

19. Oxid dusnatý v reparácii

Ľubica Bernátová

(všeobecné lekárstvo, 6. ročník)

Spoluautori: Michaela Hýblová²

Školiteľ: doc. MUDr. Pavol Janega, PhD.^{1,2}

¹ Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave;

² Medirex group academy n.o., Nitra

Úvod

Oxid dusnatý (NO) je molekula, ktorá bola v minulosti označovaná za plyn s negatívnym dopadom na životné prostredie. Historický prelom v ére NO nastal v roku 1992, keď ho časopis Science označil za molekulu roka a v roku 1998, keď Furchgott, Murad a Ignaro získali Nobelovu cenu za objav NO ako signálnej molekuly v kardiovaskulárnom systéme. Toto ocenenie vzbudilo tak veľký záujem, že sa NO dostal do popredia odborných časopisov.

V súčasnosti je už vedecky dokázané, že NO je molekulou s významným pleotropným účinkom v organizme, schopná pôsobiť ako voľný radikál a súčasne aj ako biologická signálna molekula. Zaraďuje sa medzi dôležitých mediátorov fyziologických, ale i patologických dejov. Aj keď má kľúčový význam pri poškodení tkaniva a rozvoji zápalu, rovnako dôležitý je aj jej efekt na aktiváciu reparačných procesov v organizme. Regulačný účinok NO má svoju úlohu pri obnovovaní integrity poškodeného tkaniva. NO uvoľnený v reparovanom tkanive prostredníctvom indukčnej NO syntázy (NOS2) a endotelovej NO syntázy (NOS3) reguluje tvorbu kolagénu, proliferáciu a diferenciáciu buniek na zvieracích modeloch hojenia rán. Delícia génu pre NOS2 spomaľuje hojenie, a naopak experimentálne podanie donorov NO zlepšuje hojenie rán. Z toho dôvodu sa donory NO považujú za terapeutické látky v procese hojenia rán a v súčasnosti je cieľom liečby chronických rán začlenenie NO do polymérov pri výrobe krycích materiálov (2).

Cieľom predloženej práce bolo overiť tvorbu NOS2 a NOS3 v procese reparácie za fyziologických podmienok a u pacientov s prebiehajúcou komplikáciou diabetes mellitus.

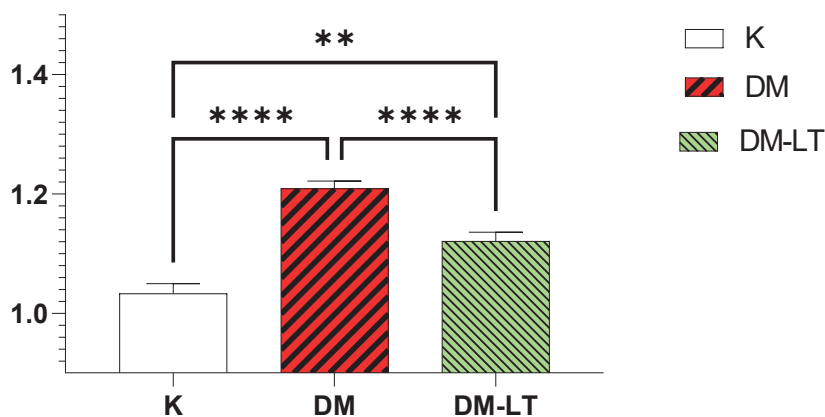
Materiál a metódy

Základný súbor štúdie tvorilo 5 pacientov bez diabetes mellitus s hojacou sa kožnou ulceráciou a 22 pacientov s diabetes mellitus s rozvinutou diabetickou nohou v štádiu hojenia. Získaný bioptický materiál u pacientov bez diabetes mellitus pochádzal z archívu Ústavu patologickej anatómie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Pacienti s diabetes mellitus boli súčasťou projektu DIASTEM „Využitie mezenchymálnych kmeňových buniek v kombinácii s ďalšími podpornými biologickými postupmi v liečbe chronického diabetického vredu“. Pacienti boli poučení a podpísali informovaný súhlas. Riešenie projektu bolo schválené etickou komisiou Nemocnice s poliklinikou, Malacky. Časť pacientov s diabetes mellitus bola liečená larválnou terapiou, ktorá mala prispieť k odstráneniu nekrotických buniek a podporiť hojenie tkaniva. Inklúznym kritériom pri výbere základného súboru bolo, aby na základe klinickej správy išlo o chronický vred s dobou hojenia dlhšou ako 10 dní.

