

УДК 616.5-003.93

И.М. Петрова¹, С.Л. Хацко^{1,2}, А.В. Жданов^{1,3}, Т.А. Калинина¹, Т.В. Глухарева¹

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАНЕВОГО ПРОЦЕССА В КОЖЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СПИРОСОЧЛЕНЕННОГО 1,2,3-ТРИАЗОЛО-[5,1-b]-1,3,4-ТИАДИАЗИНА

¹ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина». г. Екатеринбург, Российская Федерация;

²ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Екатеринбург, Российская Федерация;

³ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск, Российская Федерация

Резюме. Важнейшим критерием эффективности регенерации кожи является восстановление ее структуры, в частности реэпителизация, развитие грануляционной, а позже соединительной ткани на месте дефекта, формирование кровеносных сосудов. **Цель исследования:** дать морфологическую характеристику раневому процессу в коже при использовании спиро-сочлененного 1,2,3-триазоло[5,1-b]-1,3,4-тиадиазина (STT). **Материалы и методы.** Эксперимент проводили на 45 белых лабораторных крысах. Животным моделировали термический ожог IIIA степени с последующим воздействием на раны мазью, содержащей STT. Проводили морфологическое описание препаратов кожи с оценкой следующих показателей: площадь раны, толщина эпидермиса, количество фибробластов, тучных клеток и кровеносных сосудов, площадь и диаметр сосудов. **Результаты.** При воздействии STT на раневой процесс уже к 7-м суткам эксперимента в грануляционной ткани отмечалось повышенное количество фибробластов. К 14-м суткам эксперимента имела место полная эпителизация дефекта, а на месте грануляционной ткани формировался рубец с развитым волокнистым компонентом. К 21-м суткам наблюдалось частичное восстановление дериватов эпидермиса, а также нормализация показателей микроциркуляторного русла. **Заключение.** Показано, что использование STT при лечении ожоговой раны кожи приводит к интенсификации регенераторных процессов. Эпителизация раневого дефекта и формирование рубца осуществляются более эффективно, новообразованные ткани по строению близки к неповрежденной коже. Главным образом, эти эффекты связаны со стимулирующим влиянием STT на пролиферативную активность клеток, в том числе фибробластов. Полученные результаты обосновывают дальнейшее изучение STT в качестве ранозаживляющего средства.

Ключевые слова: регенерация кожи, ожоговые раны, ранозаживляющие средства, фибробласты, триазолы

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Петрова Ирина Михайловна

e-mail: marygane6@mail.ru

Дата поступления 10.07.2023

Образец цитирования:

Петрова И.М., Хацко С.Л., Жданов А.В., Калинина Т.А., Глухарева Т.В. Морфологическая характеристика раневого процесса в коже при воздействии спиро-сочлененного 1,2,3-триазоло-[5,1-b]-1,3,4-тиадиазина [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2023, Том 20, № 4, с. 176–189, DOI: 10.22138/2500-0918-2023-20-4-176-189

Введение

Термические поражения кожи представляют собой серьезную медицинскую и социальную проблему и занимают существенную часть среди травматических повреждений [1]. Особенно важно упомянуть о проблеме восстановления первоначальной структуры кожи, так как помимо выраженного терапевтического эффекта пациентам с ожоговыми травмами кожи необходимо также достижение благоприятного косметического результата.

Успешная регенерация прежде всего связана с восстановлением структуры тканей, в частности, с реэпителизацией, формированием соединительной ткани и ее волокнистого компонента, а также кровеносных сосудов. Восстановление структуры кожного покрова включает в себя комплекс сложных биологических процессов, в которые вовлечены разнообразные структурные элементы. Морфологические аспекты участия различных компонентов ткани в процессе восстановления крайне важны, так как для определения структурных изменений при заживлении большое значение имеет степень вовлеченности в данный процесс составляющих ткани, а также формирование сложных взаимосвязей между ними в разные фазы раневого процесса [2–4].

Целью данной работы является морфологическая характеристика раневого процесса в коже при воздействии производного 1,2,3-триазоло-[5,1-b]-1,3,4-тиадиазина – STT. Известно, что различные производные тиadiaзинов проявляют широкий спектр биологической активности, включая антимикробное, антиоксидантное, противоопухолевое действие [5–8]. Ранее было показано, что STT обладает стимулирующим эффектом на пролиферацию фибробластов [9], что вызвало интерес к дальнейшему изучению этого соединения в качестве ранозаживляющего агента.

Фибробласты являются преобладающей популяцией клеток соединительной ткани и занимают одно из ключевых мест при её формировании. Самая значимая функция фибробластов заключается в образовании на месте повреждения грануляционно-фиброзной ткани и поддержания ее структуры. Фибробласты ответственны за формирование межклеточного вещества, в том числе путем синтеза коллагенов, эластинов, гликопротеинов. Один из важнейших гликопротеинов, фибронектин, играет в репаративном процессе роль первичного каркаса для последующего упорядоченного расположения фибробластов и коллагеновых волокон [10]. Фибробласты способны переходить в фенотип миофибробластов [11], для которых описано участие в регуляции таких процессов как пролиферация и дифференцировка, репарация тканей, воспаление [12], а также сокращение рубцов [13]. Фибробласты способны стимулировать функциональную активность клеток. Известно, что через продукцию виментина фибробласты координируют пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов [14, 15], а также регулируют клеточную адгезию и миграцию различных клеток [16–18]. Кроме того, фибробласты оказывают существенное влияние на кровеносные сосуды. Они секретируют многочисленные проангиогенные факторы, например – вазоэндотелиальный фактор роста [19, 20]. Полагают, что факторы роста фибробластов индуцируют ангиогенез за счет стимуляции роста эндотелиоцитов [21].

Учитывая, что фибробласты являются ключевым звеном репаративного процесса в коже, которое координирует процессы пролиферации, миграции и дифференцировки клеток, воздействуя на них, можно добиться не только формирования соединительной ткани на месте дефекта, но также восстановления нормальной структуры и архитектоники кожи.

Материалы и методы

Характеристика экспериментальных групп

Исследование было выполнено на 45 белых беспородных лабораторных крысах, самцах, возрастом 6 месяцев. Все эксперименты были одобрены комиссией по биоэтике Института естественных наук и математики Уральского федерального университета. Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской Конвенции ET/S 129 (1986) и директивам 2010/63/EU. Животные были рандомизированы и разделены на группы по 5 особей в каждой:

- 1) CONTR – контрольная группа – крысы, не подвергавшиеся лечению ожоговой раны;
- 2) LAN – крысы, на раны которых наносилась мазевая основа с ланолином;
- 3) STT – крысы, подвергавшиеся лечению мазью, содержащей производное 1,2,3-триазоло-[5,1-b]-1,3,4-тиадиазина.

