

MEDLENE.RU, ТОМ 20, КЛИНИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 11 МАРТА 2019

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРЕТНОГО ПОКРЫТИЯ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОЖИ КРЫС
ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ**

*И.В. Фатеев, В.П. Федонюк, Н.А. Егорова, А.А. Сергеев, Т.С. Горбачева, А.А. Шубина
ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации,
195043, г. Санкт-Петербург, Россия ул. Лесопарковая 4, e-mail: gniiivm_2@mil.ru*

Резюме.

Проведены экспериментальные исследования по оценке влияния электретных покрытий на процессы заживления кожи после повреждения её серной кислотой. Показано, что их применение способствует усилению процессов пролиферации, синтеза белка в кератиноцитах и фибробластах и сокращению сроков заживления ран на 7 суток (с $25,6 \pm 0,48$ до $18,4 \pm 0,28$ суток). Выявленное усиление белоксинтетических процессов, очевидно, реализуется через активацию факторов транскрипции генов раннего стрессорного ответа в результате изменения редокс-состояния тканей.

Ключевые слова: регенерация кожи, серная кислота, электретные покрытия.

**THE INFLUENCE OF AN ELECTRET COATING ON NEOGENESIS IN RAT SKIN
IN CASE OF SULPHURIC ACID INJURY**

*I.V. Fateev, V.P. Fedonuk, N.A. Egorova, A.A. Sergeev, T.S. Gorbacheva, A.A. Shubina
State Scientific-Research Test Institute of Military Medicine of Department of Defense of the
Russian Federation*

195043, Saint-Petersburg, Lesoparkovaya street, 4, e-mail: gniiivm_2@mil.ru

Resume

Experimental research was conducted to determine the influence of electret coatings on skin healing process following sulphuric acid injury. It was shown that application of electret coatings contributes to amplification of proliferation process, protein synthesis in keratinocytes and fibroblasts and 7-day decrease of wound healing (from $25,6 \pm 0,48$ to $18,4 \pm 0,28$ days). The revealed acceleration of protein synthetic process is obviously realized through the activation of transcription factors of early response genes as a result of tissue redox state changing.

Key words: neogenesis in rat skin, sulphuric acid, electret coatings

Введение

Проблема регенерации тканей является одной из фундаментальных в современной медицине. Несмотря на то, что современный арсенал средств местного лечения ран весьма эффективен, позволяет значительно сократить сроки заживления ран и предупредить развитие осложнений, поиск новых способов лечения длительно-незаживающих ран, в том числе и после воздействия на кожу химическими агентами, остаётся актуальной задачей современной медицины [1, 2].

В качестве одного из перспективных направлений оптимизации репаративных процессов рассматривается воздействие электрического поля, создаваемого электретным покрытием. Использование отрицательно заряженных электретных покрытий оказывает стимулирующее действие на рост и пролиферацию клеток [3, 4, 5]. В результате исследований влияния электретных покрытий на регенерацию ахиллова сухожилия, седалищного нерва и костной ткани крыс выявлено повышение пролиферативной активности клеточных дифференциалов, активация белкового обмена тканей, сокращение сроков регенерации тканей [6, 7, 8].

Цель исследования – изучение эффективности применения отрицательно заряженного электретного покрытия при повреждении кожи серной кислотой.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 60 белых беспородных крысах–самцах массой 180–220 г, полученных из питомника РАМН «Рапполово», которых содержали в стандартных условиях вивария. Исследовали влияние отрицательных электретных покрытий на регенерацию тканей при повреждении кожи серной кислотой. До начала опыта у животных удаляли шерстяной покров с помощью ножниц на участке 5×5 см в области спины. Повреждение кожи на спине крысы моделировали посредством аппликации концентрированной серной кислотой (98 %) в объёме 0,1 мл на выстриженный участок. Для создания длительно незаживающего повреждения осуществляли замедление процесса регенерации посредством предварительного перорального введения животным L-тироксина (фирма Berlin-Chemi) в дозе 10 мг/кг в течение 1-й недели непосредственно перед нанесением серной кислоты. Было сформировано 3 группы по 20 животных в каждой: 1-ая - контрольная группа №1 (без лечения); 2-ая - контрольная группа №2 (применение незаряженных сеток); 3-я - опытная группа (применение сеток с электретным покрытием). Сетки фиксировали к коже лейкопластырем «Curafix» и поверх него укрепляли трубчатым эластичным бинтом. Сетки оставляли на коже до заживления раны.

