

## Влияние озонированных растворов на динамику раневого процесса при холодových повреждениях кожи крыс

UDC 615.835.3:616.5-001.19

E.V. SOMOVA, N.G. KADNIKOVA, L.N. TYNYNYKA, V.D. ZINCHENKO\*

## Effect of Ozonized Solutions on Dynamics of Wound Process During Cold Damages of Rat's Skin

На модели холодových ран кожи крыс исследовали микробную обсемененность, измеряли тепловое излучение поверхности раны в инфракрасном диапазоне и наблюдали за процессом заживления при ежедневном подкожном введении озонированного физиологического раствора (концентрация озона 1,1 мг/л) в область холодовой травмы. Показано, что обработка раны озонированным физиологическим раствором способствует более интенсивному процессу заживления холодových травм, что проявляется в уменьшении общей микробной обсемененности кожи животных и снижении показателей излучения, регистрируемого в инфракрасном диапазоне.

**Ключевые слова:** озонированный физиологический раствор, холодových повреждения, инфракрасное излучение.

На моделі холодových ран шкіри щурів досліджували мікробне обсіменіння, вимірювали теплове випромінювання поверхні рани в інфрачервоному діапазоні та спостерігали за процесом загоєння при щоденному підшкірному введенні озонованого фізіологічного розчину (концентрація озону 1,1 мг/л) у зону холодовой травми. Показано, що обробка рани озонованим фізіологічним розчином сприяє більш інтенсивному процесу загоєння холодových травм, яке виявляється у зменшенні загального мікробного обсіменіння шкіри тварин і зниженні показників випромінювання, яке реєструється у інфрачервоному діапазоні.

**Ключові слова:** озонований фізіологічний розчин, холодове ушкодження, інфрачервоне випромінювання.

In the model of rat's skin cold wounds microbe seeding has been studied, heat radiation on wound surface within infrared range has been measured and healing process at daily subcutaneous introduction of ozonized physiological solution (ozone concentration made 1.1 ml/l) into cold trauma site has been observed. It has been shown that wound treatment with ozonized physiological solution contributes to more intensive healing process of cold traumas, that manifests in reduction of total microbe seeding of animals skin and decrease in radiation values recorded within infrared range.

**Key-words:** ozonized physiological solution, cold damages, infrared radiation.

В настоящее время операции с низкотемпературным воздействием широко применяются в хирургии. Известно, что при повреждающем действии низких температур поражаются периферические сосуды и, как следствие, возникают нервно-трофические нарушения в тканях, приводящие к развитию некротических изменений. Ишемия кожных покровов – благоприятное условие развития инфекции. Для коррекции указанных нарушений многие исследователи в последнее время используют озонированные растворы. Имеются сведения об успешном их применении в лечении трофических язв, термических ожогов, ран с вялотекущим процессом заживления, а также в гнойной хирургии и стоматологии [1, 9, 10]. Представляет интерес исследовать возможность применения озонированных растворов для лечения холодových повреждений.

Цель работы – изучить динамику раневого процесса при холодových повреждениях кожи на фоне использования в качестве лечебного средства озонированного физиологического раствора.

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Nowadays, operations with low temperature influence are widely applied in surgery. It is known that under damaging effect of low temperatures peripheral vessels are impaired and as a consequence nerve and trophic disorders in tissues, leading to the development of necrotic changes, appear. Skin surface ischemia is favorable condition of infection development. To correct the mentioned disorders ozonized solutions have been used by many researches recently. There are data on their successful use in treatment of trophic ulcers, thermal burns, wounds with poor healing process, as well as in purulent surgery and dentistry [1, 9, 10]. It is of interest to investigate the possibility to use ozonized solution of cold damage treatment.

Research aim is to study the dynamics of wound process at cold damages of skin on the background of use as therapeutic means of ozonised physiological solution.