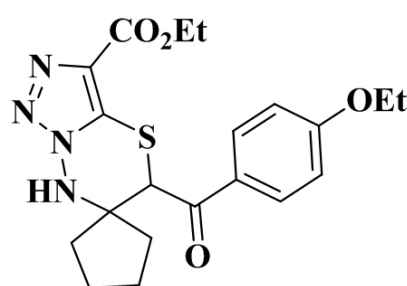
В пределах каждой группы животных выводили из эксперимента на 7-е, 14-е и 21-е сутки для оценки особенностей репаративной регенерации в различные фазы раневого процесса.

Моделирование ожоговой раны

Ожог IIIA степени наносился в межлопаточной области путём прикладывания к депилированному участку кожи нагретой до 100°C гирьки из медицинской стали размером 2,0×2,0 см на 30 секунд. Предварительно животным внутримышечно вводился анальгин в количестве 0,2 мл. Вывод животных из эксперимента производили передозировкой диэтилового эфира.

Приготовление мази

Синтез спиросочлененного 1,2,3-триазоло[5,1-b]-1,3,4-тиадиазина (рис.1) был осуществлен согласно разработанному ранее методу [9, 22, 23]. Мазь для кожного нанесения животным, содержащую 0,4% (масс.) действующего вещества, этилового эфира 5-(4-этоксibenзоил)-5,7-дигидропиро[циклопентан-1,6-[1,2,3]триазоло[5,1-b][1,3,4]тиадиазин]-3-карбоновой кислоты (STT), готовили согласно разработанной ранее методике: 800 мг 1,2,3-триазола диспергировали в 800 мкл диметилсульфоксида и добавляли этот раствор к 100 г ланолина, расплавленного при 50°C на водяной бане. К полученной мази при интенсивном перемешивании постепенно добавляли 100 г стерильной воды и размешивали до однородной консистенции [22].



STT

Рисунок 1. Строение тестируемого 1,2,3-триазоло[5,1-b]1,3,4-тиадиазина

Figure 1. The structure of 1,2,3-triazolo-[5,1-b]-1,3,4-thiadiazine

Чтобы избежать эффектов мазевой основы, в эксперимент была введена группа животных, на кожные раны которых наносилась основа («LAN»), изготовленная аналогичным способом, но без добавления действующего вещества.

Метод нанесения препаратов крысам – кожный. Препараты наносили на область раны в течение 7-и или 14-и дней (в зависимости от опытной группы), один раз в день в количестве 0,2 г.

Гистологические и морфометрические исследования

Для оценки динамики ранозаживления рассчитывалась площадь поражения. Раны фотографировались на цифровой аппарат Nikon D3000 на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки. Фотографии анализировались в программе ImageJ.

Для гистологического исследования использовали стандартные методы гистологической техники с изготовлением парафиновых срезов толщиной 3–5 мкм. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, Азуром В.

Гистологическое описание препаратов и морфо-количественный анализ регенерата проводили с помощью светового микроскопа Olympus с подключаемой камерой, используя объективы 10x, 40x. В программе TourView измеряли диаметр и площадь сосудов, площадь дермы, толщину эпидермиса. Подсчет количества сосудов, фибробластов и тучных клеток проводили в 10 случайных полях зрения с пересчётом на 1 мм².

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в компьютерных программах «Microsoft Excel» и «Статистика 12.0». Вычислялось среднее значение, стандартное отклонение и ошибка среднего. Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. После получения утвердительного результата о наличии различий в группах переходили к тестированию различий между группами с помощью post-hoc теста Данна.

При вероятности ошибки (p) $<0,05$ различия между средними значениями считались достоверными.

В программном пакете Mathematica был создан ряд регрессионных моделей, позволяющих оценить характер функциональной зависимости между различными звеньями раневого процесса; доверительный интервал соответствовал 95% доверительной вероятности. Кроме того, для оценки степени связи между показателями был проведен корреляционный анализ Спирмена. При вероятности ошибки (p) $<0,05$ связь между переменными считали статистически значимой.

Результаты и их обсуждение

Динамика раневого процесса

Через 30 минут после нанесения ожоговой травмы площадь поражения во всех опытных группах была соразмерной, составляя в среднем $276,212 \pm 10,751$ мм². Уже на 7-е сутки раневого процесса площадь раны достоверно уменьшалась в группе «STT», очевидно, ввиду перехода раневого процесса в фазу пролиферации. К 21-м суткам эксперимента при использовании STT отмечалось уменьшение площади до $8,274 \pm 2,134$ мм², что достоверно отличалось от значений групп сравнения (рис. 2).

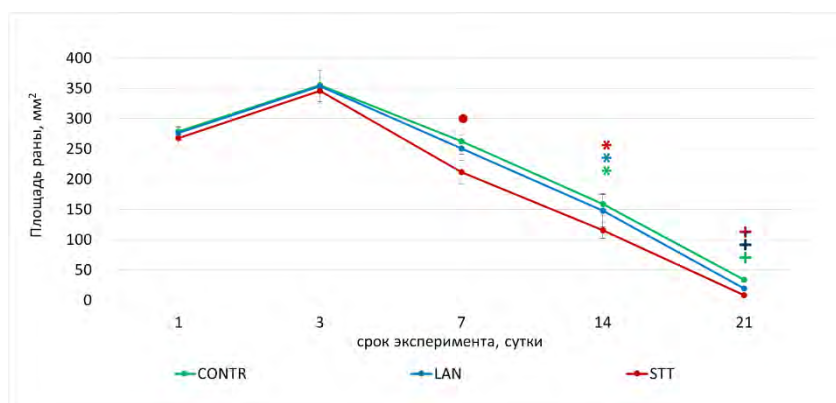


Рисунок 2. Динамика сокращения площади раны

Figure 2. Wound area reduction.

Примечание – различия достоверны при сравнении показателя на • – 0-е и 7-е сутки, * – 3-и и 14-е сутки, + – 14-е и 21-е сутки, (p) $<0,05$); на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего

Note – differences are significant between • – 0 and 7 days, * – 3 and 14 days, + – 14 and 21 days, (p) $<0,05$); SEM is plotted on the confidence intervals

Морфологическое исследование

На 7-е сутки эксперимента во всех экспериментальных группах на поверхности раны определялся лейкоцитарно-фибринозный струп. Новообразованный эпидермис располагался только по краям регенерата. Дерма характеризовалась отеком, наличием очагов некроза и выраженной лейкоцитарной инфильтрацией, расширенными кровеносными сосудами. Очаг некроза был отграничен пластом молодой грануляционной ткани, богатой клеточными элементами, новообразованными сосудами и тонкими соединительнотканными волокнами. В группе «STT» среди клеток обнаруживалось большое количество фибробластов. При окрашивании по Ван-Гизону в грануляционной ткани определяются тонкие новообразованные коллагеновые волокна, более выраженные в группе «STT» (рис. 3).

