

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

ТКАЧЕНКО ЮЛІЯ АНАТОЛІВНА

УДК 616.5-001.17-005.54-078-092.9(043.5)

**ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ШКІРИ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ ПРИ
ЛІКУВАННІ ХІМІЧНОГО ОПІКУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ХІТОЗАНОВИХ
МЕМБРАН**

14.03.01 – нормальна анатомія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Суми – 2016

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, завідувач кафедри гігієни
та екології з курсом мікробіології, вірусології
та імунології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Старченко Іван Іванович,
Вищий державний навчальний заклад
України «Українська медична стоматологічна
академія» МОЗ України,
кафедра патологічної анатомії з секційним курсом,
завідувач кафедри

доктор медичних наук, професор
Сулаєва Оксана Миколаївна,
Українського науково-практичного центру ендокринної
хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин,
МОЗ України,
Завідувач відділу патології

Захист відбудеться _____ 2017 року об _____ 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 _____ 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат медичних наук,

О. С. Погорєлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Опіки є найбільш поширеними ушкодженнями в практиці невідкладних станів (Maurice E. Asuquo, 2009). Їх частота становить від 5,6 до 12 % у структурі всіх видів травм (В.В. Бігуняк, 2004). Поширеність опіків різної етіології – від 1:10 000 до 1:1000 серед популяції, смертність від цього виду ушкоджень становить від 1,5 до 5,9 %. Найбільш уразливими при цьому є діти до 14 років та особи старше 55 років (Palao R., 2010; Wibbenmeyer L.A., 2012). В Україні частота опіків у дітей становить 14,0 на 10 000 дитячого населення (Повстяной М. Е., 2002). При цьому через незрілість тканинних структур та недосконалість репаративних механізмів навіть незначні за площею опіки можуть призводити до тяжких ускладнень (Самойленко Г.Е., 2000). Подібні наслідки мають опіки і у хворих похилого віку через зменшення регенераторного потенціалу шкіри.

У структурі опікового травматизму найбільш часто спостерігається термічне ураження. В Україні щорічно реєструється біля 50 тис. постраждалих, 10 тис. з яких є діти до 16 років. При цьому з кожним роком відбувається зростання частоти опіків хімічної, термічної та радіаційної етіології (Фісталь Е.Я., 2003). Хімічні опіки шкіри можуть спричиняти концентровані кислоти та луги, солі важких металів і фосфор (Повстяной Е.Н., 2003; Wang X., 2014). Найпоширенішими агентами є кислоти і луги, що містяться в побутових засобах, а також на виробництві (Wu M.L., 2014). Особливістю хімічних опіків є можливість руйнації тканин навіть після припинення дії агента до його повної нейтралізації чи інактивації тканиною (Palao R., 2010). Тому хімічні опіки є більш тяжкими, а їх перебіг характеризується ускладненнями з формуванням рубцевої тканини. Лікування кислотних опіків є складнішим порівняно з термічною травмою через більш виражені ураження тканин та неможливість визначити глибину ураження на початкових етапах лікування внаслідок продовження некрозу тканин хімічним агентом.

Застосування засобів для місцевого лікування опіків забезпечує захист травмованих ділянок шкіри від контакту з повітрям і контамінації мікроорганізмами з неушкоджених ділянок шкіри та повітря, зменшує механічне пошкодження та повинне створити оптимальні умови для епітелізації ушкоджених ділянок (Elias P.M., 2010).

На сьогодні існує безліч засобів для лікування опіків різної етіології як природного, так і синтетичного походження, що впливають на різні етапи регенерації шкіри після опіку (Погорелов М. В., 2013; Панарин Е. Ф., 2009; Gottrup F., 2010). Проте застосування цих засобів при хімічних опіках виявляє свої особливості, при цьому відсутні спеціальні засоби, спрямовані на нейтралізацію хімічного агента та усунення наслідків дії кислот чи лугів. У літературі є поодинокі ці щодо морфофункціональних змін регенерату шкіри під час застосуванні різних засобів місцевого лікування хімічного опіку.

Останнім часом проводяться чисельні розроблення нових засобів для лікування дефектів шкіри на основі хітозану – похідного хітину (Dragostin O.M., 2016; Orig R., 2016). При цьому в літературі відсутні ці щодо змін

репаративної регенерації шкіри при застосуванні матеріалів на основі хітозану в умовах кислотного опіку зовнішнього покриву.

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 0115U001712).

Мета дослідження. З'ясування морфологічних особливостей процесів регенерації ділянки шкіри у віковому аспекті при моделюванні опікової рани хімічної етіології та використанні хітозанових мембран.

Задачі дослідження:

1. На експериментальній моделі виявити закономірності регенерації шкіри тварин молодого, зрілого та старечого віку в умовах кислотної травми.
2. Визначити особливості планіметричних показників поверхні рани тварин різного віку після кислотного опіку в умовах застосування хітозанової мембрани.
3. Вивчити клітинний склад поверхні рани тварин різного віку у процесі регенерації ділянки шкіри при використанні матеріалу на основі хітозану.
4. Визначити особливості морфометричних параметрів ділянки шкіри тварин різного віку при лікуванні хімічного опіку матеріалами на основі хітозану.
5. Прослідкувати особливості мікробної контамінації шкіри після кислотного опіку та застосування хітозанових мембран у тварин різних вікових груп.

Об'єкт дослідження – процеси регенерації ділянки шкіри у тварин різного віку.

Предмет дослідження – морфологічний стан ділянки шкіри у щурів різного віку за умов хімічного опіку та використання хітозанових мембран.

Методи дослідження: планіметрія – для визначення швидкості процесу регенерації шкіри; цитологічне дослідження – для визначення особливостей клітинного складу регенерату шкіри; гістологічне дослідження – для вивчення морфологічних особливостей регенерату шкіри на мікроскопічному рівні; морфометричний аналіз – для визначення особливостей тканинного співвідношення регенерату шкіри в різні терміни після хімічного опіку; мікробіологічне дослідження – для вивчення особливостей мікробної контамінації поверхні рани; статистичний – для визначення достовірності одержаних відмінностей кількісних показників регенерату шкіри.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше на значній кількості матеріалу встановлені особливості стану шкіри після моделювання хімічного опіку у різні вікові періоди. Визначені особливості планіметрії рани, клітинного складу поверхні ушкоджених ділянок шкіри та морфометричні особливості процесів загоєння за умов хімічного опіку. З'ясовані особливості мікробної

контамінації рани в різні вікові періоди та виявлена залежність мікробного складу рани залежно від віку.

Уперше доведена можливість застосування інноваційних мембран на основі хітозану для лікування пошкоджень шкіри, викликаних дією кислоти. Встановлені морфофункціональні особливості регенерації шкіри, що полягають у скороченні термінів загоєння рани, зростанні кількості макрофагів та фібробластів, зменшенні судинної реакції, а також прискоренні утворення грануляційної тканини та епітелізації поверхні рани при використанні хітозанових мембран.

Практичне значення одержаних результатів. Це дослідження може бути морфологічним підґрунтям для визначення особливостей лікувальної тактики при кислотному ураженні шкіри у пацієнтів різного віку. Визначені морфофункціональні особливості процесів регенерації шкіри в різні вікові періоди дозволять диференційовано підходити до призначення лікувальних засобів.

У роботі проведено детальне вивчення нового матеріалу на основі низькомолекулярного хітозану для лікування дефектів шкіри та встановлені особливості його ефективності у тварин різного віку при кислотному опіку, що може бути морфологічним підґрунтям для проведення клінічних досліджень засобів медичного призначення.

