М.В.Погорєлов
В.В.Корнієнко

Сумський державний університет

УДК 616-001.17-089.26: 547.995

ПЛАНІМЕТРИЧНІ ТА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ДИНАМІКИ ПРОЦЕСУ ЗАГОЄННЯ МОДЕЛЬОВАНОГО ОПІКУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ХІТОЗАНОВИХ МЕМБРАН У ТВАРИН РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП

Ключові слова: опіки, засоби медичного призначення, хітозан, морфометрія, планіметрія.

Надійшла: 24.05.2015
Прийнята:13.06.2015

Реферат. Метою дослідження було вивчення планіметричних та морфо- метричних показників в динаміці процесу загоєння опікової рани IIIб ступеню у щурів різних вікових груп при застосуванні інноваційних хітозанових мембран. Стимуляція хітозаном клітинної міграції та проліферації сприяла активізації ранового очищення, зменшенню судинних розладів, оптимізуючи розвиток грануляційної тканини та епітелізацію ранового дефекту, зменшуючи терміни ранового загоєння в цілому.
Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 58-61.
© М.В.Погорєлов, В.В.Корнієнко, 2015
✉ m.pogorielov@gmail.com

Pogorelov M.V., Kornienko V.V. Planimetric and morphometric parameters of the burns healing process using chitosan membranes in animals of different age groups.

ABSTRACT. Background. The primary purpose of burn wound treatment is to promote healing. In the last decade the number of studies devoted to chitosan application has incredibly increased. Chitosan is a derivative of chitin, a natural polymer, used to create medical dressings to treat skin defects. However, the age-related features of skin regeneration with chitosan application are still uninvestigated. **Objective.** The purpose of the research was to investigate the influence of chitosan coating on the optimization of regenerative processes after its application to treat thermal damage of the skin in animals of different age. **Methods.** We modeled IIIb burns on the rats of different age from both experimental and control groups and applied innovative chitosan membranes on the burns. Planimetric analyses of the affected areas and morphometry of histological specimens were performed by the "SEO Image lab 2.0" program (Sumy, Ukraine)**. Results.** On day 3rd after chitosan application the relative area of stromal edema was significantly lower than in controls. On day 7th the growth of granulation tissue was more active. The relative area of vascular granulation tissue was significantly greater and the average diameter of vessels was significantly increased compared with the controls. On the day 14th granulation and connective tissue were more common regarding the corresponding periods. The area of vessels of the dermis and their average diameter was significantly decreased, respectively. **Conclusion.** Application of chitosan membranes to treat thermal burns enhanced wound cleaning from the dead tissue, decreased the intensity of inflammatory reactions and disorders of blood circulation, improved epithelization of the wound and regulated formation of the scar tissue.
Key words: burn, medical supplies, chitosan, morphometry, planimetria.

Citation:
Pogorelov MV, Kornienko VV. [Planimetric and morphometric parameters of the burns healing process using chitosan membranes in animals of different age groups]. Morphologia. 2015;9(2):58-61. Ukrainian.

Вступ

Висока частота термічних уражень як у побуті, так і на виробництві, поширеність серед дитячого населення, тяжкий та тривалий перебіг опікової травми, недостатня ефективність існуючих методів терапії, великий відсоток ускладнень та інвалідізації постраждалих [1] обумовлюють актуальність проблеми термічних уражень, що визначає необхідність подальшого пошуку нових і вдосконалення відомих засобів і методів лікування, які б стимулювали репаративні процеси в ранах. Поглиблене вивчення механізмів дії цих засобів, в тому числі із застосуванням морфологічних методів дослідження, дозволить розширити уявлення про можливі шляхи оптимізації ведення ранового процесу [2, 3].

Мета

Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених дослідженню механізмів загоєння опікових ушкоджень, а також вивченню ефективності засобів для місцевого лікування опіків [4], в тому числі й препаратів на основі природного походження, на сьогодні залишаються недостатньо вивченими морфо-функціональні особливості регенерації термічних пошкоджень при застосуванні хітозанових матеріалів у віковому аспекті, що визначає актуальність проведених експериментальних досліджень з метою встановлення

нових способів корекції, викликаних опіками патологічних змін.

Матеріали та методи

Вивчення особливостей регенераційних процесів шкіри при опіковій травмі та застосуванні хітозанових плівок проводилося на 180 білих лабораторних щурах-самцях 3 вікових груп: молодого (3 місяці), зрілого (9 місяців) та старечого (22 місяці) віку, які були поділені на контрольну та експериментальну серії, в кожній з яких виділили по 3 групи з 30 тварин відповідного віку. Утримання тварин та експерименти відбувалося згідно з «Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986) [5], Директивою Європейського парламенту та Ради ЄС від 22.09.2010 року та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Проведення моделювання дозованого термічного опіку шкіри IIIб ступеню лабораторним щурам з урахуванням вимог стандартизації й дотриманням заданих критеріїв площі та глибини ранових дефектів здійснювалося згідно методики експериментальної моделі опікової травми [6].