### Materials and methods

The research was performed in 60 Wistar male rats of 250-300g. For cold wounds modeling 10 mm

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

## Материалы и методы

Исследования были проведены на 60 крысах-самцах массой 250-300 г линии Вистар. Для моделирования холодовых ран использовали медный аппликатор диаметром 10 мм, охлажденный с помощью жидкого азота до температуры  $-196^{\circ}\text{C}$  (время аппликации 60 с). Озонированный физиологический раствор (ОФР) получали на сконструированной в ИПКиК НАНУ установке с генератором озона безбарьерного типа [4]. Физиологический раствор (0,89 % NaCl; pH 7,2) во флаконе объемом 200 мл барботировали озон-кислородной смесью. Для замедления распада озона процесс насыщения физиологического раствора озоном и дальнейшего хранения использовали термостат со льдом. Концентрацию озона оценивали спектрофотометическим методом на приборе Specord UV VIS (Германия) по поглощению света на полосе Хартли [6].

Регистрацию излучения кожи в инфракрасном диапазоне ( $\lambda = 8-14$  мкм) осуществляли портативным тепловизором, разработанным нами на основе принципов, описанных в работе [8].

Степень обсемененности кожи и видовую принадлежность микроорганизмов определяли стандартными методами: микроскопирование окрашенных по Граму мазков; посев и культивирование на питательных средах (культуральные и фенотипические признаки) с последующим использованием биохимических тестов для идентификации микроорганизмов [2, 5]. Количество анаэробных бактерий в 1 мл отделяемого раневой поверхности крыс определяли суммарно без идентификации (кровяной агар + 10%  $\text{CO}_2$ ). Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл отделяемого ран устанавливали подсчетом макроколоний, выросших на агаризованных и полуагаризованных питательных средах [5, 7].

Исследовали три группы животных по 20 в каждой. В первой группе (контрольной) изучали динамику заживления раневого процесса кожи при холодовом повреждении на 1, 3, 7 и 14-е сутки; во второй – динамику процессов некроза и демаркации при ежедневном подкожном введении ОФР (концентрация озона 1,1 мг/л) в зону холодовой травмы; в третьей – динамику процессов некроза и демаркации в условиях ежедневного подкожного введения физиологического раствора без озона в указанную зону холодовой травмы. Сроки исследования второй и третьей групп животных аналогичны первой.

## Результаты и обсуждение

Известно, что наиболее распространенными микроорганизмами, вызывающими инфицирование раневой поверхности, являются *Pseudomonas*,

copper applicator, cooled with liquid nitrogen up to  $-196^{\circ}\text{C}$  (application time was 60 sec) was used.

Ozonized physiological solution (OPS) was obtained with ozone generator of barrier-free type, designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [4]. Physiological solution (0.89% NaCl; pH 7.2) in 200 ml bottle was bubbled by ozone-oxygen mixture. Thermostat with ice to slow down ozone decay, the process of physiological solution enrichment with ozone and its further storage was used. Ozone concentration was assessed by spectro-photometric method with Specord UV VIS (Germany) by light absorption on Hartley band [6].

Recording of skin radiation within infrared range ( $\lambda = 8-14$   $\mu\text{m}$ ) was realized by portable thermal viewer of our own design using the principles as reported [8].

There was determined the rate of skin seeding and belonging to the species of microorganisms by standard methods: microscopy of the smears stained by Gram; seeding and culturing with nutrient media (culture and phenotypic indices) with following use of biochemical tests to identify the microorganisms [2, 5]. Number of anaerobic bacteria in 1 ml of discharge of rat's wound surface was totally examined with no identification (blood agar+10%  $\text{CO}_2$ ). Number of colony-forming units (CFU) in 1ml wound discharge was found by counting the macrocolonies, grown-up on agarized and semi-agarized nutrient media [5, 7].

Three groups of animals were under investigation by 20 animals for each group. Healing dynamics of

