

нерацию полнослойной кожной раны у лабораторных мышей (Князева и др., 2011). Кроме того, на предварительном этапе исследования данного фактора нами было показано, что наносекундное ИПМИ (10 ГГц, длительность импульсов 100 нс, частота повторения импульсов 8 Гц, пППМ 140 и 1500 Вт/см²) ускоряет процессы ранозаживления (Samoylova *et al.*, 2020; Гостюхина и др., 2022). Оказалось, что наиболее эффективным с точки зрения скорости заживления ран является облучение с интенсивностью – 140 Вт/см² (Гостюхина и др., 2022). Это представляет интерес для применения данного фактора в медицинской практике, поскольку указанный режим не превышает гигиенических уровней безопасного воздействия на организм (СанПиН 2.2.4/2.1.8.055-96., 1996). Таким образом, полученные результаты исследования динамики заживления ожоговых ран после термических повреждений и коррекции наносекундным ИПМИ у лабораторных крыс требовали гистологического подтверждения.

Цель настоящей работы – провести гистологическую оценку состояния кожи лабораторных крыс после термических повреждений и их коррекции наносекундными микроволновыми импульсами с пППМ 140 Вт/см² и частотой повторения импульсов 8 Гц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование выполнялось на 20 половозрелых самках крыс стока “Wistar” массой 230–250 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и на стандартном рационе со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры с животными выполнялись в одно и то же время (с 9:00 до 11:00). Исследование проводилось в соответствии с этическими нормами работы с лабораторными животными (ETS № 123) и санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (Правила лабораторной практики в Российской Федерации). На проведение исследования получено разрешение Комиссии по биоэтике Биологического института НИ ТГУ (протокол № 15 от 14.06.2019 г.).

Экспериментальные животные случайным образом разделялись на две группы по 10 особей в каждой:

1. Контрольная группа ($n = 10$) – крысы, которые после моделирования термического ожога содержались в стандартных условиях вивария и не подвергались воздействию ИПМИ;

2. Опытная группа ($n = 10$) – крысы, которые после моделирования термического ожога подвергались однократно в течение четырех дней локальному воздействию наносекундным ИПМИ с

пППМ 140 Вт/см² с частотой повторения импульсов 8 Гц.

Моделирование термических ожогов. За сутки до моделирования ожога на дорсальной поверхности тела крысы осуществляли депиляцию участка кожи путем выбривания электрической ветеринарной машиной. Бритье и моделирование ожога проводили под CO₂ наркозом. Термическую рану создавали прикладыванием без усилия на 30 с, разогретого до 100°C металлического стержня диаметром 2 см к поверхности кожи в межлопаточной области. Площадь повреждения в контрольной и опытной группах составляла в среднем 340 ± 18 мм², что соответствует 8–9% от площади поверхности тела.

В течение всего эксперимента крысы содержались по две особи в специальных клетках, разделенных между собой прозрачной перегородкой для исключения контакта животных друг с другом и взаимного влияния на процесс заживления ожоговой раны. Наблюдение за процессом заживления ран после 4-кратного облучения осуществляли в динамике у контрольных и опытных крыс вплоть до образования келоидного рубца.

Динамику заживления термических ожогов оценивали с помощью электронного штангенциркуля по уменьшению площади участка поврежденной кожи (Князева и др., 2011; Гостюхина и др., 2022) и фиксировали фотокамерой Sony-DSC-F717 (Япония) с последующим анализом фотографий.

