

**Міністерство освіти і науки України  
Сумський державний університет**

**ОЛЕШКО ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ**

УДК 616-003.93-053(043.3)

**АНАТОМО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ  
ВИКОРИСТАННЯ ХІТОЗАНОВИХ МЕМБРАН ДЛЯ ПЛАСТИКИ  
МЕХАНІЧНИХ ДЕФЕКТІВ ШКІРИ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ**

14.03.01 – нормальна анатомія

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Суми – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Сумському державному університеті МОН України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, доцент,  
**Погорєлов Максим Володимирович**,  
Сумський державний університет  
МОН України, професор кафедри громадського  
здоров'я

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор  
**Кривецький Віктор Васильович**,  
ВДНЗ України «Буковинський державний медичний  
університет» МОЗ України (м. Чернівці),  
завідувач кафедри анатомії людини ім. М.Г. Туркевича.

доктор медичних наук, професор  
**Федонюк Лариса Ярославівна**,  
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний  
університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»  
(м. Тернопіль), завідувач кафедри медичної біології.

Захист відбудеться 12 травня 2017 року о 13<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 55.051.05 при Сумському державному університеті (40018, м. Суми, вул. Санаторна, 31).

Із дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Сумського державного університету (40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2).

Автореферат розісланий 11 квітня 2017 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат медичних наук,

О. С. Погорєлова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Шкіра є зовнішнім покривом людського тіла, що здійснює взаємозв'язок з навколишнім середовищем. Сумарна площа шкірного покриву дорослої людини становить 1,6 – 2,3 м<sup>2</sup>, маса досягає 5 кг, а з підшкірною жировою клітковиною – 20 кг, що становить 4 – 6 і 16 – 17 % від загальної маси тіла відповідно. За кількістю ( $10^{11}$ ) та щільністю клітин (6 млн/см<sup>2</sup>) шкіра є найбільшим органом людини (Raffetto J. D., 2001).

Ушкодження шкіри займають одне з перших місць у структурі загального травматизму (Motta G., 2005). Так, за даними ВООЗ щорічно у світі одержують травми більше ніж 50 млн осіб, реєструється понад 25 млн випадків звернень із рубцями та рубцевими деформаціями. Велика кількість травм шкіри пов'язана зі стрімким розвитком виробництва, зріс відсоток побутових травм, щороку майже вдвічі збільшується кількість ДТП, які в 75 % випадків супроводжуються травмами шкіри (World Health Organization, 2009). У мирний час приблизно 40% поранень пов'язане з транспортною травмою – в Україні щорічна кількість потерпілих від ДТП близько 35 000. Також важливе значення набули травми в зоні проведення АТО – близько 80 % всіх поранень супроводжується значним пошкодженням зовнішнього покриву.

Рановий процес – це сукупність послідовних змін, що відбуваються у рані, і пов'язаних із ними реакцій усього організму, спрямованих на відмежування вогнища травматичної деструкції, видалення патологічних субстратів і ліквідацію наслідків пошкодження. Місцеві реакції на травму практично в усіх випадках обумовлені взаємодією двох факторів: наявністю вогнища тканинної деструкції та мікробної контамінації (Gonzalez A. C., 2016). Комплекс локальних порушень у вигляді розладів мікроциркуляції, порушення обмінних процесів під дією хімічних медіаторів запалення, прогресуючої гіпоксії і ряду інших факторів обумовлюють розвиток ацидозу, гіперкаліємії та збільшення осмотичного тиску в тканинах. У результаті зростає гіпергідратація тканин, що, у свою чергу, приводить до розвитку і поширення первинного чи вторинного некрозу, останній здебільшого поєднаний із розвитком гнійних процесів (Smith S. R., 2016; Данилов Р. К., 2009). Несвоєчасне надання медичної допомоги чи недосконале лікування механічних ран шкіри може призвести до розвитку посттравматичних ускладнень, таких як: кровотеча, приєднання інфекційних процесів на локальному, а потім і загальному рівні, розвиток гнійно-запальних захворювань, які у свою чергу, приводять до формування рубцевих деформацій із подальшою частковою чи навіть повною втратою функцій органа (Xie J., 2016).

Питання оптимізації процесів репаративної регенерації м'яких тканин є одним з актуальних і остаточно не вирішених у сучасній науці (Adam J. S., 2008). На сучасному етапі розвитку медицини оптимізація загоєння ушкоджень, спричинених механічними діями (садна, рани, оперативні втручання), дією крайніх температур (опіки, обмороження) та іншими пошкоджувальними факторами (гнійно-запальні процеси, потертості, попрілості, дистрофічні порушення), залишається актуальним науково-практичним завданням. У зв'язку

з тим, що штучно синтезованим лікарським засобам властиві різні прояви побічних ефектів, розроблення нових біосумісних матеріалів для використання під час лікування механічних ушкоджень шкіри та їх дослідження на експериментальних моделях є актуальними медико-біологічними проблемами.

Сучасна світова медицина має цілий арсенал різноманітних матеріалів для використання при травмах шкіри різного ступеня та локалізації (Korrapati P. S., 2016). На жаль, в Україні майже не використовуються подібні матеріали, а вартість існуючих обмежує їх призначення для більшості верств населення. Тому, аналізуючи методи лікування ран та сучасний перелік медичних засобів, можна стверджувати, що ідеальний матеріал для лікування пошкоджень шкіри повинен бути нетоксичним, апірогенним, не мати подразнювальної та антигенної дії, забезпечувати підтримку вологого середовища в рані, бути бар'єром для мікроорганізмів або мати антимікробні властивості, бути проникним для газів та стимулювати процеси регенерації (Sood A., 2014).

Останніми роками збільшилася кількість досліджень щодо можливості застосування як основи для біологічно активних матеріалів хітозану, який володіє цілим рядом властивостей, що обумовлюють його використання як матеріалу для пластики дефектів шкіри: відновлюваність ресурсів, відсутність токсичності, апірогенність, гемостатичні та бактеріостатичні властивості, біосумісність та біодеградація. Також цей матеріал здатний стимулювати процеси регенерації та перешкоджати утворенню рубців (Hilmi A. B., 2013; Yu-Wei W., 2004). За даними Willoughby et al., матеріали на основі хітозану можуть також стимулювати секрецію медіаторів запалення, таких як інтерлейкін-8, простагландин E, інтерлейкін-1 $\beta$  тощо (Willoughby D. A., 1999). Публікації останніх років свідчать про використання хітозану як одного зі складників біоматеріалів. Так, на сьогодні є дані щодо виробництва на основі даного матеріалу гідрогелів (Wathanaphanit A., 2008; Погорєлов М. В., 2014), мембран (Madhumathi K., 2009), нановолокон (Shalumon K. T., 2009; Shalumon K. T., 2010), мікро- й наночастинок (Prabaharan M., 2008; Anitha A., 2011; Суходуб Л. Ф., 2014) та губок (Portero A., 2007).

Проте дотепер залишаються актуальними питання щодо вивчення впливу матеріалів на основі хітозану на перебіг репаративної регенерації шкіри та можливості розроблення нових підходів чи методик з метою удосконалення лікування механічних травм.

Вивчення анатомо-морфологічних особливостей регенеративних процесів на основі планіметричних, гістоморфометричних, цитологічних, мікробіологічних та інших сучасних методів досліджень дозволить підтвердити особливості фізико-хімічних властивостей і відсутність цитотоксичності хітозанових матеріалів, а також дасть можливість розробити нові методики та підходи щодо стимуляції процесів репаративної регенерації з метою покращання лікування механічних пошкоджень шкіри.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Сумського державного університету та є складовою частиною науково-дослідної теми Сумського державного університету «Медико-біологічні та доклінічні

дослідження нових біоматеріалів медичного призначення на основі хітозану» (номер держреєстрації 60115U001712). Автор дисертації виконував дослідження в рамках гранту ДФФД № Ф44/445-2012 «Розроблення та доклінічні дослідження нанокompозитних матеріалів для медицини».