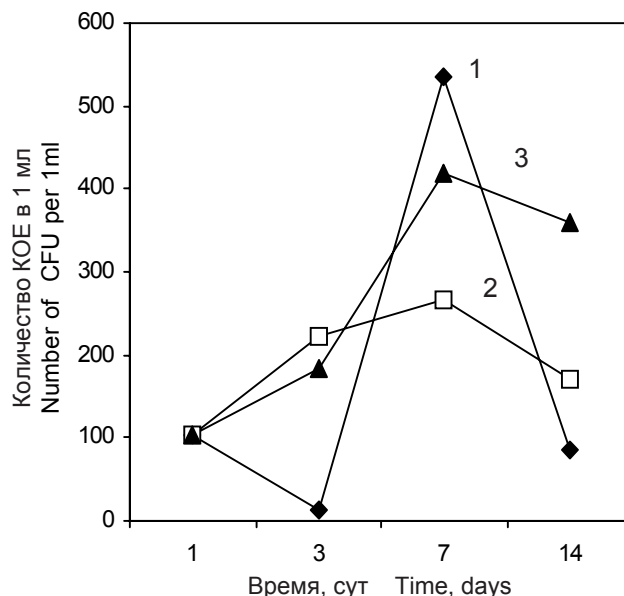


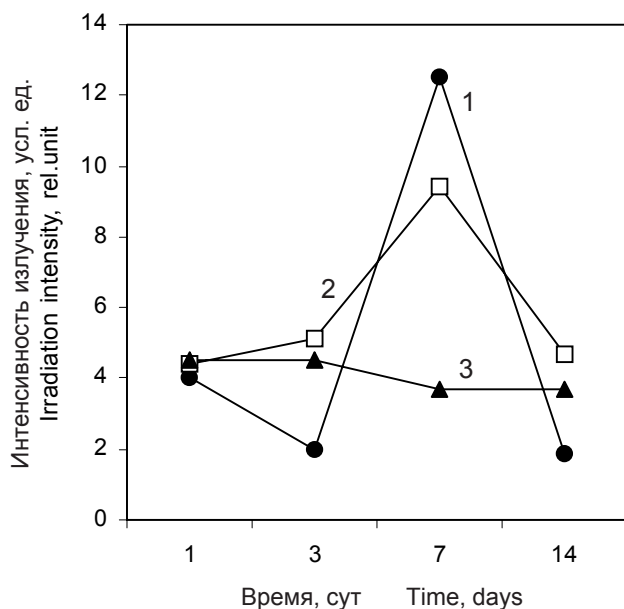
Рис. 1. Зависимости степени обсемененности раневой поверхности от времени после обработки ОФР (1); физиологическим раствором (2); контрольных, не обработанных ранах (3).

Fig. 1. Time dependencies of seeding rate of wound surface after treating with OPS (1); physiological solution (2); control non-treated ones (3).

*Streptococcus*, *Candida*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, анаэробные бактерии *Clostridium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*. Мы изучили видовое разнообразие обсемененности неповрежденной кожи крыс и установили, что семейство *Enterobacteriaceae* представлено *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloceae*; род *Staphylococcus* – *St. epidermidis*, *St. Aureus*; род *Streptococcus* – *Str. agalactiae*, *Str. faecalis*. При выщипывании шерсти у животных перед холодовым воздействием достоверно снижалась общая обсемененность кожи микроорганизмами на 32%.

При изучении отделяемого холодовых ран показано, что количество микроорганизмов на 3-и сутки у животных первой и третьей групп достоверно не отличалось, а второй группы – было в 2 раза ниже (рис. 1). Количество микроорганизмов в 1мл отделяемого холодовых ран у животных второй группы на 7-е сутки в 2 раза больше по сравнению с третьей и в 1,3 раза – по сравнению с первой. На 14-е сутки количество микроорганизмов в 1мл отделяемого холодовых ран у животных второй группы приближается к исходному показателю, что в 4 раза меньше по сравнению с контролем и в 1,5 раза – с показателями третьей группы.

Следует отметить, что анаэробные микроорганизмы после применения озонированного раствора погибали во всех образцах отделяемого ран (3,7 и 14-е сутки). Аналогичные результаты были представлены в работе [10].



**Рис. 2.** Зависимости интенсивности излучения в инфракрасном диапазоне ( $\lambda=8-14$  мкм) поверхности ран, обработанных ОФР (1); физиологическим раствором (2); в контрольных, не обработанных ранах (3).

**Fig. 2.** Dependencies of irradiation intensity in infrared range ( $\lambda=8-14$   $\mu\text{m}$ ) of wound surface, treated with OPS (1); physiological solution (2); in control, non-treated ones (3).

skin wound was studied during cold damage to the 1, 3, 7 and 14 days in the first group (control); in the second group dynamics of necrosis and demarcation at daily subcutaneous OPS injection (1.1 mg/l ozone concentration) into cold trauma area was studied; in the third group the dynamics of necrosis and demarcation processes under daily subcutaneous injection of physiological solution with no ozone in the chosen area was investigated. Research term for the second and third groups of animals is similar to the first one.