Результати експериментальних досліджень впроваджені у навчальний процес на кафедрах анатомії людини Буковинського державного медичного університету, Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, Запорізького державного медичного університету, Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.

Особистий внесок дисертанта. Дисертантом проведений інформаційний пошук даних літератури, власноруч виконані всі етапи експериментального дослідження, реалізоване статистичне опрацювання та аналіз одержаних результатів, автором самостійно проведено узагальнення результатів дослідження, підготовлено праці до друку та сформульовано висновки з дисертації.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертації обговорені на Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини» (Суми, 10–12 квітня 2013 р.), на Міжнародній науково-практичній конференції «Морфогенез органів в умовах дії несприятливих чинників» (Алушта, 20–23 травня 2013 р.), на II Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини» (Суми, 16–18 квітня 2014 р.), на науково-практичній конференції «Морфологічні дослідження – виклики сучасності» (Суми, 23–24 квітня 2015 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 9 наукових праць, з яких 5 статей – у наукових фахових виданнях, рекомендованих ДАК МОН України для медичних наук (з них 2 – у науковому журналі, що індексується

SciVerse Scopus) 1 патент на корисну модель, 3 праці – у матеріалах з'їздів, конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 172 сторінках комп'ютерного тексту. Вона складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, розділу «Результати власних досліджень», структурованого на 6 підрозділи, обговорення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел налічує 197 найменувань. Роботу ілюстровано 26 таблицями та 89 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вивчення морфофункціональних особливостей регенерації шкіри після хімічного опіку за умов використання хітозанової плівки проведене на 180 білих лабораторних щурах-самцях трьох вікових груп: молодого (3 місяці), зрілого (9 місяців) та старечого (22 місяці) віку.

Перед початком експерименту тварин оглядали, враховуючи їх локомоторну активність та стан шкірного покриву. Під час дослідів у віварії підтримувалася постійна температура, тварини отримували належний догляд. Утримання тварин та експерименти відбувалися згідно з Директивою Європейського парламенту та Ради ЄС від 22.09.2010 року, Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Під ін'єкційним кетаміновим наркозом (10 мг на 1 кг маси тварини внутрішньом'язово) щура фіксували до предметного столика за чотири кінцівки. На оголену поверхню проводили аплікацію марлі змоченої 10% розчином азотної кислоти упродовж 25 секунд, що дозволяє досягти опіку III ступеня. Контроль глибини ураження здійснювався гістологічно в день виведення тварини з експерименту.

Залежно від віку та способу впливу на процеси регенерації шкіри після нанесення опіку всі тварини були поділені на 2 серії – контрольну та експериментальну. В кожній серії тварини були поділені на вікові групи (табл. 1).

Тваринам контрольної серії проводили стандартне лікування хімічних опіків із застосуванням стерильних марлевих пов'язок, які змінювали щоденно.

Експериментальній серії тварин для лікування пошкоджень шкіри використовували гідрогель хітозану, який накладали на пошкоджені ділянки із заміною плівки 1 раз на день.

Тварин обох серій виводили з експерименту шляхом передозування наркозу (70 мг/кг) через 1, 3, 7, 14 та 21 день після травми, що дозволяє простежувати особливості загоєння шкіри на всіх стадіях регенерації.

Розподіл тварин за серіями

Серія тварин		Термін забору матеріалу після травми, дні				
		1	3	7	14	21
Контроль	молоді (К1)	6	6	6	6	6
	зрілі (К2)	6	6	6	6	6
	старі (К3)	6	6	6	6	6
Експеримент	молоді (Е1)	6	6	6	6	6
	зрілі (Е2)	6	6	6	6	6
	старі (Е3)	6	6	6	6	6

Для вивчення особливостей регенерації пошкоджень шкіри у тварин контрольної та експериментальної серій використовували такі методи дослідження:

1. **Планіметрія поверхні рани.** Після виведення тварин з експерименту травмовану ділянку фотографували за допомогою цифрового фотоапарата Nikon D3200 з отриманням зображень із роздільною здатністю 1920x1080. Для одержання реального зображення разом із поверхнею дефекту фотографували лінійку з мінімальною шкалою в 1 мм. Після отримання та збереження зображення на жорсткому диску проводили вимірювання загальної площі дефекту, визначали відсоток некротизованих тканин, грануляцій та епітелізованих ділянок із використанням програми «SEO Image lab 1.0».

2. **Цитологічне дослідження.** Для цитологічного дослідження проводили забір матеріалу з ранової поверхні методом «мазків-відбитків», а також зскрібок методом «поверхневої біопсії» залежно від фази перебігу ранового процесу. В кожному терміні дослідження виготовляли препарати після видалення кірочок та некротичних тканин із поверхні рани за допомогою стерильного марлевого тампона, змоченого у фізіологічному розчині. Отримані препарати висушували на повітрі, фіксували в метиловому спирті 5 - 10 хвилин або 15 - 20 хвилин у суміші Никифорова і забарвлювали за Романовським-Гімзою. В отриманих препаратах враховувались загальна кількість бактеріальних клітин та лейкоцитів у полі зору (зокрема відсотковий вміст лейкоцитів з ознаками деструкції), відсотковий вміст нейтрофілів, лімфоцитів, моноцитів, макрофагів, плазматичних клітин, фібробластів та епітеліальних клітин). Підрахунок цитограм проводили на 200 клітинах.

3. **Гістологічне дослідження біопсії.** Біопсію ранової поверхні проводили в її центральних та периферичних відділах (5 шматочків із кожної рани). Одержані зразки фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну (рН

7,2). Після 24-годинної експозиції у розчині формаліну та подальшого проведення шматочків шкіри в етиловому спирті висхідної концентрації біоптат заливали в парафінові блоки. Потім виготовлялися серійні зрізи товщиною 5–7 мкм, які після депарафінізації забарвлювали гематоксилін-еозином. Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа «Olympus BH 2» з цифровою відеокамерою DCM 510 5,0 pixels.

4. **Морфометрія гістологічних препаратів.** Зображення, збережені на жорсткому диску обробляли за допомогою прикладної програми для морфометрії "SEO Image Lab 1.0" з оцінюванням таких параметрів: відносної площі стромального набряку, відносної площі судин дерми, середнього діаметра судин дерми, відносної площі судин грануляційної тканини та середнього діаметра судин грануляційної тканини.

5. **Мікробіологічне дослідження поверхні рани.** Для мікробіологічного дослідження мікрофлори 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.

6. **Статистичний метод.** Одержані дані обробляли методом варіаційної статистики за допомогою програм для обробки статистичної інформації IBM SPSS Statistics 21 та GraphPad software. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії та похибки середньої (m). Достовірність розходження експериментальних і контрольних даних оцінювали з використанням критерію Стюдента, достовірною вважали ймовірність похибки, яка менше чи дорівнює 5% ($p \leq 0,05$). Перед проведенням порівняння отриманих даних, для з'ясування типу розподілу даних використовували тест Колмогорова-Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В нашому експерименті через 1 добу після травми на поверхні шкіри утворюється некротична кірка, що виконує захисну функцію та попереджає поширення хімічного опіку на здорові тканини. Незважаючи на уніфіковану методику завдання травми, площа некрозу у тварин різного віку відрізняється, що, можливо, є наслідком більшої здатності шкіри тварин молодого віку до контракції через високі еластичні властивості, з одного боку, та значну коагуляцію білкових молекул у тварин старечого віку – з іншого. Так, відносна площа некрозу у тварин старечого віку перевищує зазначений показник у молодих щурів на 10,05% ($p=0,032$), різниця з тваринами зрілого віку становить 6,91% ($p=0,04$). Необхідно зазначити, що площа некротично змінених тканин у тварин молодого та зрілого віку відрізняється недостовірно.