**Мета дослідження.** Вивчення особливостей будови ділянки шкіри щурів при використанні хітозанових мембран для пластики механічних дефектів зовнішнього покриву у віковому аспекті.

**Задачі дослідження:**

1. Дослідити фізико-хімічні властивості та цитотоксичність хітозанових плівок різного складу з метою вибору оптимального засобу для пластики дефектів шкіри.

2. Вивчити особливості планіметричних, цитологічних і мікробіологічних показників, а також гістологічної будови шкіри в різні терміни загоєння у тварин контрольної серії після механічної травми.

3. Визначити особливості планіметрії та цитологічних показників поверхні ділянки шкіри у тварин різних вікових груп при застосуванні хітозанових плівок.

4. Вивчити зміни гістологічної будови та морфометричних параметрів ділянки шкіри у тварин різних вікових груп під час застосування хітозанових плівок.

5. Установити особливості мікробіологічних показників поверхні рани шкіри тварин за умов застосування хітозанових мембран у різні терміни загоєння рани.

*Об'єкт дослідження* – репаративна регенерація шкіри.

*Предмет дослідження* – морфологічні зміни ділянки шкіри тварин різного віку при механічній травмі та використанні хітозанових мембран.

**Методи дослідження:** дослідження фізико-хімічних властивостей матеріалів проводилось за допомогою растрової електронної мікроскопії, інфрачервоної спектроскопії та на культурі клітин; вивчення особливостей процесів регенерації – методами планіметрії ранової поверхні, цитологічного, гістологічного та морфометричного досліджень, мікробіологічного дослідження поверхні механічної рани та з використанням статистичних методів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** За допомогою сучасних методів дослідження було вперше вивчено особливості репаративної регенерації шкіри за умов її механічної травми на основі фаз ранового процесу у віковому аспекті. Була зафіксована чітка відмінність швидкості рубцювання з віком, що підтверджує уповільнення регенераторних процесів у щурів старечого та, навпаки, активацію – у молодих, порівняно з тваринами зрілого віку.

Вперше було виявлено достовірну різницю між традиційними підходами та застосуванням хітозанових мембран із метою лікування механічних ран шкіри, яке супроводжується вираженим терапевтичним ефектом, підсиленням макрофагальної реакції, призводячи до активації функції фагоцитозу, що у свою чергу, приводить до зменшення мікробної контамінації механічної рани.

Відбувається більш достовірне зменшення площі поверхні дефекту при застосуванні хітозану, ніж без використання лікарських засобів. Цитологічне дослідження показало, що застосування хітозану сприяє швидшому переходу фази запалення у фазу регенерації.

Уперше встановлено, що при загоєнні ран шкіри під впливом хітозану відбувається швидке формування грануляційної тканини, великою кількістю і поліморфізмом клітин і волокнистих структур. Прискорення процесів диференціювання тканинних елементів сприяє утворенню шару горизонтально орієнтованих фібробластів, більш ранній трансформації сполучної тканини, посиленню процесів епітелізації та контракції рани, що приводить до утворення органоспецифічного регенерату.

**Практичне значення одержаних результатів.** Виконані комплексні дослідження характеризують морфофункціональні зміни шкіри в процесі репаративної регенерації за умов застосування хітозану. Представлені матеріали можуть бути використані як обґрунтування для подальшого дослідження матеріалів на основі хітозану з метою створення лікарських препаратів – стимуляторів репаративної регенерації шкіри.

Результати цих досліджень дозволили визначити різницю та особливості показників регенераторних процесів шкіри тварин за умов механічної рани, що може бути використане як морфологічне підґрунтя в експериментальній медицині й біології, зокрема нормальній та патологічній анатомії, фізіології, експериментальній хірургії, гістології та для розробки новітніх способів лікування механічних травм шкіри.

Результати експериментальних досліджень упроваджені в навчальний процес на кафедрах: анатомії людини імені М. Г. Туркевича ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», Запорізького державного медичного університету, Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; нормальної анатомії людини Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; гістології, цитології та ембріології Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; патологічної анатомії з секційним курсом ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України; в наукову роботу лабораторії морфології сполучної тканини ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України».

**Особистий внесок дисертанта.** Дисертантом особисто проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз літературних джерел за темою наукового дослідження, визначено мету та завдання дослідження. Автором розроблено патент на корисну модель механічної рани у лабораторних тварин, проведено постановку експерименту, забір матеріалу, здійснені аналіз та статистична обробка одержаних результатів, оформлення їх у вигляді графіків і таблиць, сформульовані висновки, підготовлені наукові матеріали до публікацій та виступів на конференціях. Морфологічні, мікробіологічні, морфометричні, планіметричні, цитологічні та дослідження з визначення

фізико-хімічних властивостей проведені особисто здобувачем. Дослідження з використанням культур клітин проведені в рамках співпраці наукового керівника з Шеффільдським університетом (Великобританія), результати дослідження опрацьовані особисто дисертантом.

**Апробація результатів дисертації.** Основні матеріали дисертації повідомлені та обговорені на таких конференціях і конгресах: Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини» (Суми, 10–12 квітня 2013 р.), Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених, присвяченій 20-річчю медичного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 18–19 квітня 2013 р.), 6-му міжнародному студентському медичному конгресі «6th International Student Medical Congress in Košice (Кошице, Словаччина, 25 – 27 червня 2014 р.), II Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини» (Суми, 16–18 квітня 2014 р.), науково-практичній конференції «Морфологічні дослідження – виклики сучасності» (23–24 квітня 2015 р.), 8-му Міжнародному студентському медичному конгресі «8th International Student Medical Congress in Košice (Кошице, Словаччина, 22 – 24 червня 2016 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць, з яких 8 статей – у наукових фахових виданнях, рекомендованих ДАК МОН України для медичних наук (зокрема, 2 – одноосібні, 1 – оглядового характеру), 1 – у науковому журналі, що індексується Sci Verse Scopus, 2 – патенти на корисну модель, 6 праць – у матеріалах з'їздів, конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертацію викладено на 185 сторінках комп'ютерного тексту. Вона складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, розділу «Результати власних досліджень», структурованого на 5 підрозділів, обговорення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел налічує 277 найменувань. Роботу ілюстровано 26 таблицями та 89 рисунками.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **Матеріали та методи дослідження**

#### **Дослідження фізико-хімічних властивостей та цитотоксичності плівок**

У роботі проводилося вивчення процесів регенерації шкіри тварин після механічної травми і застосування хітозанових плівок. Матеріал для покриття дефекту був одержаний у співпраці з Інститутом прикладної фізики НАН України (м. Суми). Для одержання гелю хітозану використовували хітозан із різною молекулярною масою (200, 500 та 700 кДа), одержаний із панцирів камчатських крабів без будь-яких домішок. Готували 2 % розчин хітозану в 0,5 % оцтовій кислоті впродовж 24 год, профільтрувавши його через скляний фільтр. рН одержаного гелю витримували не нижче 7.0. Гель формував тонку помірно розчинну у воді плівку на полімерній підкладці впродовж 10 хвилин.

Для формування плівок товщиною більше 0,5–1,0 мм використовували тефлонові форми, час формування – від 1 до 3 діб.

Для одержання нерозчинної у водному середовищі плівки необхідне додаткове оброблення ранового покриття гідроксидом натрію (0,1 М розчин). Одержане таким чином покриття міцне та має високу адгезію до шкіри.

**Дослідження плівок проводили з використанням таких методів:**

#### 1. *Растрова електронна мікроскопія*

Із метою визначення особливостей рельєфу поверхні та внутрішньої будови сформованих плівок проводили напилення зразків сріблом у стандартній вакуумній установці (ВУП-5) товщиною 40–50 нм. Дослідження зовнішньої поверхні мембрани та її профілю здійснювали на растровому мікроскопі PEMMA-102 (SELMІ, Україна) при збільшенні від 300 до 2 000 разів.

