

УДК 616.5-006.81-03-053-089

О. В. Пасічник, В. С. Коноплицький, Ю. Є. Коробко

Порівняльний аналіз структури шкіри експериментальних тварин при різних видах енергетичного впливу

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна

Paediatric surgery.Ukraine.2021.4(73):13-23; doi 10.15574/PS.2021.73.13

For citation: Pasichnyk OV, Konoplytskyi VS, Korobko YYe. (2021). Comparative analysis of the skin structure of experimental animals under different types of energy exposure. Paediatric Surgery.Ukraine. 4(73):13-23; doi 10.15574/PS.2021.73.13.

Невуси здебільшого являють собою доброякісні пігментовані утворення, які в деяких випадках із певних причин можуть підлягати злоякісній трансформації. Показаннями для видалення різних за величиною невусів у цілому слугують косметичні причини, постійне подразнення новоутворень, локалізація пігментних невусів в анатомічних ділянках, складних для самоконтролю, наявність невусів особливо схильних до малігнізації.

Мета – оцінити шляхом експериментального дослідження морфологічний стан і склад тканин шкіри в краях, дні рани залежно від характеру впливу механічного та енергетичних факторів для подальшого визначення тактики лікування невусів у дітей.

Матеріали та методи. Вибір морських свинок масою 350–400 г та віком 6–8 тижнів в якості експериментальних тварин зумовлений тим, що в свавців цього виду морфологічна будова шкіри дуже близька до будови шкіри людини, у тому числі за структурою та локалізацією меланоцитарних клітин. Біопсію шкіри брали у двох симетричних відносно хребта ділянках. Усіх тварин після висічення біоптатів шкіри утримували в індивідуальних клітках в умовах віварію, а через 24 год поділили на три групи по 5 особин у кожній, залежно від застосованого методу забору матеріалу для подальшого гістологічного дослідження: I група (n=5) – висічення утворення проводили гострим шляхом, за допомогою скальпеля; II група (n=5) – за допомогою лазера хірургічного високоінтенсивного «LIKA-surgeon» (потужність на виході – 10 Вт, довжина хвилі – 940 нм); III група (n=5) – за допомогою високочастотного електрохірургічного апарату «BOWA-ARC 350».

Результати. Максимально виражені морфологічні та морфометричні зміни в тканинах біоптатів шкіри в усі терміни дослідження відмічалися в III експериментальній групі тварин, а мінімальні – у I групі.

Висновки. Морфологічні та морфометричні дослідження біоптатів шкіри експериментальних тварин при різних методах висічення переконливо засвідчили, що на всіх етапах експерименту мінімальні ураження тканин спостерігалися в групі тварин, у яких висічення проводили за допомогою скальпеля, а максимальні патоморфологічні зміни – при біопсії за допомогою монополярного коагулятора.

Під час експериментів із лабораторними тваринами всі біоетичні норми та рекомендації дотримано. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Ключові слова: діти, дитяча хірургія, невуси.

Comparative analysis of the skin structure of experimental animals under different types of energy exposure

O. V. Pasichnyk, V. S. Konoplytskyi, Y. Ye. Korobko

National Pirogov Memorial Medical University, Ukraine

Nevi are mostly benign pigmented formations, which, however, in some cases, for some reason, may be subject to malignant transformation. Indications for the removal of nevi of different sizes in general are cosmetic causes, constant irritation of tumors, localization of pigmented nevi in anatomical areas that are difficult to self-control, the presence of nevi particularly prone to malignancy.

The aim is to evaluate, by means of an experimental study, the morphological state and composition of skin tissues in the edges, the bottom of the wound, depending on the nature of the influence of mechanical and energy factors, in order to further determine the tactics of treating nevi in children.

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

Materials and methods. The choice of guinea pigs as experimental animals, weighing 350–400 g and aged 6–8 weeks, was due to the fact that in mammals of this species the morphological structure of the skin is very close to the structure of human skin, including the structure and location of melanocyte cells. Skin biopsy was taken in two symmetrical relative to the spine areas. After excision of skin biopsies, all animals were kept in individual cages in vivarium, and after 24 hours were divided into 3 groups of 5 individuals each, depending on the method of sampling for further histological examination: group I (n=5) – excision the formation took place in a acute way, with the help of a scalpel; group II (n=5) – excision of the formation was performed using a high-intensity surgical laser «LIKA-surgeon» (output power – 10 W, wavelength – 940 nm); group III (n=5) – excision of the formation using a high-frequency electrosurgical device «BOWA-ARC 350».

Results. The most pronounced morphological and morphometric changes in the tissues of skin biopsies in all terms of the study were determined in animals of the III experimental group, and the minimum in the I group of experimental animals.

Conclusions. Morphological and morphometric studies of skin biopsies of experimental animals with different methods of excision convincingly determined that at all stages of the experiment, minimal tissue damage was inherent in the group of animals in which excision was performed with a scalpel, and maximum pathomorphological changes were observed in biopsy with a monopolar coagulator.

When carrying out experiments with laboratory animals, all bioethical norms and recommendations were observed.

No conflict of interest was declared by the authors.

Key words: children, pediatric surgery, nevi.

