

ВИКОРИСТАННЯ ХІТОЗАНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПОШКОДЖЕНЬ ШКІРИ РІЗНОЇ ЕТИОЛОГІЇ

М. В. Погорєлов, О. В. Калінкевич*, О. В. Солодовник, О. М. Олешко, О. М. Калінкевич*, В. В. Корнієнко, Ю. А. Ткаченко, Г. Ф. Ткач, С. М. Данильченко*, І. М. Бабіч

Кафедра гігієни та екології (зав.— д.мед.н., доц. Погорєлов М. В.), Сумський державний університет. 40007 Україна, м. Суми, вул. Санаторна, 31.

Відділ радіаційної біофізики (зав.— к.фіз.-мат.н. Данильченко С. М.) Інститут прикладної фізики НАН України. 40000 Україна, м. Суми, вул. Петропавлівська, 58. E-mail: pogorelov_max@mail.ru

CHITOSAN USE TO TREAT SKINDAMAGEOFVARIOUSETIOLOGIES

M. V. Pogorelov, O. V. Kalinkevich, A. V. Solodovnik, A. N. Oleshko, A. N. Kalinkevich, V. V. Kornienko, Y. A. Tkachenko, G. F. Tkach, S. N. Danilchenko, I. M. Babich

SUMMARY

For effective treatment of deep wounds of variouse tiologies, natural and synthetic materials that have an impact on the wound microenvironment are used. These materials accelerate healing and reduce complications. We have studied the effect of the chitosan film on skin regeneration at damages of thermal, chemical and mechanical etiology. An experimental study was carried out on 108 male white laboratory rats, of 6-month age, with wounds of the above-stated etiologies, of the III a degree; the skin was damaged in the interscapular area. The material effectiveness was established by cytology and determination of the wound healing speed. Application of chitosan membranes in treatment of integument injuries provides for a decrease of inflammation and an increase of phagocytosis activity, which reduces the epithelialization time by 2,4 days on the average and accelerates wound healing, as a result, the full epithelialization of the defect surface takes 2,2 days on the average.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

М. В. Погорєлов, О. В. Калінкевич, А. В. Солодовник, А. Н. Олешко, А. Н. Калінкевич, В. В. Корнієнко, Ю. А. Ткаченко, Г. Ф. Ткач, С. Н. Данильченко, І. М. Бабіч

РЕЗЮМЕ

Для эффективного лечения глубоких ран различной этиологии используются природные и искусственные материалы, которые обеспечивают влияние на микроокружение раны, ускоряют ее заживления и уменьшают количество осложнений. В нашей работе проведено изучение эффективности применения хитозановой пленки на ход регенерации поврежденной кожи термической, химической и механической этиологии. Экспериментальное исследование было выполнено на 108 белых лабораторных крысах самцах 6-ти месячного возраста, которым моделировали раны указанных этиологий IIIa степени на коже межлопаточной области. Изучение эффективности применения материала изучали с помощью цитологического исследования и определения скорости заживления раны. В условиях применения хитозановой мембраны для лечения повреждений наружных покровов наблюдается уменьшение воспалительной реакции и рост активности фагоцитоза, что приводит к уменьшению сроков начала эпителизации в среднем на 2,4 суток и увеличения скорости заживления раны, что позволяет уменьшить сроки полной эпителизации поверхности дефекта в среднем на 2,2 суток.

Ключові слова: хітозан, рана, опік, хімічна травма, механічне ушкодження.

Ушкодження шкіри займають одне з перших місць в структурі травм. Особливо великого значення набули опіки шкіряного покриву, що пов'язане зі стрімким розвитком виробництва, погіршенням стану безпеки на багатьох підприємствах металургійної та вугледобувної промисловості. Виріс відсоток побутових опіків, як термічних, так і хімічних, у зв'язку з ростом кількості електричного обладнання, збільшенням пожеж, тощо.