Тваринам експериментальної серії для місцевого лікування ран використовували інноваційні хітозанові покриття, в контрольній серії заживлення рани відбувалося з використанням стерильних марлевих пов'язок. Заміна хітозанових плівок та марлевих пов'язок проводилася щоденно після стандартної обробки рани, починаючи з 1 доби після моделювання опіку.

Матеріал для покриття дефекту отримували в Інституті прикладної фізики НАН України. Для одержання гелю хітозану використовували хітозан з молекулярною масою 700 кДа та ступенем деацетилювання 87%.

Для вивчення морфофункціональних особливостей регенерації шкіри при опіковій травмі використовувалися морфометричні та планіметричні методи дослідження Для проведення планіметрії проводилось фотографування поверхні дефекту фотоапаратом Cannon 550 D EOS кожної доби. Для оцінки стану раневої поверхні вивчалися терміни очищення рани від гнійно-некротичних мас, час появи грануляцій та початку крайової епітелізації, а також терміни повної епітелізації поверхні рани. Вираховувлись загальна площа дефекту в см², відносна площа некрозу, грануляцій та епітелізації у відсотках. Оцінка швидкості загоєння раневого дефекту проводилася з використанням наступних показників: середня швидкість зменшення раневої поверхні в см² за добу (СерШЗР) та зменшення площі рани у відсотках за добу (ЗПР) за формулою:

$$ЗПР = (S-Sn) \times 100/S \times t,$$

де S-площа рани попереднього вимірювання, Sn-площа рани в даний час, t-кількість діб між першим та наступним вимірюваннями [7]. Для приготування гістологічних препаратів відбувався забір ділянки раневого дефекту з прилеглою шкірою та підлеглими тканинами розміром 1 см² та товщиною до 5 мм на 1, 3, 7, 14 та 21 добу після нанесення травми. Отримані зразки фіксувалися в 10% розчині нейтрального формаліну (pH 7,2). Після 24-годинної експозиції у розчині формаліну та наступного проведення шматочків шкіри в етиловому спирті висхідної концентрації, біоптат заливався в парафінові блоки. В подальшому виготовлялися серійні зрізи товщиною 5-7 мкм та після депарафінізації проводилося забарвлення препаратів гематоксилін-еозином [8]. Гістологічні препарати досліджувались з використанням світлового мікроскопу «Olympus BH 2» з цифровою відеокамерою DCM 510 5,0 pixels. Морфометрію гістологічних препаратів проводили з урахуванням наступних показників: відносна площа стромального набряку, відносна площа судин дерми, середній діаметр судин дерми, відносна площа судин грануляційної тканини та середній діаметр судин грануляційної тканини [9]. Отримані дані оброблялися методом варіаційної статистики за допомогою програми для обробки статистичної інформації IBM SPSS Statistics 21. Використовувались як параметричні (порівняння середніх за допомогою t-теста) так і непараметричні (критерій Пірсона). Відмінності вважали значущими з рівнем ймовірності не менше 95% ($p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення

Морфометричні дослідження гістологічних препаратів на 1 добу спостереження не виявили достовірних відмінностей між показниками відносної площі стромального набряку тварин контрольної та експериментальної серій всіх вікових груп. Також виявлено не було і достовірних змін показників стану судин дерми при застосуванні хітозану.

Дослідження гістологічних препаратів на 3 добу експерименту виявило позитивну динаміку всіх показників морфометрії у тварин всіх вікових груп. Проте, якщо у тварин молодого та зрілого віку достовірні відмінності між контрольною та експериментальною серіями спостерігались для всіх показників, крім відносної площі судин дерми, то у тварин старечого віку достовірних відмінностей виявлено не було. Необхідно зауважити, що найбільша різниця була встановлена для відносної площі судин дерми – 22,89% ($p \leq 0,05$) у тварин молодого та 25,92% ($p \leq 0,05$) у тварин зрілого віку на тлі суттєвої різниці у динаміці відносної площі стромального набряку – 18,63% ($p \leq 0,05$) та 16,14% ($p \leq 0,05$) у тварин відповідних вікових груп. Створення оптимального ранового середовища та стимуляція хітозаном міграції нейтрофільних гранулоцитів та активі-

зації їх діяльності обумовлює активізацію процесів очищення та зменшення застійних проявів запальної реакції у вигляді стромального набряку [10].