## Results and discussions

The most widespread microorganisms are known to cause a wound surface contamination, they are *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Candida*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* anaerobic bacteria, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*. We have studied a specific variety of seeding rate for rat's undamaged skin and found that the *Enterobacteriaceae* family is presented by *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloceae*; *Staphylococcus* class is done by *St. epidermidis*, *St. Aureus*; *Streptococcus* class is presented by *Str. agalactiae*, *Str. faecalis*. Total microorganism seeding rate of skin was statistically and significantly reduced by 32% during hair plucking in animals prior to cold effect.

Microorganism number to the third day was shown as not statistically and significantly differing in the first and third groups of animals during studying of cold wound discharge but in the second one it was twice lower (Fig. 1). Number of microorganisms in animals of the second group was twice higher if compared with the third group and 1.3 times higher if compared to the first one in 1ml of cold wound discharge to the 7<sup>th</sup> day. To the 14<sup>th</sup> day the number of microorganisms in 1ml of cold wound discharge in the second group of animals approached to an initial index, which in 4 times lower in comparison with the control as well as 1.5 times lower in comparison with the third group.

It should be noted that anaerobic microorganisms died in all samples of discharge wound (3, 7 and 14 days) after use of ozonized solution. The same results were presented in the paper [10].

There was visually observed a complete wound healing after necrotic mass rejection in the animals of the second group, to 30<sup>th</sup> day for the first group and to 24<sup>th</sup> day for the third group.

Acceleration of healing may be noted for a cold wound in the group with OPS when comparing the data of visual control and cold wound seeding rate. Indices of seeding dynamics of rat's skin wound surface correspond to the change of infrared radiation intensity when two diagram types are compared (Fig. 1, 2).

Analysis of the diminution of radiation values of wound surface and non-treated skin ( $\Delta = I_{\text{wound}} - I_{\text{skin}}$ )



У животных второй группы к 14-м суткам наблюдалось полное заживление ран после отторжения некротических масс, первой группы – к 30-м, а третьей – к 24-м.

При сопоставлении данных визуального контроля и степени обсемененности холодových ран можно отметить ускорение процессов заживления холодových ран в группе с применением ОФР. Динамика показателей обсемененности раневой поверхности кожи крыс соответствует изменениям показателей интенсивности инфракрасного излучения при сравнении графиков (рис. 1, 2).

Анализ разности величины излучений раневой поверхности и необработанной кожи ( $\Delta = I_{\text{раны}} - I_{\text{кожи}}$ ) позволил установить, что характер динамики данного показателя сходен у всех животных исследуемых групп. Средние значения величины  $\Delta$  возрастают с 3-х до 7-ми суток во второй, третьей группах, причем этот скачок у животных второй группы более выражен.

На 14-е сутки разность излучений  $\Delta$  над поверхностью раны и неповрежденной кожей уменьшается, т.е. величина излучения с поверхности раны приближается к величине излучения с поверхности кожи у животных всех групп. Представленные данные свидетельствуют о процессах заживления, причем во второй группе животных эти процессы протекают интенсивнее.

Как видно из рис. 1 и 2, изменения показателей микробной обсемененности и инфракрасного излучения в каждой группе сходны и отражают состояние раневого процесса, т.е. клиническое течение местных изменений. Б.С. Вихриев [3] выделяет в этот период следующие фазы: 1) воспаление; 2) развитие некроза и его ограничение; 3) рубцевание и эпителизация ран.

Полученные нами результаты подтверждают существование всех указанных фаз, причем обработка холодových травм ОФР способствует сокращению сроков протекания раневых процессов.

## Выводы

Установлено, что применение озонированного физиологического раствора способствует более интенсивному процессу заживления ран после холодového повреждения, что проявляется в ускорении сроков заживления, уменьшении общей микробной обсемененности кожи животных.