Сравнительный анализ структуры кожи экспериментальных животных при различных видах энергетического воздействия

О. В. Пасечник, В. С. Коноплицкий, Ю. Е. Коробко

Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Украина

Невусы в основном представляют собой доброкачественные пигментированные образования, однако в некоторых случаях по определенным причинам могут подвергаться злокачественной трансформации. Показаниями для удаления различных по величине невусов в целом служат косметические причины, постоянное раздражение новообразований, локализация пигментных невусов в анатомических участках, сложных для самоконтроля, наличие невусов, особо склонных к малигнизации.

Цель – оценить путем экспериментального исследования морфологическое состояние и состав тканей кожи в краях, дне раны в зависимости от характера влияния механического и энергетического факторов для дальнейшего определения тактики лечения невусов у детей.

Материалы и методы. Выбор морских свинок массой 350–400 г и в возрасте 6–8 недель в качестве экспериментальных животных обусловлен тем, что у млекопитающих данного вида морфологическое строение кожи очень близко к строению кожи человека, в том числе по структуре и локализации меланоцитарных клеток. Биопсию кожи брали в двух симметричных относительно хребта участках. Всех животных после иссечения биоптатов кожи содержали в индивидуальных клетках в условиях вивария, а через 24 часа разделили на 3 группы по 5 особей в каждой, в зависимости от метода забора материала с целью дальнейшего гистологического исследования: I группа (n=5) – иссечение образования проводили острым путем с помощью скальпеля. II группа (n=5) – с помощью лазера хирургического высокоинтенсивного «LIKA-surgeon» (мощность на выходе – 10 Вт, длина волны – 940 нм); III группы (n=5) – с помощью высокочастотного электрохирургического аппарата «BOWA-ARC 350».

Результаты. Максимально выраженные морфологические и морфометрические изменения в тканях биоптатов кожи во всех сроках исследования отмечались в III экспериментальной группе животных, а минимальные – в I группе.

Выводы. Морфологические и морфометрические исследования биоптатов кожи экспериментальных животных при различных методах иссечения убедительно засвидетельствовали, что на всех этапах эксперимента минимальные поражения тканей наблюдались в группе животных, у которых иссечение проводили с помощью скальпеля, а максимальные патоморфологические изменения – при биопсии с помощью монополярного коагулятора. При экспериментах с лабораторными животными все биоэтические нормы и рекомендации соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ключевые слова: дети, детская хирургия, невусы.

Вступ

Невуси здебільшого являють собою доброякісні пігментовані утворення, які в деяких випадках із певних причин можуть підлягати злоякісній трансформації [3]. У таких ситуаціях лікування пігментних новоутворень (ПН) беззаперечно полягає в їх видаленні, яке на сучасному етапі розвитку медичної науки виконують за допомогою хірургічного методу (висічення скальпелем) або під впливом різних видів енергії (високих / низьких температур, лазерного опромінення, хімічно- / електрокоагуляції, радіохірургічного методу тощо), кожний з яких має певні показання й протипоказання [5,11,12]. Необхідність видалення різних за величиною невусів у цілому обумовлена косметичними причинами, постійним подразненням новоутворень, локалізацією ПН в анатомічних ділянках, складних для самоконтролю, наявністю невусів особливого меланомо-загрозливого виду [1,7].

Однак кожний з існуючих методів видалення ПН має переваги й недоліки, які не обмежуються лише косметичними причинами; немає змоги профілактикувати рецидивування / продовжений ріст патологічних новоутворень шкіри, що в подальшому потребує повторних хірургічних втручань [4,6].

Крім того, суттєвим недоліком деяких методик видалення ПН є відсутність післяопераційного матеріалу для первинного гістологічного дослідження, що сприяє ранньому виявленню злоякісного переродження. А первинне гістологічне дослідження особливо важливе при диспластичних невусах, які в дитячій популяції становлять від 4,5% до 10% усіх випадків, коли, крім морфологічної диференційної діагностики (змішаний, межовий тощо), слід визначити ступінь малигнізації меланоцитарної дисплазії та надати відповідну оцінку рівню інвазії при меланомі, яка має поверхневе поширення [2,8,9].

Наведені в сучасній науковій літературі результати застосування різних методів видалення ПН досить спорадичні, багато в чому суперечливі та неоднозначно трактуються, що спонукає дослідників продовжити науковий пошук у цьому напрямі [10].

Мета дослідження – оцінити шляхом експериментального дослідження морфологічний стан і склад тканин шкіри в краях, дні рани залежно від характеру впливу механічного та енергетичних факторів для подальшого визначення тактики лікування невусів у дітей.

Матеріали та методи дослідження

Проведено експериментальне дослідження на морських свинках масою 350–400 г і віком 6–8 тижнів. Вибір такого виду ссавців зумовлений тим, що в них морфологічна будова шкіри дуже близька до будови шкіри людини, у тому числі за структурою і локалізацією меланоцитарних клітин.

Експеримент виконано відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин із дотриманням основних правил належної лабораторної практики GLP (1981). Комісією з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова встановлено, що дослідження відповідають етичним і морально-правовим вимогам відповідно до наказу МОЗ України від 01.11.2000 №281. Усіх тварин, як у період двотижневого карантину, так і в період експерименту, утримували в умовах віварію на стандартній дієті. Питво не обмежували. Стан здоров'я та вік експериментальних тварин визначав ветеринар.