#### 2. *Інфрачервона спектроскопія*

Інфрачервоні спектри матеріалу були отримані на інфрачервоному спектрометрі «Spectrum One» («Perkin Elmer»). Перед вимірюваннями зразки змішували з порошком KBr (2,5–3,0 мг ChAr і 300 мг KBr) та пресували у тверду таблетку.

#### 3. **Визначення швидкості деградації плівок**

Визначення швидкості біодеградації проводили шляхом поміщення плівки у розчин simulated body fluid (SBF) рН = 7,2 за температури 37 °С. Аналіз ранніх результатів проводили через 15, 30, 40 та 60 хв, віддалені результати деградації вивчали через 12, 24 та 48 годин після початку експерименту. Швидкість біодеградації D визначали за формулою

$$D = \frac{W_0 - W_t}{W_0} 100\%,$$

де  $W_0$  – маса сухого зразка;  $W_t$  – маса зразка через проміжок часу  $t$ .

#### 4. **Визначення токсичності та біосумісності з використанням культур фібробластів**

Зважаючи на те, що хітозанові плівки одержані з матеріалу з різною молекулярною масою – 200, 500, 700 кДа, було проведено дослідження плівок на культурі фібробластів для оцінювання адгезії та проліферації клітин на поверхні зразків. Дослідження було проведено в лабораторії клітинної і тканинної інженерії Kroto Research Institute Шеффілдського університету (Великобританія), керівник лабораторії – др. Гвендолен Рейлі.

Для проведення дослідження з плівок були виготовлені диски діаметром 12 мм, які розміщені у 12-лунковому планшеті. Попередньо диски були простерилізовані у 100 % етанолі впродовж 1 години. На поверхню кожного диска було поміщено 50 000 клітин (фібробласти – OF). У кожен лунку додавали 2 мл модифікованого середовища Ігла (DMEM medium), планшет поміщали в CO<sub>2</sub>-інкубатор, заміну середовища здійснювали кожні 3 дні. Як позитивний контроль використовували культивування фібробластів на культуральному пластику (TCP), негативний – вільні від клітин диски з хітозановими плівками.



Оцінювання адгезії та росту фіброblastів проводили за допомогою мікроскопії. Проліферацію оцінювали за допомогою тесту Almal Bleu на 3-тю, 7-му та 14-ту доби після початку експерименту. Метод ґрунтується на здатності клітин переводити резазурин, який має флуоресцентні властивості, в резорурфін з флуоресцентними властивостями. За інтенсивністю флуоресценції резорурфіну в експериментальних зразках у порівнянні з контролем визначали кількість живих клітин на поверхні зразка.

### **Дослідження впливу хітозанових плівок на регенерацію механічного дефекту шкіри.**

Вивчення особливостей процесу регенерації шкірного покриву проведено на 180 білих лабораторних щурах – самцях 3 вікових груп – молоді (3 місяці), зрілі (9 місяців) та старечого віку (22 місяці) у терміни 1, 3, 7, 14 та 21 день після початку експерименту.

Залежно від віку тварини були поділені на 6 серій, з яких 3 контрольні та 3 експериментальні.

Усім тваринам в умовах стерильної операційної було завдано стандартного дефекту – механічної травми шкіри з руйнуванням усіх шарів за власною методикою (Олешко О. М., 2014).

Для формування дозованої механічної травми шкіри з руйнуванням усіх її шарів під дією кетамінового наркозу (10 мг на 1 кг маси тварини) лабораторну тварину голили на спині в міжлопатковій зоні, формуючи квадратну ділянку площею 9 см<sup>2</sup>. Тварину фіксували до предметного столика за чотири кінцівки. Додаткову фіксацію потрібної ділянки шкіри забезпечували шляхом опускання пластинки, що вільно ковзала по осі штатива (висота – 60 см), площею 20 см<sup>2</sup> (2x10 см) та масою 0,5 кг, в якій попередньо був сформований отвір діаметром 1,6 см. Далі, попередньо поголену шкіру обробляли 40 % розчином етилового спирту з метою профілактики бактеріальної контамінації.

Контактно впливаючи на шкіру алмазною пластинкою площею 1,76 см<sup>2</sup> (діаметр 1,5 см) і товщиною 0,4 см, котра закріплена в бормашині Proxxon-microtom 50E-28515, рукоятка якої зафіксована на штативі за допомогою тримача та ввімкнена в мережу постійного струму (220 В), за допомогою регулятора швидкості обертів вмикали потрібний режим швидкості обертів (5 000 обертів/хв), після запуску бормашини, тримач, що фіксує рукоятку бормашини, опускали та витримували на шкірі впродовж 2 секунд. У результаті даної експозиції створювали механічну рану всіх шарів шкіри до підшкірної клітковини з площею, що дорівнює площі алмазної пластинки.

Тварин виводили з наркозу та, підтримуючи стаціонарні умови, утримували в спеціально обладнаному віварії.

Контрольній групі тварин після завдання дефекту проводили стандартний туалет рани з використанням стерильних марлевих пов'язок, заміну яких проводили щоденно.

Експериментальній серії тварин для місцевого лікування рани з першої доби після травми використовували експериментальні хітозанові покриття, заміну яких проводили щоденно.

Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 3-тю, 7-му, 14-ту та 21-шу доби після завдання травми, що відповідає термінам, які характеризують основні етапи регенераційних процесів шкіри.

Для вивчення морфофункціональних особливостей регенерації шкіри в умовах експерименту використовували такі методи дослідження:

#### 1. *Планіметричне дослідження ділянки травми*

Після виведення тварин з експерименту травмовану ділянку фотографували за допомогою цифрового фотоапарата Nikon D3200 з одержанням зображень із роздільною здатністю 1920x1080. Для отримання реального зображення разом із поверхнею дефекту фотографували лінійку з мінімальною шкалою 1 мм. Після одержання зображення проводили вимірювання загальної площі дефекту, відсоток некротизованих тканин, грануляцій та епітелізованих ділянок із використанням програми «SEO Image lab 2.0» (Суми, Україна).

#### 2. *Цитологічне дослідження поверхні дефекту*

Для цитологічного дослідження проводили забір матеріалу з ранової поверхні за методом «мазків-відбитків», а також зіскоб – за методом «поверхневої біопсії» залежно від фази перебігу ранового процесу (Корнієнко В. В., 2013). В кожному терміні дослідження виготовляли по 3–5 препаратів з однієї й тієї самої ділянки ранової поверхні після видалення кірочок і некротичних тканин із поверхні рани за допомогою марлевого тампона, змоченого у стерильному фізіологічному розчині. Проводили вивчення цитограми за такими показниками: кількість лейкоцитів у полі зору, відсоток нейтрофілів, лімфоцитів, моноцитів, еозинофілів, макрофагів, полібластів та фібробластів, а також ендотеліоцитів та епітеліоцитів.

#### 3. *Гістологічне дослідження*

З метою виготовлення гістологічних препаратів проводили біопсію ранової поверхні з прилеглою шкірою та підлеглими тканинами розміром 2 см<sup>2</sup> і товщиною до 5 мм. Біопсію ранової поверхні проводили в її центральних та периферичних відділах (5 шматочків із кожної рани). Для виготовлення гістологічних препаратів шматочки біопсії фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну (рН 7,2) впродовж 1 доби, потім зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та заливали у парафінові блоки. Потім виготовляли серійні зрізи товщиною 5–7 мкм, які після депарафінізації забарвлювали гематоксилін-еозином. Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою світлового мікроскопа «Olympus BH 2» з цифровою відеокамерою DCM 510 5,0 pixels.

#### 4. *Морфометрія гістологічних препаратів*

Морфометричне дослідження проводили за допомогою програми «SEO Image lab 2.0» (Суми, Україна) з урахуванням наступних показників: відносна площа набряку строми, відносна площа судин дерми, середній діаметр судин дерми в мкм, відносна площа судин грануляційної тканини та середній діаметр судин грануляційної тканини в мкм (Корнієнко В. В., 2013).