Через 3 доби після травми площа рани у тварин молодого та зрілого віку зменшується відповідно до $31,22 \pm 0,12\%$ та $43,56 \pm 0,17\%$. При цьому у тварин старечого віку цей показник змінюється недостовірно. Таким чином, вже через 3 доби після травми відзначається очищення рани від некротичних мас у тварин

молодого та зрілого віку та затримка цих процесів у щурів старечого віку, що, можливо, є наслідком низької активності макрофагів.

Через 7 та 14 днів після травми зберігається тенденція, що була виявлена у попередні терміни спостереження і на 14-ту добу площа некрозу у тварин старечого віку перевищує цей показник у щурів молодого та зрілого віку на 59,05% ($p=0.034$) та 114,29% ($p=0.0001$) відповідно. На 21-шу добу спостереження у всіх вікових групах відбувається повна епітелізація рани з відсутністю вогнищ некротично змінених тканин.

Загальна площа дефекту з 7-ї доби спостереження зменшується у всі вікові періоди, що пов'язане з контракцією рани та її поступовою епітелізацією. При цьому у тварин молодого та зрілого віку процес зменшення площі дефекту виявляє більш швидку динаміку порівняно з тваринами старечого віку. За рахунок контракції рани та її епітелізації на 21-шу добу спостереження площа рани епітелізованого дефекту становить відповідно $0,54\pm 0,01$ см², $0,68\pm 0,05$ см² та $0,75\pm 0,03$ см². Використання хітозаної мембрани призводить до зменшення площі дефекту у всіх вікових групах, починаючи з 14-ї доби спостереження, що, можливо, є наслідком утворення повноцінної сполучної тканини в умовах застосування штучного покриття. Дослідження деяких авторів свідчать про формування повноцінного колагену та покращення орієнтації його волокон при застосуванні хітозану (Juckett G., 2009; Mori M., 2016). Через 21 добу спостереження застосування хітозану призводить до зменшення площі дефекту у тварин молодого віку на 26,23% ($p=0.001$), зрілого віку – на 21,13% ($p=0.02$) та у щурів старечого віку – на 11,32% ($p=0,01$) (рис. 4.1).

Відносна площа некротизованих тканин при використанні хітозаної мембрани починає зменшуватись у тварин молодого та зрілого віку через 3 доби після травми порівняно з контрольною групою щурів. Прискорення динаміки очищення рани від некротизованих тканин може бути наслідком активізації макрофагів олігомерами хітозану. Є докази стимуляції міграції клітин макрофагального ряду та зростання їх фагоцитарної активності внаслідок взаємодії з хітозаном (Tokura S., 1994; Chum-Mei D., 2007). Відсутність динаміки у тварин старечого віку може бути свідченням зменшення чутливості макрофагів до зовнішніх чинників, а також порушенням місцевого кровообігу, що погіршує процеси міграції клітин (Ovington L. G., 2007). Через 3 доби після травми відносна площа некрозу у тварин молодого віку при застосуванні хітозаної мембрани менша порівняно з контролем на 15,65% ($p=0.0001$), у щурів зрілого віку – на 20,44% ($p=0.001$).

У подальшому відзначається зменшення відносної площі некрозу у всіх вікових групах порівняно з контролем, проте спостерігається вікова залежність. Так, у тварин молодого віку через 14 днів після травми площа некрозу менша за контроль на 45,44% ($p=0.001$), у зрілих – на 32,81% ($p=0.017$) і у щурів старечого віку – на 24,13% ($p=0.0038$).

Грануляційна тканина з'являється у ділянці дефекту через 3 доби після травми. Поява цієї тканини є наслідком міграції фібробластів з неушкоджених ділянок шкіри і синтезу ними сполучнотканинного каркасу у який врастають чисельні капіляри (Schmauss D., 2015). Порівнюючи динаміку зростання

грануляцій на поверхні рани, ми підтвердили дані багатьох авторів про уповільнення її формування в особин старечого віку, що пов'язане зі зменшенням активності клітин фібробластичного ряду та пригніченням процесів ангиогенезу з віком (Zurada J.M., 2006; Майборода А. А., 2006]. Площа грануляцій через 3 доби у тварин старечого віку менша, ніж у щурів молодого віку майже у чотири рази.

Кількість грануляцій зростає до 7 доби у тварин молодого та зрілого віку і значно зменшується на кінець терміну спостереження. При цьому у тварин старечого віку зменшення площі грануляційної тканини відзначається лише через 21 добу спостереження.

Зменшення площі грануляцій є наслідком епітелізації поверхні рани, яка розпочинається через 7 днів у тварин молодого та зрілого віку і через 2 тижні – у щурів старечого віку. Реепітелізація ранової поверхні є наслідком міграції епітеліоцитів та їх проліферації з неушкоджених ділянок шкіри та виявляє залежність від інтенсивності кровопостачання. Останній чинник може бути причиною уповільнення утворення епітеліального покриву у тварин старечого віку.

Застосування хітозанової мембрани для закриття дефекту призводить до зростання кількості грануляцій в усіх вікових групах тварин, проте інтенсивність збільшення площі є різною. Так, через 3 доби після травми площа грануляційної тканини зростає у тварин молодого віку порівняно з контролем на 52,14% ($p=0.001$), зрілого віку – на 56,08% ($p=0.001$) і старечого – лише на 17,89% ($p=0.016$). При цьому у тварин останньої вікової групи через 7 днів після травми не відзначається достовірного зростання площі грануляцій. Активний ріст грануляційної тканини та процесів епітелізації призводить до відсутності грануляцій в останній термін спостереження при використанні хітозанової мембрани у тварин молодого та зрілого віку. У тварин старечого віку відносна площа грануляційної тканини через 21 добу після травми дорівнює $3,25 \pm 0,03$ %, що майже утричі менше за аналогічний показник у контрольній групі.

Використання хітозанової мембрани призводить до прискорення епітелізації поверхні рани у тварин усіх вікових груп, а у щурів старечого віку зміщує термін появи епітелізованих ділянок на 7-му добу спостереження. На 21-шу добу після травми відбувається майже повна епітелізація дефекту зі зменшенням утворення рубцевої тканини у тварин молодого та зрілого віку. У щурів старечого віку відбувається збільшення відсотка епітелізованих ділянок в усі терміни спостереження, проте на 21-шу добу він становить $75,12 \pm 0,47$ %, але цей показник на 9,76% ($p=0.043$) перевищує контроль.

Прискорений розвиток грануляцій та збільшення площі епітелізованих ділянок при використанні хітозанової мембрани виявляє декілька механізмів. По-перше, олігомери хітозану, які вивільняються при його деградації, мають хемотаксичні властивості по відношенню до фібробластів, які синтезують міжклітинний матрикс (Jayakumar R., 2011). По-друге, хітозан може виступати в якості матеріалу для формування сітки глікозаміногліканів як структурного шару сполучної речовини (Scchriest V. F., 2000). Також є докази підвищення проліферативної активності фібробластів та епітеліоцитів у культурі при додаванні продуктів деградації хітозану (Gallico G.G., 1990). Олігомери хітозану, за даними деяких авторів, можуть також активізувати процеси ангиогенезу (O'Connor N.E.,

1981).

