

Верхневолжский медицинский журнал. 2024; 23(3): 18–22
 Upper Volga Medical Journal. 2024; 23(3): 18–22
 УДК 616.5-001.17-003.93-085-092.4

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ТЕРМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ КОЖИ КРЫС ПРИ ПРИМЕНЕНИИ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНИЯ N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОАТА

**Марина Анатольевна Петровская¹, Маргарита Борисовна Петрова¹,
 Елена Николаевна Егорова², Елена Вячеславовна Андрианова²**

¹Кафедра биологии,

²кафедра биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики

ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь, Россия

Аннотация. В эксперименте на крысах оценивались репаративные свойства 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата по морфологии стадий заживления ожоговых ран кожи и их взаимосвязи с содержанием сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) в регенерирующих тканях и сыворотке крови.

Ключевые слова: ожоговая рана кожи, регенерация, фазы заживления, грануляционная ткань, факторы роста

Для цитирования: Петровская М.А., Петрова М.Б., Егорова Е.Н., Андрианова Е.В. Морфологические и биохимические особенности регенерации термических ожогов кожи крыс при применении 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата. Верхневолжский медицинский журнал. 2024; 23(3): 18–22

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FEATURES OF REGENERATION OF THERMAL SKIN BURNS IN RATS AT APPLICATION OF 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINIUM N-ACETYL-6-AMINOHEXOANOATE

M. A. Petrovskaya, M. B. Petrova, E. N. Egorova, E. V. Andrianova

Tver State Medical University, Tver, Russia

Abstract. In an experiment on rats, the reparative properties of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate were assessed according to the morphology of the stages of healing of skin burn wounds and their relationship with the content of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in regenerating tissues and blood serum.

Key words: skin burn, regeneration, healing phases, granulation tissue, growth factors

For citation: Petrovskaya M. A., Petrova M. B., Egorova E. N., Andrianova E. V. Morphological and biochemical features of regeneration of thermal skin burns in rats at application of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexanoate. Upper Volga Medical Journal. 2024; 23(3): 18–22

Введение

Сохранение целостности кожного покрова и его оптимальное восстановление при различных повреждениях являются важными звеньями поддержания гомеостаза внутренней среды организма. Одной из перспективных разработок по поиску эффективных репаративных является создание препаратов на основе ацетилсалициловой кислоты (АСК). Преимуществом известных и вновь синтезированных производных АСК — солей серебра, церия, пиридиния — являются низкая токсичность и способность стимулировать регенерацию тканей [1–5]. При этом до настоящего времени остается нерешенным вопрос о влиянии 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-

аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ) на морфологические особенности различных стадий репарации термических ожогов кожи и их взаимосвязь с содержанием факторов роста в регенерирующих тканях и сыворотке крови.

Цель работы — доклиническая оценка регенераторного потенциала 2-Э-6-М-3-ГП N-А-6-АГ на модели заживления ожоговых ран кожи у крыс, основанная на сопоставлении морфологических показателей и уровней сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) в регенерирующих тканях и сыворотке крови в различные фазы процесса репарации.

Таблица 1. Морфометрические параметры структур регенерата кожи крыс в динамике эксперимента

Table 1. Morphometric parameters of rat skin regenerate structures in the dynamics of the experiment

Группы животных (по n = 21)		Показатели, X±SD				
		толщина струпа, мкм	лейкоцитарный вал, мкм	грануляционная ткань, мкм	эпителий, мкм	
					протяженность	на границе
7-е сутки	Контрольная 1	367,9 ± 15,7	142,8 ± 7,4	484,7 ± 12,9	386,3 ± 14,4	20,5 ± 6,6
	Контрольная 2	325,1 ± 14,7	131,2 ± 6,1	501,5 ± 14,0	401,3 ± 15,7	22,6 ± 6,4
	Опытная	233,5 ± 14,4*#	117,7 ± 12,2*	604,2 ± 13,0*	568,1 ± 22,2*	35,0 ± 7,2
14-е сутки	Контрольная 1	213,7 ± 13,6	88,1 ± 10,5	786,1 ± 14,6	601,2 ± 15,0	38,7 ± 7,1
	Контрольная 2	203,8 ± 10,2	79,9 ± 7,4	798,2 ± 10,2	610,9 ± 19,3	42,8 ± 11,5
	Опытная	56,1 ± 12,1*#	20,1 ± 6,4*#	904,5 ± 12,0*#	715,9 ± 14,5*#	61,7 ± 10,2