Облучение термических ожогов. Через 5 ч после формирования ожога ежедневно в течение 4 последующих дней ожоговые раны лабораторных крыс подвергали однократному воздействию наносекундным ИПМИ (4000 импульсов за сеанс/день, пППМ 140 Вт/см², частота повторения импульсов 8 Гц). Для локального воздействия на термическую рану и устранения возможности облучения всего организма остальная часть тела животных укрывалась радиопоглощающим материалом. Продолжительность однократного облучения с указанными параметрами воздействия составляла 8 минут. В качестве источника ЭМИ использовался импульсный лабораторный СВЧ-генератор (несущая частота 10 ГГц, длительность импульсов на полувисоте 100 нс). Во время воздействий животные в специальных пластиковых контейнерах диаметром 10 см и длиной 30 см помещали на расстоянии 20 см от рупора антенны генератора, в зоне сформировавшейся волны ИПМИ. При радиочастотном электромагнитном воздействии возможен нагрев тканей и, соответственно, повышение температуры облучаемой ткани, поэтому во время воздействия с помощью волоконно-оптического термометра МТ-4МО-1 (Россия) осуществляли температурный контроль. При использованной интенсивности ИПМИ температура нагрева

тканей в области раны не превышала 0.05°C. Выбор режима воздействия (длительность, пППМ, частота повторения) основан на результатах предыдущих исследований, как наиболее эффективно влияющего на скорость репаративной регенерации полнослойных кожных и термических ран (Князева и др., 2011; Гостюхина и др., 2022).

Гистологический анализ. На 30 день после моделирования термического ожога животных вывели из эксперимента путем перезодировки CO₂-наркоза. Для проведения гистологического анализа вырезали участок кожи, включающий пораженную и соседнюю интактную области. Гистологическую обработку материала проводили стандартными методиками (Коржевский, 2010; Exbryat, 2013; Ярцев, 2019). После фиксации в 10% растворе забуференного формалина образцы кожи обезвоживали в растворах этанола возрастающей крепости (70, 95, 98%), просветляли в бутаноле и заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме RMD-3000 (“MTPoint”, Россия) и переносили на предметные стекла с белок-глицериновым покрытием. Окраску полученных срезов осуществляли гематоксилином Майера–эозином и модифицированным азановым методом. Всего было получено 60 микропрепаратов. Микроскопию препаратов, изготовление снимков выбранных показательных образцов, а также измерения осуществляли с помощью микроскопа AxioLab A1, камеры AxioCamERc 5s и программы ZEN 2 (“CarlZeissMicroscop”, Германия).

На микрофотоснимках измеряли общую площадь исследуемого фрагмента (ПФ, мкм²), площадь грануляционной ткани (ПГТ, мкм²), разрывов в исследуемом фрагменте (ПР, мкм²), толщину новообразованного эпидермиса (ТЭ, мкм) или длину раны – расстояние между краями раны (ДР, мкм) – для ран с неполной эпителизацией. На основе первичных измерений рассчитывали относительную площадь грануляционной ткани (ОПГТ):

$$\text{ОПГТ} = \text{ПГТ} \times 100 / \text{ПФ} - \text{ПР} (\%) \quad (1)$$

Для сравнения экспериментальных групп использовали показатели ТЭ, ДР, ОПГТ.

Статистическая обработка данных. В ходе статистической обработки результатов гистологического анализа рассчитывали: среднее значение (\bar{x}), минимум (min) и максимум (max), стандартное отклонение (σ), стандартную ошибку средней ($m_{\bar{x}}$), коэффициент вариации (Cv), уровень значимости (p). Для оценки характера распределения использовали критерий Краскела–Уоллиса. Для сравнения результатов групп применяли точный критерий Фишера и тест Стьюдента. При проверке статистических гипотез достоверным считали уровень значимости менее 5% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологический анализ показал, что на 30-е сутки эксперимента после моделирования ожогов и 4х-кратного облучения наносекундным ИПМИ с пППМ 140 Вт/см², с частотой повторения импульсов 8 Гц термические раны у всех исследованных групп животных находились в фазе регенерации (рис. 1).

В контрольной группе полная эпителизация ран была выявлена в 33% случаев. Относительная площадь грануляционной ткани (t -test: $t = -2.2$, $p > 0.05$) и толщина новообразованного эпидермиса (t -test: $t = 1.4$, $p > 0.05$) у крыс данной группы с незавершенной эпителизацией ран (67%) не отличались от таковых с полной эпителизацией.