Загалом використання хітозанової мембрани призводить до більш раннього початку епітелізації у тварин всіх вікових груп і зменшення терміну повної епітелізації поверхні рани і швидкості її заживлення у щурів молодого та зрілого віку.

Аналізуючи показники цитологічного дослідження мазків із поверхні рани у тварин різного віку, привертає увагу зменшення кількості лейкоцитів на 1-шу та 3-тю доби у тварин старечого віку. Так, на першу добу після травми кількість клітин становить $98 \pm 0,67$ у полі зору у щурів молодого віку, зменшуючись до $86,98 \pm 0,39$ – у зрілих та до $65,03 \pm 0,19$ – у особин старечого віку. Цей показник свідчить про зменшення запальних процесів у рані. Проте запальна реакція у перші дні після нанесення хімічного опіку виконує захисну реакцію та спрямована на захист здорових тканин від ушкодження (Gottrup F., 2010; Рева И. В., 2013). Разом із цим через 7 та 14 днів після травми відзначається значне зменшення кількості лейкоцитів у тварин молодого та зрілого віку, що свідчить про зменшення запальної реакції. На 21-шу добу після травми кількість лейкоцитів у полі зору у тварин молодого віку становить $11,8 \pm 0,03$, у зрілих – $10,2 \pm 0,04$, що є нормальним показником для шкіри щурів. У тварин старечого віку динаміка зменшення кількості лейкоцитів є повільною, що свідчить про пролонгацію запального процесу. Відомо, що в умовах хронізації запалення порушуються процеси синтезу сполучної речовини, що може призводити до незавершеної регенерації та формування рубцевої тканини (Hutchinson J.J., 1993). Навіть через 21 добу після травми кількість лейкоцитів у тварин старечого віку в рані перевищує показник попередніх вікових груп майже удвічі (рис. 1). Як видно з графіка, крива кількості лейкоцитів у тварин старечого віку є більш пологою та в терміни між 3-ю та 7-ю добами спостереження майже не змінюється на відміну від тварин молодого та зрілого віку, у яких відбувається різке зменшення кількості клітин в цей проміжок часу.

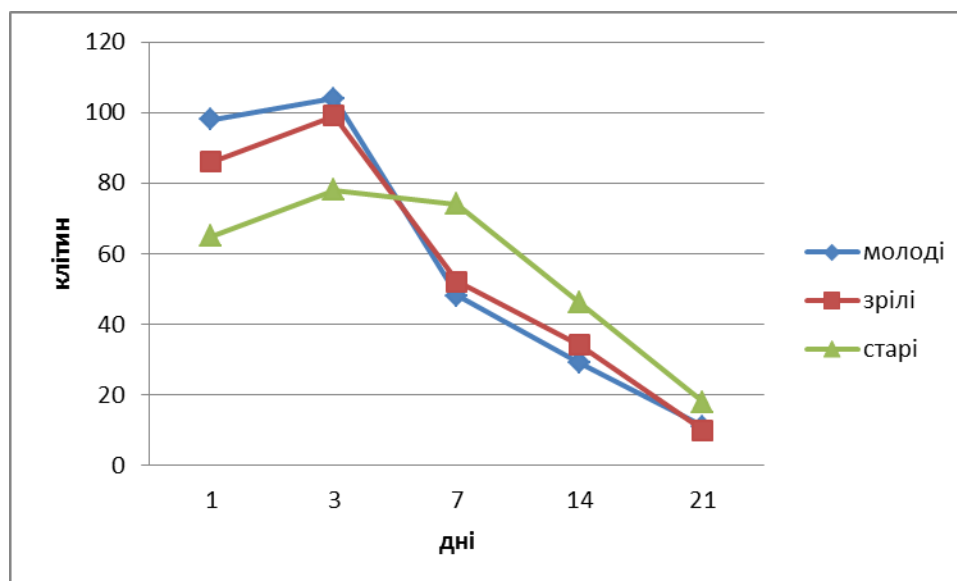


Рисунок 1 – Динаміка зміни кількості лейкоцитів на поверхні рани у тварин різного віку при застосуванні стандартного лікування

При застосуванні хітозанової мембрани для лікування хімічного опіку шкіри відзначається зменшення вираженості запальних процесів, про що свідчить зменшення кількості лейкоцитів у тварин молодого та зрілого віку. Зменшення кількості лейкоцитів може бути наслідком антибактеріальних властивостей хітозану та зменшення внаслідок цього бактеріального навантаження на рану (Rabea E. I., 2003). При цьому у тварин старечого віку відбувається зростання кількості клітин запальних на 3-тю добу спостереження, досягаючи рівня тварин молодого та зрілого віку. Це, можливо, пов'язане з активізацією клітин лейкоцитарного ряду олігомерами хітозану, про що свідчить ряд досліджень (Петрович Ю. А., 2008). Особливістю цитологічної картини при застосуванні хітозанової мембрани є стрімке зменшення кількості клітин у терміни з 3-ї до 7-ї доби в усі вікові періоди. Саме в цей термін відбувається перехід від запальної стадії до фази утворення грануляцій, і зменшення запальної реакції виявляє бути позитивним чинником утворення сполучнотканинного каркасу та росту судин грануляційної тканини (Church D., 2008). Найбільш значне зменшення кількості лейкоцитів відбувається у тварин молодого віку, що, ймовірно, пов'язане з високою чутливістю клітин до впливу зовнішніх стимулів, зокрема молекул хітозану.

Аналізуючи відсотковий вміст лейкоцитів, привертає увагу перевага нейтрофілів, як маркерів септичного запалення в перші терміни спостереження. У тварин молодого та зрілого віку відбувається зростання вмісту даних клітин з 1-ї до 3-ї доби спостереження, що відображає розвиток запалення як реакцію на некроз тканин у рані. У тварин молодого віку рівень нейтрофілів досягає $91,1 \pm 0,28\%$ на 3-тю добу спостереження. При цьому, починаючи з 7-ї доби їх вміст різко зменшується та становить $11,5 \pm 0,04\%$ та $13,4 \pm 0,03\%$ на 21-шу добу спостереження відповідно до віку. Зменшення кількості нейтрофілів відображає зниження інтенсивності запалення та формування грануляційної тканини і процеси епітелізації ранової поверхні.

У щурів старечого віку відзначається більш повільна динаміка зменшення відсотка нейтрофілів порівняно з тваринами попередніх вікових груп. Так, зростання їх кількості спостерігається до 7-ї доби, досягаючи рівня $74,8 \pm 0,37\%$. Навіть через 14 та 21 доби після травми відсоток даних клітин перевищує показники тварин молодого віку більше ніж удвічі. Таким чином, наявність високого рівня нейтрофілів може свідчити про персистуюче запалення на поверхні рани у тварин старечого віку, що може мати наслідком уповільнення процесів регенерації.

При застосуванні хітозанової мембрани для лікування кислотної травми шкіри не відбувається зменшення відсотка нейтрофілів у перші терміни спостереження порівняно з контролем. При цьому відбувається зміна динаміки їх зменшення відповідно до термінів спостереження. Так, у щурів молодого та зрілого віку не відбувається достовірного зростання кількості даних клітин на 3-тю добу після травми та більш швидке їх зменшення в інші терміни спостереження (рис. 2). На 21-шу добу після травми відсоток нейтрофілів становить $8,2 \pm 0,07\%$ та $10,8 \pm 0,09\%$, що достовірно менше, ніж при використанні стандартного лікування.