Примечание: * — различие статистически значимо ($p < 0,05$) между показателем у животных опытной и контрольных групп 1 и 2; # — различие статистически значимо ($p < 0,05$) между соответствующими показателями у животных группы по сравнению с предыдущим сроком эксперимента.

Материал и методы исследования

Проведение экспериментального исследования одобрено локальным Этическим комитетом ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 09 марта 2023 года). Оно проводилось с соблюдением требований гуманного обращения с лабораторными животными [6–8]. При этом 63-м лабораторным нелинейным крысам массой 180–200 г в межлопаточной области моделировали термический ожог площадью 225 мм² контактным способом под общей анестезией («Золетил-100» в дозе 8 мг/кг внутримышечно) с помощью стального трафарета (температура 240 °С, экспозиция 8 сек.). Крысы были разделены на три группы: в контрольной 1 группе наблюдали спонтанное течение заживления кожи лишь с имитацией аппликации в зоне ожога; крысам контрольной 2 группы на дефект наносили мазевую основу (полиэтиленгликоль); животным опытной группы — 2 % мазь с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ. Аппликации мази, мазевой основы и их имитации выполняли, начиная со вторых суток до завершения эксперимента. 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ синтезирован в АО «ВНЦ БАВ» (руководитель отдела химии и технологии синтетических лекарственных средств, д.х.н., профессор С. Я. Скачилова).

Регенерирующие ткани для морфологического исследования иссекали из зоны термического ожога на 7, 14 и 21-е сутки эксперимента и подвергали пробоподготовке по стандартным протоколам [8, 9]. Количественная оценка структур регенерата проводилась путем микроскопической морфометрии. Изготовление гомогенатов тканей производили в гомогенизаторе «Minilys» (Bertin Technologies, Франция). Кровь получали из хвостовой вены крыс. Концентрацию факторов роста в сыворотке крови и гомогенатах регенерирующих тканей определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Rat bFGF» производства Ray Biotech, Inc. и «Quantikine® ELISA Rat VEGF Immunoassay» производства R&D Systems, Inc. (США). Уровни специфических белков нормализовали по содержанию общего белка в гомогенатах тканей и выражали в пикограммах на мг белка (пг/мг белка). Концентрацию общего белка в супернатантах гомогенатов ре-

генерирующих тканей определяли биуретовым методом [10] с использованием наборов реагентов производства АО «ДИАКОН-ДС», Россия.

Результаты исследования и их обсуждение

Гистологический анализ микропрепаратов тканей из области термического повреждения показал, что смена фаз регенерационного гистогенеза у животных трех изучаемых групп носила стереотипный характер, однако морфологически и морфометрически были выявлены отличия в их осуществлении.

У животных опытной группы было установлено ускоренное, по сравнению с контрольными группами, течение всех фаз репарации. На 7-е сутки наблюдения (фаза воспаления) толщина струпа была значительно меньше, чем у животных контрольных групп 1 и 2 и составляла $257,3 \pm 1,2$ мкм против $368,5 \pm 19,7$ мкм и $310,6 \pm 5,6$ мкм соответственно (табл. 1). Лейкоцитарный вал почти не определялся, его толщина в 1,3 раза меньше, чем у крыс обеих контрольных групп, что свидетельствует о стихании воспалительного процесса.