У облученных животных (опытная группа) в 67% случаев установлена полная эпителизация ожоговых ран. В данной группе крысы с незавершенной эпителизацией ран статистически отличались от таковых с полностью эпителизованными ранами по толщине новообразованного эпидермиса (t -test: $t = 1.21$, $p \leq 0.05$). Этот показатель оказался в 3.88 раза меньше толщины у животных с незавершенной эпителизацией раны (табл. 1).

Сравнение показателей опытных и контрольных групп животных с не полностью эпителизованными ранами продемонстрировало статистически значимые различия по величине относительной площади грануляционной ткани (t -test: $t = -2.37$, $p \leq 0.05$), в то время как по толщине эпидермиса различия отсутствовали (t -test: $t = -1.87$, $p > 0.05$). После облучения раны имели в 4.22 раза большую относительную площадь грануляционной ткани по сравнению с таковыми у контрольных животных (табл. 1).

В случае с полной эпителизацией ран животных опытной и контрольной групп отличались только по площади грануляционной ткани (t -test: $t = -3.83$, $p < 0.05$), которая была в 5.66 раз больше у животных после облучения (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты работы подтвердили ранее полученные данные о том, что воздействие наносекундным ИПМИ с интенсивностью 140 Вт/см² с частотой повторения импульсов 8 Гц способствует ускорению процесса регенерации ожоговых ран (Гостюхина и др., 2022). По результатам гистологического анализа было установлено, что животные, термические травмы которых подвергались облучению, имели более выраженную степень эпителизации ран. При этом, вне зависимости от степени эпителизации у крыс после облучения наблюдался больший размер области грануляционной ткани по отношению к контрольной группе.

Из литературных источников следует, что заживление кожных ран представляет собой слож-