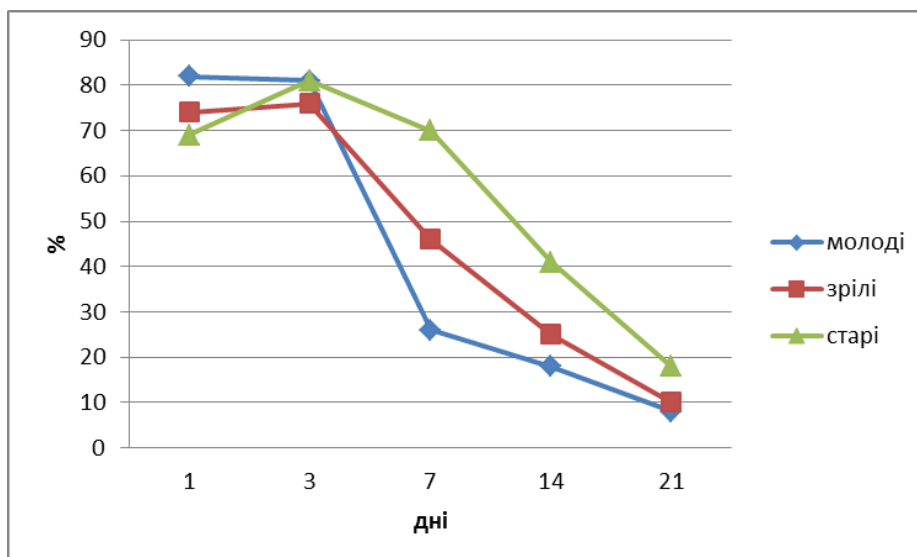


Рисунок 2 – Динаміка зміни відсотка нейтрофілів на поверхні рани у тварин різного віку при застосуванні хітозанової мембрани

У щурів старечого віку спостерігається зростання відсотка нейтрофілів лише до 3-ї доби спостереження з поступовим їх зменшенням в інші терміни після травми. На 21-шу добу відсоток нейтрофілів становить лише $18,2 \pm 0,28\%$, що на $26,02\%$ ($p \leq 0,05$) менше за контроль. Загалом зменшення відсотка нейтрофілів при застосуванні хітозанового матеріалу може бути наслідком зменшення мікробного навантаження на рану та активізацією ланок місцевого імунітету.

Відсотковий вміст лімфоцитів та моноцитів у тварин контрольної та експериментальної серії мають подібну до нейтрофілів динаміку, що свідчить про їх залучення до запального процесу в рані. Використання хітозанової мембрани, таким чином зменшує вираженість запалення та виявляє стимулювальний вплив на процеси регенерації.

Макрофаги відіграють основну роль в очищенні рани від гнійно–некротичної кірки та беруть участь в елімінації мікроорганізмів та механізмах місцевого імунного захисту (Brusselaers N., 2012). Таку саму роль відіграють і полібласти, динаміка вмісту яких повністю співпадає з макрофагами. Ці клітини з'являються в рані на 3-тю добу спостереження у невеликій кількості в усі вікові періоди, проте їх відсоток у тварин старечого віку майже удвічі менший. Із 7-ї до 14-ї доби відсоток фагоцитуючих клітин у тварин молодого та зрілого віку зростає відповідно до $21,9 \pm 0,11\%$ та $19,7 \pm 0,17\%$ та зменшується до 21-ї доби майже удвічі. У тварин старечого віку кількість даних клітин постійно зростає, хоча рівень приросту є незначним. Зростання вмісту макрофагів до 21 доби свідчить про наявність вогнищ запалення та некрозу.

Використання хітозану для місцевого лікування хімічної травми призводить до зростання вмісту макрофагів на поверхні рани. Є докази щодо хемотаксичного впливу продуктів деградації хітозану та хітину стосовно макрофагів в опіковій рані (Alsharabasy A.M., 2016). Проте в експерименті ми одержали різну чутливість цих клітин відповідно до віку. Кількість макрофагів у тварин молодого та зрілого віку зростає майже утричі, у той час, як у щурів старечого віку зростання відсотка клітин є незначним. Надалі до 7-го дня експерименту відбувається достовірне

зростання відсотка макрофагів в усіх вікових групах, але приріст клітин у старечих щурів все ще є незначним. У тварин перших вікових груп, ймовірно, відбувається зростання активності макрофагів та більш швидке очищення рани від некротичних мас та мікроорганізмів, що виявляється у зменшенні кількості фагоцитуючих клітин до 14 дня після травми з подальшим зменшенням їх відсотка відповідно до $12,6 \pm 0,03\%$ та $9,3 \pm 0,11\%$. У щурів старечого віку рівень макрофагів зменшується на 21 добу, що не спостерігалось у контрольній групі. Це свідчить про зростання активності клітин та очищення рани від залишків некротично змінених тканин.

Фібробласти відносять до клітин, що здатні синтезувати сполучнотканинний матрикс, а саме колагенові та еластичні волокна. У відбитках із поверхні ран фібробласти візуалізуються з 7-ї доби спостереження, хоча розвиток грануляційної тканини розпочинається вже з 3-ї доби після травми. Відсоток фібробластів у рані виявляє виражену залежність від віку – найбільша їх кількість спостерігається у тварин молодого віку і становить $9,2 \pm 0,11\%$ від загальної кількості клітин у мазку. З віком відбувається зменшення відсотка даних клітин у 1,5 рази, досягаючи $4,7 \pm 0,10\%$ у тварин старечого віку. У подальшому спостерігається збільшення відсотка клітин, рівень яких досягає від $20,5 \pm 0,29\%$ у тварин старечого віку до $32,9 \pm 0,23\%$ – у молодих особин.

При використанні хітозанової мембрани фібробласти виявляються через 3 доби у тварин молодого та зрілого віку, що може свідчити про створення оптимального мікрооточення на поверхні рани. Також є достеменні дані щодо стимуляції міграції фібробластів у культурі за наявності олігомерів хітозану, що утворюються під час його біодеградації (Chen Z., 2008; Dragostin O.M., 2016). Відсоток сполучнотканинних клітин зростає у молодих та зрілих тварин більше ніж удвічі через 7 днів після травми порівняно з контролем. У тварин старечого віку відсоток фібробластів зростає на $54,7\%$ ($p=0.016$) порівняно з контролем. Кількість фібробластів зростає зі збільшенням терміну спостереження та перевищує контроль через 21 добу відповідно до віку на $23,76\%$ ($p=0.015$), $18,54\%$ ($p=0.0094$) та $9,65\%$ ($p=0.0065$).

Кількість ендотеліоцитів у мазках із поверхні рани може опосередковано свідчити про динаміку утворення нових судин у регенерації шкіри. У щурів контрольної групи ми спостерігаємо появу цих клітин із 7-ї доби після травми. Як і у випадку з фібробластами, перші судини грануляційної тканини візуалізуються на гістологічних препаратах, проте ендотеліоцити в мазках виявляються лише через 1 тиждень. Також спостерігаються вікові відмінності, що полягають у зменшенні відсотка клітин з $2,9 \pm 0,06\%$ у молодих тварин до $1,8 \pm 0,06\%$ – у щурів старечого віку. До 21-ї доби спостереження кількість клітин зростає незначно, проте це не може повною мірою свідчити про динаміку ангиогенезу, оскільки цей тип клітин не є характерним для ранового вмісту.