К 14-м суткам эксперимента группа «STT» характеризовалась активной эпителизацией: дефект был полностью покрыт эпидермисом, в котором повсеместно определялись фокуса акантозов. Грануляционная ткань претерпевала перестройку, в частности, в некоторых местах дерма имела отчетливое подразделение на сосочковый и сетчатый слои. При этом поверхностные слои дермы содержали большое количество фибробластических клеток, тогда как в более глубоких слоях превалировал волокнистый компонент: коллагеновые волокна толстые, извитые, сложены в пучки. На границе с гиподермой сохранялась инфильтрация умеренного характера (рис. 4).

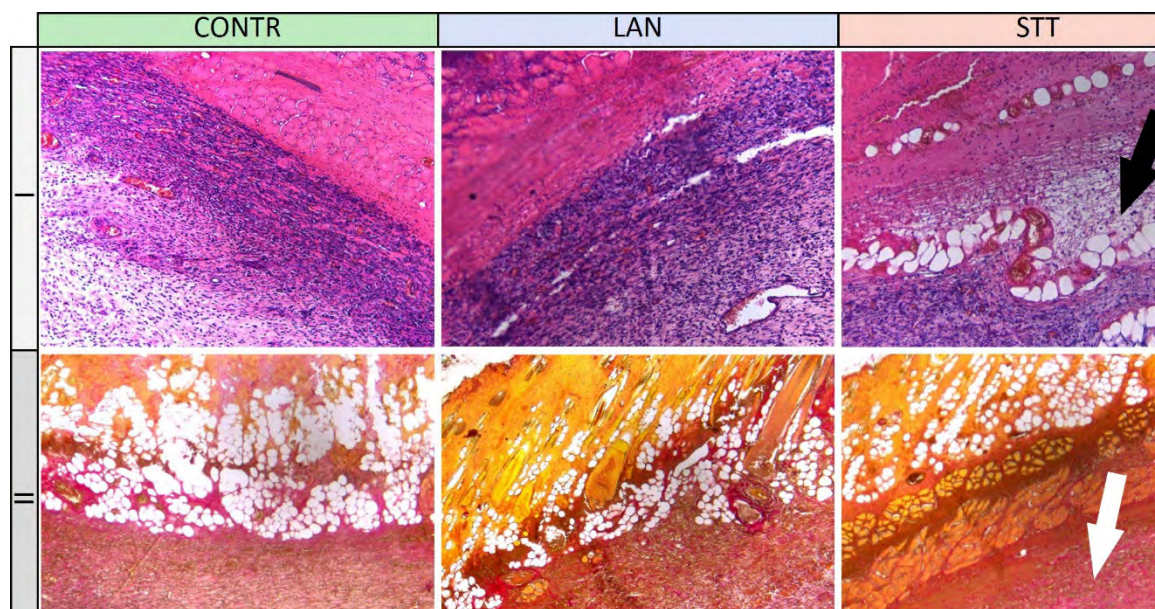


Рисунок 3. Морфологическая структура кожи на 7-е сутки эксперимента,
Figure 3. Skin morphological structure on the 7th experiment day

Примечание – I: окраска – гематоксилин и эозин, II: окраска – Ван-Гизон; об. $\times 10$ (Olympus); черная стрелка указывает на грануляционную ткань, белая стрелка указывает на новообразованные коллагеновые волокна

Note – I: H&E staining, II: Van Gieson's staining; $\times 10$ (Olympus); black arrow indicates granulation tissue, white arrow indicates collagen fibers

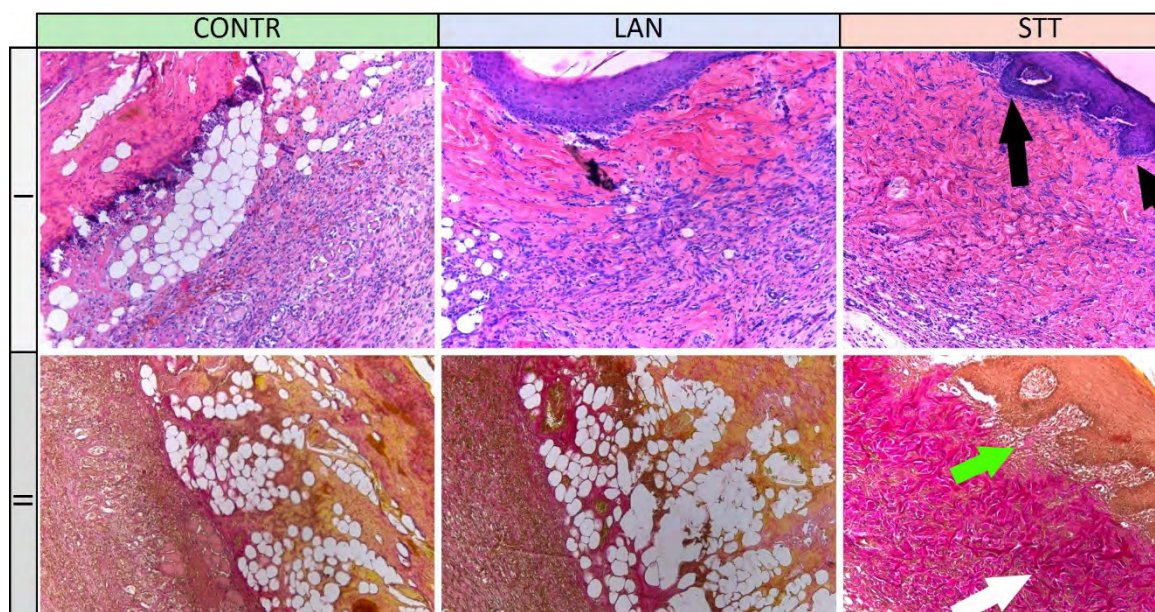


Рисунок 4. Морфологическая структура кожи на 14-е сутки эксперимента.

Примечание – I: окраска – гематоксилин и эозин, II: окраска – Ван-Гизон; об. $\times 10$ (Olympus); черная стрелка указывает на акантозы, зеленая стрелка указывает на сосочковый слой, белая стрелка указывает на пучки коллагеновых волокон в сетчатом слое

Figure 4. Skin morphological structure on the 14th experiment day.

Note – I: H&E staining, II: Van Gieson's staining; $\times 10$ (Olympus); black arrow indicates acanthosis, green arrow indicates papillary layer, white arrow indicates collagen fiber bundles in reticular layer

К 21-м суткам эксперимента в группе «СТТ» строение кожи приближалось к нормальному. Эпидермис приобретал равномерную толщину, наблюдались признаки восстановления его дериватов. В дерме до границы с гиподермой сформировался зрелый рубец с выраженным волокнистым компонентом, общее количество клеток значительно снизилось. При окраске пикрофуксином в области

рубца определялись оформленные тяжи коллагеновых волокон. Количество волокнистых структур увеличивалось, сами волокна утолщались, сильно извивались. Более массивные скопления пучков коллагеновых волокон отмечалось в области сетчатого слоя дермы, с формированием характерного циркулярного узора. Воспалительные реакции отсутствовали (рис. 5).