Pacientom bola odobratá vzorka z hojacej sa rany, ktorá bola štandardne histologicky spracovaná. Následne po 1 mesiaci bola odobratá kontrolná vzorka z hojaceho sa granulačného tkaniva. Súčasne boli pripravené 2 paralelné rezy, ktoré boli imunohistochemicky farbené s použitím komerčných protilátok proti NOS2 a NOS3. V hodnotenom tkanive sme sa sústredili samostatne na ložiská granulačného tkaniva, charakteristické neovaskularizáciou so sprievodným zápalom a na ložiská zápalovo nezmenenej dermy v okolí ulcerácie. Pozitivita proteínov bola vyšetrená svetelným mikroskopom a kvantifikovaná morfometricky s využitím obrazového analyzátora Fiji. Pozitivitu sme následne vyjadrili ako pomer k príslušnej priemernej pozitivite v kontrolnej skupine pacientov bez diabetes mellitus. Takto získané výsledky sme štatisticky spracovali a vyjadrili ako priemer \pm štandardná chyba merania.

Výsledky

NOS2 vykazovala počas reparácie v granulačnom tkanive pravidelnú expresiu v cievnom endoteli, pericytoch a v okolitých zápalových bunkách. U pacientov s diabetes mellitus pozorujeme signifikantne vyššiu expresiu NOS2 v reparujúcom sa granulačnom tkanive (červený a zelený stĺpec) ako u pacientov s ulceráciou kože bez diabetes mellitus (biely stĺpec). Expresia NOS2 však signifikantne poklesla po 1 mesiaci larválnej terapie (zelený stĺpec), ale naďalej ostala signifikantne vyššia. Tento jav je schematicky znázornený na obrázku 1.

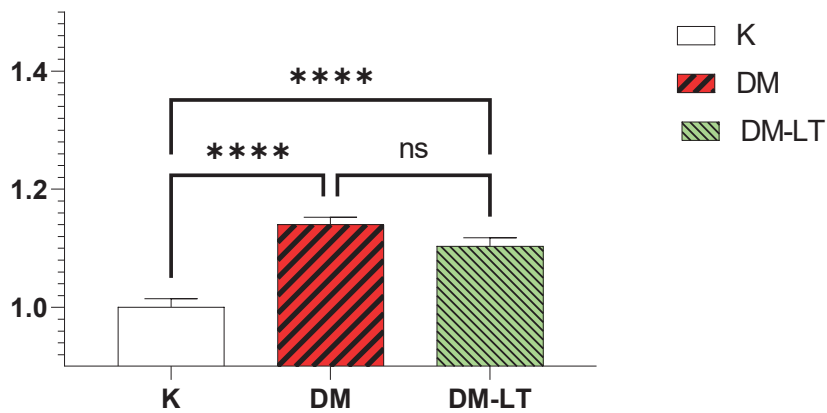


Obrázok 1 NOS2 počas reparácie v granulačnom tkanive

Vyjadrené ako index v porovnaní voči pozitivite v okolitom tkanive u pacientov bez diabetes mellitus. **** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ v porovnaní voči kontrolnej skupine pacientov bez diabetes mellitus, **** $p < 0,001$ v porovnaní pred liečbou larválnou terapiou.

Expresia NOS2 počas reparácie v okolitom tkanive taktiež ako počas reparácie v granulačnom tkanive vykazovala pravidelnú expresiu v cievnom endoteli, pericytoch a v okolitých zápalových bunkách. U pacientov s diabetes mellitus pozorujeme signifikantne vyššiu expresiu NOS2 v okolitom tkanive ako u pacientov v kontrolnej skupine bez diabetes mellitus. Výsledky pozorovania sú schematicky znázornené na obrázku 2.

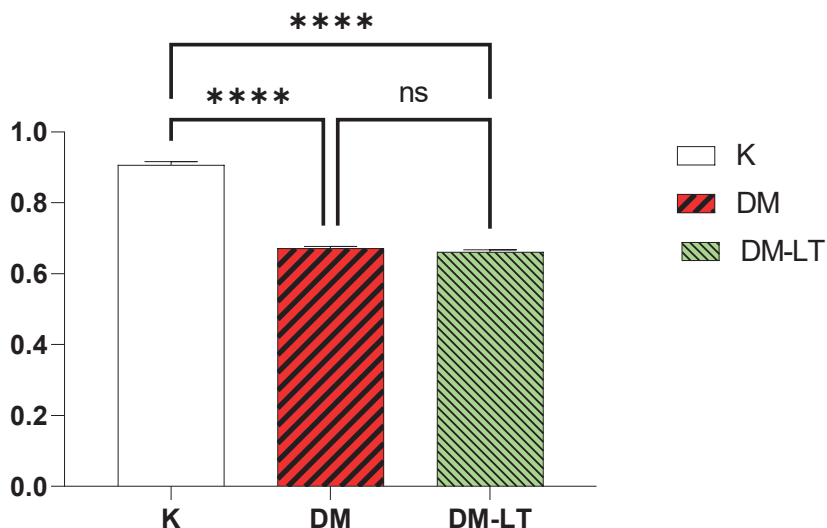
Zdá sa teda, že samotný DM priamo vedie k zvýšenej expresii NOS2.