В асептичних умовах лабораторну тварину фіксували на операційному столі. Анестезію проводили внутрішньоочеревинним введенням тіопенталу натрію (50 мг/кг). За 30 хв до оперативного втручання тваринам, які напередодні не отримували їжі, виконували премедикацію шляхом внутрішньом'язової ін'єкції: анальгін 50% (10 мг/кг), атропіну сульфат 0,1% (0,1 мг/кг), аміназін 2,5% (0,5 мг/кг). Введеним у наркоз тваринам у ділянці спини проводили депіляцію, обробляли шкіру розчином антисептика (2,0% хлоргексидин).

Біопсію шкіри брали у двох симетричних відносно хребта ділянках спини, локалізованих каудальніше рівня XIII ребер (з боку хвоста) та обмежених проекційно нижнім краєм грудної частини трапецієподібного м'язу – зверху, а також латеральним краєм остюкового м'язу, тобто над дорзальним зубчастим і зовнішнім косим м'язом живота. Враховуючи недостатній розвиток гіподерми в морських свинок у ділянці спини, для попередження пошкодження

м'язів у ділянці місця прогнозованої біопсії виконували гідропрепарування в підшкірному шарі шляхом ін'єкції розчину 0,9% NaCl.

Зразки біопсії шкіри являли собою еліпси 8×12 мм, при цьому центри біоптатів знаходилися на відстані близько 25 мм один від одного. Усіх тварин після висічення біоптатів шкіри утримували в індивідуальних клітках в умовах віварію, а за 24 години розділили на три групи по 5 особин у кожній, залежно від застосованого методу забору матеріалу для подальшого гістологічного дослідження: I група (n=5) – висічення утворення проводили гострим шляхом, за допомогою скальпеля; II група (n=5) – висічення утворення проводили за допомогою лазера хірургічного високоінтенсивного «LIKA-surgeon» (виробник ПМПП «Фотонік Плюс», Україна, сертифікат оцінки відповідності UA.TR.001.015917–18; потужність на виході – 10 Вт, довжина хвилі – 940 нм); III група (n=5) – висічення утворення проводили за допомогою височастотного електрохірургічного апарату «BOWA-ARC 350» (виробник «BOWA-electronic Gmb&Co.», Німеччина), у монополярному режимі.

Тварин розподілили згідно з обраним дизайном дослідження відповідно до етапів експерименту (табл. 1).

Для контролю обрали дві інтактні тварини, у яких забирали зразки шкіри у визначених ділянках, аналогічно як і для решти тварин. Забрані зразки матеріалу фіксували в розчині нейтрального формаліну. Препарати виготовляли за стандартними методиками, гістологічні зрізи товщиною 5–7 мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за ван Гізоном. Мікроскопію та фотофіксацію препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа «OLIMPUS BX 41» (МОЗ України. Свідоцтво про державну реєстрацію №8120/2008, код 9011800000) при ×100, 200 та 400 разів. Отримували і обробляли зображення, проводили цифрову морфометрію і обробку за допомогою програми «Quick PHOTO MICRO 2.3» (ліцензійна згода №925113924), що дає змогу проводити 2737 пікселей.

Результати дослідження та їх обговорення

Відповідно до завдань дослідження, під час порівняльного оцінювання дермальної регенерації ран, як у групі контролю, так серед усіх трьох груп дослідження, після впливу різних методів висічення зразків шкіри в різні терміни дослідження в кожній експериментальній тварини враховували: стан і структурний склад шарів епідермісу (роговий, блискучий, зернистий, шипуватий, базальний), дерми (сітчастий, сосочковий); наявність та стан саль-

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

Таблиця 1

Дизайн експериментального дослідження

Термін дослідження	Група тварин		
	I (n=5)	II (n=5)	III (n=5)
Інтраопераційний (первинний) забір матеріалу	I етап експерименту		
	10 зразків	10 зразків	10 зразків
За 14 діб після оперативного втручання	II етап експерименту		
	10 зразків	10 зразків	10 зразків
За 28 діб після оперативного втручання	III етап експерименту		
	10 зразків	10 зразків	10 зразків
Усього	30 зразків	30 зразків	30 зразків

Таблиця 2

Розподіл та маркування експериментальних тварин за підгрупами морфологічного дослідження

Термін забору біопсій шкіри	Підгрупи експериментальних тварин	I група (висічення скальпелем)	II група (висічення хірургічним лазером)	III група (висічення монополярним коагулятором)
Інтраопераційний забір матеріалу (первинний)		2	5	8
За 14 діб після початку експерименту		3	6	9
За 28 діб після початку експерименту		4	7	10

них залоз і волосяних фолікулів; стан гіподерми (оцінка вторинного поширення некрозу з дерми та критерії утворення глибини патологічних змін); поширеність набряку, клітинної інфільтрації і крововиливів відповідно до різних шарів шкіри.