Скорость заживления ран определяли по методике Л.Н. Поповой [9]. Для этого регистрировали динамику площади раневого дефекта и срок заживления (по 10 крыс из каждой группы). Срок заживления определяли по визуальной картине отторжения корочки. Вычисление скорости заживления производили по формуле (1), при этом характеристикой скорости являлся процент уменьшения раневой поверхности [9]:

$$V = \frac{(S - S_t) \times 100}{S \times t} \quad \% \text{ в сут,} \quad (1)$$

где V – скорость заживления; S – величина площади раны при первичном измерении; S_t – величина площади раны в настоящий момент (полная эпителизация); t – число дней между первым и последующим измерением.

При проведении гистохимических исследований (по 10 крыс из каждой группы) оценивали содержания рибонуклеопротеидов и общего белка на седьмые сутки после воздействия кислотой, что соответствовало максимальному развитию повреждения к этому сроку. Для количественного исследования рибонуклеопротеидного обмена определяли суммарные нуклеиновые кислоты в кератиноцитах и фибробластах гистохимическим методом Эйнарсона [10]. Белковый синтез изучали при окраске раствором амидочерного 10 В [11]. Применяли точечную фотометрию на фотомикроскопах Оптон-3 и Jenamed с приставкой ФМЭЛ-1 и цифровым вольтметром с использованием автоматизированной системы «Видеотест-Морфо 3». Оценку содержания рибонуклеопротеидов проводили при длине волны $\lambda=580$ нм, а белков – при длине волны $\lambda=220-280$ нм. Выбор количества точек измерения определялся статистическими требованиями достоверности данных [12]. Измерения осуществляли при увеличении $40\times 3\times 1,25$ и при площади зонда $6,7 \text{ мкм}^2$.

Полученные результаты исследований обрабатывали статистически с использованием программного обеспечения Statistica 10.0. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсий – с помощью критерия Барлетта, статистическую значимость различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Стьюденту-Ньюмену-Кейлсу. Критический уровень значимости $p \leq 0,05$ [13].

Результаты исследования и их обсуждение

При воздействии на кожу крыс концентрированной серной кислоты развивался коагуляционный некроз тканей в течение 1 суток. Воспалительные изменения распространялись за пределы очага воздействия. Повреждение нервных структур выявляли и в зоне внешне интактной ткани при отсутствии инфильтративно-воспалительной реакции. Это обуславливало развитие трофических нарушений структур дермы при формировании грануляций. На третьи сутки исследования формировался ограниченный очаг поражения площадью $151 \pm 1,9 \text{ мм}^2$.

В контрольной группе животных №1 (без лечения) через 3 суток после отторжения некротических тканей и очищения раны на дне раневого ложа выявлены очаговые грануляции, которые к исходу 1-ой недели исследования заполняли практически весь кожный дефект. По всему периметру раны отмечали краевую эпителизацию. На 14-е сутки кожный дефект был выполнен грануляционной тканью до уровня базального слоя эпидермиса. Эпителизация раны развивалась медленно. К 3-ей неделе формировался плотный рубец, поверхность которого несколько выступала над поверхностью кожи. Полная эпителизация кожного дефекта наступала на 4-ой неделе периода заживления. К этому сроку рана представляла собой приподнятой над поверхностью кожи участок плотной ткани, покрытый эпидермисом с полигональными участками рубцовой ткани по центру под струпом серого цвета или без него.

У животных второй (контрольной) группы, которым применяли незаражённые сетки, обеспечивающие отток раневого отделяемого, отмечали процессы заживления кожного дефекта, сходные по интенсивности с животными 1-ой группы. Грануляционная ткань на дне раны развивалась более интенсивно и уже к исходу 1-ой недели исследования формировались сочные кровотоочивые островки в просвете ячеек сетки. К исходу 2-ой недели поверхность грануляционной ткани выровнялась и приподнимала сетчатое покрытие.