Obrázok 2 NOS2 počas reparácie v okolitom tkanive

Vyjadrené ako index v porovnaní voči pozitívite v okolitom tkanive u pacientov bez diabetes mellitus. **** $p < 0,001$ v porovnaní voči kontrolnej skupine pacientov bez diabetes mellitus.

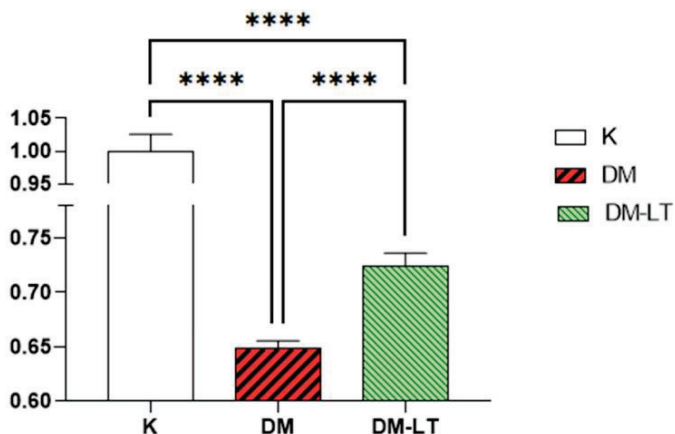
Počas reparácie v granulačnom tkanive dominuje najmä pozitívita NOS3 v cievnom endoteli a v okolitých pericytoch, pričom pozitívitu NOS3 pozorujeme aj v okolitých zápalových bunkách. U pacientov s diabetes mellitus s komplikáciou diabetickej nohy pozorujeme signifikantný pokles expresie NOS3 v reparujúcom sa granulačnom tkanive v porovnaní s pacientami bez diabetes mellitus s ulceráciou kože.



Obrázok 3 NOS3 počas reparácie v granulačnom tkanive

Vyjadrené ako index v porovnaní voči pozitívite v okolitom tkanive u pacientov bez diabetes mellitus. **** $p < 0,001$ v porovnaní voči kontrolnej skupine pacientov bez diabetes mellitus.

Počas reparácie v okolitom tkanive dominuje najmä pozitivita NOS3 v cievnom endoteli a v okolitých pericytoch. U pacientov s diabetes mellitus s komplikáciou diabetickej nohy pozorujeme nápadný pokles expresie NOS3 v okolitom tkanive v porovnaní s pacientami s ulceráciou kože bez diabetes mellitus. Táto signifikantne stúpa po 1 mesiaci larválnej terapii, čo schematicky znázorňuje obrázok 4.



Obrázok 4 NOS3 počas reparácie v okolitom tkanive

Vyjadrené ako index v porovnaní voči pozitivite v okolitom tkanive u pacientov bez diabetes mellitus. **** $p < 0,001$ v porovnaní voči kontrolnej skupine pacientov bez diabetes mellitus, **** $p < 0,001$ v porovnaní pred liečbou larválnou terapiou.

Diskusia

Oxid dusnatý je biologicky aktívna molekula, ktorá má v tkanivách významnú úlohu pri aktivácii reparačných procesov. Regulačný účinok oxidu dusnatého má úlohu pri obnovení integrity poškodeného tkaniva (2). Uvažuje sa, že práve zmenená produkcia NO sa môže podieľať na zmenách reparácie tkaniva za patologických podmienok.