Для визначення морфологічних змін у будові та встановлення характеру реакцій тканин шкіри під впливом різних методів видалення пігментних новоутворень шкіри, як механічних, так і різних видів енергії, відповідно до дизайну експериментального дослідження, провели розподіл тварин за відповідними підгрупами морфологічного дослідження (табл. 2).

На першому етапі експериментального дослідження вивчали нормальну морфологію шкіри в морських свинок.

1-ша підгрупа експериментальних тварин (група контролю) – інтактні особини, у яких вивчали нормальну гістологічну будову всіх шарів шкіри.

У нормі ззовні шкіра представлена багатошаровим пласким епітелієм з ороговінням епідермісу. Підлегла сполучнотканинна основа – дерма – власне шкіра переходить у підшкірну клітковину (гіподерму, частина якої представлена тонким прошарком жиру, чітка межа між цим переходом відсутня).

Дерма представлена двома різновидами сполучної тканини, що формують сосочковий і сітчастий шари, без чіткої границі між ними. Сосочковий шар виражений нерівномірно, утворений пухкою фіброзною тканиною. В окремих місцях він ледь помітний, подекуди зовнішній рельєф епідермісу повторює контури сполучнотканинних сосочків і значно виступає над сусідніми ділянками шкіри.

Сітчастий шар розвинений добре, утворений щільною волокнистою неоформленою фіброзною тканиною. У цьому шарі визначаються додатки шкіри – волосяні фолікули і тісно зв'язані з ними сальні залози. Стрижні волосся виступають над поверхнею шкіри. У гіподерму без чіткої межі переходить сітчастий шар дерми. Основою гіподерми є жирова клітковина (так званий білий жир). Адипоцити, що утворюють жирову тканину, складаються в частки різної форми та розміру, розділені між собою тонкими прошарками пухкої волокнистої фіброзної тканини, в якій проходять нервові структури і кровоносні судини.

На наступному етапі експериментального дослідження вивчали морфологічні зміни шкіри морських свинок під впливом різних методів висічення біоптатів у різні терміни експерименту.

2-га підгрупа – первинне висічення шкіри скальпелем.

Одразу після висічення скальпелем у досліджуваному біоптаті шкірі загалом визначалась її нормальна гістологічна структура. Епідерміс у краях післяопераційної рани був механічно пошкоджений – розшарований, мали місце вогнищеві субепітеліальні крововиливи та набряк. У підлеглої сполучнотканинній основі – дермі – відмічалися вогнищеві крововиливи та набряк із розшаруванням колагенових волокон. Спостерігалися дилатація та повнокров'я судин. Запальна клітинна інфільтрація в цей період ще не визначалася (рис. 1).

3-тя підгрупа – первинне висічення хірургічним лазером.

Одразу після висічення біоптату хірургічним лазером у досліджуваній шкірі визначалася також нормальна гістологічна структура. Епідерміс у краях післяопераційної рани був пошкоджений – розшарований, спостерігалися вогнищеві субепітеліальні крововиливи та набряк. У підлеглий сполучнотканинній основі – дермі – безпосередньо по самому краю відмічалася вузька смужка коагульованих тканин. Також визначався набряк дерми з розшаруванням колагенових волокон, який був більш поширений і мав більш виражений характер. Крововиливів не було. Спостерігалася дилатація судин. Запальна клітинна інфільтрація в цей період також ще не визначалася (рис. 2).

4-та підгрупа – первинне висічення монополярним коагулятором.

Одразу після висічення біоптату монополярним коагулятором у шкірі спостерігалася в цілому також нормальна гістологічна структура. Однак епідерміс у краях післяопераційної рани був значно пошкоджений та частково коагульований – розшарований, визначалися вогнищеві субепітеліальні крововиливи та набряк, на поверхні коагульованого епідермісу відмічалися ознаки формування опікового струпа – нашарування фібрину з домішками формених елементів крові. По самому краю дерми визначалася вузька смужка коагульованих тканин. Також визначався набряк дерми з розшаруванням колагенових волокон, який був ще більш поширений і мав більш виражений характер порівняно з попередніми підгрупами. Спостерігалися вогнищеві крововиливи та дилатація судин. Запальна клітинна інфільтрація в цей період також ще не визначалася (рис. 3).

Морфологічне дослідження біоптатів шкіри на 14-ту добу експерименту

5-та підгрупа – висічення скальпелем.

На 14-ту добу від початку експерименту у хворих 5-ї підгрупи відмічалася майже повне загоєння рани. Рановий дефект був заповнений тонким «молодим» сполучнотканинним рубцем, повністю епітелізований. Під «молодою» рубцевою тканиною розташована щільна волокниста фіброзна тканина, яка за структурою не відрізнялася від фіброзної волокнистої щільної тканини дерми інтактних тварин. Під нею визначався прошарок жирової тканини гіподерми. Рубцева тканина складалася з тонких колагенових волокон і фібробластів, розташованих паралельно поверхні рани. У зоні рубця й оточуючих тканинах не було ознак запалення та розладів гемомікроциркуляції. У фіброзній тканині самого рубця кількість кровоносних судин була дуже мала, серед них визначалися судини з непрохідним зарос-

лим просвітом (так звана редукція судин), у глибших відділах дерми розташовувалися функціонуючі судини (рис. 4).