Под действием мази морфологические изменения характеризуются активной миграцией клеток в область раны и последующей интенсификацией процессов дифференцировки клеточного компонента. К этому сроку наблюдения раневой дефект практически полностью заместился грануляционной тканью, отмечалось появление краевой эпителизации. На высокую степень зрелости грануляционной ткани указывало присутствие помимо популяции клеток воспаления, горизонтально ориентированных фибробластов и интенсивное новообразование капилляров.

Область ожоговой травмы к 14-м суткам эксперимента у животных опытной группы сохраняла тонкий струп (толщина $172,7 \pm 4,12$ мкм, что значимо меньше, чем в обеих контрольных группах), под который нарастал пролиферирующий пласт эпителия. Область дефекта была заполнена грануляционной тканью, с признаками преобладания пролиферативных процессов и активной перестройки в развитую соединительную ткань, а именно, резорбцией капилляров, значительным ростом фибробластов, более ранним появлением коллагеновых волокон и преобладанием среди них горизонтально направленных (рис. 1).

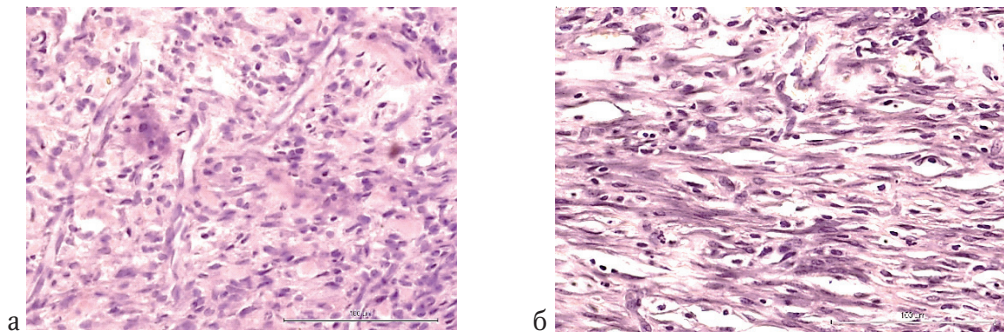


Рис. 1. Гистологическая структура центральной зоны регенерата в контрольной 1 (а) и опытной группе (б). 14-е сутки. Гематоксилин и эозин. Ок. $\times 10$, об. $\times 40$

Fig. 1. Histological structure of the central zone of the regenerate in control group 1 (a) and experimental group (b). 14th day. Hematoxylin and eosin. $\times 400$

Морфометрически были выявлены статистически значимые различия между сравниваемыми группами и в фазу пролиферации (14-е сутки). Причем в ходе смены фаз посттравматической регенерации значения толщины струпа и лейкоцитарного вала уменьшались, а грануляционной ткани, новообразованного эпителия и его протяженности увеличивались (см. табл. 1).

Эпителизация области бывшего ожога у мазь-индуцированных животных завершилась в среднем на 2,2 суток раньше в сравнении контрольными группами. Микроскопически на 21-е сутки наблюдался рост регенерирующего эпителия по всей площади дефекта с образованием производных кожи, в отличие от слабодифференцированного эпителия в группах контроля. У крыс контрольных групп к этому же сроку место дефекта еще хорошо просматривалось, сохранялись фрагменты струпа, тогда как у животных опытной группы этот участок практически неотличим от неповрежденной кожи.

Поскольку морфологические изменения в тканях всегда обусловлены их функциональным состоянием [11], нами были определены уровни bFGF и VEGF в регенерирующих структурах кожи и сыворотке крови (табл. 2).

Концентрации bFGF и VEGF в сыворотке крови и гомогенатах регенерирующих тканей кожи животных обеих контрольных групп статистически значимо не отличались во все сроки эксперимента.