При використанні хітозану для місцевого лікування ран ми спостерігаємо значний ріст кількості ендотеліоцитів у відбитках з поверхні рани. Більше того, клітини цього типу виявляються у тварин молодого та зрілого віку вже на 3 добу після травми. Зростання кількості ендотеліоцитів у мазках може опосередковано свідчити про стимулюючі властивості хітозану стосовно процесів ангиогенезу, що підтверджується даними деяких дослідників (Chen X. G., 2002). При цьому

динаміка зростання відсотка клітин у тварин старечого віку значно відстає від попередніх вікових груп, що свідчить про зменшення чутливості ендотеліоцитів до чинників, які підсилюють ангіогенез. На 21-шу добу після травми відсоток ендотеліоцитів перевищує контроль на 29,73% ($p=0.079$) у молодих тварин, на 27,94% ($p=0.19$) – у зрілих та на 16,67% ($p=0.068$) – у щурів старечого віку.

На жаль, об'єктивно оцінити кількість епітеліоцитів у мазках важко, проте у тварин молодого та зрілого віку вони починають формувати пласти вже з 14 дня після травми, в той час як у щурів старечого віку – лише в останній термін спостереження. При використанні хітозану ми спостерігаємо більшу кількість клітин у полі зору та початок формування груп та пластів епітеліоцитів вже на 14 добу в усі вікові періоди. Є поодинокі свідчення стимуляції міграції епітеліоцитів в культурі клітин за наявності хітозану (Denkbas E.V., 2012). Проте, на нашу думку, основною причиною прискорення епітелізації поверхні є комплексний вплив, який включає в себе зменшення запалення на початкових стадіях регенерації та стимуляцію утворення сполучної тканини і судин на стадії утворення грануляцій. Вирішальним є також факт створення оптимального вологого середовища в рані, на що вказують чисельні дослідження (Бігуняк В. В., 2004; Gottrup F., 2010).

Дані морфометрії свідчать про розвиток набряку тканин, що виявляє в своїй основі судинну реакцію у вигляді повнокров'я та периваскулярного випоту. Вираженість набряку залежить від віку. У тварин старечого віку контрольної серії відносна площа стромального набряку на 12,89% ($p=0.035$) перевищує показники молодих тварин та на 25,11% ($p=0.012$) – зрілого віку. У тварин молодого віку відбувається поступове зменшення площі набряку, який складає на 14-ту добу $8,65 \pm 0,26\%$ та відсутній на 21-й день після травми. У щурів зрілого та старечого віку на 3 добу відбувається збільшення відносної площі набряку з поступовим зменшенням. У тварин зрілого віку динаміка зменшення набряку є стрімкою, у той час як у щурів старечого віку він наявний навіть через 21 добу після нанесення хімічної травми.

Використання хітозанової мембрани для місцевого лікування хімічного опіку призводить до зменшення відносної площі стромального набряку в 1-шу добу спостереження лише у тварин молодого віку. У подальшому достовірна різниця з контролем спостерігається у тварин молодого та зрілого віку. У щурів старечого віку різниця з контролем спостерігається через 14 та 21 день після травми. Хоча, навіть в останній термін спостереження спостерігаються незначні залишки набряку. Аналізуючи можливі механізми зменшення набряку слід звернути увагу на високі сорбуючі властивості хітозанових матеріалів, що зменшує кількість ексудату на поверхні рани. З іншого боку, зменшення запалення та мікробного навантаження може призводити до активізації неоангіогенезу та до нормалізації кровопостачання в неущкоджених ділянках шкіри.

В експерименті відбувається зростання відносної площі судин дерми, що, можливо, є наслідком їх повнокров'я. Тим більше, що до кінця експерименту відбувається зменшення їх площі, що супроводжується зникненням стромального та периваскулярного набряків. При використанні хітозанової мембрани відбувається достовірне зменшення відносної площі судин дерми лише у тварин молодого віку, що добре корелює зі зменшенням стромального набряку в даній

віковій групі.

Середній діаметр судин дерми також зменшується з 1-ї до 21-ї доби спостереження у тварин контрольної та експериментальної серії. При цьому достовірна різниця з контролем спостерігається лише у тварин молодого віку.

У тварин усіх вікових груп відбувається зростання відносної площі судин грануляційної тканини, що відповідає строкам її визрівання. Площа судин є різною у всі вікові групи. Так, починаючи з 3 доби спостереження площа судин у тварин старечого віку майже удвічі менша за показники тварин інших вікових груп. Максимальна відносна площа судин відзначається через 14 днів спостереження та зменшується до 21 доби, що характеризує трансформацію грануляційної тканини в сполучнотканинну основу дерми. Максимальна площа судин у тварин старечого віку менше за показники молодих та зрілих тварин відповідно на 21,57% ($p=0.032$) та 24,22% ($p=0.047$). Через 21 добу після травми достовірна різниця спостерігається лише між тваринами старечого та зрілого віку і становить 13,97% ($p=0.019$).

При використанні хітозаної мембрани для лікування опіку спостерігається достовірне зростання відносної площі судин грануляцій у тварин молодого віку через 7 днів після травми та зменшення цього показника вже через 14 днів, що свідчить про прискорення визрівання грануляційної тканини. В інших вікових групах різниця є недостовірною в усі строки спостереження.

Зростання кількості мікроорганізмів на поверхні рани у тварин контрольної серії відбувається з 3-ї доби спостереження, що свідчить про колонізацію бактеріями з поверхні неушкоджених ділянок шкіри та зовнішнього середовища. В усіх вікових групах спостерігається зростання кількості мікроорганізмів на поверхні рани до 14-ї доби та зменшення їх виявлення до 21-ї доби після травми, що відповідає терміну загоєння рани та її епітелізації. У цей термін у щурів молодого та зрілого віку на поверхні шкіри ідентифікуються стафілококи, стрептококи, аспергили та *Vacillus cereus* у незначній кількості, що відповідає нормальній мікрофлорі поверхні шкіри щурів (Erol S., 2004). У тварин старечого віку, окрім зазначених мікроорганізмів, із 3-ї доби виявляється кишкова паличка, кількість якої залишається значною навіть через 21 добу спостереження. Можливим джерелом цього мікроорганізму є фекальні маси і його персистенція стає можливою завдяки зниженню механізмів місцевого імунного захисту. Крім того, на 21-шу добу спостереження у щурів старечого віку виявляються гриби роду *Candida*, що також є показником зниження імунітету (Heyer K., 2013; Weber J. M., 1997).

Використання хітозану для місцевого закриття кислотного опіку призводить до зменшення колонізації поверхні рани мікроорганізмами, що виявляється у зменшенні їх кількості на поверхні рани в усі терміни спостереження. Так, у тварин молодого та зрілого віку аспергіли не виявляються взагалі, а їх кількість у щурів старечого віку є мінімальною та клінічно не значимою. У тварин всіх вікових груп на 21-шу добу з поверхні рани виділяються стафілококи та стрептококи у незначній кількості. Також у тварин старечого віку не виділяється кишкова паличка, що свідчить про високі протекторні властивості хітозаної мембрани.

Механізм антибактеріальної дії хітозану полягає у взаємодії позитивно заряджених амідних груп хітозану з негативно зарядженими ділянками мембрани мікробної клітини з подальшою її деструкцією (Raafat D., 2008; Orig R., 2016).

Також хітозан виступає як хелатуючий агент, який селективно зв'язує метали клітинної стінки бактерій та пригнічує ріст мікроорганізмів (Manson W.L., 1998). Також існує докази пригнічення синтезу м-РНК мікроорганізмів при проникненні хітозану усередину клітини (Zheng L. Y., 2003).