6-та підгрупа – висічення хірургічним лазером.

На 14-ту добу експерименту у тварин 6-ї підгрупи також відмічалася майже повне загоєння рани. Рановий дефект був заповнений тонким «молодим» сполучнотканинним рубцем, повністю епітелізований. Під «молодою» рубцевою тканиною розташовувалася щільна волокниста фіброзна тканина, яка за структурою не відрізнялася від фіброзної волокнистої щільної тканини дерми інтактних тварин. Під нею визначався прошарок жирової тканини гіподерми. Рубцева тканина складалася з тонких колагенових волокон і фібробластів, розміщених паралельно поверхні рани. У зоні рубця й оточуючих тканин відмічалися мінімальні ознаки запалення та розладів гемомікроциркуляції у вигляді незначного набряку дерми та наявності в ній поодиноких лімфогістіоцитарних елементів без ознак нагноєння. У фіброзній тканині самого рубця кількість кровоносних судин була дуже мала, серед них визначалися судини з непрохідним зарослим просвітом (так звана редукція судин), у глибших відділах дерми розташовувалися функціонуючі судини (рис. 5).

7-ма підгрупа – висічення монополярним коагулятором.

На 14-ту добу від початку експерименту у тварин 7-ї підгрупи також спостерігалася майже повне загоєння рани. Рановий дефект заповнений тонким «молодим» сполучнотканинним рубцем, повністю епітелізований. Під «молодою» рубцевою тканиною розташовувалася щільна волокниста фіброзна тканина, яка за структурою не відрізнялася від фіброзної волокнистої щільної тканини дерми інтактних тварин. Під нею визначався прошарок жирової тканини гіподерми. Рубцева тканина складалася з тонких колагенових волокон і фібробластів, розміщених паралельно поверхні рани. У зоні рубця й оточуючих тканин відмічалися більш виражені ознаки запалення та розладів гемомікроциркуляції у вигляді помірного набряку дерми та наявності в ній лімфогістіоцитарних елементів із домішкою сегментоядерних лейкоцитів. У фіброзній тканині самого рубця кількість кровоносних судин була дуже мала, серед них визначалися судини з редукцією судин, а в глибших відділах дерми розташовувалися функціонуючі судини (рис. 6).

Морфологічне дослідження біоптатів шкіри на 28-му добу експерименту

8-ма підгрупа – післяопераційна рана після висічення скальпелем.

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

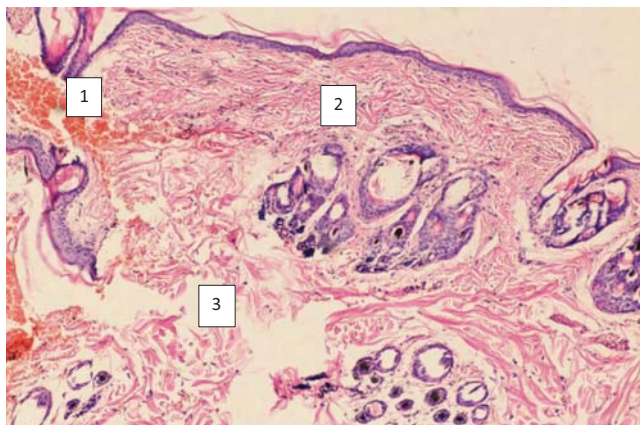


Рис. 1. Друга експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри скальпелем). Патоморфологічні зміни: вогнищеві субепітеліальні та інтрадермальні крововиливи (1); витончення епідермісу (2); набряк, розшарування колагенових волокон дерми (3). Забарвлення гематоксилін та еозин. $\times 100$

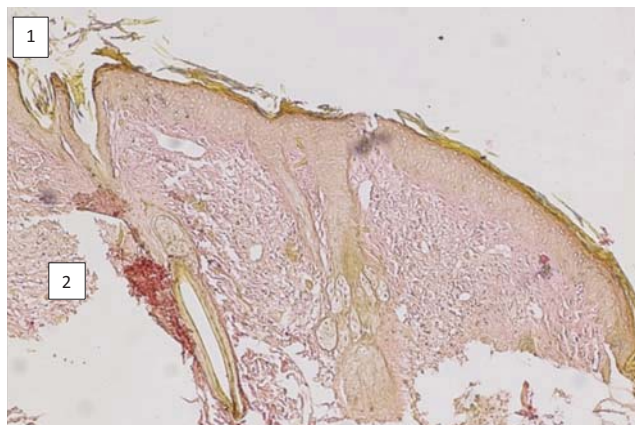


Рис. 2. Третя експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри хірургічним лазером). Патоморфологічні зміни: відшарування, дистрофічні зміни епідермісу в краях рани (1); виражений набряк, розшарування колагенових волокон дерми на великому протязі від країв рани (2). Забарвлення за ван Гізоном. $\times 100$