У животных третьей (опытной) группы уже через неделю после очищения раны отмечали интенсивный рост сочных кровотоочивых грануляций, покрывающих всю поверхность зияющего участка фасции. К исходу 2-ой недели исследования наблюдали ровный, несколько западающий внутрь рубец со значимой краевой эпителизацией. Грануляционная ткань не выступала над поверхностью раны, а по мере её созревания стягивала края дефекта, формируя к началу 3-ей недели звездчатый рубец. В процессе сближения участков, покрытых эпидермальной выстилкой, скорость эпителизации дефекта резко возрастала. На 3-ей неделе в большинстве случаев отмечали полное

заживление дефекта кожных покровов крыс, причём припухлости в зоне повреждения, как правило, не наблюдали.

Данные о заживлении ран в экспериментальных группах представлены в таблице 1. Отмечали сокращение сроков заживления ран на фоне электретиного покрытия, которое составило 28,1 % и 26,6 % по сравнению с контролем без лечения (№ 1) и контролем с незаряженными покрытием (№ 2), соответственно. При этом скорость заживления в опытной группе увеличивалась в 1,37 и 1,34 раза, соответственно, по сравнению с контрольными группа №1 и №2.

Таблица 1. Эффективность применения электретиных покрытий при повреждении кожи крыс серной кислотой, $M \pm m$, $n=10$

Группы животных	Срок заживления, сут	Скорость заживления, %/сут
Контрольная группа №1 (без лечения)	25,6 $\pm$ 0,48	4,0 $\pm$ 0,05
Контрольная группа №2 (незаряженная сетка)	25,1 $\pm$ 0,42	4,1 $\pm$ 0,07
Опытная группа (электретиное покрытие)	18,4 $\pm$ 0,28*	5,5 $\pm$ 0,06*
Примечание – * – различия значимы по сравнению с контрольными группами № 1 и № 2, $p \leq 0,05$.		

При гистохимической оценке содержания нуклеиновых кислот в фибробластах и эпителиоцитах заживающего раневого дефекта учитывали, что окрашивание цитозоля сопряжено, главным образом, с рибосомами и позволяет также оценить интенсивность белкового синтеза и концентрацию рибонуклеопротеидов. В ядрах выявляли как рибонуклеопротеиды, так и дезоксирибонуклеопротеиды.

Установлено, что применение отрицательных электретиных покрытий способствует повышению концентрации рибонуклеопротеидов и общего белка в цитоплазме кератиноцитов (в 1,65-1,8 раза и 1,39-1,45 раз, соответственно) и фибробластов (в 1,5-1,62 раза и 1,35-1,4 раза, соответственно) по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольных групп (таблица 2). Полученные данные свидетельствует об активации метаболических процессов и белкового синтеза под влиянием электростатического поля.

Гистохимические показатели интенсивности синтеза белка в цитозоле базальных кератиноцитов и фибробластов дермы при повреждении кожи крыс серной кислотой и применении электретных покрытий (в ед.опт.плот), $M \pm m$, $n=10$.

Группы животных	Кератиноциты		Фибробласты	
	РНК	Общий белок	РНК	Общий белок
Контрольная группа №1 (без лечения)	0,21±0,014	0,47±0,023	0,35±0,026	0,60±0,036
Контрольная группа №2 (незаряженная сетка)	0,23±0,016	0,49±0,027	0,38±0,021	0,58±0,035
Опытная группа (электретное покрытие)	0,38±0,027*	0,68±0,053*	0,57±0,044*	0,81±0,044*
Примечание – * – различия значимы по сравнению с контрольными группами № 1 и № 2, $p \leq 0,05$.				

Таким образом, в результате исследования выявлено сокращение сроков заживления кожи после повреждения серной кислотой в группе с применением электретов по сравнению с контрольными группами на 7 суток и повышение скорости заживления раневого дефекта.

Учитывая данные научной литературы о влиянии электретных покрытий на регенерационные способности тканей, а также результаты проведенных исследований можно предположить, что механизм реализации заживляющего действия электретных покрытий связан с изменением окислительно-восстановительного потенциала клеток и запуском экспрессии генов раннего стрессорного ответа [14-18]. В результате активации факторов транскрипции генов раннего стрессорного ответа происходит запуск процессов клеточного роста, дифференцировки, воспаления, иммунного ответа и функционирования других систем гомеостатирования внутренней среды организма, обеспечивая адекватные адаптивные реакции клеток в изменяющихся условиях [19-21]. Применение электрета в настоящем исследовании способствовало интенсификации пластического обмена в цитозоле кератиноцитов и фибробластов и повышению пролиферативной активности клеток.