## 5. *Мікробіологічне дослідження поверхні травми*

Виходячи з того, що для механічних ран характерне зараження не монокультурою, а в основному асоціаціями мікроорганізмів, для мікробіологічного дослідження мікрофлори механічної рани використовували змиви, які засівали на різні спеціальні живильні середовища (кров'яний агар, жовтково-сольовий агар, середовище Ендо, агар Цейслера, живильне середовище «Псевдомонас АПС-20» та середовище Сабуро) з метою виділення й ідентифікації виділених мікроорганізмів.

### **Результати дослідження та їх обговорення**

Інфрачервона спектроскопія довела, що плівки, утворені з хітозану різної молекулярної маси, мають подібні спектри. Дослідження мембран методом растрової електронної мікроскопії довело відмінність у будові одержаних матеріалів. Збільшення молекулярної маси приводить до утворення більш рівної поверхні матеріалів. Проте відомо, що наявність розвиненого рельєфу (особливо в мікро- та нанодіапазолах) є сприятливим чинником для адсорбції протеїнів плазми крові та адгезії клітин. Таким чином, матеріали з низькомолекулярного хітозану, які мають найбільш розвинений рельєф поверхні, є найбільш перспективними для застосування як скафолдів для пластики дефектів шкіри. Також матеріали з хітозану 200 та 500 кДа є більш пористими порівняно з високомолекулярним хітозаном. Таким чином, за даними фізико-хімічних досліджень, плівки з молекулярною масою 200 та 500 кДа є найоптимальнішими для клінічного застосування.

Використання будь-яких біоматеріалів неможливе без визначення їх цитотоксичності та біосумісності. Найбільш простий та об'єктивний метод дослідження цих параметрів є культивування специфічних клітин на поверхні матеріалів. У нашому експерименті використовувалася культура фібробластів людини, ріст яких на поверхні матеріалів простежувався з 3-ї по 14-ту добу. Результати експерименту показали, що формування моношару клітин до 14-ї доби відбувається лише на поверхні плівок із молекулярною масою 500 та 700 кДа. На поверхні плівки з молекулярною масою 200 кДа відсутнє формування суцільного шару. При цьому клітини втрачають типовий фенотип. Реакція редукції резазурину показала, що активність клітин на поверхні низькомолекулярного хітозану менша за показники фібробластів, ріст яких відбувався на поверхні культурального пластику (контроль). При цьому флюоресценція резазурину на 14-ту добу в культурі клітин на поверхні зразків з молекулярною масою 500 та 700 кДа у півтора – два рази вища. Ці дані свідчать, що високомолекулярний хітозан є нетоксичним та має стимулювальний вплив на ріст фібробластів у культурі клітин.

Таким чином, за результатом вивчення фізико-хімічних параметрів та цитотоксичності плівок із хітозану різної молекулярної маси, для проведення досліджень на тваринах, був відібраний матеріал, синтезований із хітозану молекулярною масою 500 кДа. Ці плівки мають розвинений рельєф поверхні, наявність мікропор у середині та показали стимулювальний вплив на проліферацію фібробластів.

У нашому експерименті вже з першої доби застосування хітозанових мембран відзначається зменшення кількості лейкоцитів на поверхні дефекту у

тварин зрілого та старечого віку, а також нейтрофілів у щурів молодого віку. Проте кількісний склад клітин рани істотно змінюється вже з 3-ї доби, достовірно зростає кількість макрофагів у щурів усіх вікових груп. Також майже вдвічі зростає кількість моноцитів у тварин зрілого та старечого віку.

Збільшення кількості фагоцитів на поверхні рани приводить до прискорення очищення ділянки ушкодження від некротичних мас та сприяє більш ранньому початку утворення сполучної тканини. Крім того, активація макрофагальної ланки імунітету запобігає бактеріальній контамінації поверхні рани (Gurtner G. C., 2016).

Таким чином, у першій фазі ранового процесу, що триває в середньому до 4-ї доби, відбувається заповнення дефекту згустком крові та тканинним ексудатом. Відбувається спазм судин та утворення тромбів. Проте за 10 – 15 хвилин відзначається дилатація судинного русла, порушення проникності стінки судин, ексудація та розвиток набряку. У цій фазі відбувається нейтрофільна грануляція, переміщення лімфоцитів та макрофагів у зону ушкодження. Утворений лейкоцитарний вал забезпечує фагоцитоз та очищення рани від некротичних тканин (Данилов Р. К., 2009). В очищенні рани важливу роль відіграють макрофаги, які містять лізосомальні ферменти, зокрема рибонуклеази, кислі фосфатази, протеази тощо (Майборода А. А., 2006). Відомо, що продукти деградації хітозану здатні впливати на процеси міграції лейкоцитів та макрофагів, а також збільшувати активність клітин (Chachuli S. H., 2016).

На 7-му добу спостереження у нашому експерименті при застосуванні хітозанових мембран, за результатами планіметричного дослідження, не відбувається загоювання площі дефекту у тварин усіх вікових груп, проте відносна площа некрозу є достовірно меншою та становить ( $3,71 \pm 0,17$ ) у тварин молодого, ( $4,04 \pm 0,29$ ) – зрілого та ( $4,22 \pm 0,11$ ) – старечого віку відповідно. Утворення грануляцій починається з дна рани. Важливе значення на цьому етапі відіграє ендотелій капілярів, який бере участь в утворенні нових судин а також фібробластів, які синтезують позаклітинний матрикс (Данилов Р. К., 2009). Площа грануляцій за результатами планіметричних досліджень достовірно перевищує контроль у тварин молодого та зрілого віку і становить ( $29,65 \pm 1,39$ ) та ( $28,51 \pm 0,62$ ) % відповідно. Використання хітозанових плівок приводить до зменшення набряку шкіри у тварин усіх вікових груп, а також до зниження відносної площі судин дерми у молодих тварин, що свідчить про нормалізацію судинної реакції. Основну роль у процесах утворення грануляцій відіграють судини. Їх відносна площа у тварин усіх вікових груп значно перевищує контроль. Деякі дослідники довели, що за умов впливу хітозану відбувається секреція судинного ендотеліального фактора росту, що приводить до підвищення проліферації ендотеліоцитів та утворення судин. Навіть за умов моделювання діабету у мишей спостерігалась активація ангіогенезу в рані при використанні хітозанових нановолокон (Pietramaggiore G., 2008).

До 14-ї доби спостереження відбувається загоєння площі дефекту у тварин як контрольної, так і експериментальної серії. При цьому різниця з контролем відзначається лише у тварин молодого віку. В даний термін спостереження відбувається дозрівання грануляційної тканини, заміщення її

тканиноспецифічними структурами та початок активації епітелізації поверхні. Планіметричні показники показали зменшення площі грануляцій на поверхні дефекту у тварин усіх вікових груп за рахунок достовірного зростання площі епітелізованих ділянок. На відміну від попереднього терміну спостереження відносна площа та середній діаметр судин грануляційної тканини достовірно відрізняється від контролю лише у тварин старечого віку та становить 6,37 % та 22,39 мкм відповідно.

Формування тканиноспецифічних структур шкіри відбувається за рахунок синтезу міжклітинного матриксу фібробластами. Дослідження впливу хітозану на культуру фібробластів показало його здатність до стимуляції адгезії та проліферації клітин (Alekhin A. I., 2016). Позитивно заряджені аміногрупи хітозану вступають в електростатичну взаємодію з глікозаміногліканами, які є ростовим фактором, що здатний впливати на ріст фібробластів та їх проліферацію. Крім того, доведено, що за наявності хітозану відбувається паралельне укладання молекул колагену, що зменшує ризик розвитку рубців (Muzzarelli R. A., 2009).