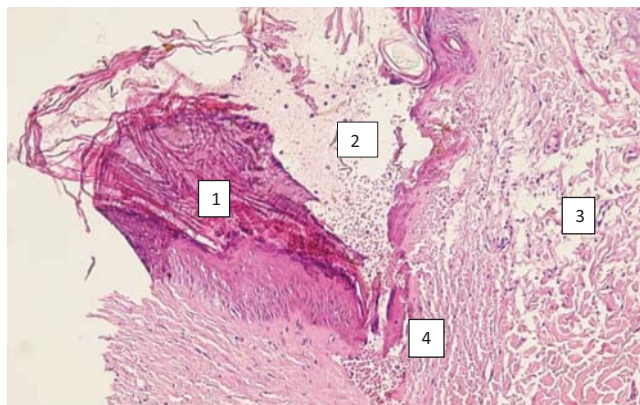


Рис. 3. Четверта експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри монополярним коагулятором). Патоморфологічні зміни: відшарування, дистрофічні та коагуляційні зміни епідермісу в краях рани (1); формування опікового струпа (2); виражений набряк, розшарування колагенових волокон дерми на великому протязі від країв рани (3); субепітеліальний крововилив (4). Забарвлення гематоксилін та еозин. $\times 100$

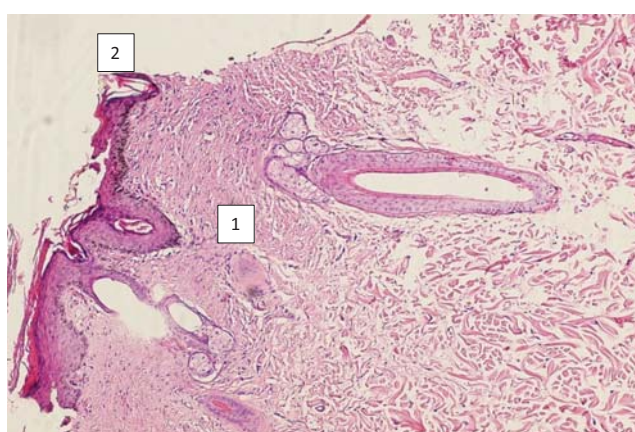


Рис. 4. П'ята експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри скальпелем). Краї рани на 14-ту добу експерименту: рановий дефект заповнений тонким «молодим» сполучнотканинним рубцем (1); повністю епітелізований (2). Забарвлення гематоксилін та еозин. $\times 100$

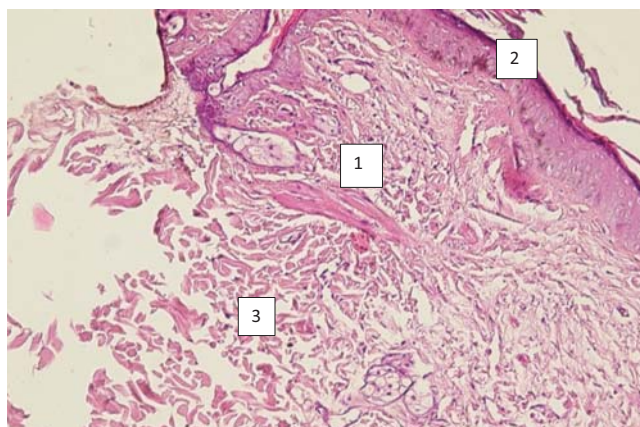


Рис. 5. Шоста експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри хірургічним лазером). Краї рани на 14-ту добу експерименту: рановий дефект заповнений тонким «молодим» сполучнотканинним рубцем (1); повністю епітелізований (2); помірний набряк фіброзної тканини дерми (3). Забарвлення гематоксилін та еозин. $\times 100$

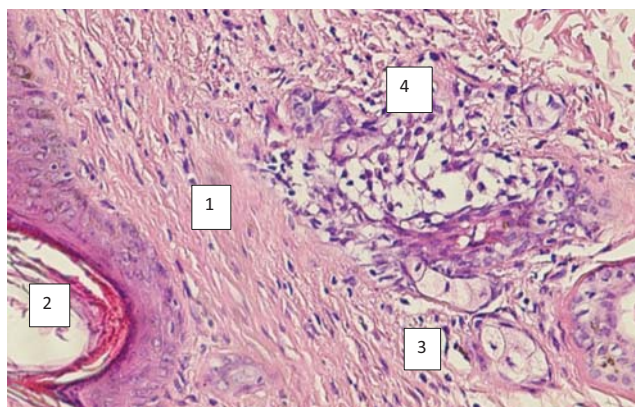


Рис. 6. Сьома експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри монополярним коагулятором). Краї рани на 14-ту добу експерименту: рановий дефект заповнений тонким «клітинним» сполучнотканинним рубцем (1); повністю епітелізований (2); помірний набряк фіброзної тканини дерми (3); помірна лімфогістіоцитарна інфільтрація з домішкою сегментоядерних лейкоцитів (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$

Таблиця 3

Морфометричні показники уражених тканин шкіри експериментальних тварин при первинному висіченні біоптатів

Морфометричний показник уражених тканин шкіри	Підгрупа дослідження				
	2-га	3-тя	p	4-та	p
Відносна площа стромального набряку, %	22,74±0,68	26,12±0,72	<0,05	28,46±0,74	<0,05
Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми, %	13,18±0,34	15,12±0,48	<0,05	16,34±0,51	<0,05
Середній діаметр судин рубцевої тканини та фіброзної тканини дерми, мкм	17,12±0,42	19,24±0,49	<0,05	21,04±0,48	<0,05

Примітка: p – достовірна відмінність порівняно з показниками 2-ї підгрупи.