Таким чином, співставляючи одержані результати та дані літератури, можна зробити припущення щодо механізмів впливу хітозаної мембрани на прискорення процесів регенерації шкіри тварин після хімічної травми. По-перше, більшість матеріалів на основі хітозану здатні впливати на вологість поверхні рани шляхом адсорбції надлишку ексудату на перших стадіях загоєння та через попередження її втрати в більш пізні терміни регенерації (Бузинова Д. А., 2008; Федосеева Е. Н., 2008). Згідно з концепцією вологого загоєння ран нормалізація вмісту рідини на поверхні призводить до оптимізації мікрооточення в рані, зменшення мікробної контамінації та попередження формування трофічних виразок [Santaniello J. M., 2004]. Крім того, мембрана на основі хітозану проникна для повітря та парів вологи, що попереджає формування «парникового ефекту», що є побічною дією багатьох сучасних перев'язувальних матеріалів [Lu G., 2010].

Окрім створення сприятливого оточення в рані, олігомери хітозану, що вивільняються при деградації мембрани, здатні безпосередньо впливати на процеси регенерації через стимуляцію клітин. Є докази регуляції активності фібробластів та макрофагів за наявності хітозану в культурі клітин (Chun-Mei Deng, 2007; Yang X., 2010). Зростання кількості макрофагів та підвищення їх активності повинне прискорити процеси очищення поверхні рани від некротично змінених тканин та зменшити мікробне навантаження на поверхню дефекту. Регуляція активності фібробластів може впливати на швидкість утворення грануляційної тканини та формування міжклітинного матриксу дерми (Raffetto J.D., 2001). Є докази стимуляції ангиогенезу у присутності олігомерів хітозану, що також виявляє на формування грануляційної тканини. Деякі автори свідчать про більш впорядковану орієнтацію колагенових волокон в присутності хітозану, що, в свою чергу, може попереджувати формування післяопераційного рубця (Gauglitz G.G., 2011; Kohsari I., 2016). Саме клітинні механізми впливу можуть пояснити меншу ефективність мембрани у тварин старечого віку.

Крім того, зменшення мікробного навантаження на поверхню рани призводить до прискорення процесів регенерації. Як відомо, бактеріальне запалення призводить до уповільнення формування грануляційної тканини та епітелізації поверхні рани (Erol S., 2004). Хронізація запалення може також призвести до утворення ран, що довго не загоюються. (Kaiser M.L., 2011). Як видно з експерименту, хітозан виявляє майже однакову антибактеріальну активність у тварин всіх вікових груп. Зменшення ефективності матеріалу у щурів старечого віку можна пояснити зменшенням активності макрофагальної ланки імунного захисту з віком.

Загалом використання хітозаної мембрани для лікування кислотного опіку шкіри призводить до прискорення очищення поверхні рани від загиблих тканин, більш швидкої появи грануляцій та епітелізації поверхні рани. Більш виражена дія спостерігається у тварин молодого та зрілого віку, проте навіть у щурів старечого віку використання матеріалу є ефективним.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене вирішення актуальної медико-біологічної задачі – визначення морфофункціональних особливостей регенерації ділянки шкіри після нанесення кислотної травми та застосування матеріалу на основі низькомолекулярного хітозану для прискорення процесів регенерації у тварин молодого, зрілого та старечого віку.

1. Після моделювання кислотної травми відбувається формування некрозу та струпу на поверхні рани з наступним утворенням на їх місці грануляцій та епітелізації рани. Площа некрозу у тварин старечого віку перевищує показник щурів молодого та зрілого віку на 10,5% ($p=0.027$) та 6,91% ($p=0.041$). Формування грануляційної тканини розпочинається з 3-ї доби після травми та відбувається більш повільно у тварин старечого віку. Епітелізація поверхні рани розпочинається з периферійних ділянок та не завершується до 21 доби спостереження. Найбільший відсоток епітелізованих ділянок спостерігається у тварин молодого та зрілого віку. Характерною відмінністю будови ділянки шкіри у тварин старечого віку після нанесення кислотної травми є формування виражених рубцевих зміни.

2. Після травми у контрольних тварин відбувається очищення рани від некрозу, відносна площа якого відповідно віку становить через 14 днів $6,11\pm 0,15\%$, $8,23\pm 0,89\%$ та $13,09\pm 0,65\%$. Ці процеси відбуваються за участі макрофагів та лейкоцитів, кількість яких вища у тварин молодого та зрілого віку. У щурів цих вікових груп відбувається інтенсивне утворення грануляційної тканини, багатої на судини та фібробласти з подальшою її епітелізацією до 21-ї доби. Відносна площа епітелізованих ділянок на 21 добу становить від $68,44\pm 2,48\%$ у тварин старечого віку до $89,86\pm 0,36\%$ - у молодих щурів.

3. Застосування хітозанової мембрани призводить до зменшення площі дефекту у порівнянні з контролем на 21-шу добу від $28,00\%$ ($p=0.01$) у тварин старечого віку до $40,75\%$ ($p=0.001$) – у молодих щурів. Прискорення загоєння кислотного опіку відбувається за рахунок очищення рани від некротичних мас та оптимізації формування грануляційної тканини і процесів епітелізації, особливо у тварин молодого та зрілого віку. Відносна площа епітелізованих ділянок у експериментальних тварин становить відповідно віку $92,45\pm 2,52\%$ ($p=0.29$), $89,44\pm 4,41\%$ ($p=0.021$) та $75,12\pm 1,47\%$ ($p=0.043$).

4. Використання матеріалу на основі хітозану при кислотному опіку призводить до зменшення лейкоцитарної інфільтрації тканин рани, відсоток нейтрофілів при цьому становить у тварин експериментальної серії молодого та зрілого віку на 21-шу добу спостереження $8,2\pm 0,37\%$ ($p=0.013$) та $10,8\pm 0,49\%$ ($p=0.0048$) відповідно. У тварин усіх вікових груп відбувається зростання кількості макрофагів на ранніх етапах загоєння дефекту та фібробластів і епітеліоцитів, починаючи з 7-ї доби спостереження, що є передумовою прискорення регенераторних процесів.

5. Процеси регенерації шкіри при використанні хітозанового покриття характеризуються зменшенням відносної площі периваскулярного та стромального набряків шкіри на $48,21\%$ ($p=0.0019$) на 14 добу спостереження у тварин молодого віку та прискоренням формування сполучної тканини. У тварин молодого та старечого віку відбувається стимуляція процесів ангиогенезу, що призводить до

покращення кровопостачання новоутворених тканин. На 21-й день спостереження в усіх вікових групах спостерігається значне зменшення формування грубоволокнистої тканини, особливо у тварин старечого віку.

6. Процеси регенерації шкіри супроводжуються колонізацією поверхні рани мікроорганізмами, кількісний та якісний склад яких значно більший у тварин старечого віку, що може призводити до пригнічення процесів епітелізації травмованої ділянки. Використання хітозану для лікування кислотного опіку призводить до уповільнення процесів контамінації шкіри мікроорганізмами та значно зменшує їх кількість, особливо у тварин старечого віку, що свідчить про виражені антибактеріальні властивості матеріалу та виявляє стимулювальний вплив на процеси регенерації.