Для ефективного лікування глибоких ран різної етіології використовуються природні та штучні матеріали, які забезпечують вплив на мікрооточення рани, пришвидшують її загоєння та зменшують кількість ускладнень. В останні роки збільшилась кількість досліджень можливості застосування в якості основи для біологічно активних матеріалів хітозана, який є похідним природного полімеру хітину. Хітозан володіє цілим рядом властивостей, які

обумовлюють його використання в якості матеріалу для пластики дефектів шкіри — відновлюваність ресурсів, відсутність токсичності, апірогенність, гемостатичні та бактеріостатичні властивості, біосумісність та біодеградація. Також даний матеріал здатний стимулювати процеси регенерації та перешкоджати утворенню шрамів [6, 11, 15, 16, 18]. За даними Bottomley et al., матеріали на основі хітозана можуть також стимулювати секрецію медіаторів запалення, таких як інтерлейкін 8, простагландин E, інтерлейкін 1β тощо [8, 19]. Публікації останніх років свідчать про використання хітозана, як одного зі складників біоматеріалів. Так на даний час є дані щодо виробництва на основі даного матеріалу гідрогелів [1], мембран [4, 5, 10, 14], нановолокон [17], мікро- та наночасточок [3, 9, 12, 13] та губок [2, 7]. Проте повного циклу досліджень не пройшов жодний з зазначених матеріалів.

Тому метою нашої роботи стало вивчення ефективності застосування хітозанових плівок на перебіг регенерації пошкоджень шкіри різної етіології.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріал для покриття дефекту отримували в Інституті прикладної фізики НАН України. Для одержання гелю хітозану використовували низькомолекулярний хітозан, одержаний з панцирів камчатських крабів (Скляр А. М.) без будь-яких домішок (за результатами мікроскопічних досліджень — XRD). Готували 2% розчин хітозану в 0,5% оцтовій кислоті протягом 24 год, який профільтрували через скляний фільтр з середнім розміром пор. рН одержаного гелю витримували не нижче 7.0. Гель формує тонку помірно розчинну в воді плівку на полімерній підкладці протягом 10 хвилин. Для формування плівок товщиною більше 0,5 мм використовували тефлонові форми, час формування — від 1 до 3 діб.

Для одержання нерозчинної в водному середовищі плівки необхідна додаткова обробка раневого покриття гідроксидом натрію (0,1 н розчин) або розчином звичайного мила. Одержане таким чином покриття міцне, має високу адгезію до шкіри, повільніше деградує.

Експериментальне дослідження було виконано на 108 білих лабораторних щурах самцях 6-ти місячного віку, що знаходились в стаціонарних умовах віварію. Перед початком експерименту тварин оглядали, враховуючи їх локомоторну активність та стан шкіряного покриву. Під час дослідів у віварії підтримувалась постійна температура, тварини знаходились в умовах належного догляду.

Всім тваринам під наркозом наносились рани III ступеню, діаметром 15 мм на шкірі міжлопаткової ділянки. Попередньо відбувалося видалення волосяного покриву. З метою вивчення особливостей загоєння ран різної етіології тваринам наносились термічні та хімічні (10% азотна кислота) опіки а також глибока механічна травма.

Відповідно до мети та задач роботи тварини були розділені на 2 серії.

I серія (36 тварин) — контрольна, в якій вивчалось загоєння рани з використанням стерильних марлевих пов'язок.

II серія (72 тварин) — для місцевого лікування ран різної етіології з першої доби після травми використовували експериментальні хітозанові покриття, заміна яких проводилась щоденно.

Тварин виводили з експерименту на 3, 7, 14 та 21 добу після нанесення травми, що відповідає термінам, які характеризують основні етапи регенераційних процесів шкіри. Протягом всього терміну проведення експерименту тварин щодня оглядали, відмічали їх загальний стан, активність, характер шерстяного покриву, стан рани та прилеглих тканин.

Для вивчення особливостей загоєння ран вивчали показник швидкості заживлення рани та її цитологічну картину. Для цитологічного дослідження брався мазок-відбиток раневої поверхні за методом М. П. Покровської та М. С. Макарова, а також зіскоб за методом «поверхневої біопсії» М. Ф. Камаєва. Метод «раневих відбитків» дає можливість дослідити клітинні реакції поверхневого шару рани, найменш зрілі клітини регенерату, що не пов'язані щільно між собою, і за рахунок яких буде відбуватися закриття раневого дефекту, в той час як вивчення цитологічної картини за методом «поверхневої біопсії» дозволяє отримати більше даних безпосередньо про регенеративні процеси, адекватно відображаючи динаміку репаративної регенерації. В кожному терміні дослідження робили по 3–5 препаратів з однієї і тієї ж ділянки раневої поверхні. Отримані препарати висушувались на повітрі, фіксувалися в метиловому спирті 5–10 хвилин або 15–20 хвилин в суміші Нікіфорова (суміш рівних частин ефіру та 96° етилового спирту) та фарбувалися. В роботі використовувалися основні методи фарбування цитологічних препаратів: за Романовським-Гімзою та гематоксилін-еозином. Проводилося визначення цитограми за наступними показниками: кількість лейкоцитів у полі зору, клітинний склад у відсотках (нейтрофіли, лімфоцити, моноцити, макрофаги, багатоядерні клітини та фібробласти).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загоєння рани будь-якої етіології проходить через фазу запалення, грануляції та епітелізації. Швидкість утворення епітелію при цьому залежить як від виду травми, так і від особливостей реактивності організму. Фаза запалення відіграє центральну роль в процесах утворення регенерату на наступних етапах і порушення співвідношення клітин може призвести до хронізації процесу та уповільнення утворення епітеліальної тканини. Як видно з таблиці 1, на початкових етапах регенерації шкіри цитологічна картина має свої особливості в залежності від виду пошкодження.