Початок епітелізації поверхні дефекту, за даними планіметрії, відбувається з 7-ї доби спостереження. При чому площа епітелізації зменшується з віком майже удвічі. Використання хітозанових мембран приводить до збільшення площі краєвої епітелізації у тварин усіх вікових груп на 7-му та 14-ту доби спостереження. При цьому відносна площа епітелізації тканин становить  $(12,21 \pm 0,17)$  % та 68,11 % у щурів молодого віку,  $(6,48 \pm 0,11)$  % та 56,10 % – зрілого,  $(3,95 \pm 0,19)$  та  $(45,91 \pm 1,93)$  % – старечого відповідно. На сьогодні відсутні дані щодо прямого впливу хітозану на процеси епітелізації, тому можна зробити припущення, що використання хітозану має опосередкований вплив на епітелізацію через нормалізацію кровопостачання ділянки дефекту, зменшення запалення та прискорення утворення тканиноспецифічних структур дерми (Reed S., 2006). Таким чином, вплив хітозану на процеси регенерації у фазу проліферації полягає у зменшенні набряку, стимуляції росту судин грануляційної тканини та прискоренні епітелізації поверхні дефекту.

Таким чином, фаза проліферації без чіткої межі з попередньою починається з 3-ї, 4-ї діб після ушкодження. У цій фазі продовжується некроліз, очищення рани від некротичних тканин та починається розвиток грануляцій. Залежно від глибини рани та її типу дана фаза закінчується через 15 – 30 діб (Данилов Р. К., 2009). Основною метою керування процесами регенерації в цій фазі є прискорення очищення рани та стимуляція проліферативних процесів.

У молодих тварин контрольної серії на 21-шу добу спостереження відбувається повна епітелізація дефекту, а у щурів інших вікових груп незначні за площею дефекти –  $(0,16 \pm 0,04)$  та  $(0,23 \pm 0,06)$  см<sup>2</sup> відповідно. Відносна площа епітелізації становить від  $(76,34 \pm 2,14)$  % у щурів старечого віку до  $(98,71 \pm 1,12)$  % - у тварин молодого віку. Неепітелізовані ділянки представлені рубцевою тканиною. За умов використання хітозанових мембран на 21-шу добу спостереження відбувається повне закриття дефекту у тварин усіх вікових груп. Відносна площа епітелізації поверхні значно зростає, особливо у щурів

старечого віку та становить  $(88,62 \pm 1,71)$  %. У тварин інших вікових груп поверхня рани майже на 100 % вкрита епітелієм. Таким чином, застосування хітозану приводить до зменшення утворення рубцевої тканини, що особливо помітно у тварин старечого віку. Цитологічні дослідження зіскобів дефекту на 21-шу добу у тварин контрольної серії показало наявність незначної кількості лейкоцитів, серед яких домінували нейтрофіли та лейкоцити. У мазках відзначається значна кількість фібробластів та ендотеліоцитів. У тварин експериментальної серії відзначається достовірне зменшення як загальної кількості лейкоцитів, так і відсотка нейтрофілів. Кількість лімфоцитів, макрофагів та ендотеліоцитів достовірно не змінюється.

Дослідження гістологічних препаратів у тварин контрольної серії на 21-шу добу спостереження свідчить про відсутність набряку строми у тварин молодого та зрілого віку, а також незначний за площею набряк у щурів старечого –  $(4,39 \pm 0,81)$  %. Відносна площа судин дерми та грануляційної тканини, а також середній діаметр судин на 21-шу добу у тварин контрольної серії свідчить про відсутність судинної реакції. Застосування хітозану достовірно не впливає на зазначені показники. При цьому спостерігається значне та достовірне зменшення відносної площі набряку строми у тварин старечого віку до  $(3,53 \pm 0,36)$  %.

Гістологічні дослідження препаратів шкіри тварин експериментальної серії показало формування сполучної тканини з будовою, типовою для дерми. Відмінністю від контрольної серії є упорядкованість пучків колагенових та еластичних волокон. За даними деяких дослідників, олігомери хітозану здатні упорядковувати розміщення колагенових фібрил через безпосередній вплив на секретуючі клітини – фібробласти (Muzzarelli R. A., 2009). Ця властивість хітозану дозволила попередити утворення рубцевої тканини у тварин молодого та зрілого і зменшити її формування – у щурів старечого віку.

Таким чином, третя фаза ранового процесу – фаза загоювання, характеризується утворенням рубцевої тканини та епітелізацією поверхні дефекту. Кінцеве формування рубцевої тканини та епітелізація відбуваються через 1 тиждень від початку даної фази. Проте залежить від розмірів рани, ступеня пошкодження тканин, кількості та вірулентності мікроорганізмів, які попали в рану, загального стану організму, віку та методів лікування (Данилов Р. К., 2009). У цій фазі відбувається дозрівання грануляційної тканини, що супроводжується запускінням судин, зменшенням кількості клітинних елементів, зокрема макрофагів, лейкоцитів та фібробластів. У даний період відбувається активація процесів розвитку колагенових та еластичних волокон, а також епітелізація поверхні дефекту, що відбувається за рахунок міграції епітеліальних клітин від країв до середини рани (Данилов Р. К., 2009).

Бактеріальна контамінація є одним з основних факторів, що здатний негативно впливати на процеси регенерації дефектів шкіри. Хронізація запалення може призвести навіть до утворення трофічних виразок та розвитку дизрегенерації. Основними мікроорганізмами, що спричинюють ускладнення, є умовнопатогенні бактерії. У даному експерименті у тварин контрольної серії відзначається активна колонізація поверхні рани з 3-ї доби після травми та

збільшення їх загальної кількості до 7-ї доби. Основними виявленими мікроорганізмами були *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida* spp., *Bacillus cereus* та *Aspergillus* spp.. З 14-ї до 21-ї доби спостереження відбувається зменшення кількості мікроорганізмів на поверхні рани у тварин молодого та зрілого віку, проте у щурів старечого віку їх кількість залишається клінічно значущою.

Застосування хітозану приводить до зменшення колонізації поверхні рани мікроорганізмами, особливо у тварин молодого та зрілого віку. У тварин старечого віку у змивах із поверхні рани на 3-ю добу представлений весь спектр мікроорганізмів, характерний для щурів контрольної серії, проте їх кількість є значно меншою. До 21-шої доби спостереження з поверхні рани виділялись лише стрептококи та стафілококи у кількості, характерній для тварин контрольної серії.

Механізм антибактеріальної дії хітозану полягає як у прямому впливі на мікроорганізми, так і має опосередкований характер (рис. 1).