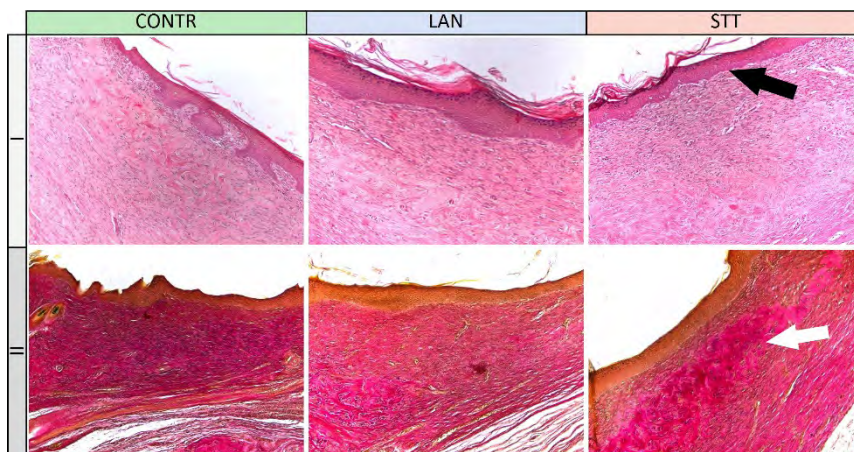


Рисунок 5. Морфологическая структура кожи на 21-е сутки эксперимента.

Примечание – I: окраска – гематоксилин и эозин, II: окраска – Ван-Гизон; об. $\times 10$ (Olympus); черная стрелка указывает на эпидермис равномерной толщины, белая стрелка указывает на пучки коллагеновых волокон

Figure 5. Skin morphological structure on the 21th experiment day.

Note – I: H&E staining, II: Van Gieson's staining; $\times 10$ (Olympus); black arrow indicates uniform thickness epidermis, white arrow indicates collagen fiber bundles

В целом раневой процесс соответствовал типичному ходу заживления ожоговых ран. Однако, при использовании STT регенераторные реакции носили более интенсивный характер. В частности, более эффективная эпителизация, восстановление сосудов МЦР (микроциркуляторного русла), формирование рубца с развитым волокнистым компонентом свидетельствовали о благоприятном влиянии STT на восстановление нормальной структуры тканей.

Действительно, было выявлено, что к 14-м суткам в группе «STT» эпителизация осуществлялась более интенсивно, повсеместно определялись акантозы, что сказывалось на увеличении толщины эпидермиса — эпителиальный пласт неровный, с выростами в виде язычков, вдающимися в дерму. К 21-м суткам эпидермис приобретал равномерную толщину, что, вероятно, обусловлено завершением реэпителизации (рис. 6).

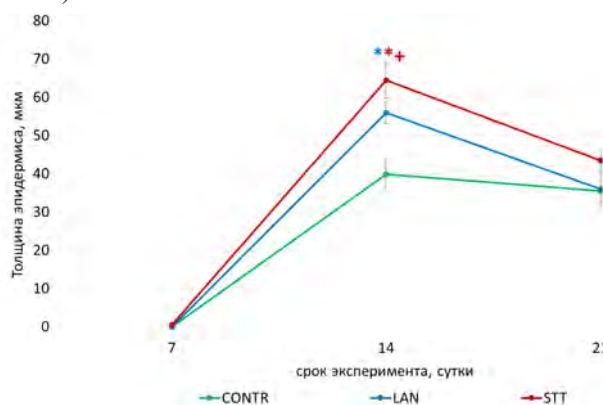


Рисунок 6. Динамика изменения толщины эпидермиса.

Figure 6. Changes in the epidermis thickness.

Примечание – различия достоверны при сравнении показателя на * – 7-и и 14-е сутки, + – 7-е и 14-е сутки с группой «CONTR», ($p < 0,05$); на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего

Note – differences are significant between * – 7 and 14 days, + – 7 and 14 days with the «CONTR» group ($p < 0,05$); SEM is plotted on the confidence intervals

Ранее было высказано предположение, что STT оказывает эффект на клетки базального слоя эпидермиса, способствуя их интенсивной пролиферации и дифференцировке в шиповатые клетки [22]. Однако, возможны и другие механизмы, обеспечивающие данное явление. Известно, что на протяжении раневого процесса устанавливаются особые взаимоотношения между кератиноцитами и фибробластами. В процессе восстановления эпидермиса кератиноциты формируют эпителиальные тяжи по направлению к дермальному слою кожи для обеспечения взаимодействия с матриксом и клетками дермы, преимущественно фибробластами. В свою очередь, известно, что фибробласты координируют пролиферацию, миграцию и дифференцировку кератиноцитов [24–26]. Проведенный нами регрессионный анализ обнаружил значимую зависимость толщины эпидермиса от количества фибробластов в группе «STT». Так, на 14-е сутки эксперимента, изменчивость переменной описывалась уравнением линейной регрессии с коэффициентом детерминации 0,660 и наличием сильной положительной корреляции, $r=0,8$ ($p<0,05$). В группах сравнения данная тенденция статистически не подтвердилась. Возможно, что большее количество фибробластов, характерное для группы «STT», оказывало стимулирующее влияние на процессы реэпителизации.

Кроме того, эффективность восстановления эпидермиса зависит от интенсивности кровоснабжения, а значит, от состояния МЦР. В частности, в группе «STT» изменение толщины эпидермиса на протяжении раневого процесса в значительной степени зависело от количества сосудов. На 14-е сутки изменчивость переменной описывалась уравнением линейной регрессии с коэффициентом детерминации 0,854. Кроме того, обнаруживалась сильная положительная корреляция, $r=0,9$ ($p<0,05$), которая сохранялась до конца эксперимента.

Действительно, состояние МЦР играет значимую роль не только для эпителизации, но прежде всего для формирования рубцовой ткани на месте повреждения [27] и служит важным маркером успешной регенерации. На протяжении раневого процесса основным ответным механизмом со стороны МЦР являлась вазодилатация. Достоверное уменьшение диаметра сосудов наблюдалось лишь к 21-м суткам эксперимента в группе «STT», что являлось свидетельством стабилизации состояния МЦР и возвращения показателей к нормальным значениям (рис. 7).