В фазу воспаления (7-е сутки) концентрации bFGF и VEGF в сыворотке крови у животных опытной и контрольных групп статистически значимо не отличались. Уровни bFGF и VEGF в регенерирующих тканях кожи крыс опытной группы значимо превышали этот показатель в контрольных группах 1 и 2 соответственно на 14,5 % и 24,4 %, на 31,3 % и 27,7 % (все $p < 0,05$).

В фазу пролиферации к концу второй недели эксперимента (14-е сутки) уровни bFGF в сыворотке крови значимо не отличались между опытной и контрольными группами крыс, тогда как содержание VEGF у животных опытной группы было статистически значимо выше, чем в обеих контрольных группах на 21,8 % и 9,0 % соответственно. В этот срок эксперимента происходило повышение концентрации bFGF в регенерирующих тканях у всех исследуемых крыс. Однако особенно резкие изменения отмечались у животных опытной группы, у которых содержание этого цитокина по сравнению с контрольными группами было выше на 39,9 % и 50,1 % соответственно (оба $p < 0,05$). Различий в содержа-

Таблица 2. Содержание факторов роста в гомогенатах тканей и сыворотке крови в процессе регенерации термического ожога кожи крыс

Table 2. Content of growth factors in tissue homogenates and blood serum during the process of regeneration of thermal burns of the skin of rats

Группы животных (по n = 21)		Показатели, X \pm SD			
		bFGF, пг/мг белка	bFGF, пг/мл	VEGF, пг/мг белка	VEGF, пг/мл
7-сутки	Контрольная 1	25,9 \pm 1,60	6,42 \pm 0,47	97,0 \pm 13,9	76,0 \pm 6,24
	Контрольная 2	22,9 \pm 0,99	6,21 \pm 0,33	102,1 \pm 16,4	71,4 \pm 5,64
	Опытная	30,3 \pm 1,49*	7,54 \pm 0,33	141,2 \pm 15,5*	80,4 \pm 1,32
14-е сутки	Контрольная 1	51,0 \pm 2,73#	6,96 \pm 0,43	118,6 \pm 9,35	65,9 \pm 3,40
	Контрольная 2	42,1 \pm 3,30#	7,13 \pm 4,1	100,2 \pm 12,5	76,8 \pm 3,45
	Опытная	84,8 \pm 3,90* #	8,04 \pm 0,45	113,0 \pm 12,4	84,3 \pm 2,88*
21-е сутки	Контрольная 1	22,0 \pm 0,93#	6,08 \pm 0,40	66,3 \pm 3,43#!	71,2 \pm 3,65
	Контрольная 2	25,3 \pm 1,41#	6,73 \pm 0,54	72,3 \pm 6,88#!	68,6 \pm 4,46
	Опытная	12,7 \pm 1,07* #!	5,94 \pm 0,34#!	39,8 \pm 3,56* #!	69,4 \pm 4,47 #!

Примечание: * — различие статистически значимо ($p < 0,05$) между показателями у животных опытной и 1 и 2 контрольных групп; # — различие статистически значимо ($p < 0,05$) между соответствующими показателями у животных группы по сравнению с предыдущим сроком эксперимента; ! — различие статистически значимо ($p < 0,05$) между соответствующими показателями у животных группы на третьей неделе эксперимента в сравнении с первой неделей.

нии VEGF в гомогенатах новообразованных тканей кожи животных опытной и контрольных групп не обнаружено (оба $p > 0,05$).

К моменту завершения репарации (21-е сутки) концентрации обоих исследуемых факторов роста в сыворотке крови и регенерирующих тканях кожи снизились во всех группах животных, но особенно выраженные изменения наблюдались в опытной группе. Так, у крыс данной группы уровень bFGF в гомогенатах регенерирующих тканей был на 42,3 % и 49,8 % ниже, а уровень VEGF был на 39,9 % и 44,9 % ниже, чем в контрольных группах (все $p < 0,05$). Концентрации bFGF и VEGF в сыворотке крови крыс опытной группы в эту фазу репарации значимо не отличались от таковых у животных контрольных групп.