На 1 та 3 добу спостереження кореляційний аналіз виявив зворотній зв'язок між площею судин дерми та терміном появи грануляцій - (r=-0,822; p<0,05) та (r=-0,857; p<0,05) відповідно, а також між площею судин дерми та відсотком ЗПР з 3 по 7 добу (r=-0,860; p<0,05) та (r=-0,851; p<0,05) у тварин молодого віку. У тварин зрілого віку на 3 добу площа судин дерми корелювала з відсотком ЗПР 1-3-ї діб (r=-0,857; p<0,05).

Дослідження гістологічних препаратів на 7 добу спостереження виявило також позитивну динаміку порівняно з 3 добою спостереження. Так, відносна площа стромального набряку зазнала зменшення, відносна площа судин дерми та їх середній діаметр також зменшились, відносна площа судин грануляційної тканини та їх середній діаметр збільшились порівняно з попереднім терміном дослідження у тварин всіх вікових груп. Позитивний вплив хітозану на процес регенерації через стимулюючий вплив на грануляційну тканину співвідноситься з даними попередніх досліджень [11]. При цьому достовірна різниця між відповідними морфометричними показниками також була визначена у тварин всіх вікових груп. Необхідно зазначити, що найбільш вираженою ця різниця такого показника, як відносна площа стромального набряку була у тварин молодого та у тварин старечого віку – складала відповідно 29,86% (p≤0,05) та 27,36% (p≤0,05), в той час як різниця між показниками середнього діаметру судин грануляційної тканини мала найбільше значення у тварин старечого віку – 15,72% (p≤0,05).

При проведенні кореляційного аналізу був встановлений прямий зв'язок між площею стромального набряку на 1 добу та терміном появи грануляцій у тварин зрілого віку (r=0,952; p<0,01), а у тварин старечого віку – на 7 добу експеримента (r=0,832; p<0,05). Крім того, у тварин зрілого віку площа стромального набряку на 3 добу мала також позитивний зв'язок з терміном очищення (r=0,837; p<0,05) та негативний - з терміном повної епітелізації рани (r=0,963; p<0,01), а на 7 добу – з відсотком ЗПР в період з 7 по 14 добу (r=-0,841; p<0,05). Таким чином, можна стверджувати, що стромальний набряк уповільнював динаміку загоєння опіку, збільшуючи терміни очищення рани, появи грануляційної тканини та епітелізації рани.

Також відносна площа судин дерми на 7 добу мала негативні кореляційні зв'язки з терміном очищення та позитивні – з терміном повної епітелізації рани у тварин зрілого віку - (r=-0,926; p<0,01) та (r=0,919; p<0,01), а у тварин старечого віку – на 3 добу експеримента - (r=-0,858; p<0,05) та (r=0,833; p<0,05) відповідно. Діаметр судин грануляційної тканини тварин старечого віку на 3 та 7 добу мав зворотні зв'язки з відсотком ЗПР 8-14-ї доби - (r=-0,840; p<0,05) та (r=-0,820; p<0,05).

На 14 добу дослідження, незважаючи на позитивну динаміку всіх показників у тварин всіх вікових груп як контрольної, так і експериментальної серій, у тварин молодого та зрілого віку достовірна різниця була зафіксована лише при визначенні відносної площі стромального набряку та складала відповідно 20,00% (p≤0,05) і 20,04% (p≤0,05), а також середнього діаметру судин грануляційної тканини, який був більшим на 11,37% (p≤0,05) та 10,59% (p≤0,05) у щурів відповідних вікових періодів. В той час як у тварин старечого віку достовірну різницю мали всі показники морфометрії гістологічних препаратів. Так, відносна площа стромального набряку при застосуванні хітозану виявилась меншою на 13,76% (p≤0,05), відносна площа судин дерми – на 9,76% (p≤0,05), а середній діаметр її судин – на 9,76% (p≤0,05). Стан грануляційної тканини характеризувався у тварин старечого віку експериментальної серії достовірною різницею з контролем у відносній площі її на 10,17% (p≤0,05), а в середньому діаметрі її судин – на 8,59% (p≤0,05). Позитивна динаміка як площі, так і діаметра судин дерми та грануляційної тканини обумовлювалось оптимізуючим впливом хітозану як на клітинну проліферацію [11], так і на формування грануляційної тканини та волокнистого компоненту сполучної тканини, що обумовлювало оптимальний перебіг регенерації та відновлення структури шкіри [12].

На 21 добу морфометрія гістологічних препаратів виявила збереження динаміки змін площі судин дерми та грануляційної тканини, а також змін середнього діаметру їх судин. Однак, достовірні відмінності при застосуванні хітозану виявились лише у тварин старечого віку - середній діаметр судин дерми був меншим на 13,46% (p≤0,05) та середній діаметр судин грануляційної тканини – більшим на 8,35% (p≤0,05) [11].