Таблиця 4

Морфометричні показники уражених тканин шкіри в експериментальних тварин на 14-ту добу експерименту

Морфометричний показник уражених тканин шкіри	Підгрупа дослідження				
	5-та	6-та	p	7-ма	p
Відносна площа стромального набряку, %	17,32±0,44	19,54±0,58	<0,05	21,14±0,52	<0,05
Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми, %	10,04±0,34	9,06±0,34	>0,05	8,46±0,32	<0,05
Середній діаметр судин рубцевої тканини та фіброзної тканини дерми, мкм	15,08±0,36	17,28±0,39	<0,05	18,56±0,42	<0,05

Примітка: p – достовірна відмінність порівняно з показниками 5-ї підгрупи.

На 28-му добу від початку експерименту у тварин 8-ї підгрупи спостерігалось повне загоєння рани. Рановий дефект був заповнений сформованим сполучнотканинним рубцем, повністю епітелізований. Під рубцевою тканиною розташовувалася щільна волокниста фіброзна тканина, яка за структурою не відрізнялася від фіброзної волокнистої щільної тканини дерми інтактних тварин, під якою визначався прошарок гіподерми. Рубцева тканина складалася з тонких колагенових волокон і фібробластів, розташованих паралельно поверхні рани. У зоні рубця й оточуючих тканин зовсім не було ознак запалення та розладів гемомікроциркуляції. У фіброзній тканині самого рубця кількість кровоносних судин була незначна, серед них визначалися редуковані судини, а в глибших відділах дерми розташовувалися функціонуючі судини (рис. 7).

9-та підгрупа – висічення біоптату шкіри хірургічним лазером.

На 28-му добу експерименту у тварин 9-ї підгрупи також відмічалось повне загоєння рани. Рановий дефект був заповнений сформованим сполучнотканинним рубцем, повністю епітелізований. Під рубцевою тканиною розташовувалася щільна волокниста фіброзна тканина, яка за структурою не відрізнялася від фіброзної волокнистої щільної тканини дерми інтактних тварин. Під нею визначався прошарок жирової тканини гіподерми. Рубцева тканина складалася з тонких колагенових волокон і фібробластів, розташованих паралельно поверхні рани. У зоні рубця й оточуючих тканин відмічалися мінімальні ознаки запалення та розладів гемомікроциркуляції у вигляді

незначного набряку та поодиноких лімфогістіоцитарних елементів без домішки сегментоядерних лейкоцитів. У фіброзній тканині самого рубця кількість кровоносних судин була дуже мала, серед них визначалися судини з непрохідним зарослим просвітом, а в глибших шарах дерми розташовувалися функціонуючі судини (рис. 8).

10-та підгрупа – висічення біоптату шкіри монополярним коагулятором.

На 28-му добу від початку експерименту у тварин 10-ї підгрупи на тлі повного загоєння рани рановий дефект був заповнений сформованим грубим сполучнотканинним рубцем, повністю епітелізований дистрофічно зміненим багатошаровим плоским епітелієм. Під рубцевою тканиною розташовувалася щільна волокниста фіброзна тканина, яка за структурою не відрізнялася від фіброзної волокнистої щільної тканини дерми інтактних тварин. Рубцева тканина складалася з тонких колагенових волокон і фібробластів, розташованих паралельно поверхні рани. У зоні рубця й оточуючих тканин відмічалися мінімальні ознаки запалення та розладів гемомікроциркуляції у вигляді незначного набряку та поодиноких лімфогістіоцитарних елементів без домішки сегментоядерних лейкоцитів. У фіброзній тканині самого рубця кількість кровоносних судин була дуже мала, серед них визначалися судини з редукцією просвіту (рис. 9).

Отже, проведені експериментальні дослідження виявили практично однотипні морфологічні зміни в біоптатах шкіри тварин усіх груп в усі терміни дослідження.

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

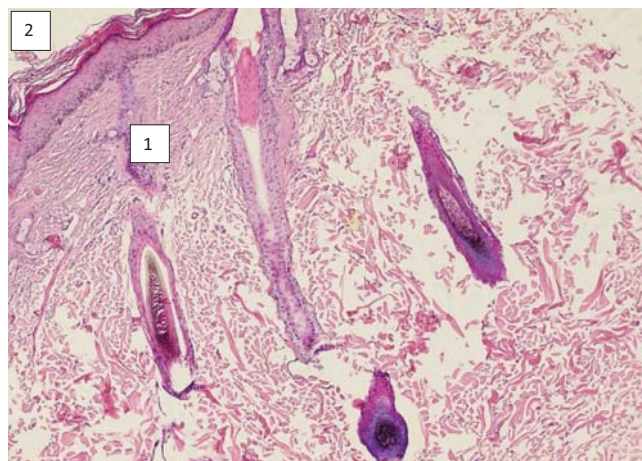


Рис. 7. Восьма експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри скальпелем). Краї рани на 28-му добу експерименту: рановий дефект, заповнений сформованим сполучнотканинним рубцем (1); повністю епітелізований (2). Забарвлення гематоксилін та еозин. $\times 100$