Так, термічна та механічна травма характеризується наявністю більшої кількості лейкоцитів у полі зору, ніж при хімічному опіку, що може свідчити про меншу реактивність в зоні ушкодження за умов дії кислоти. При цьому, в ділянці хімічного опіку спостерігається достовірно більший рівень нейтрофілів, що характеризує запальний тип цитограми та може призвести до уповільнення епітелізації рани. До того ж в рані відсутні моноцити та багатоядерні клітини, що є попередниками макрофагів, які виконують роль очищення рани від загиблих тканин та попереджають розвиток інфікування поверхні. Кількість макрофагальних клітин на поверхні хімічного опіку більш ніж удвічі менша за аналогічний

Таблиця 1

Характеристика цитограми поверхні рани в залежності від виду ушкоджень на 3 добу спостереження

Показник	Вид ушкодження		
	Термічний опік	Хімічний опік	Механічна травма
Кількість лейкоцитів у полі зору	110,4±2,8	89,6±1,3	123,3±4,1
Нейтрофіли, %	85,6±1,5	89,4±1,8	82,5±2,7
Лімфоцити, %	2,1±0,4	1,6±0,2	1,8±0,5
Моноцити, %	0,4±0,1	-	0,6±0,1
Макрофаги, %	3,1±0,2	1,3±0,3	3,6±0,2
Багатоядерні клітини, %	1,0±0,1	-	1,4±0,2
Фібробласти, %	-	-	-

показник термічної та механічної рани. Найбільший відсоток фагоцитуючих клітин виявлений на поверхні механічної рани, що свідчить про виражений регенераторний потенціал.

В наступний термін спостереження відбувається зменшення кількості лейкоцитів у полі зору та зрушення співвідношення клітин у цитограмі. При цьому спостерігається відставання регенераторних процесів у рані за умов моделювання хімічного опіку. На 7 добу спостереження кількість лейкоцитів зменшується в опіковій та термічній травмі до 98,5±1,8 та 92,1±2,8 відповідно, в той час як в умовах хімічного опіку їх кількість залишається на рівні 87,3±1,7. Відсоток нейтрофілів значно зменшується в усіх досліджуваних групах, становлячи відповідно 72,4±1,5% при термічній травмі, 75,9±0,7 — при хімічній та 69,4±1,6 — при механічній. В усіх групах зростає кількість моноцитів та макрофагів в середньому на 25,4%. Відсоток лімфоцитів та багатоядерних клітин достовірно не змінюється в усіх піддослідних групах. Поява фібробластів свідчить про формування грануляційної тканини та початку закриття поверхні рани. Так, на сьому добу спостереження відсоток фібробластоподібних клітин становив при термічному опіку 5,9±1,1%, при хімічному — 3,5±0,5% та при механічній травмі — 7,1±1,4%, що свідчить про низькі регенераторні можливості за умов кислотного опіку.

В подальшому відбувається зменшення кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій на поверхні дефекту та зростання вмісту макрофагів та фібробластів, що свідчить про активні регенераторні процеси на поверхні рани. З 7 доби відмічається поява епітеліальних клітин на поверхні рани після опікової та механічної травми. За умов кислотної травми епітелізація дефекту розпочинається лише на 14 день.

Загалом, до 21 доби спостереження відбувається епітелізація поверхні дефекту. При цьому початок епітелізації склав для механічної травми 10,3±0,4

днів, для опікової — 12,5±0,6 днів та для хімічної — 14,8±0,3 дні. Повна епітелізація поверхні дефекту настає відповідно групам через 18,5±0,7 днів, 20,2±0,4 дні та 22,3±0,6 днів. Швидкість заживлення ран при цьому становила відповідно 0,81±0,07 мм/добу, 0,74±0,05 мм/добу та 0,67±0,08 мм/добу.