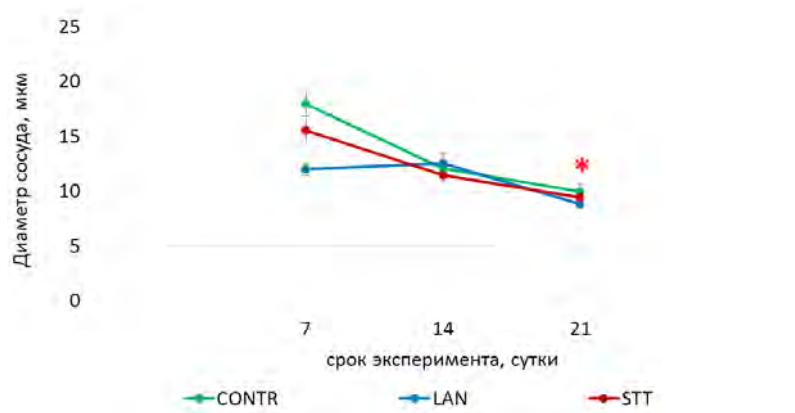


Рисунок 7. Динамика изменения диаметра сосудов

Figure 7. Changes in the blood vessels diameter

Примечание – * – различия достоверны при сравнении показателя на 7-е и 21-е сутки, ($p<0,05$); на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего

Note – * – differences are significant between 7 and 21 days, ($p<0,05$); SEM is plotted on the confidence intervals

В значительной степени с вышеописанным показателем коррелировала площадь сосудов. В группе «STT» средняя площадь сосудов достигала высоких значений к 7-м суткам эксперимента, достоверно отличаясь от групп сравнения. К 21-м суткам значение показателя уменьшалось (рис. 8).

Анализируя динамику изменения количества сосудов, выявили, что в группе «STT» количество сосудов достоверно увеличивалось к 21-м суткам эксперимента, что, вероятно, было обусловлено более активным формированием новых кровеносных сосудов (рис. 9).

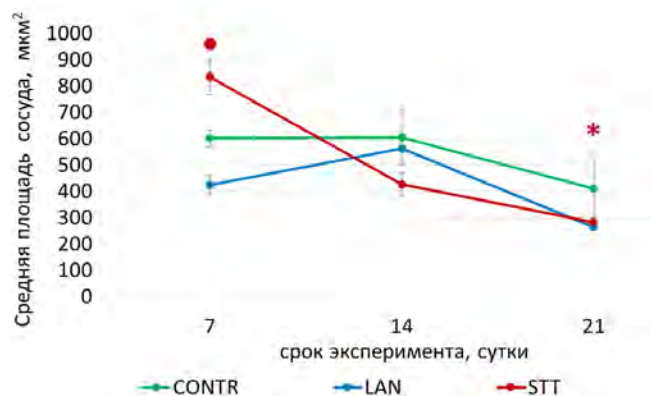


Рисунок 8. Динамика изменения площади сосудов

Figure 8. Mean vessels area

Примечание – • – различия с группами «CONTR», «LAN» достоверны при сравнении показателя на 7-е сутки, * – различие достоверно в сравнении со сроком 7 суток ($p \leq 0,05$); на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего

Note – • – differences with «CONTR» and «LAN» groups are significant at 7 days, * – differences are significant between 7 and 21 days, ($p < 0,05$); SEM is plotted on the confidence intervals

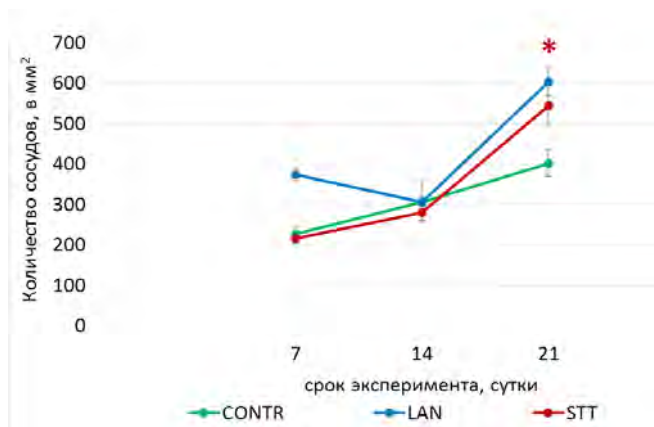


Рисунок 9. Динамика изменения количества сосудов

Figure 9. Number of vessels

Примечание – * – различия достоверны при сравнении показателя на 7-е и 21-е сутки ($p < 0,05$); на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего

Note – * – differences are significant between 7 and 21 days ($p < 0,05$); SEM is plotted on the confidence intervals

Таким образом, в группе «STT» возвращение показателей МЦР к нормальному состоянию носило более выраженный характер. Вероятно, ранозаживляющий эффект STT, описанный ранее на примере линейной раны [22], проявляется также и при лечении им ожоговых травм кожи. Ввиду стимуляции репаративных процессов, триазолотиадиазин оказывал, возможно, модулирующий эффект на сосудистые реакции.

Говоря о формировании рубцовой ткани, прежде всего следует упомянуть фибробласты – основные клетки соединительнотканной части кожи. Среди всех дермальных клеток фибробласты являются ключевым звеном, поскольку, во-первых, ответственны за образование межклеточного вещества и поддержание структуры дермы, во-вторых, в связи со способностью интегрировать различные процессы в течении регенерации [28].

К 7-м суткам эксперимента в месте поражения формировалась грануляционная ткань, состоящая из клеток гематогенной природы и фибробластов. В группе «STT» количество последних достоверно выше, чем в группах сравнения. Это согласуется с ранее высказанным предположением о влиянии STT на пролиферативную активность фибробластов [22]. К 14-м суткам количество клеток несколько уменьшалось, однако оно было достоверно выше контрольного значения. Лишь к 21-м суткам эксперимента число клеток достоверно уменьшалось относительно раннего срока

регенерации. Общее количество клеток дермы, таким образом, несколько снижалось, что характеризовало рубец как более зрелый (рис. 10).

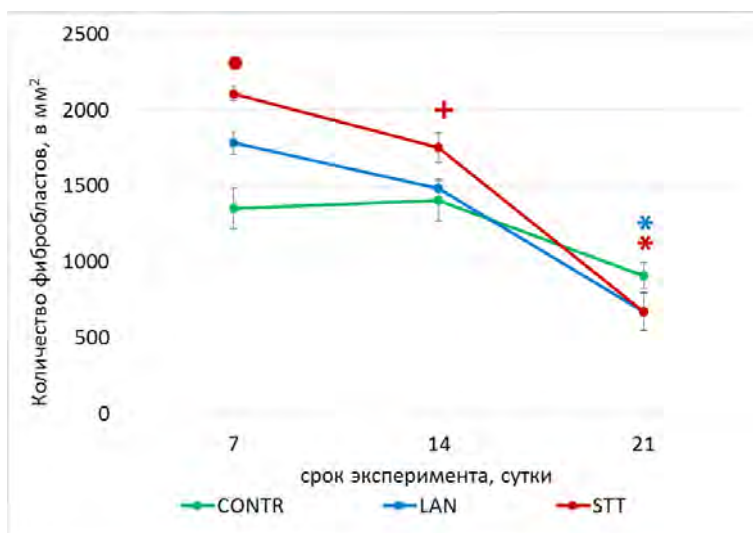


Рисунок 10. Динамика изменения количества фибробластов

Figure 10. Number of fibroblasts

Примечание – • – различия с группами «CONTR», «LAN» достоверны при сравнении показателя на 7-е сутки, + – различие достоверно в сравнении с группой «CONTR», * – различие достоверно в сравнении со сроком 7 суток ($p \leq 0,05$), на доверительных интервалах отложена величина ошибки среднего

Note – • – differences with «CONTR» and «LAN» groups are significant at 7 days, + – difference is significant between 7 and 14 days ($p < 0,05$); SEM is plotted on the confidence intervals

В условиях регенерации активность фибробластов связана с ускорением заживления ран, что подтверждается результатами статистического анализа. Так, в группе «STT» до 14-х суток эксперимента показатель площади ран был связан высокой отрицательной корреляцией, $r = -0,8$ ($p < 0,05$) с количеством фибробластов, чего не наблюдалось в группах сравнения.