Заключение

Применение отрицательных электретных покрытий способствует сокращению длительности восстановлению целостности кожного покрова при поражении серной кислотой в результате стимуляции белоксинтетических процессов, проявляющихся повышением концентрации рибонуклеопротеидов и общего белка в цитоплазме кератиноцитов эпителиального регенерата и фибробластов дермы. Заживляющее действие отрицательных электретов, очевидно, обусловлено изменением редокс-состояния тканей, которое инициируют активацию факторов транскрипции генов раннего стрессорного ответа. В целом результаты исследований свидетельствуют о целесообразности и перспективности применения электретов для лечения местных повреждений химическими веществами.

Литература

1. Лафи С.Г. Психологические аспекты ожоговой травмы: монография. – Омск: Изд-во ОмГМА; 2014.
2. Ожоги. Информационный бюллетень № 365. Май 2012 г. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/index.html>. Дата обращения 23.04.2013.
3. Артемьев А.А., Руцкий В.В., Артемьев Ал.Ал. Влияние электретов на остеорепарацию при интрамедуллярном остеосинтезе // Ортопедия, травматология и протезирование. 1990; 7: 25–30.
4. Jiang. J., Lili C., Chengrong S., Zhongfu X. A study of the Effect of PTEE Electret on Fibroblast Cell Cycle with Flow Cytometry. 10-th International Symposium on Electrets: Proceedings. European Cultural Center of Delphy. Greece. 1999; 171–173.
5. Yasuda J. Electrical Callus and Callus Formation by electret // Clin. Orthop. 1977; V. 124. P. 53–56.
6. Руцкий В.В., Хомутов В.П., Моргунов М.С. Особенности остеорепарации при накостном остеосинтезе с использованием электретов. Ортопедия и травматология. 1988; 12: 1–6.
7. Василевич С.В., Бойко А.Н., Хомутов В.П., Шарова О.Л., Комлев А.Е. Оценка влияния отрицательных тонкопленочных электретного покрытия Ta2O5 на имплантатах на репаративные процессы в сухожилиях при изолированных механических поражениях. Сборник научно-практических работ «Современные аспекты организации медицинской помощи в условиях многопрофильного стационара». 2007; вып. 4: 246-252.

8. Фатеев И.В., Василевич С.В., Чепур С.В., Быков В.Н. Влияние отрицательно заряженных электродов на регенерацию седалищного нерва после лекарственного повреждения. Морфология: «Колосовские чтения 2006». 2006; 96-97.
9. Кузина М.И., Костюченко Б.М., ред. Раны и раневая инфекция. М.: Медицина; 1990.
10. Einarson L., Krogh E. Variation in the basophilia of nerve cells associated with increased cell activity and functional stress. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry; 1955. V.18: 1: 1–12.
11. Кононский А.И. Гистохимия. Киев : Издательское объединение «Вища школа»; 1976.
12. Канитас Г.С. и др. О нахождении стандартной ошибки среднего с учетом изменчивости признака в пределах организма. Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1969; Т. 57, вып. 9: 97-104.
13. Гланс С. Медико-биологическая статистика. М.: «Практика»; 1998.
14. Кулин Е.Т. Биоэлектретный эффект. Минск. : «Наука и техника»; 1980.
15. Плужников Н.Н. и др. Редокс-регуляция: фундаментальные и прикладные. Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины: науч. тр. НИИЦ (МБЗ) ГНИИИВМ МО РФ ; 2003; 139–173.
16. Бэссет А. Электрические явления в костях. Молекулы и клетки. М.: «Мир»; 1967: 123–130.
17. Зиновьев Е.В., Парамонов Б.А., Турковский Н.И., Харисов А.М., Бабкин В.Б. Изменение импеданса ожоговой раны на фоне местного лечения препаратами супероксид дисмутаза и интерлейкина-1 β . В кн.: Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины : науч. тр. НИИЦ (МБЗ) ГНИИИВМ МО РФ ; 2003; Т. 4: 83–89.
18. Ткаченко С.С., Руцкий В.В. Электростимуляция остеорепарации. Л.: Медицина. 1989.
19. Baeuerle P.A., Baltimore D. NF- κ B: 10 years after // Cell. 1996. V.87. P. 1320.
20. Meyer M., Schreck R., Baeuerle P.A. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor // EMBO J. 1993. V. 12. P. 2005–2015.
21. Baeuerle P.A. The inducible transcription factor NF- κ B: regulation by distinct protein subunits // Biochimica and Biophysica Acta. 1991. V.1072. P. 63–80.