Сравнение содержания bFGF и VEGF в гомогенатах регенерирующих тканей кожи в каждой исследуемой группе животных в разные фазы раневого процесса по сравнению с предыдущей фазой показало однонаправленность изменений концентрации факторов роста во всех группах, но выявило различия по достоверности уровней этих изменений в контрольных и опытной группах. Так, повышение уровня bFGF в фазу пролиферации и его снижение к 21-му дню эксперимента было достоверным у животных всех исследуемых групп. Однако только в опытной группе животных уровень bFGF на 21-е сутки наблюдения был статистически значимо ниже такового к 7-м суткам эксперимента. К 14-м суткам эксперимента уровни VEGF в гомогенатах регенерирующих тканей кожи крыс всех групп значимо не отличались от таковых на предыдущем сроке эксперимента. В завершающий срок эксперимента было выявлено статистически значимое снижение уровня VEGF в гомогенатах регенерирующих тканей кожи всех групп животных, а также значения этого фактора роста были значимо ниже по сравнению с таковыми на 7-е сутки эксперимента.

В сыворотке крови концентрации bFGF и VEGF к окончанию эксперимента только у животных опытной группы были значимо ниже по сравнению с таковыми на 7-е и 14-е сутки эксперимента.

В проведенных нами исследованиях морфология раневого процесса и динамика факторов роста в контрольных группах не имели существенных различий, следовательно, обнаруженный эффект индукции заживления ожогов определяется действием мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, которое особенно выражено в фазы воспаления и пролиферации. Дебютная фаза (воспаления) характеризовалась активной продукцией и высвобождением из клеток проангиогенных факторов, в первую очередь VEGF, что морфологически проявилось более ранним неоваскулогенезом в новообразованной грануляционной ткани, а также достоверными различиями показателей толщины грануляционной ткани у крыс опытной группы.

Отмеченные в фазу пролиферации особенности морфогенеза, а именно, — активация пролиферации и дифференцировки клеток фибробластического ряда, синтезирующих коллаген, ассоциированы с возрастанием уровня bFGF и сохранением повы-

шенного уровня VEGF во всех группах, но особенно высоким у крыс, получавших аппликации мази. Это проявлялось стимулирующим влиянием на активность соединительной ткани — более ранней заменой клеток воспалительного ряда на фибробласты, ускорением трансформации грануляционной ткани в зрелую соединительную, характеризующейся редукцией капилляров.

Фаза эпителизации сопровождалась статистически значимым снижением содержания bFGF и VEGF в регенерирующих тканях кожи. Причем в опытной группе животных концентрация обоих факторов роста были ниже сравнительно с контрольными группами животных в 1,9 и 1,8 раза соответственно. Перестройка грануляционной ткани в зрелую соединительную стимулировала репарацию эпителия, что подтверждалось морфометрическими и планиметрическими данными.

Заключение

Таким образом, 2 % мазь с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ обладает репаративным потенциалом, о чем свидетельствует ускоренное сокращение как площади ожоговых дефектов, так и средних сроков их заживления в опытной группе по сравнению с контрольными. В связи с отсутствием существенных различий в морфологии раневого процесса в контрольных группах, можно утверждать, что обнаруженный эффект индукции заживления ожогов определяется действием мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, которое особенно выражено в фазы воспаления и пролиферации. Поскольку в опытной группе заживление термических ожогов кожи животных наступило в более ранние сроки и при более низких уровнях bFGF и VEGF в регенерирующих тканях и сыворотке крови по сравнению с контрольными группами, можно заключить, что для оптимальной репарации тканей кожи в фазу эпителизации характерны низкие уровни изученных факторов роста.