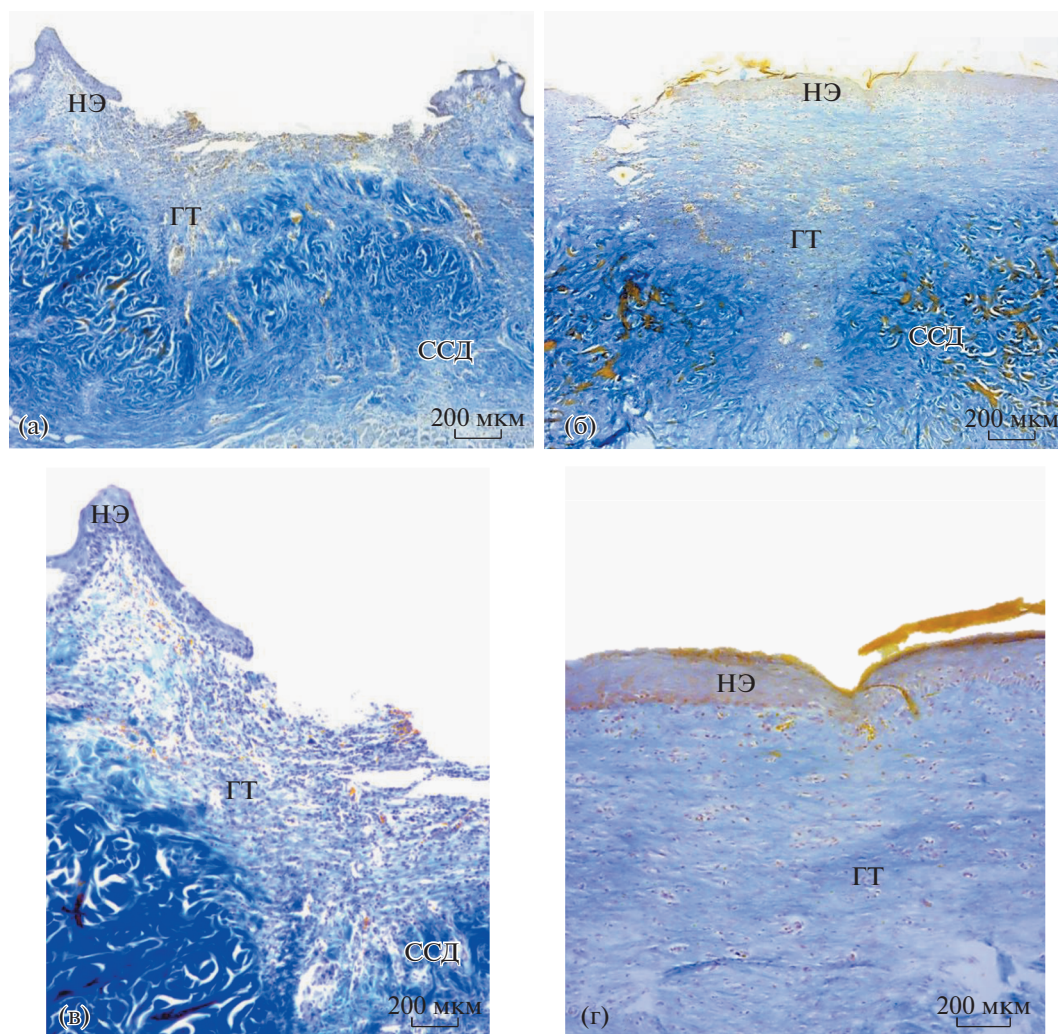


Рис. 1. Поперечные срезы центральной области ожоговых ран кожных покровов крыс контрольной (а, в) и опытной (б, г) групп на 30-е сутки заживления. Окраска модифицированным азановым методом НЭ – новообразованный эпидермис, ГТ – грануляционная ткань, ССД – сетчатый слой дермы.

Таблица 1. Показатели поврежденного участка кожных покровов крыс на 30-е сутки эксперимента после моделирования ожоговой травмы и 4-кратного воздействия наносекундным ИПМИ

Группа	Параметр		
	относительная площадь грануляционной ткани, мм ²	толщина новообразованного эпидермиса, мкм	длина раны, мм
	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm m_{\bar{x}}$
Крысы с не полностью эпителизированными ранами после ожоговой травмы			
Контрольные	0.50 ± 0.20	49.22 ± 21.15	2.19 ± 0.70
Опытные	2.39 ± 1.86	37.71 ± 53.32	4.85 ± 5.07
Крысы с полностью эпителизированными ранами после ожоговой травмы			
Контрольные	0.27 ± 0.03	65.21 ± 10.31	
Опытные	1.53 ± 1.05	146.33 ± 116.99	

ное взаимодействие между разными типами клеток, цитокинами и нейрососудистой системой (Fox *et al.*, 2008). Использование новых технологий регенерации ткани способно заметно улучшать восстановление кожи, в частности, посредством реэпидермизации, ангиогенеза и заселения гипертрофических рубцов и келоидов (Sakallioğlu *et al.*, 2006). Известно, что ЭМИ разных диапазонов и интенсивностей также способно стимулировать репаративную регенерацию в поврежденных тканях (Бессонов и др., 2000; Лушников и др., 2003; Rodrigo *et al.*, 2009; Strauch *et al.*, 2009) за счет усиления кальций-кальмодулинового связывания в клетках и активации NO-синтазы (Pilla, 2008; Strauch *et al.*, 2009). Поэтому, не исключено, что наносекундное ИПМИ обладает аналогичным биологическим эффектом.

Увеличение толщины новообразованного эпидермиса после облучения указывает на то, что возможный эффект воздействия ИПМИ связан с активацией фибробластов. Фибробласты, являясь основными клетками дермы, продуцируют коллаген, эластин и протеогликаны, важные компоненты межклеточного вещества, а также секретируют различные факторы роста (TGF- β) и цитокины (TNF- α) (Bainbridge, 2013; Tracy *et al.*, 2016). Такой потенциальный набор мишеней влияет не только на элементы дермы, но и на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов (Wang *et al.*, 2007). Помимо этого, фибробласты являются важным компонентом процесса ранозаживления, поскольку участвуют в образовании и увеличении размеров грануляционной ткани, что продемонстрировано в ходе гистологического исследования. Не исключено, что участие ИПМИ в активации фибробластов может быть важнейшим вариантом успешного ранозаживления.