References

1. Lafi S.G. Psychological aspects of burn injury: monograph. - Omsk: Publishing house OmGMA, 2014. - 178 p.
2. Burns. Newsletter No. 365. May 2012 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/ru/index.html>. The date of the appeal is 23.04.2013.
3. Artemyev A.A. Rutsky V.V., Artemyev A.I. Effect of electrets on osteoreparation in intramedullary osteosynthesis // Orthopedics, traumatology and prosthetics. 1990. №7. Pp. 25–30.
4. Jiang. J., Lili C., Chengrong S., Zhongfu X. Electret on Fibroblast Cell Cycle with Flow Cytometry // 10th International Symposium on Electrets: Proceedings, European Cultural Center of Delphy, Greece. 1999. p. 171–173.
5. Yasuda J. Electrical Callus Formation by electret // Clin. Orthop. 1977. V. 124. P. 53-56.
6. Rutsky V.V. Khomutov V.P., Morgunov M.S. Peculiarities of osteoreparation with external osteosynthesis using electrets // Orthopedics and Traumatology. 1988. №12. Pp. 1–6.
7. Vasilevich S.V. Boyko A.N., Khomutov V.P., Sharova O.L., Komlev A.E. Evaluation of the impact of negative thin-film electret coatings Ta₂O₅ on implants on reparative processes in tendons with isolated mechanical lesions // Collection of scientific and practical works "Modern aspects of the organization of medical care in a multidisciplinary hospital". 2007. vol. 4. S. 246-252.
8. Fateev I.V. Vasilevich, S.V., Chepur, S.V., Bykov, V.N. The effect of negatively charged electrets on the regeneration of the sciatic nerve after drug damage. // Morphology: "Kolosovsky Readings 2006". 2006. pp. 96-97.
9. Wounds and wound infection / Ed. M.I. Kuzina, B.M. Kostyuchenok. M.: Medicine. 1990. 592 p.
10. Einarson L., Krogh E. Variation in the basal cell of nerve cells associated with increased cell activity and functional stress // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1955. V.18. № 1. P. 1–12.
11. Kononsky A.I. Histochemistry. Kiev: Publishing Association "Vishcha School". 1976. 280 p.
12. Kanitas G.S. et al. On finding the standard error of the mean, taking into account the variability of the trait within the body, Arch. anatomy, histology and embryology. 1969. T.57. vyp.9. Pp. 97-104.
13. Glans, S. Biomedical statistics / S. Glans. - M.: "Practice", 1998. - 459 p.
14. Kulin E.T. Bioelectret effect. Minsk.: "Science and technology." 1980. 216 p.

15. Pluzhnikov N.N. Redox regulation: fundamental and applied // Actual problems and prospects for the development of military medicine: scientific. tr. NIITS (MBZ) State Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 2003. p. 139–173.
16. Basset A. Electrical phenomena in bones // Molecules and cells. M. : Mir. 1967. pp. 123–130.
17. Zinoviev E.V., Paramonov B.A., Turkovsky N.I., Kharisov A.M., Babkin V.B. Impedance change of a burn wound on the background of local treatment with drugs superoxide dismutase and interleukin-1 β // Actual problems and prospects for the development of military meiocins: scientific. tr. NIITS (MBZ) GNIIIVM RF Ministry of Defense. 2003. T. 4. P. 83–89.
18. Tkachenko S.S., Rutsky V.V. Osteoreparation electrostimulation. L. : Medicine. 1989. 207 p.
19. Baeuerle P.A., Baltimore D. NF- κ B: 10 years after // Cell. 1996. V.87. P. 13–20.
20. Meyer M., Schreck R., Baeuerle P.A. H₂O₂ and inox cells: AP-1 as a secondary antioxidant-responsive factor // EMBO J. 1993. V. 12. P. 2005–2015.
21. Baeuerle P.A. The inducible transcription factor NF- κ B: regulation by distinct protein subunits // Biochimica and Biophysica Acta. 1991. V.1072. P. 63–80.