7. Вікові особливості процесів регенерації шкіри при застосуванні хітозанової мембрани полягають у пролонгації фази запалення та більш пізньому початку процесів епітелізації поверхні дефекту, в уповільненні очищення рани, утворення грануляційної тканини та судин. Проте в усіх вікових групах відзначається позитивний ефект, що характеризується зменшенням термінів епітелізації рани.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ СТАТЕЙ

1. Экспериментальное применение хитозанового покрытия для лечения химических ожогов кожи / Погорелов М. В., Калинин О. В., Гортинская Е. Н., Москаленко Р. А., Ткаченко Ю. А. // Georgian Medical News. – 2014. - №1 (226). – С. 65-69. *(Автором спланований та проведений експеримент, проведений аналіз результатів дослідження та підготовлена стаття до друку).*
2. 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. *(Дисертантом розроблена модель нанесення хімічного опіку шкіри, підготовлений розділ статті).*
3. 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).*
4. 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 проаналізовані літературні джерела та підготовлений відповідний розділ статті, проведена експериментальна частина роботи та сформульовані висновки).*
5. Ткаченко Ю.А Изменение цитологических показателей поверхности кислотного ожога при применении хитозановых мембран. / Ю.А Ткаченко // Современный научный вестник. – 2013. - № 30 (169). – С. 64-71.

ПАТЕНТИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

1. Пат. № 91169 Україна, МПК G09В 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 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. 24-25. *(Дисертантом проведені цитологічні дослідження та підготовлений текст до друку)*
2. Ткаченко Ю.А. Особливості гістологічної будови та рН шкіри щурів молодого віку з різними видами опіку /Ю.А. Ткаченко, С.Д. Бончев // Збірник тез доповідей Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених: “Актуальні питання теоретичної та практичної медицини” (Суми, 16-18 квітня 2014 року). – С. 63-64. *(Дисертант провів гістологічні дослідження та підготував текст до друку).*
3. Ткаченко Ю.А. Використання хітозану для лікування кислотних опіків / Ю.А. Ткаченко // Збірник тез доповідей науково-практичної конференції : “Морфологічні дослідження – виклики сучасності” (Суми, 23–24 квітня 2015 року). – С. 110–112.

АНОТАЦІЯ

Ткаченко Ю.А. Особливості будови шкіри тварин різного віку при лікуванні хімічного опіку із застосуванням хітозанових мембран. – 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 морфофункціональних особливостей процесів регенерації ділянки шкіри у віковому аспекті при моделюванні опікової рани хімічної етіології та використанні хітозанових мембран.

Уперше встановлені особливості морфофункціонального стану шкіри після нанесення кислотного опіку у різні вікові періоди. Визначені особливості планіметрії рани, клітинного складу регенерату шкіри та гістоморфометричні особливості процесів загоєння опіку, спричиненого дією кислоти. З'ясовані особливості мікробної контамінації рани в різні вікові періоди та виявлена залежність мікробного складу рани залежно від віку.

Доведена можливість застосування мембран на основі хітозану для лікування ран шкіри, викликаних дією кислоти. Встановлені

морфофункціональні особливості регенерації шкіри, що полягають у скороченні термінів загоєння рани, зростанні кількості макрофагів та фібробластів, зменшенні судинної реакції, а також прискоренні утворення грануляційної тканини та епітелізації поверхні рани при використанні хітозанових мембран.

Вікові особливості процесів регенерації шкіри при застосуванні хітозанової мембрани полягають у меншій чутливості клітин регенерату тварин старечого віку до дії активного агента, що проявляється в уповільненні очищення рани, утворення грануляційної тканини та судин. Проте в усіх вікових групах відзначається позитивний ефект, що характеризується зменшенням термінів епітелізації рани та профілактикою утворення рубцевої тканини.

Ключові слова: шкіра, хімічні опіки, регенерація, хітозан.

АННОТАЦІЯ

Ткаченко Ю.А. Особенности строения кожи животных разного возраста при лечении химического ожога с применением хитозановых мембран. – 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 морфофункциональных особенностей процессов регенерации участков кожи в возрастном аспекте при моделировании ожоговой раны химической этиологии и использовании хитозановой мембран.

Впервые установлены особенности морфофункционального состояния кожи после нанесения кислотного ожога в различные возрастные периоды. Определены особенности планиметрии раны, клеточного состава регенерата кожи и гистоморфометрические особенности процессов заживления ожога, вызванного действием кислоты. Выявлены особенности микробной контаминации раны в разные возрастные периоды и выявлена зависимость микробного состава раны в зависимости от возраста.

Доказана возможность применения мембран на основе хитозана для лечения ран кожи, вызванных действием кислоты. Установлены морфофункциональные особенности регенерации кожи, состоящие в сокращении сроков заживления раны, росте количества макрофагов и фибробластов, уменьшении сосудистой реакции, а также ускорении образования грануляционной ткани и эпителизации раневой поверхности при использовании хитозановой мембран.

Возрастные особенности процессов регенерации кожи при применении хитозановой мембраны состоят в меньшей чувствительности клеток регенерата животных старческого возраста к действию активного агента, что проявляется в замедленные очищения раны, образования грануляционной ткани и сосудов. Однако во всех возрастных группах отмечается положительный эффект, характеризующийся уменьшением сроков эпителизации раны и профилактикой образования рубцовой ткани.

Ключевые слова: кожа, химические ожоги, регенерація, хітозан.

SUMMARY

Tkachenko Yu. A. The features of skin regeneration in rats with different ages in case of chitosan membranes application. – 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 morphological and functional features of skin regeneration in the age aspect after modeling of chemical burn wound and chitosan membranes application.

The study of morphological features of skin regenerate after chemical burns and application of chitosan film was conducted on 180 white laboratory male rats of three age groups: young (3 months), mature (9 months) and old (22 months).

In experimental group of animals for the treatment of skin damage we applied chitosan hydrogel 1 time per day.

The application of chitosan membrane leads to a decrease of defect area compared with control at the 21st day from 28.00% ($p = 0.01$) in elderly animals to 40.75% ($p = 0.001$) - in young rats. Accelerating of acid burns healing observed due to cleaning of wound from necrotic masses and optimization of granular tissue formation and epithelialization process, especially in animals and young age. The relative area of epithelial sites in experimental animals are $92.45 \pm 2,52\%$ ($p = 0.29$), $89.44 \pm 4,41\%$ ($p = 0.021$) and $75.12 \pm 1,47\%$ ($p = 0.043$) corresponding the age.

We established the features of morphological and functional states of the skin regeneration in different ages after acid burn. The features of the planimetry, cell compound of the skin regenerate and histomorphometric features of burn healing process caused by the action of acid was defined in this study. We clarify the features of wound's microbial contamination in different age periods.

We proved the possibility of membranes based on chitosan application for the treatment of skin injuries caused by the action of acid. Morphological and functional features of skin regeneration - reduction of wound healing terms, the number of macrophages and fibroblasts increasing, vascular reaction reducing, as well as the formation of granulation tissue and epithelialization of the wound surface accelerating using chitosan membranes was established.

In animals of young and old ages observed the stimulation of angiogenesis, leading to improved blood supply of the newly formed tissues in wound. After 21 days of observation in all age groups there is a significant reduction of scar tissue formation.

Application of chitosan for the treatment of acid burns leads to the slow microorganisms contamination and reduces their number, especially in elderly animals, indicating a pronounced antibacterial properties of the material and finds stimulating effect on regeneration.

Age characteristics of the skin regeneration process after the application of chitosan membranes includes the less sensitivity of cell in regenerate in animals of senile age to the active agent, which is manifested in delayed wound cleansing, retard in formation of granulation tissue and blood vessels. However, in all age groups was noted a positive effect, that characterized in decreasing of wound epithelialization terms and prevention of scar tissue formation.

Key words: skin, chemical wound, regeneration, chitosan.