Таким образом, полученная гистологическая картина регенерации кожных покровов крыс после моделирования термического повреждения и локального облучения наносекундным ИПМИ позволяет утверждать, что использование данного энергетического воздействия для заживления ран представляет перспективное направление для разработки новых технологий в области косметологии и комбустеологии. Для их успешного продвижения в практическое использование требуются соответствующие доклинические и клинические исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алексеев А.А., Бобровников А.Э., Малютина Н.Б. Экстренная и неотложная медицинская помощь после ожоговой травмы // Медицинский алфавит. 2016. Т. 2. № 15(278). С. 6–12.

Бессонов А.Е., Чемерис Н.К., Ганеев А.Б. Репаративная регенерация тканей под воздействием электромагнитных волн миллиметрового, инфракрасного и

части видимого диапазонов, генерируемых терапевтическим аппаратом “Минитаг” НИР НЦИМ “ЛИДО” // Физ.-хим. основы информ. медицины. ИБК РАН. Пушкино. 2000. С. 18.

- Ганеев А.Б., Чемерис Н.К. Механизмы биологического действия электромагнитного излучения крайне высоких частот на уровне организма // Биомедицинская радиоэлектроника. 2007. № 8–9. С. 30–46.
- Ганеев А.Б. Механизмы противовоспалительного и противоопухолевого действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот // Миллиметровые волны в биологии и медицине. 2012. № 3. С. 3.
- Гостюхина А.А., Самойлова А.В., Большаков М.А., Мочалова В.М., Зайцев К.В., Кутенков О.П., Ростов В.В. Стимуляция заживления ожоговых ран у крыс наносекундным импульсно-периодическим микроволновым излучением // Известия РАН. Серия биологическая. 2022. № 5. С. 530–537. <https://doi.org/10.31857/S1026347022050080>
- Князева И.Р., Медведев М.А., Жаркова Л.П., Гостюхина А.А., Кутенков О.П., Ростов В.В., Большаков М.А. Действие наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения на процессы регенерации // Бюллетень сибирской медицины. 2011. № 6. С. 109–113.
- Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2010. 95 с.
URL: <http://sun.tsu.ru/limit/2016/000550786/000550786.pdf>.
- Лушников К.В., Ганеев А.Б., Шумилина Ю.В. Снижение интенсивности клеточного иммунного ответа и неспецифического воспаления при действии электромагнитного излучения крайне высоких частот // Биофизика. 2003. Т. 38. № 5. С. 918–925.
- Ярцев В.В. Основы гистологической техники для зоологов: учебно-методическое пособие для биологических специальностей вузов [для студентов, обучающихся по направлению 06.04.01 Биология / авт.-сост.]. М-во науки и высш. образования, Нац. исслед. Том. гос. ун-т. Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2019. 84 с.
URL: <http://vital.lib.tsu.ru/vital/access/manager/Repository/vtls:000660316>.
- Athanasiou A., Karkambounas S., Batistatou A. The effect of pulsed electromagnetic fields on secondary skin wound healing: an experimental study // Bioelectromagnetics. 2007. V. 28. P. 362–368.
- Atiyeh B.S., Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later // Burns. 2007. V. 33. P. 405–413.
- Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts // J. Wound Care. 2013. V. 22. № 8. P. 407–412.
- Exbrayat J.M. Classical methods of visualization. Histochemical and cytochemical methods of visualization / Boca Raton, London, N.Y.: CRC Press Taylor and Francis Group, 2013. 367 p.
- Fox A., Smythe J., Fisher N., Tyler M.P.H., Mcgrouter D.A., Watt S.M., Harris A.L. Mobilization of endothelial progenitor cells into the circulation in burned patients // Br J Surg. 2008. V. 95. P. 244–251.

