дозами сапрофітної і умовно патогенної мікрофлори), а також велика кількість випадків (33,3%) загоспня модульованої рани до початку розвитку змін, морфологічно схожих на клінічний прототип.

Для вирішення поставлених завдань та більш адекватного розкриття патогенезу досліджуваного синдрому нами розроблено удосконалений метод скарифікаційно-сорбційний [7], при якому гнійно-запальне вогнище моделювали на 13-у добу алоксан-індукованої гіперглікемії у підготовленій методом скарифікації міжлопатковій зоні піддослідних тварин за допомогою імплантації силікогелевого контейнера з сумішшю аеробних та анаеробних мікроорганізмів за допомогою капшуківого шва (рис. 4). При цій методиці відтворення моделі «стопи діабетика» із врахуванням стану мікроциркуляції та морфологічних змін (рис. 5) ми спостерігали у 21 тварини (75%)

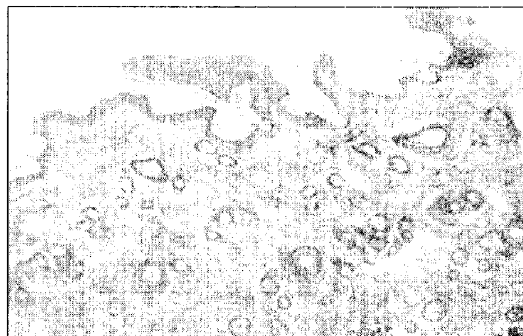
При гістологічному дослідженні на ранніх етапах розвитку досліджуваного синдрому (14 доба) виявлено практично ідентичні зміни стану ранового процесу: у всіх мікропрепаратах спостерігалася картина гнійного запалення з дифузною ек-



**Рис. 6.** Мікропрепарат з ділянки гнійно-некротичного вогнища у тварин із гіперглікемією, 26 доба експерименту - мікротромбози, фібриноїдний некроз та набряк тканин. Забарвлення гематоксилін-еозином.  $36 \times 60$

судацією гіподерми, вогнищевою деструкцією жирової тканини, значною інфільтрацією поліморфоядерними лейкоцитами, рани були вкриті пластинами фібрину і містили детрит.

Подальше дослідження (26 доба) підтвердили різницю в динаміці репараційних процесів у тварин з різними рівнями глікемії. Так, в основній групі, а також у препаратах клінічного прототипу, відзначалося значне пригнічення репаративного процесу (рис. 6): ознаки мікроциркуляторних порушень (стаз еритроцитів, мікротромбози, васкуліт, лімфостаз, фібриноїдний некроз, значний набряк тканин), недостатність макрофагальної реакції, пригнічення проліферації та дистрофія фібробластів, порушений синтез колагену, що значно відрізнялося від нормоглікемічного контролю, де визначалися зменшення зони попереднього некрозу на дозріваючу та зрілу грануляційну тканину (грануляційна тканина мала яскраво-рожевий колір, м'яку консистенцію, мілко-зернисту поверхню, утворену петлеподібно закрученими капілярами) (рис. 7). Вогнищеві інфільтрати



**Рис. 7.** Мікропрепарат із ділянки гнійно-некротичного вогнища у тварин із нормоглікемією, 26 доба експерименту - утворення зрілої грануляційної тканини. Забарвлення гематоксилін-еозином.  $36 \times 60$

були розміщені здебільшого на поверхні рани, в гіподермі різко зменшилась ексудативні реакції, більше виражений, порівняно з основною групою і клінічним прототипом, розвиток судин як вертикальних, так і горизонтальних.

### Висновки

1. Існуючі моделі синдрому стопи діабетика (М. Д. Абдулаєва, С. С. Казакова) мають ряд суттєвих технічних недоліків (зокрема високу смертність, частий відсоток розвитку між'язових флегмон або навпаки – самовільне загоєння рани) та не повністю розкривають патогенетичний розвиток змін в гнійній рані на фоні гіперглікемії.

2. Застосування розробленого скарифікаційно-сорбційного методу дозволяє сформувати адекватні патоморфологічні зміни у тварин, ідентичні клінічному прототипу, що дає змогу детально вивчити вплив місцевої терапії при синдромі стопи діабетика.

### Перспективи подальших досліджень.

Використання розробленого скарифікаційно-сорбційного методу моделювання синдрому стопи діабетика дасть змогу в подальшому дослідити вплив місцевої терапії на перебіг репараційних процесів при лікуванні синдрому діабетичної стопи.