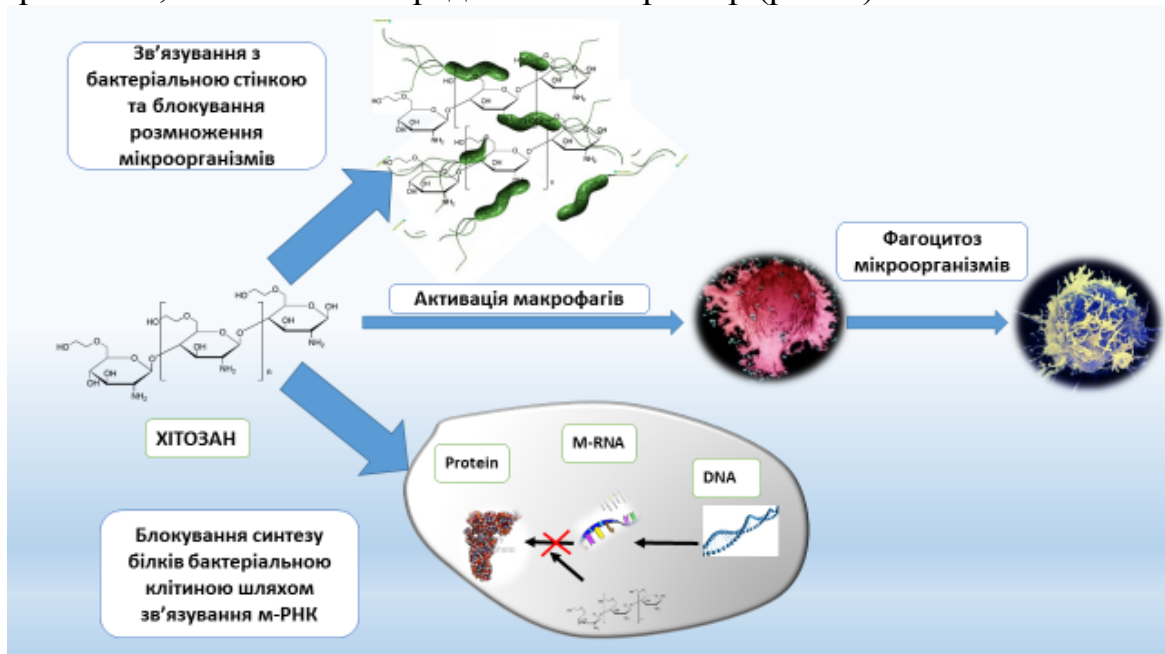


Рисунок 1 – Механізм антибактеріальної дії хітозану

Відомо, що позитивно заряджені олігомери хітозану здатні зв'язуватися з негативно зарядженою стінкою мікроорганізмів, що блокує розмноження та міграцію клітин (Bingjun Q., 2015). Крім того, олігомери низькомолекулярного хітозану здатні проникати в середину бактеріальних клітин та зв'язуватися з мРНК, тим самим блокуючи синтез білків та призводячи до загибелі клітин (Zhang J., 2014). Більшість дослідників вказують на бактериостатичну дію хітозану, проте є докази і бактерицидного ефекту (Dragland I. S., 2016). Опосередкована дія хітозану полягає у стимуляції міграції лімфоцитів та макрофагів у рановий дефект та активації процесів фагоцитозу (Park C. J., 2009). Цей механізм може пояснити меншу антибактеріальну дію хітозанових плівок у тварин старечого віку експериментальної серії. Адже відомо, що кількість макрофагів та їх чутливість до зовнішніх впливів значно зменшується з віком (Salem S. A., 2016).

Таким чином, аналізуючи одержані результати та спираючись на дані літератури, можна запропонувати таку схему змін процесів регенерації шкіри за умов застосування хітозанових мембран (рис. 2).

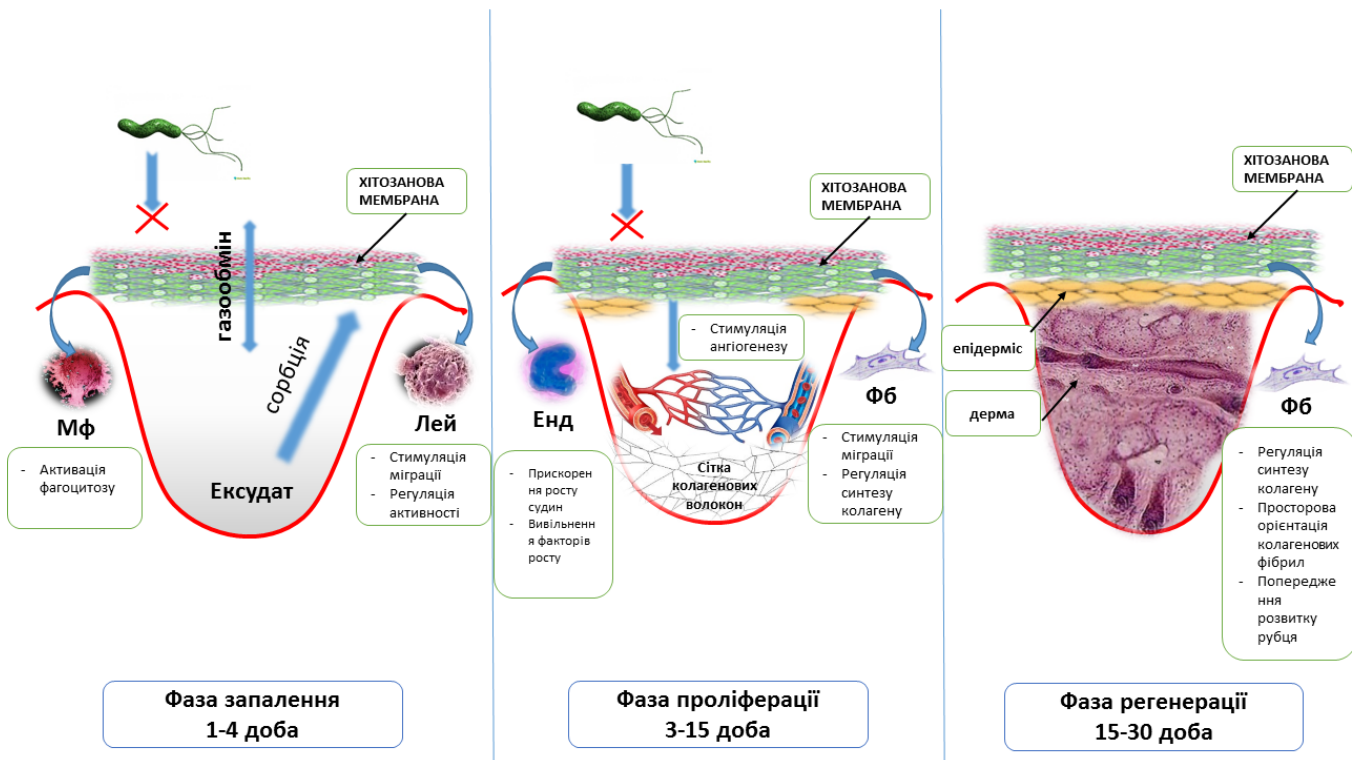


Рисунок 2 – Механізми впливу хітозанової мембрани на регенерацію механічного дефекту шкіри в різні фази репаративного процесу. Примітки:

Мф – макрофаг; Лей – лейкоцит; Енд – ендотеліоцит; Фб – фібробласт

У фазу запалення хітозанова мембрана служить бар'єром між зовнішнім середовищем та поверхнею дефекту. Сорбційні властивості мембрани забезпечують відведення надлишку ексудату, а паропровідність забезпечує газообмін та створення оптимального мікросередовища для початку процесів регенерації. Крім того, мембрана є механічним бар'єром для мікроорганізмів, а продукти її деградації мають пряму антибактеріальну дію. Олігомери хітозану, які виділились у процесі біодеградації стимулюють міграцію лейкоцитів та макрофагів, регулюють активність імунокомпетентних клітин та активують фагоцитоз. Усе це приводить до прискорення очищення ранового ложа від некротизованих мас та сприяє більш ранньому початку розвитку сполучної тканини.

У фазі проліферації хітозанова мембрана все ще забезпечує оптимальне мікросередовище та слугує бар'єром для мікроорганізмів. Вплив олігомерів хітозану на міграцію фібробластів та регуляцію синтезу колагену приводить до більш раннього утворення грануляційної тканини. Хітозан стимулює ангіогенез грануляційної тканини шляхом впливу на ендотеліоцити, що приводить до прискорення вивільнення факторів росту. Очищення поверхні рани в першій фазі регенерації та раннє формування грануляційної тканини і відсутність бактеріального запалення призводять до початку краєвої епітелізації, що



відбувається за рахунок міграції епітеліоцитів із країв рани.

У фазі регенерації відбувається формування усіх шарів дерми та епідермісу за рахунок регуляції синтезу колагену та оптимізації просторової орієнтації колагенових фібрил. Ці ефекти олігомерів хітозану реалізуються за рахунок безпосереднього впливу на фібробласти.

Таким чином, мембрани хітозану з молекулярною масою 500 кДа можуть бути ефективним засобом медичного призначення та призводити до оптимізації процесів регенерації глибоких механічних дефектів шкіри.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі подане теоретичне обґрунтування та вирішене практично-наукове завдання, а саме визначення особливостей морфофункціонального стану шкіри тварин різного віку за умов застосування хітозанових плівок після механічної травми.