- Labus W., Kitala D., Klama-Baryla A., Szapski M., Kraut M., Smetek W., Glik J., Kucharzewski M., Rojczyk E., Utrata-Wesolek A., Trzebicka B., Szeluga U., Sobota M., Poloczek R., Kamiński A.* Influence of electron beam irradiation on extracellular matrix of the human allogeneic skin grafts *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2022. V. 110(3). P. 547–563.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34934>
- Pilla A.* Proposed electrochemical mechanism of EMF modulation of tissue repair // *Thebioelectromagnetic society 30th annual meeting abstract collection*, San Diego, California. 2008. P. 147.
- Rodrigo S.M., Cunha A., Pozza D.H., Blaya D.S., Moraes J.F., Blessmann J.B., Weber, Oliveira M.G.* Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair // *Photomed Laser Surg.* 2009. V. 27(6). P. 929–935.
<https://doi.org/10.1089/pho.2008.2306>
- Sakallioğlu E.A., Basaran O., Ozdemir B.H., Arat Z., Yucel M., Haberal M.* Local and systemic interactions related to serum transforming growth factor- β levels in burn wounds of various depths // *Burns.* 2006. V. 32. P. 980–985.
- Samoylova A.V., Gostyukhina A.A., Rostov V.V., Bolshakov M.A., Zaitsev K.V., Kutenkov O.P.* Dynamics of Burn Wound Healing in Rats Irradiated by Nanosecond Microwave Pulses // *Biomedical J. Scientific and Technical Research.* 2020. V. 32. № 2. P. 24791–24792.
- Shpichka A., Butnaru D., Bezrukov E.A., Sukhanov R.B., Atal A., Burdukovskii V., Zhang Yu., Timashev P.* Skin tissue regeneration for burn injury // *Stem Cell Research & Therapy.* 2019. V. 10. № 94.
<https://doi.org/10.1186/s13287-019-1203-3>
- Strauch B., Herman C., Dabb R., Ignarro L.J., Pilla A.A.* Evidence-based use of pulsed electromagnetic field therapy in clinical plastic surgery // *Aesthet. Surg. J.* 2009. № 29(2). P. 135–143.
<https://doi.org/10.1016/j.asj.2009.02.001>
- Tracy L.E., Minasia R.A., Caterson E.J.* Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound // *Adv Wound Care.* 2016. V. 5. P. 119–136.
- Wang J.H.C., Thampatty B.P., Lin J.S., Im H.J.* Mechano-regulation of gene expression in fibroblasts. *Gene.* 2007. V. 391. P. 1–15.
- Wood F.M., Kolybaba M.L., Allen P.* The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: a critical review of the literature // *Burns.* 2006. V. 32. P. 395–401.

Histological Assessment of the Laboratory Rats Skin after Thermal Damages Treated with Nanosecond Microwave Pulses

A. A. Gostyukhina^{1,2,3,#}, V. V. Yartsev^{2,3,4}, A. V. Samoylova^{1,3,4}, M. A. Bolshakov^{1,3}, S. S. Evseeva^{2,3}, V. M. Mochalova³, K. V. Zaitsev², O. P. Kutenkov¹, and V. V. Rostov¹

¹ Institute of High Current Electronics SB RAS, Akademicheskyy Ave., 2/3, Tomsk, 634055 Russia

² Federal Scientific and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Goluboe village, Solnechnogorsk district, Moscow region, 141551 Russia

³ National research Tomsk State University, Lenin Str., 36, Tomsk, 634050 Russia

⁴ Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow tract, 2, Tomsk, 634050 Russia

#e-mail: antariks-tomsk2015@yandex.ru

The effect of nanosecond repetitively pulsed microwave radiation (RPMR, 10 GHz, 100 ns pulse duration, 8 Hz pulse repetition rate, 140 W/cm² peak power flux density (pPFD)) on the treatment of a model thermal burn of the skin of laboratory rats was investigated. It is established that after 4-fold local irradiation, the rate of wound healing increases; it is due to the accelerated formation of granulation tissue and a decrease in the thickness of the scab, which ensures scarless healing.

Keywords: burn wound, nanosecond pulses, microwave radiation, histology, rats