## Литература

1. Аронов Л.С., Оболенский В.Н., Родоман Г.В. и др. Клинические и экономические аспекты выбора антибактериальной терапии тяжелых форм хирургической инфекции: Сб. науч. трудов "Современные проблемы практической хирургии". – М., 2000. – С.7-18.

enabled to find out that the dynamics character of these indices was similar in the animals of all examined groups. Average  $\Delta$  values increase from the 3<sup>rd</sup> to 7<sup>th</sup> days in the second and third groups, moreover this skip in animals of the second group more manifested.

To the 14<sup>th</sup> day the  $\Delta$  diminution of radiation values above a wound surface and undamaged skin reduces, i.e. the radiation value from a skin surface approaches to the radiation value from the skin surface in all groups of animals. The presented data testify to the healing evidence, moreover these processes proceed more intensively in the second group of animals.

Fig. 1 and 2 show that the changes in indices of microbe seeding and infrared radiation in each group are the similar and reflect the state of wound process, i.e. a clinical course of local alterations. Vikhriev B.S. et al. [3] within this period have emphasized the following phases: 1) inflammation; 2) necrosis development and its restriction; 3) wound cicatrization and epithelization.

The obtained results confirm the existence of all mentioned phases, moreover the cold traumas treatment with OPS contributes to shortening of terms of wound process healing.

## Conclusions

Application of ozonized physiological solution contributes to more intensive wounds healing after cold damage, that is manifested in accelerating the healing terms, reduction of total microbe seeding of animal's skin and decrease in the indices of radiation recorded within infrared range.

## References

1. Aronov L.S., Obolensky V.N., Rodoman G.V. et al. Clinical and economical selection aspects of antibacterial therapy of severe surgery infection forms: Collection of Scientific Papers "Current problems of practical surgery". – Moscow, 2000. – P. 7-18.
2. *Manual on microbiological and virusological research methods* / Ed. by Birger M.O. – Moscow: Meditsina, 1982. – P. 22-23.
3. Vikhriev B.S., Kichemasov S.Kh., Skvortsov Yu.P. Local impairments by cold. – Leningrad: Meditsina, 1991. – 189 p.
4. Zinchenko V.D., Golota V.I., Sukhomlin E.A. et al. Laboratory equipment for ozone techniques application in biology and medicine // *Problems of Cryobiology*. – 2005, N4. – P. 712-718.
5. Labinskaya A.S. Microbiology with technique of microbiological researches. – Moscow: Meditsina, 1978. – 394 p.
6. Lunin V.V., Popovich M.P., Tkachenko S.N. Physical chemistry of ozone. – Moscow: Moscow State University. – 1998. – 480 p.
7. Lusta K.A., Fikhte B.A. Determination methods of microorganisms viability. – Puschino, 1990. – 186 p.
8. *Infrared imaging in medicine* / Ed. by Miroshnikova M.M. – L., 1976. – 116 p.
9. Tondiy L.D., Ganichev V.V. Ozone therapy methods: Meth. Recommendations. – Kharkov, 2001. – 86 p.

2. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* / Под ред. М.О. Биргера.– М.: Медицина, 1982.– С. 22-23.
3. *Вихриев Б.С., Кичемасов С.Х., Скворцов Ю.Р.* Местные поражения холодом.– Л.: Медицина, 1991.– 189 с.
4. *Зинченко В.Д., Голота В.И., Сухомлин Е.А., Таран Г.В. и др.* Лабораторное оборудование для использования озоновых технологий в биологии и медицине// Пробл. криобиологии.– 2005, №4.– С. 712-718.
5. *Лабинская А.С.* *Микробиология с техникой микробиологических исследований.* – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
6. *Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н.* Физическая химия озона.– М.: МГУ., 1998.– 480 с.
7. *Луста К.А., Фихте Б.А.* Методы определения жизнеспособности микроорганизмов.– Пущино, 1990.– 186 с.
8. *Тепловидение в медицине* / Под ред. М.М. Мирошникова.– Л., 1976. – 116 с.
9. *Тондий Л.Д., Ганичев В.В.* Методики озонотерапии: Метод. рекомендации.– Харьков, 2001.– 86 с.
10. *Hems R.S., Gulabvala K., Ready D. et al.* An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis* // *Int. Endod. J.*– 2005.– Vol. 38, N1.– P. 22-29.

*Accepted in 25.10.2005*

*Поступила 25.10.2005*