Интересно отметить, что в ходе ранозаживления в группе «STT» от количества фибробластов зависело также и количество сосудов. На 14-е сутки взаимосвязь переменных носила нелинейный характер с коэффициентом детерминации 0,999 и сильной прямой связью между переменными, $r = 1$ ($p < 0,05$), то есть, чем больше фибробластов определялось в рубце, тем больше количество сосудов.

В течение эксперимента были отмечены некоторые изменения со стороны тучноклеточной популяции. Между группами не было обнаружено достоверных различий по числу мастоцитов, однако менялась их локализация, размеры и интенсивность дегрануляции. Так, на 14-е сутки в группе «STT», тучные клетки были обнаружены в рубце, вокруг сосудов, а также вблизи фибробластов и между пучками коллагеновых волокон, причем клетки активно дегранулировали. К 21-м суткам «STT» мастоциты в рубце отмечались в небольшом количестве, среди них редко обнаруживались дегранулирующие клетки. Возможно, некоторая активация тучных клеток была связана с переходом раневого процесса из фазы пролиферации в фазу ремоделирования рубца к 14-м суткам эксперимента. Большое количество фибробластов и волокнистых структур в тканях могло быть своеобразным триггером для мастоцитов к повышению функциональной активности. Учитывая тот факт, что большая часть обнаруженных мастоцитов – это дегранулирующие клетки, располагающиеся вокруг сосудов, вблизи фибробластов, между коллагеновыми волокнами, можно предположить, что они выполняли роль регуляторов в процессе перестройки рубцовой ткани.

Заключение

Морфологические исследования демонстрируют, что лечение ожоговых ран STT приводит к формированию более качественного рубца, что проявляется в положительной динамике изменения показателей микроциркуляторного русла, активной пролиферации фибробластов и формировании рубца с развитым волокнистым компонентом, восстановлении нормальной структуры эпидермиса и его дери-

ватов. Показано, что при воздействии STT на раневой процесс многие показатели находятся в тесной связи, причем, динамически изменяющейся во времени. Анализируя полученные результаты, можно заключить, что каждый из этапов раневого процесса характеризуется сложными взаимоотношениями между структурными компонентами регенерата. Особенности этих взаимодействий зависят, в том числе, и от методов терапевтического воздействия на течение регенерации. Высокое содержание фибробластов, вызванное применением STT, приводит к интенсификации регенераторных реакций, в том числе благодаря установлению особых взаимосвязей между участниками раневого процесса. Однако механизмы действия STT остаются неясными и требуют дальнейшего исследования.

Работа была поддержана госзаданием НИУ ЮУрГУ (FENU-2023-0014)

ЛИТЕРАТУРА

1. Voigt J., Driver V.R. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Wound Repair Regeneration*. – 2012. V. 20, № 3. – P. 317–331. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00777.x.
2. Алексеева Н. Т. Морфологические особенности раневого процесса в коже при региональном лечебном воздействии / Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Оренбург. 2015. 327 с.
3. Юшков Б.Г. Структурный гомеостаз / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин, А.Е. Ткаченко, Е.А. Дугина. – Москва: Комментарий, 2019. – 200 с.
4. Одинцова И.А. Регенерационный гистогенез в кожно-мышечной ране (экспериментально-гистологическое исследование) / Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Санкт-Петербург. 2004. 34 с.
5. Abdelwahed R.S. Synthesis of 1,3,4-thiadiazines, bis-1,3,4-thiadiazoles, [1,2,4]triazino[3,4-b][1,3,4]thiadiazine, thiazolines from carbonothioic dihydrazide // *Tetrahedron*. – 2012. – V. 86, №.13. – P. 2784-2789. DOI: 10.1016/j.tet.2012.02.011.
6. Герасимова Е.Л., Газизуллина Е.Р., Игдисанова Д.И. и др. Антиоксидантные свойства 2,5-замещенных 6Н-1,3,4-тиадиазинов, перспективных для экспериментальной терапии сахарного диабета // *Известия Академии Наук*. – 2022. №.71. С. 2730–2739. DOI: 10.1007/s11172-022-3702-0.
7. Sever B., Altıntop M.D., Kuş G., Özkurt M. et al. Indomethacin based new triazolothiadiazine derivatives: Synthesis, evaluation of their anticancer effects on T98 human glioma cell line related to COX-2 inhibition and docking studies // *Eur J Med Chem*. – 2016. – №.4. P. 113–179. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.02.036.
8. Altıntop M.D., Ciftci H.I., Radwan M.O., Sever B., et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential antitumor agents against chronic myelogenous leukemia: striking effect of nitrothiazole moiety // *Molecules*. – 2017. – Vol. 23, №. 1. P. 59. DOI: 10.3390/molecules23010059.
9. Калинина Т.А., Быстрых О.А., Поздина В.А. и др. Синтез спиропроизводных 1,2,3-триазоло[5,1-b][1,3,4]тиадиазинов и их биологическая активность // *Химия гетероциклических соединений*. – 2015. – Т. 51, № 6. – С. 589–592.
10. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г, Аюшинова Н.И. и др. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани // *Сибирский медицинский журнал*. – 2012. – № 3. – С. 8–12.
11. Hong K.M., Belperio J.A., Keane M.P., et al. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisomeproliferator-activated receptor gamma // *J Biol Chem*. – 2007. – V. 282. – P. 22910–22920. DOI: 10.1074/jbc.M703597200.
12. Watsky M.A., Weber K.T., Sun Y., et al. New insights into the mechanism of fibroblast to myofibroblast transformation and associated pathologies // *International review of cell and molecular biology*. – 2010. – V. 282. – P. 165–192. DOI: 10.1016/S1937-6448(10)82004-0.
13. Никонорова В. Г., Криштоп В. В., Румянцева Т. А. Факторы роста в восстановлении и формировании кожных рубцов // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. – 2022. – №1. – С. 102–112.
14. Menko A. S., Bleaken B. M., Libowitz A. A. et al. A central role for vimentin in regulating repair function during healing of the lens epithelium // *Mol Biol Cell*. – 2014. – V. 25, № 6. – P. 776–790. DOI: 10.1091/mbc.E12-12-0900.
15. Shen Y., Ning J., Zhao L. et al. Matrix remodeling associated 7 proteins promote cutaneous wound

healing through vimentin in coordinating fibroblast functions // *Inflamm Regen.* – 2023. – V. 43, № 1. – P. 5. DOI: 10.1186/s41232-023-00256-8.