Використання хітозаної мембрани створює оптимальне мікрооточення в рані через можливість газообміну, контроль втрати рідини та попередження мікробної контамінації поверхні. При цьому спостерігається стимулюючий вплив матеріалу на процеси формування клітинних популяцій в регенераті, що підтверджує дані деяких дослідників [5]. Як видно з таблиці 2, відмічається зростання кількості лейкоцитів на поверхні хімічного опіку та зменшення їх кількості на поверхні ран іншої етіології, що свідчить про нормалізацію клітинного складу при застосуванні хітозану. При цьому достовірно зменшується кількість нейтрофілів, що є свідченням зниження запальної реакції в ділянці травми. Спостерігається зростання відсотку моноцитів, макрофагів та багатоядерних клітин з ознаками активного фагоцитозу, що призводить до швидкого очищення поверхні рани та формуванню грануляцій з наступною епітелізацією. Рівень лімфоцитів при цьому майже не відрізняється від контрольної серії.

Починаючи з сьомої доби спостереження спостерігається формування грануляційної тканини в усіх досліджуваних групах, при цьому цитограми характеризуються переходом від запального до регенеративного типу, що не спостерігалось в групі контролю. В усіх групах відмічається поява епітеліальних клітин та формування капілярів, що прискорює процеси епітелізації. В даний термін спостереження на поверхні дефекту з'являються фібробласти, відсоток яких складає 7,9±0,8% при термічному опіку, 6,4±1,2% — при хімічному та 9,1±0,5 — при механічній травмі. Не зважаючи на активізацію регенераторних процесів при застосуванні хітозаної мембрани, при кислотному опіку спостерігається більш повільне формування регенерату.

Таблиця 2

Характеристика цитограми поверхні рани в залежності від виду ушкоджень на 3 добу спостереження при застосуванні хітозанової мембрани

Показник	Вид ушкодження		
	Термічний опік	Хімічний опік	Механічна травма
Кількість лейкоцитів у полі зору	102,1±1,3	95,7±0,9	116,5±2,2
Нейтрофіли, %	79,2±2,1	80,9±2,7	76,3±1,2
Лімфоцити, %	3,2±1,7	2,4±0,7	2,5±0,9
Моноцити, %	1,2±0,3	1,4±0,5	2,3±0,4
Макрофаги, %	3,1±0,4	2,5±0,8	4,9±0,5
Багатоядерні клітини, %	1,9±0,3	1,2±0,1	1,9±0,3
Фібробласти, %	-	-	-

На 14 добу спостереження відмічається значне зменшення кількості лейкоцитів та їх субпопуляцій, що характеризує зменшення запальної реакції та епітелізацію травмованої поверхні. При цьому в декілька разів зростає відсоток макрофагів та багатоядерних клітин з проявами активного фагоцитозу, що характеризує активність процесів очищення рани від некротизованих тканин та грануляцій. Як видно з таблиці 3, відсоток фібробластів також значно зростає, що свідчить про утворення сполучної тканини. При цьому різниця з контролем є достовірною для всіх типів ушкодження. Проте, за умов хімічного опіку відмічається затримка макрофагальної реакції та достовірно менша кількість фібробластів в полі зору.

До 21 доби спостереження відмічається повна епітелізація поверхні дефекту для всіх видів травми. Початок епітелізації за умов застосування хітозанової мембрани є достовірно раннім ніж в контрольній групі тварин та складає для механічної травми 8,2±0,1 днів, для опікової — 10,2±0,3 днів та для хімічної — 11,8±0,5 днів. Повна епітелізація поверхні дефекту також настає достовірно раніше та складає відповідно виду ушкодження

на 16,8±0,3 день, 17,6±0,5 день та 19,9±0,6 день. При цьому швидкість заживлення рани склала для механічної травми 0,89±0,05 мм/добу, для термічної — 0,85±0,08 мм/добу та 0,75 мм/добу — для хімічного опіку.

ВИСНОВКИ

Таким чином, заживлення травм різної етіології відбувається через формування запальної реакції, яка більш виражена за умов механічного та термічного ушкодження з подальшим утворенням грануляцій та епітелізацією ранової поверхні. При цьому відмічається пригнічення процесу фагоцитозу та утворення епітелію при хімічному опіку, що призводить до уповільнення строків епітелізації рани. За умов застосування хітозанової мембрани для лікування пошкоджень зовнішніх покривів спостерігається зменшення запальної реакції та зростання активності фагоцитозу, що призводить до зменшення строків початку епітелізації в середньому на 2,4 дні та прискорення швидкості заживлення рани, що дає змогу зменшити строки повної епітелізації поверхні дефекту в середньому на 2,2 дні.