Висновки

1. Створюючи оптимальне ранове середовище, а також стимулюючи міграцію та клітинну проліферацію, хітозанові мембрани сприяли процесу ранового очищення та зменшували прояви судинних розладів, зменшуючи як терміни очищення ран та терміни появи грануляційної тканини, так і ранового загоєння вцілому.

2. Стимулюючий вплив хітозану на формування грануляцій та волокнистого компоненту сполучної тканини проявлявся позитивною динамікою показників стану судин дерми та грануляційної тканини, що особливо вирізнялось у тварин старечого віку.

3. Сприяння хітозану процесу регенерації та повноцінному відновленню ділянки ушкодження проявлялося прискоренням зменшення ранового

дефекту у відсотках та в см² за добу.

Перспективи подальших досліджень

Планується дослідження антибактеріальних властивостей хітозанових мембран in vitro та in vivo для вивчення антибактеріального ефекту хітозанових плівкових зразків щодо виділеної мікробіоти з поверхні рани лабораторних тварин.

Літературні джерела
References

1. Fistal EYa. [Complications of burns: classification, clinic, prevention, treatment]. Kombustiologiia. 2003;14:55-7. Russian.
2. Singer AJ, Dagum AB. Current management of acute cutaneous wounds. N Engl J Med. 2008 Sep 4; 359 (10): 1037-46. doi: 10.1056/NEJMra0707253. PMID: 18768947.
3. Fistal NN [Treatment of combustion convalescents: the present state of the problem (bibliographical review]. Bukovinian Medical Herald. 2009;13(2):94-9. Ukrainian.
4. Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative medicine. Annu Rev. Med. 2007;58:299-312. PMID: 17076602.
5. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose. [Council of Europe; 1986 Mar 18; Strasbourg]; 1986. 52 p.
6. Oleshko OM Kornienko VV, Tkachenko YuO, Pogorelov MV, Bonchev SD, Deineka VM, inventirs; Sumy State University, assignee. [Method for simulation of dosed skin heat burn in laboratory rats]. Ukrainian patent UA 89985. 2014 May 12. Int. Cl. G09B 23/28. Ukrainian.
7. Savchenko IuP, Fedosov SR. [Methods of determination of sizes of the wound surface]. Vestn. Khir. im. I. I. Grek. 2007;166(1):102-5. Russian. PMID: 17672120.
8. Korzhevsky DE, Gilyarov AV. [Basics of histological techniques]. St Petersburg: SpetsLit; 2010. 95 p. Russian.
9. Avtandilov GG. [Fundamentals of quantitative pathological anatomy]. Moscow: Meditsina; 2002. 239 p. Russian.
10. Hong HJ, Jin SE, Park JS, Ahn WS, Kim CK. Accelerated wound healing by smad3 antisense oligonucleotides-impregnated chitosan/alginate polyelectrolyte complex. Biomaterials. 2008;29(36):4831-7. doi: 10.1016/j.biomaterials. 2008.08.023. PMID: 18829100.
11. Boucard N, Viton C, Agay D, Mari E, Roger T, Chancerelle Y, Domard A. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. Biomaterials. 2007;28(24):3478-88. PMID: 17482258.
12. Depan D, Kumar AP, Singh RP. Cell proliferation and controlled drug release studies of nanohybrids based on chitosan-g-lactic acid and montmorillonite. Acta Biomater. 2009;5(1):93-100. doi: 10.1016/j.actbio.2008.08.007. PMID: 18796355.
13. Kirichenko AK, Bolshakov IN, Ali-Riza AE, Vlasov AA. Morphological study of burn wound healing with the use of collagen-chitosan wound dressing. Bull. Exp. Biol. Med. 2013;154(5):692-6. PMID: 23658900.
14. Ma L, Shi Y, Chen Y, Zhao H, Gao C, Han C. In vitro and in vivo biological performance of collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal equivalent. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2007;18(11):2185-91. PMID: 17665115.
15. Chao Yang, Ling Xu, Ying Zhou, Xiangmei Zhang, Xin Huang, Min Wang, Ye Han, Maolin Zhai, Shicheng Wei, Jiuqiang Li. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. Carbohydrate Polymers. 2010;82(4):1297-305.

Погорелов М.В., Корниенко В.В. Планиметрические и морфометрические показатели динамики процесса заживления моделированного ожога при применении хитозановых мембран у животных разных возрастных групп.

Резюме. Целью исследования было изучение планиметрических и морфометрических показателей в динамике процесса заживления ожоговой раны III б степени у крыс разных возрастных групп при применении инновационных хитозановых мембран. Стимуляция хитозаном клеточной миграции и пролиферации обеспечивала активизацию раневого очищения, уменьшение сосудистых расстройств, оптимизируя развитие грануляционной ткани и эпителизацию раневого дефекта, уменьшая сроки раневого заживления в целом.

Ключевые слова: ожоги, средства медицинского назначения, хитозан, морфометрия, планиметрия.