1. Дослідження фізико-хімічних властивостей мембран, одержаних із хітозану різної молекулярної маси (200, 500 та 700 кДа), показало їх однорідний хімічний склад та наявність структурних відмінностей, які полягають у зменшенні пористості зі збільшенням молекулярної маси та зростанням нерівності поверхні мембран за умов зниження молекулярної маси хітозану від 700 до 200 кДа. Культивування фібробластів на поверхні мембран довело відсутність клітинної токсичності мембран, при цьому матеріали з хітозану молекулярними масами 500 та 700 кДа мають стимулювальний вплив на проліферацію клітин у культурі. Таким чином, плівки з хітозану молекулярною масою 500 кДа мають оптимальні характеристики для застосування з метою пластики дефектів шкіри.

2. Ушкодження шкіри у контрольних тварин усіх вікових груп супроводжується утворенням ділянки некрозу, зростанням кількості нейтрофілів на поверхні рани, розвитком набряку строми та судинної реакції у вигляді повнокров'я судин та стазу еритроцитів. Третя та сьома доби після травми характеризуються міграцією макрофагів та полібластів у ділянку дефекту, які беруть участь в очищенні рани та формуванні грануляційної тканини, відсоток якої максимально зростає з  $(10,12 \pm 0,61)$  на 3-тю добу до  $(33,72 \pm 1,04)$  % на 7-му добу у щурів молодого віку. На 21-шу добу спостереження відзначається епітелізація ділянки дефекту та формування рубцевої тканини, кількість якої більша у тварин старечого віку.

3. Застосування хітозанових мембран приводить до достовірного зростання площі грануляційної тканини на 3-тю добу спостереження у тварин усіх вікових груп (максимальний показник у тварин молодого віку до  $(13,21 \pm 0,46)$  % ( $p = 0,0023$ )). Із 7-ї доби кількість грануляційної тканини зменшується, що свідчить про формування сполучнотканинного регенерату. Загальна площа дефекту при цьому достовірно менша порівняно з контрольними показниками лише у тварин молодого віку  $(0,35 \pm 0,05)$  см<sup>2</sup> ( $p = 0,0183$ ). Клітинний склад рани характеризується зменшенням кількості нейтрофілів та лімфоцитів в усі терміни спостереження та зростанням відсотка макрофагів та фібробластів із 3-ї та 7-ї діб відповідно. Кількість ендотеліоцитів максимально зростає з 7-ї доби та становить залежно від віку від  $(3,1 \pm 0,16)$  % ( $p = 0,1075$ ) (старечого віку) до  $(7,2 \pm 0,44)$  % ( $p = 0,0246$ )

(тварин молодого віку). Оптимізація клітинного складу рани за умов застосування хітозану є підґрунтям прискорення процесів регенерації.

4. При дослідженні морфометричних показників за умов застосування хітозанової мембрани відбувається нормалізація судинної реакції, що супроводжується зменшенням відносної площі набряку строми у тварин молодого та зрілого віку з 3-ї доби, а у щурів старечого віку – 7-ї доби спостереження. Відносна площа судин дерми та їх діаметр зменшується лише у тварин молодого віку до  $(6,90 \pm 0,47) \%$  ( $p = 0,5481$ ) та  $(17,77 \pm 1,25)$  мкм ( $p = 0,2051$ ) відповідно. Дані гістологічного дослідження свідчать про більш ранній початок утворення грануляційної тканини, особливо у тварин молодого віку (з 3-ї доби спостереження) та оптимізацію формування сполучної тканини, а також епітелізації поверхні рани до 21-ї доби. У щурів молодого та зрілого віку відсутні рубцеві зміни, в той час як у тварин старечого віку їх кількість значно менша, ніж у контролі.

5. Використання хітозанових мембран приводить до зменшення колонізації поверхні рани умовно-патогенними мікроорганізмами на ранніх етапах репаративного процесу у тварин молодого та зрілого віку. До 21-ї доби спостереження на поверхні рани спостерігається наявність лише стафілококів та стрептококів у кількості від  $\leq 40$  до  $\leq 102$  КУО/мл. Лише у тварин старечого віку спостерігається наявність *Aspergillus spp.* у кількості  $\leq 50$  КУО/мл, що свідчить про вікову залежність ефективності хітозанових мембран.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ СТАТЕЙ

1. Моделирование дефектов кожи у экспериментальных животных / А. Н. Олешко, В. В. Корниенко, Ю. А. Ткаченко [и др.] // Georgian Medical News. – 2015. – № 2 (239). – С. 103 – 108. *(Автором розроблена модель нанесення механічного, термічного та хімічного опіку шкіри лабораторним тваринам, підготовлений відповідний розділ статті, а також проведена експериментальна частина роботи та сформульовані висновки).*
2. Використання хітозану для лікування пошкоджень різної етіології / М. В. Погорелов, О. В. Калінкевич, О. В. Солодовник [та ін.] // Таврійський медико-біологічний вісник. – 2013. – Т. 16, № 1, ч. 2 (61). – С. 150–154. *(Дисертантом проведений експеримент з моделювання дефекту шкіри, проведені планіметричні дослідження та сформульовані висновки).*
3. Матеріали для лікування дефектів шкіри: перспективи застосування похідних хітозану / М. В. Погорелов, В. В. Корнієнко, Ю. А. Ткаченко [та ін.] // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2013. – Т. 1, № 3. – С. 275–285. *(Автором, проведена експериментальна частина роботи та сформульовані висновки).*
4. Олешко А.Н. «Эффективность применения хитозановых мембран при механической травме кожи» / А.Н. Олешко, М.В. Погорелов // Современный научный вестник: №30 (169) 2013 Серия: медицина биологические науки – ст. 79-87. *(Автором проаналізовані літературні джерела стосовно матеріалів на основі хітозану, проведені*

*експериментальні дослідження та підготовлені відповідні розділи статті).*

5. Особливості морфогенезу опікової рани при застосуванні хітозанових мембран в різні вікові періоди / В. В. Корнієнко, О. В. Калінкевич, М. В. Погорелов [та ін.] // Морфологія. – 2013. – Т. 7, № 4. – С. 42–50. *(Дисертантом проведені експериментальні дослідження та підготовлений відповідний розділ статті).*
6. Корнієнко В. В. Особливості морфогенезу опікової рани при застосуванні хітозанових плівок у тварин старечого віку / В. В. Корнієнко, О. М. Олешко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 4, Т. 1 (113). – С. 275–278. *(Автором проведені гістологічні та цитологічні дослідження та підготовлені відповідні розділи статті).*
7. Oleshko A. N. Age Futures of Wound Treatment With Chitosan Films Application / A. N. Oleshko // European Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 4 № 2. – P. – 87–100.
8. Oleshko A. N. Cell Compound of Wound Surface After the Chitosan Membranes Application / A. N. Oleshko // European Journal of Medicine. Series B. – 2014. – Vol. 1 № 1. – P. – 27–44.