Таблиця 3

Характеристика цитограми поверхні рани в залежності від виду ушкоджень на 14 добу спостереження при застосуванні хітозанової мембрани

Показник	Вид ушкодження		
	Термічний опік	Хімічний опік	Механічна травма
Кількість лейкоцитів у полі зору	9,2±0,5	12,3±0,8	6,1±0,2
Нейтрофіли, %	23,5±1,3	29,1±1,1	19,5±0,8
Лімфоцити, %	4,1±0,7	3,1±0,5	3,2±0,4
Моноцити, %	-	-	-
Макрофаги, %	19,1±0,7	13,4±0,6	21,8±0,9
Багатоядерні клітини, %	0,8±0,3	1,1±0,7	0,6±0,5
Фібробласти, %	19,6±0,8	13,7±1,2	23,5±1,5

ЛІТЕРАТУРА

1. Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds / H. Tamura, T. Furuike, S. V. Nair et al. // *Carbohydr Polym.*— 2010.
2. Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin / A. Portero, D. Teijeiro-Osorio, M. J. Alonso et al. // *Carbohydr Polym.*— 2007.— V. 68.— P. 617–25.
3. Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications / A. Anitha, N. Deepa, K. P. Chennazhi et al. // *Carbohydr Polym.*— 2010.
4. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings / P. R. Marreco, P. L. Moreira, S. C. Genari et al. // *Biomed Mater Res B Appl Biomater.*— 2004.— V. 71B.— P. 268–77.
5. Flexible chitin films as potential wound-dressing materials: wound model studies / N. L. B. M. Yusof, A. Wee, L. Y. Lim et al. // *Biomed Mater Res.*— 2003.— V. 66A.— P. 224–32.
6. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: A novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis / V. F. Schriest, Y. J. Miao, C. Niyibizi et al. // *Journal of Biomedical Material Research.*— 2000.— V. 49 (4).— P. 534–541.
7. In vitro degradation behavior of freeze-dried carboxymethyl-chitin sponges processed by vacuum-heating and gamma irradiation / K. Muramatsu, S. Masuda, Y. Yoshihara et al. // *Polym Deg Stab.*— 2003.— V. 81.— P. 327–32.
8. Metalloproteinases as targets for anti-inflammatory drugs / K. M. K. Bottomley, D. Bradshaw, J. S. Nixon // Basel: Birkhauser.— 1999.
9. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications / A. Dev, J. C. Mohan, V. Sreeja et al. // *Carbohydr Polym.*— 2010.— V. 79.— P. 273–9.
10. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications / R. Jayakumar, M. Prabakaran, S. V. Nair et al. // *Prog Mater Sci.*— 2010.— V. 55.— P. 675–709.
11. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process / Masayuki, Ishihara, Kuniaki et al. // *Biomaterials.*— 2002.— V. 23 (5).— P. 833–840.
12. Prabakaran M. Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery / M. Prabakaran // *Biomater Appl.*— 2008.— V. 23.— P. 5–36.
13. Prabakaran M. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems / M. Prabakaran, J. F. Mano // *Drug Deliv.*— 2005.— V. 12.— P. 41–57.
14. Preparation and characterization of novel α -chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications / K. Madhumathi, N. S. Binulal, H. Nagahama et al. // *Biol Macromol.*— 2009.— V. 44.— P. 1–5.
15. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends / Yu-Bey, Wu, Shu-Huei, Yu, Fwu-Long, Mi et al. // *Carbohydrate Polymers.*— 2004.— V. 57 (7).— P. 435–440.
16. Preparation of chitosan and its study on medicament / Lai, ling-yan, Suyuan-fen et al. // *Journal of Chinese Biochemical Drug.*— 1999.— V. 20 (4).— P. 204–205.
17. Single step electrospinning of chitosan/poly (caprolactone) nanofibers using formic acid/acetone solvent mixture / K. T. Shalumon, K. H. Anulekha, C. M. Girish et al. // *Carbohydr polym.*— 2010.— V. 80.— P. 413–9.
18. Studies on nerve affinity of chitosan-derived materials / G. HaiPeng, Z. Yinghui, L. Jianchun et al. // *Journal of Biomedical Material Research.*— 2000.— V. 52 (2).— P. 285–295.
19. Willoughby D. A. Inducible enzymes in the inflammatory response. D. A. Willoughby, A. Tomlinson // Basel, CH: Birkhauser Verlag.— 1999.