16. Rogel M.R., Soni P. N., Troken J. R. et al. Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells // *FASEB J.* 2011. – V. 25, № 11. – P. 3873–3883. DOI: 10.1096/fj.10-170795.

17. Walker J.L., Bleaken B. M., Romisher A. R. et al. In wound repair vimentin mediates the transition of mesenchymal leader cells to a myofibroblast phenotype // *Mol Biol Cell.* – 2018. – V. 29, № 13. – P. 1555–1570. DOI: 10.1091/mbc.E17-06-0364.

18. Mendez M.G., Kojima S.-I., Goldman R.D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition // *FASEB J.* – 2010. – V. 24, № 6. – P. 1838–1851. DOI: 10.1096/fj.09-151639.

19. Hartlapp I., Abe R., Saeed R.W., et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – P. 2215–2224. DOI: 10.1096/fj.01-0049com.

20. Moore B.B., Kolodsick J.E., Thannickal V.J., et al. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury // *Am J Pathol.* – 2005. – V. 166, № 3. – P. 675–684. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62289-4.

21. Conway E.M., Collen D., Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth // *Cardiovasc Res.* – 2001. – V. 49, №3. – P. 507–521. DOI: 10.1016/s0008-6363(00)00281-9.

22. Высокова О.А., Жданова А.В., Петрова И.М. и др. Оценка ранозаживляющего действия спиросочлененного 1,2,3-триазоло[5,1-b][1,3,4]тиадиазина на модели линейной кожной раны // *Химико-фармацевтический журнал.* – 2019. – Т. 53, №7. – С. 41–44. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-7-41-44.

23. Kalinina T.A., Bystrykh O.A., Glukhareva T.V., et al. Transformation of 1,2,3-thiadiazolyl hydrazones as method for preparation of 1,2,3-triazolo[5,1-b][1,3,4]thiadiazines // *J Heterocycl Chem.* – 2017. – V. 54, №.1. – P. 137–146. DOI: 10.1002/jhet.2554.

24. Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2007. – V. 127, № 5. – P. 998–1008. DOI: 10.1038/sj.jid.5700786.

25. Hudson L.G., Newkirk K.M., Chandler H.L., et al. Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2) // *J Dermatol Sci.* – 2009. – V. 56, № 1. – P. 19–26. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2009.06.009.

26. Boehnke K., Mirancea N., Pavesio A., et al. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents // *Eur J Cell Biol.* – 2007. – V. 86, № 11–12. – P. 731–46. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.12.005.

27. Пигарева Ю. Н., Салмина А. Б., Карачева Ю. В. Особенности микроциркуляторного русла кожи: механизмы регуляции и современные методы исследования // *Сибирское медицинское обозрение.* – 2013. – №. 4. – С. 3–8.

28. Cheng F., Shen Y., Mohanasundaram P., et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF-beta-Slug signaling // *Proc Natl Acad Sci. USA.* – 2016. – №.113. – P. 4320–4327. DOI: 10.1073/pnas.1519197113.

Авторы

Петрова Ирина Михайловна
Старший преподаватель
marygane6@mail.ru

Хацко Сергей Леонидович
Заведующий анатомо-физиологической экспериментальной лабораторией
sergey.khatsko@urfu.ru

Жданов Александр Васильевич
Ассистент
sanya.zhdanov.1996@mail.ru

Калинина Татьяна Андреевна

Кандидат химических наук, доцент
t.a.kalinina@urfu.ru

Глухарева Татьяна Владимировна
Кандидат химических наук, доцент, доцент
taniagluhareva@yandex.ru

ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
Российская Федерация, Екатеринбург

I.M. Petrova¹, S.L. Khatsko^{1,2}, A.V. Zhdanov^{1,3}, T.A. Kalinina¹, T.V. Glukhareva¹

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE SKIN WOUND PROCESS UNDER SPIROCONJUGATED 1,2,3-TRIAZOLO-[5,1-b]-1,3,4-THIADIAZINE INFLUENCE

¹ Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin,
Yekaterinburg, Russian Federation;

² Ural Federal Agrarian Research Center, Yekaterinburg, Russian Federation;

³ South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. The most important criterion of the skin regeneration effectiveness is the restoration of its structure, in particular re-epithelialization, the development of granulation and connective tissue at the site of the defect, and the blood vessels formation. **The purpose** of this study is to perform a morphological characteristics of the skin wound process under spiroconjugated 1,2,3-triazolo[5,1-b]1,3,4-thiadiazine (STT) applying. **Materials and methods.** The experiment utilized 45 white rats. The study included 3rdA degree burn injury modeling with wounds exposure to an ointment containing STT. A morphological description of skin was carried out with an assessment of the following parameters: wound area, epidermis thickness, fibroblasts number, as well as mast cells and blood vessels, vessels area and diameter. **Results.** Under STT influence of on the wound process, by the 7th day of the experiment, an increased number of fibroblasts was noted in the granulation tissue. By the 14th day of the experiment, complete epithelialization of the defect took place, as well as scar formation with a developed fibrous component. By the 21st day, partial restoration of epidermal derivatives was observed, together with normalization of microcirculatory parameters. **Conclusion.** It has been shown that STT using leads to the intensification of regenerative processes. The wound defect epithelialization and the scar formation are carried out more efficiently, the newly formed tissues are similar to intact skin. These effects are mainly associated with the stimulating effect of STT on the proliferative activity of cells, including fibroblasts. The results substantiate further study of STT as a wound healing agent.

Keywords: skin regeneration, burn wounds, wound healing agent, fibroblasts, triazoles

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Irina M. Petrova
marygane6@mail.ru

Received 10.07.2023

For citation:

Petrova I.M., Khatsko S.L., Zhdanov A.V., Kalinina T.A., Glukhareva T.V. Morphological characteristics of the skin wound process under spiroconjugated 1,2,3-triazolo-[5,1-b]-1,3,4-thiadiazine influence [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2023, Vol. 20, no. 4, pp. 176–189. DOI: 10.22138/2500-0918-2023-20-4-176-189 (In Russ)