Vyhodnotením expresie NOS3 u pacientov s diabetes mellitus sme pozorovali jej signifikantne nižšiu expresiu tak v reparujúcom sa granulačnom tkanive, ako aj v okolitom tkanive, v porovnaní s pacientami bez diabetes mellitus. Taktiež sme však zistili, že pacientom s diabetes mellitus, ktorým bola podaná larválna terapia sa expresia NOS3 v okolitom tkanive signifikantne zvýšila po prvom mesiaci, pričom expresia v granulačnom tkanive bola u oboch skupín pacientov s diabetes mellitus rovnaká. Predpokladáme, že pokles tvorby NO prostredníctvom NOS3 sa môže podieľať na patologických zmenách mikrocirkulácie pri ochorení diabetes mellitus aj za fyziologických podmienok. Podobné výsledky preukázal aj Safiah Mokhtar a kol. (2013), ktorí publikovali štúdiu, ktorej výsledky tiež ukazujú, že expresia NOS3 je znížená u diabetickej pacientov v porovnaní s nediabetickejmi kontrolami. Predpokladajú, že tento patomechanizmus môže súvisieť s vysokými hladinami glukózy v plazme, nakoľko už Ding a kol. (2000) a Srinivasan a kol. (2004) zistili, že expresia NOS3 v prostredí s vysokou koncentráciou glukózy je znížená, v porovnaní s prostredím s nižšou koncentráciou glukózy.

V prípade expresie NOS2 pozorujeme u pacientov s diabetes mellitus signifikantne zvýšenú expresiu NO syntázy v reparujúcom sa granulačnom tkanive, ako aj v okolitom tkanive.

Diabetes mellitus je charakteristický zápalovým fenotypom v reparujúcom sa tkanive. Liu a kol. (2008) preukázali, že diabetes mellitus u pacientov vedie k up-regulácii expresie NOS2. Podobný nález publikovali aj Bahadoran a kol. (2019), ktorí taktiež opísali zvýšenú expresiu NOS2 u pacientov s diabetes mellitus v dôsledku zápalových cytokínov. Hoci je syntéza NO počas hojenia nevyhnutná, ak sa teda sa NO produkuje vo vyššej miere v dôsledku zvýšenej aktivity NOS2, pôsobí NO vo vyšších koncentráciách prooxidačne a predlžuje zápalovú fázu hojenia rany. Zvýšená aktivita enzýmu preto paradoxne môže viesť k potlačeniu bunkovej proliferácie, syntézy kolagénu a k poruche uzatvárania rany. Vysoká syntéza NO prostredníctvom NOS2 môže byť škodlivá, ak pokračuje aj po prvých dňoch hojenia (4). Tento patomechanizmus je príčinou rozvoja chronických rán u pacientov s diabetes mellitus a zabraňuje prechodu zo zápalovej fázy do proliferatívnej fázy hojenia a tak bráni v tvorbe nového a zdravého tkaniva (6).

Konštatujeme, že u pacientov s diabetes mellitus je vyššia hladina NOS2 a zároveň nižšia hladina NOS3 v procese reparácie v granulačnom a okolitom tkanive ako u pacientov bez diabetes mellitus. Keďže rozdiel medzi skupinami je nápadný a signifikantný, predstavuje toto zistenie možnú cestu v budúcnosti pre liečebné postupy ovplyvňujúce regulácie sprostredkované prostredníctvom NO pri liečbe diabetickej nohy ako závažnej komplikácie ochorenia diabetes mellitus.

PodĎakovanie:

Táto práca vznikla vďaka podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-17-0526 (30%) a vďaka podpory v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Závažné civilizačné ochorenia a COVID-19, kód ITMS: 313011AVH7 (70%), spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

1. Bahadoran Z, Mirmiran P, Ghasemi A, Kashfi K. Type 2 Diabetes and Cancer: The Nitric Oxide Connection. *Crit Rev Oncog*. 2019; 24(3): 235-242
2. Bernátová L, Janega P. Oxid dusnatý a jeho význam pri poškodení tkaniva a v reparácii. *Newslab* 13 (2): 58-61
3. Ding Y, Vaziri ND, Coulson R, Kamanna VS, Roh DD. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(1): E11-7.
4. Chu AS, Delmore B. Arginine: What You Need to Know for Pressure Injury Healing. *Adv Skin Wound Care*. 2021; 34(12): 630-636.
5. Liu F, Xia M, Xu A. Expression of VEGF, iNOS, and eNOS is increased in cochlea of diabetic rat. *Acta Otolaryngol*. 2008; 128(11): 1178-86.
6. Malone-Povolny MJ, Maloney SE, Schoenfisch MH. Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Adv Healthc Mater*. 2019; 8(12): e1801210.
7. Safiah Mokhtar S, M Vanhoutte P, W S Leung S, Imran Yusof M, Wan Sulaiman WA, Zaharil Mat Saad A, Suppian R, Ghulam Rasool AH. Reduced expression of prostacyclin synthase and nitric oxide synthase in subcutaneous arteries of type 2 diabetic patients. *Tohoku J Exp Med*. 2013; 231(3): 217-22.

8. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia*. 2004 Oct;47(10): 1727-34.