Список источников

1. Hadj Abdallah N., Baulies A., Bouhleb A., Bejaoui M., Zaouali M.A., Ben Mimouna S., Messaoudi I., Fernandez-Checa J.C., Garcia Ruiz C., Ben Abdennebi H. The effect of zinc acexamate on oxidative stress, inflammation and mitochondria induced apoptosis in rat model of renal warm ischemia. *Biomed Pharmacother.* 2018;105: 573–581. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.017
2. Blinova E., Pakhomov D., Shimanovsky D., Kilmyashkina M., Mazov Y., Demura T., Drozdov V., Blinov D., Deryabina O., Samishina E., Butenko A., Skachilova S., Sokolov A., Vasilkina O., Alkhatatneh B.A., Vavilova O., Sukhov A., Shmatok D., Sorokvasha I., Tumutolova O., Lobanova E. Cerium-Containing N-Acetyl-6-Aminohexanoic Acid Formulation Accelerates Wound Reparation in Diabetic Animals. *Biomolecules.* 2021; 11(6): 834. doi: 10.3390/biom11060834
3. Патент № 2731175 C1 Российская Федерация, МПК A61K 31/195, A61K 31/4412, A61K 47/00. Мазь для лечения ожогов 1–3 степени : № 2019131604 :

- заявл. 08.10.2019 : опубл. 31.08.2020 / С. Я. Скачилова, Г. А. Ермакова, Е. В. Блинова [и др.] ; заявитель Акционерное общество «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» АО «ВНЦ БАВ».
4. Пахомов Д.В., Блинова Е.В., Шимановский Д.Н., Кильмяшкина М.Ф., Казаева М.А., Блинов Д.С., Нелипа М.В., Николаев А.В., Алхататнех Б.А., Скачилова С.Я., Богоявленская Т.А., Кытько О.В. Доказательные аспекты стимулирования заживления неосложненной раны при локальном применении серебряной соли ацексамовой кислоты. *Оперативная хирургия и клиническая анатомия*. 2020; 4 (1); 19–25. doi: 10.17116/operhirurg 2020401119
 5. Андрианова Е.В., Егорова Е.Н., Петрова М.Б., Пахомов М.А. Биохимические аспекты прорегенераторного действия 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2021; 17 (1): 12–16.
 6. Перетягин С.П., Мартусевич А.К., Гришина А.А., Соловьева А.Г., Зимин Ю.В. Лабораторные животные в экспериментальной медицине. Нижний Новгород : Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии. 2011; 300.
 7. Огнева Е.С., Савченко Е.С., Табоякова Л.А. Анестезия самок мышей при хирургической трансплантации эмбрионов. *Биомедицина*. 2021; 17 (3E): 64–69. — doi: 10.33647/2713-0428-17-3E-64-69
 8. Файн А.М., Петухова М.Н., Мигулева И.Ю., Савотченко А.М. Сравнительная оценка двух схем внутримышечного наркоза у лабораторных крыс в эксперименте. *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии*. 2019; 22 (2): 53–61. doi: 10.17223/1814147/69/07
 9. Семченко В.В., Барашкова С.А., Ноздрин В.И., Артемьев В.Н. Гистологическая техника: учебное пособие для студентов медицинских вузов. 3-е изд., доп. и перераб. Омск-Орел: Омская областная типография. 2006: 289.
 10. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований) / под ред. проф. В.С. Камышникова. — 3-е изд. — Москва : МЕДпресс-информ. 2022: 720.
 11. Макаревич П.И., Ефименко А.Ю., Ткачук В.А. Биохимическая регуляция регенеративных процессов факторами роста и цитокинами: основные механизмы и значимость для регенеративной медицины. *Биохимия*. 2020; 85 (1): 15–33. doi: 10.31857/S0320972520010029

Петровская Марина Анатольевна (контактное лицо) — ассистент кафедры биологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России; 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4; solm1990@mail.ru

Поступила в редакцию / The article received 24.02.2024.

Принята к публикации / Was accepted for publication 02.09.2024.