REFERENCES

1. Voigt J., Driver V.R. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regeneration*. 2012, Vol. 20 (3), pp. 317–331. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00777.x.
2. Alexeeva N. T. Morphological features of the skin wound process under regional therapeutic effect. Extended Abstract of Doctoral (Med.) Dissertation, Orenburg, 2015. 327 p. (InRuss).
3. Yushkov B.G. Structural homeostasis. B.G. Yushkov, V.G. Klimin, A.E. Tkachenko, E.A. Dugina. Moscow: Kommentarij, 2019. 200 p. (InRuss).
4. Odintsova I.A. Regeneration histogenesis in a musclocutaneous wound (experimental-histological study). Extended Abstract of Doctoral (Med.) Dissertation, Saint Petersburg, 2004. 34 p. (InRuss).
5. Abdelwahed R.S. Synthesis of 1,3,4-thiadiazines, bis-1,3,4-thiadiazoles, [1,2,4]triazino[3,4-b][1,3,4]thiadiazine, thiazolines from carbonothioic dihydrazide. *Tetrahedron*. 2012. Vol. 86 (13), pp. 2784-2789. DOI: 10.1016/j.tet.2012.02.011.
6. Gerasimova E.L., Gazizullina E.G., Igdisanova D.I. et al. Antioxidant properties of 2,5-substituted 6H-1,3,4-thiadiazines promising for experimental therapy of diabetes mellitus. *Russ Chem Bull*. 2022. no. 7, pp. 2730-2739. DOI: 10.1007/s11172-022-3702-0.
7. Sever B., Altıntop M.D., Kuş G., et al. Indomethacin based new triazolothiadiazine derivatives: Synthesis, evaluation of their anticancer effects on T98 human glioma cell line related to COX-2 inhibition and docking studies. *Eur J Med Chem*. 2016. no. 4, pp. 113-179. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.02.036.
8. Altıntop M.D., Ciftci H.I., Radwan M.O., et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential antitumor agents against chronic myelogenous leukemia: striking effect of nitrothiazole moiety. *Molecules*. 2017. Vol. 23 (1), pp. 59. DOI: 10.3390/molecules23010059.
9. Kalinina T.A., Bystrykh O.A., Pozdina V.A., Glukhareva T.V., Ulitko M.V., Morzherin Yu.Yu. Synthesis of spiro derivatives of 1,2,3-triazolo[5,1-b][1,3,4]thiadiazines and biological activity thereof. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2015, Vol. 51 (6), pp. 589–592. (InRuss).
10. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., et al. Fibroblasts and their role in the development of connective tissue. *Siberian Medical Journal*. 2012, no. 3, pp. 8–12. (InRuss).
11. Hong K.M., Belperio J.A., Keane M.P., et al. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisomeproliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 2007, Vol. 282, pp. 22910–22920. DOI: 10.1074/jbc.M703597200.
12. Watsky M.A., Weber K.T., Sun Y., Postlethwaite A. New insights into the mechanism of fibroblast to myofibroblast transformation and associated pathologies. *International review of cell and molecular biology*. 2010, Vol. 282, pp. 165–192. DOI: 10.1016/S1937-6448(10)82004-0.
13. Nikonorova V. G., Chrishtop V. V., Rummyantseva T. A. Growth factors in the restoration and formation of skin scars. *Crimean journal of experimental and clinical medicine*. 2022, no. 1, pp. 102-112. (InRuss).
14. Menko A. S., Bleaken B. M., Libowitz A. A. et al. A central role for vimentin in regulating repair function during healing of the lens epithelium. *Mol Biol Cell*. 2014, Vol. 25 (6), pp. 776-790. DOI: 10.1091/mbc.E12-12-0900.
15. Shen Y., Ning J., Zhao L. et al. Matrix remodeling associated 7 proteins promote cutaneous wound healing through vimentin in coordinating fibroblast functions. *Inflamm Regen*. 2023, Vol. 43 (1), p. 5. DOI: 10.1186/s41232-023-00256-8.
16. Rogel M.R., Soni P. N., Troken J. R. et al. Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells. *FASEB J*. 2011, Vol. 25 (11), pp. 3873-3883. DOI: 10.1096/fj.10-170795.
17. Walker J.L., Bleaken B. M., Romisher A. R. et al. In wound repair vimentin mediates the transition of mesenchymal leader cells to a myofibroblast phenotype. *Mol Biol Cell*. 2018, Vol. 29 (13), pp. 1555-1570. DOI: 10.1091/mbc.E17-06-0364.
18. Mendez M.G., Kojima S.-I., Goldman R.D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010, Vol. 24 (6), pp. 1838-1851. DOI: 10.1096/fj.09-151639.
19. Hartlapp I., Abe R., Saeed R.W., et al. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J*. 2001, Vol. 15, pp. 2215-2224. DOI: 10.1096/fj.01-0049com.
20. Moore B.B., Kolodsick J.E., Thannickal V.J., et al. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol*. 2005, Vol. 166 (3), pp. 675-684. DOI: 10.1016/S0002-

9440(10)62289-4.

21. Conway E.M., Collen D., Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001, Vol. 49 (3), pp. 507-521. DOI: 10.1016/s0008-6363(00)00281-9.

22. Vysokova O.A., Zhdanova A.V., Petrova I.M., Medvedeva S. Yu., Kalinina T.A., Khatsko S.L. et al. Assessment of the wound-healing action of spiroconjugated 1,2,3-triazolo[5,1-b]-1,3,4-thiadiazine in a linear skin wound model. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2019, Vol. 53 (7), pp. 41-44. DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-7-41-44. (InRuss).

23. Kalinina T.A., Bystrykh O.A., Glukhareva T.V., et al. Transformation of 1,2,3-thiadiazolyl hydrazones as method for preparation of 1,2,3-triazolo[5,1-b][1,3,4]thiadiazines. *J Heterocycl Chem.* 2017. Vol. 54 (1), pp. 137-146. DOI: 10.1002/jhet.2554.

24. Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007, Vol. 127 (5), pp. 998-1008. DOI: 10.1038/sj.jid.5700786.

25. Hudson L.G., Newkirk K.M., Chandler H.L., Choi C, Fossey S.L., Parent A.E., et al. Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2). *J Dermatol Sci.* 2009, Vol. 56 (1), pp. 19-26. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2009.06.009.

26. Boehnke K., Mirancea N., Pavesio A., et al. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur J Cell Biol.* 2007, Vol. 86 (11–12), pp. 731-746. DOI: 10.1016/j.ejcb.2006.12.005.

27. Pigareva Yu. N., Salmina A. B., Karacheva Yu. V. Features of microcirculatory channel of the skin: regulation mechanisms and modern methods of investigation. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie.* 2013, no. 4, pp. 3-8. (InRuss).

28. Cheng F., Shen Y., Mohanasundaram P., Lindstrom M., Ivaska J., Ny T., et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF-beta-Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2016, no. 113, pp. 4320-4327. DOI: 10.1073/pnas.1519197113.

Author

Irina M. Petrova
Senior Lecturer
marygane6@mail.ru

Sergei L. Khatsko

Head of the Anatomical and physiological experimental laboratory
sergey.khatsko@urfu.ru

Alexander V. Zhdanov

Assistant
sanya.zhdanov.1996@mail.ru

Tatiana A. Kalinina

Ph.D, Associate Professor
t.a.kalinina@urfu.ru

Tatiana V. Glukhareva

Ph.D, Docent, Associate Professor
taniagluhareva@yandex.ru

Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin
Russian Federation, Yekaterinburg