#### **ПАТЕНТИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

1. Пат. № 91169 Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання дозованої травми шкіри з руйнуванням всіх її шарів в умовах експерименту на лабораторних тваринах / Олешко О. М., Корнієнко В. В., Ткаченко Ю. А. [та ін.] ; патентовласник Сумський державний університет. – № u 2014 00251 ; заявл. 13.01.14 ; опубл. 25.06.14, Бюл. № 12. *(Дисертантом проведено патентний пошук, розроблена експериментальна модель, проведені експериментальні дослідження моделі та підготовлений текст патенту).*
2. Пат. № 89985 Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання дозованого термічного опіку шкіри лабораторним щурам / Олешко О. М., Корнієнко В. В., Ткаченко Ю. А. [та ін.] ; патентовласник Сумський державний університет. – № u 2013 13489 ; заявл. 20.11.13 ; опубл. 12.05.14, Бюл. № 9. *(Автором проведено патентний пошук, розроблена експериментальна модель, проведені експериментальні дослідження моделі та підготовлений текст патенту)*

#### **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ТЕЗ**

1. Клітинна характеристика ранової поверхні при застосуванні хітозану для лікування ран різної етіології / Ткаченко Ю. А., Олешко О. М., Дейнека В. М., Погорелов М. В. // Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених: “Актуальні питання теоретичної та практичної медицини” (Суми, 10-12 квітня 2013 року). – С. 23-24.
2. Спосіб моделювання гнійної рани в експерименті на лабораторних тваринах / В.М. Дейнека, Т.В. Івахнюк, О.М. Олешко [та ін.] // Актуальні питання сучасної медицини: Міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених, присвячена 20-річчю медичного факультету Харківського

- національного університету імені В. Н. Каразіна, 18–19 квітня 2013 р. : тези доп. – Харків, 2013. – С. 98.
3. Oleshko O.M. New experimental model for studying skin injuries on rats / O.M. Oleshko // FOLICA MEDICA: 6th International Student Medical Congress 25th – 27th of June 2014.: Abstract book. – Košice P. – 129.
  4. Oleshko O. M. New experimental model for studying the skin defects of different etiology on laboratory rats / O. M. Oleshko // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини: II міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених, 16–18 квітня 2014 р.: тези доп. – Суми, 2014. – С. 113–114.
  5. Pogorielov M. V. Cell toxicity of new chitosan films for skin replacement / M. V. Pogorielov/ O. M. Oleshko // Морфологічні дослідження – виклики сучасності : наук.-практ. конф., 23–24 квітня 2015 року. : тези доп. – Суми, 2015. – С. 107–108.
  6. Napchenko A. Dinamic and static degradation of electrospinning polymers / A. Napchenko, O. Oleshko, B. Drigval // FOLICA MEDICA: 8th International Student Medical Congress 22th – 24th of June 2016. .: Abstract book. – Košice P. – 168.

### АНОТАЦІЯ

**Олешко О.М. Анатомо-експериментальне обґрунтування використання хітозанових мембран для пластики механічних дефектів шкіри у віковому аспекті** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.01 – нормальна анатомія. – Сумський державний університет, Суми, 2017.

Дисертація присвячена вивченню особливостей будови ділянки шкіри в процесі регенерації механічного дефекту у віковому аспекті при використанні хітозанових мембран.

За допомогою сучасних методів дослідження було вперше вивчено особливості репаративної регенерації шкіри за умов її механічної травми на основі фаз ранового процесу у віковому аспекті.

Вперше було виявлено достовірну різницю між традиційними підходами та застосуванням хітозанових мембран із метою лікування механічних ран шкіри. Експериментальні покриття одержали більш виражений терапевтичний ефект. Виявлено, що хітозан підсилює макрофагальну реакцію, що свідчить про активацію функції фагоцитозу, що у свою чергу, приводить до зменшення мікробної контамінації механічної рани. Зменшення площі поверхні дефекту при застосуванні хітозану достовірно вище, ніж без використання лікарських засобів.

Уперше встановлено, що при загоєнні ран шкіри під впливом хітозану відбувається швидке формування грануляційної тканини з добре розвиненим мікроциркуляторним руслом, великою кількістю і поліморфізмом клітин і волокнистих структур.

**Ключові слова:** шкіра, механічна травма, вікові особливості, хітозан.

## АННОТАЦИЯ

**Олешко А.Н. Анатомо-экспериментальное обоснование применения хитозановых мембран для пластики механических дефектов кожи в возрастном аспекте.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.01 – нормальная анатомия. – Сумский государственный университет, Сумы, 2017.

Диссертация посвящена изучению особенностей строения участка кожи в процессе регенерации механического дефекта в возрастном аспекте при использовании хитозановых мембран.

С помощью современных методов исследования впервые изучены особенности репаративной регенерации кожи в условиях ее механической травмы на основе фаз раневого процесса в возрастном аспекте.

Впервые была выявлена достоверная разница между традиционными подходами и применением хитозановых мембран с целью лечения механических ран кожи. Экспериментальные покрытия получили более выраженный терапевтический эффект. Выявлено, что хитозан усиливает макрофагальную реакцию, что свидетельствует об активации функции фагоцитоза, что в свою очередь, приводит к уменьшению микробной контаминации механической раны. Уменьшение площади поверхности дефекта при применении хитозана достоверно выше, чем без использования лекарственных средств.

Впервые установлено, что при заживлении ран кожи под влиянием хитозана происходит быстрое формирование грануляционной ткани с хорошо развитым микроциркуляторным руслом, большим количеством и полиморфизмом клеток и волокнистых структур.

**Ключевые слова:** кожа, механическая травма, возрастные особенности, хитозан.

## SUMMARY

**Oleshko O. M. Anatomical and experimental study of chitosan membrane application for treatment of skin mechanical defects in the age aspect.** – Manuscript.

Dissertation for degree of Ph.D on speciality 14.03.01 – Normal anatomy – Sumy State University, 2017.

Dissertation is devoted to the study of the structural features of skin in the process of regeneration of a mechanical defect in the age aspect after application of chitosan membranes.

Features of reparative regeneration of the skin mechanical trauma was studied using modern methods of research based on the phases of wound healing in the age aspect.

We found significant difference between traditional approaches and the use of chitosan membranes for the treatment of mechanical skin wound. Experimental wound dressings have shown pronounced therapeutic effect. It revealed that chitosan enhances macrophage response, which indicates by activation of phagocytosis, which in turn, reduces microbial contamination of trauma surface. Reducing the surface area of the defect in the application of chitosan was significantly higher than without the treatment.

It was found that the healing of skin wounds under the influence of chitosan leads rapid formation of granulation tissue with well-developed vessels, and a large number of polymorphic cells and fibrous structures.

The use of chitosan membranes leads to a significant increase in the area of granulation tissue at the 3<sup>rd</sup> day of observation in animals of all ages (maximum rate in young animals –  $13.21 \pm 0.46\%$  ( $p = 0.0023$ )). The amount of granulation tissue decreased from the 7<sup>th</sup> day, indicating the formation of connective tissue regenerate. Total area of the defect was significantly lower compared to the control only in young animals –  $0.35 \pm 0.05 \text{ cm}^2$  ( $p = 0.0183$ ).

Cell compound of the wounds characterized by decreasing in the number of neutrophils and lymphocytes in all periods of observation and the percentage of macrophages and fibroblasts from the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days, respectively. Maximum number of endothelial cells increased on the 7<sup>th</sup> day and is depending on the age of – from  $3.1 \pm 0.16\%$  ( $p = 0.1075$ ) (old age) to  $7.2 \pm 0.44\%$  ( $p = 0.0246$ ) (young animals).

Morphometric study in case of chitosan application indicate normalization of vascular reactions, accompanied by a decrease in the relative area of stromal edema in animals and young age from the 3<sup>rd</sup> day, and in old rats – in 7<sup>th</sup> day of observation. The relative area of the dermis and blood vessels diameter is reduced only to animals of young age –  $6.90 \pm 0.47\%$  ( $p = 0.5481$ ) and  $17.77 \pm 1.25 \text{ mm}$  ( $p = 0.2051$ ), respectively. These histological studies suggest an earlier beginning of the formation of granulation tissue, especially in young animals (from the 3<sup>rd</sup> day of observation) and optimization of the formation of connective tissue and epithelialization of the wound surface to the 21<sup>st</sup> day.

Application of chitosan membranes leads to reduction of wound surface colonization by opportunistic pathogens in the early stages of reparative processes in animals and young and adult ages. Up to the 21<sup>st</sup> day of observation on the wound surface observed the presence of staphylococci and streptococci only in an amount from  $\leq 40$  to  $\leq 102 \text{ CFU / ml}$ .

**Key words:** skin, mechanical trauma, age features, chitosan.

Підписано до друку 28.03.2017 р.  
Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0,9. Тираж 100 пр. Зам. № 311

Видавець і виготовлювач  
Сумський державний університет,  
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3062 від 17.12.2007.