**Література.** 1. *Выбор антибактериальной терапии у больных с осложненным синдромом стопы диабетика* / [Б.С. Брискин, А.В. Прошин, В.В. Лебедев [та ін.] // *Consilium Medicum*. – 2004. – №1 (06). – С. 39-61. 2. *Морфология инфицированной хронической раны при её лечении биологически активными препаратами наружного применения* / [Л.С. Васильева, С.С. Казаков, Л.К. Куликов, А.А. Смирнов] // *Сиб. мед. журнал*. – 2009. – №4. – С. 41-43. 3. *Кузнецов Ю.А.* Сахарный диабет мелких домашних животных // *Вет. пагол.* – 2005. – №4. – С. 82-94. 4. *Ларін О.С.* Організація подіагностичної допомоги та профілактика розвитку синдрому діабетичної стопи / О.С. Ларін // *Здоров'я України*. – 2007. – №22 (1). – С. 69-71. 5. *Лігоненко О.В.* Вплив естрогенів та ліпосом на перебіг гнійної рани в експерименті / О.В. Лігоненко, І.І. Дігтяр // *Клін. хірургія*. – 2008. – №7. – С. 55-58. 6. *Пат. 25532 UA, МПК G09B 23/28 (2007. 01)* Спосіб моделювання синдрому діабетичної стопи в експерименті / Лікутов С.А., Сидорчук Р.І., Білик І.І., Полянський О.І., Бурега О.С., Михайловський О.В., Кнут Р.П.; заявник та патентовласник Лікутов С.А., Сидорчук Р.І., Білик І.І., Полянський О.І., Бурега О.С., Михайловський О.В., Кнут Р.П., – u 200703928; заявл. 10.04.07; опубл. 10.08.2007, Бюл. № 12, – 2007р. 7. *Пат. 42826 UA, МПК G09B 23/28 (2009. 01)* Спосіб експериментального моделювання синдрому «стопи діабетика» скарифікаційно-сорбційним методом / Лікутов С.А., Сидорчук Р.І., Кнут

Р.П.; заявник та патентовласник Лікутов С.А., Сидорчук Р.І., Кнут Р.П. – u 200900937; заявл. 09.02.09; опубл. 27.07.2009, Бюл. № 14, – 2009р. 8. *Тронько М.Д.* Сучасний стан та перспективи розвитку фундаментальної та клінічної ендокринології в Україні / М.Д. Тронько // *Здоров'я України*. – 2007. – №10 (1). – С. 10-13. 9. *Propagation of anaerobic bacteria within an aerobic multi-species chronic wound biofilm model* / [Y. Sun, E. Smith, R. Wolcott, S. Dowd] // *J. Wound Care*. – 2009. – №18 (10). – P. 426-431. 10. *Dinh T.* Review of the mechanisms implicated in the pathogenesis of the diabetic foot / T. Dinh // *Int. J. Low Extrem. Wounds*. – 2005. – № 4. – P. 154-159. 11. *Lobmann R.* Molecular fundamentals of wound healing in diabetic foot syndrome / R. Lobmann, G. Schultz // *Med. Klin.* – 2003. – Vol. 98. – P. 292-301.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Е. А. Ликсутов

**Резюме.** Проведено сравнительное исследование экспериментальных моделей синдрома стопы диабетика (методов С. С. Казакова, Н. Д. Абдулаева, скарификационного метода и скарификационно-сорбционного метода). На основе анализа существующих моделей с учетом их недостатков, патогенетических и этиологических факторов эталонного процесса созданы собственные модели патологического состояния. Исследована патоморфологическая адекватность клиническому прототипу разработанной усовершенствованной модели, заключающейся в соответствии ангиопатических изменений и процессов ревазуляризации в гнойно-некротических очагах.

**Ключевые слова:** Модель синдрома стопы диабетика, аллоксановый диабет

### THE MODELING OF NECROTIC SUPPURATIVE PROCESS IN EXPERIMENTAL ALLOXAN-INDUCED DIABETES

I. A. Liksutov

**Abstract.** A comparative study of different experimental models of diabetic foot syndrome (methods by S. S. Kazakov, M. D. Abdulaev, methods of scarification and scarification with sorption) has been performed. The creation of proposed original models was based on the analysis of presenting ones with regard to their shortcomings and etiological and pathogenetical factors of standard process. The pathomorphological coincidence with clinical prototype of proposed improved model has been studied. This was consisted in studying the correspondence of angiopathic changes with revascularization process in necrotic suppurative focus.

**Key words:** diabetic foot syndrome model, alloxan-induced diabetes.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

*Clin. and experim. pathol.* - 2010. - Vol.9, №1 (31). - P.36-40.

Надійшла до редакції 25.02.2010

Рецензент – проф. І. Ю. Полянський

© С. А. Лікутов. 2010