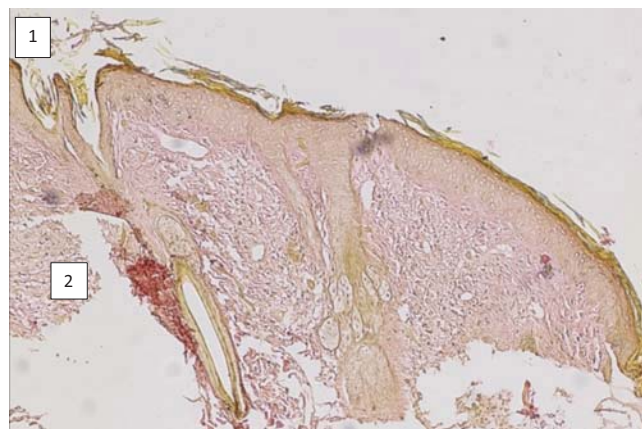


Рис. 9. Десята експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри монополярним коагулятором). Краї рани на 28-му добу експерименту: рановий дефект заповнений сформованим грубим сполучнотканинним рубцем (1); повністю епітелізований (2); помірний набряк фіброзної тканини дерми (3); незначна лімфогістіоцитарна інфільтрація без домішки сегментоядерних лейкоцитів (4). Забарвлення гематоксилін та еозин. $\times 200$

Мінімальні патоморфологічні зміни визначалися в групі тварин, у яких висічення біоптатів шкіри проводили за допомогою скальпеля, а максимальні – за допомогою монополярного коагулятора.

Морфометричні показники біоптатів шкіри в експериментальних тварин різних підгруп дослідження

На остаточному етапі експериментального дослідження вивчали морфометричні показники уражених тканин у тварин різних підгруп.

Для вивчення впливу різних методів висічення біоптатів шкіри вивчали такі морфометричні показники в процесі загоєння біопсійних ран:

- відносна площа стромального набряку;
- відносна площа судин рубцевої тканини та фіброзної тканини дерми;

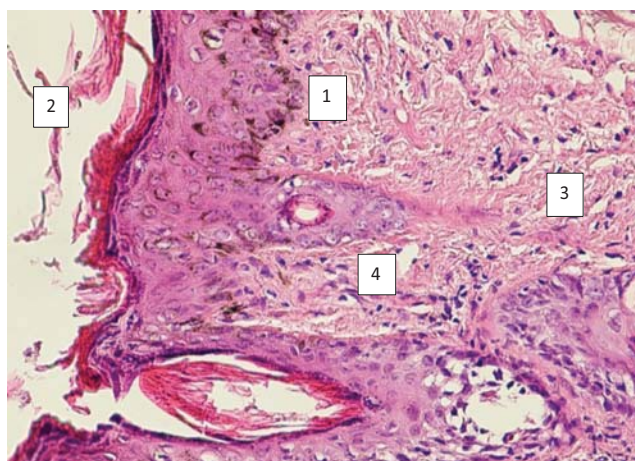


Рис. 8. Дев'ята експериментальна підгрупа (висічення біоптату шкіри хірургічним скальпелем). Краї рани на 28-му добу експерименту: рановий дефект заповнений тонким сформованим сполучнотканинним рубцем (1); повністю епітелізований (2); помірний набряк фіброзної тканини дерми (3); незначна лімфогістіоцитарна інфільтрація без домішки сегментоядерних лейкоцитів (4). Забарвлення гематоксилін та еозин. $\times 400$

- діаметр судин рубцевої тканини та фіброзної тканини дерми;
- кількість судин на 1 мм^2 ;
- щільність запального клітинного інфільтрату (сегментоядерних лейкоцитів, плазматичних клітин, макрофагальних елементів) на 1 мм^2 ;
- кількість фібробластів на 1 мм^2 .

У тварин 2-ї дослідної підгрупи шкіра, взята на дослідження первинно, характеризувалася наявністю волокнистих структур (колагенових волокон) і великої кількості судин малого калібру з набряклим ендотелієм. Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми становила при цьому $13,18 \pm 0,34\%$, а їх середній діаметр – $17,12 \pm 0,42 \text{ мкм}$. Відносна площа стромального набряку дорівнювала $22,74 \pm 0,68\%$, що свідчить про реакцію судин і підвищену проникність їх стінки в ураженій тканині.

Судини дерми були дилатовані, повнокровні, ендотелій – набряклий, відмічався периваскулярний набряк. У деяких судинах спостерігався сладж – феномен еритроцитів, що свідчить про помірні порушення мікрогемоциркуляції в уражених тканинах.

Отже, у 2-й підгрупі експериментальних тварин визначалися ознаки помірної патологічної судинної реакції.

У тварин 3-ї дослідної підгрупи шкіра, взята на дослідження первинно, також характеризувалася наявністю волокнистих структур (колагенових волокон) і великої кількості судин малого калібру з набряклим ендотелієм. Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми становила при цьому $15,12 \pm 0,48\%$, а їх середній діаметр – $19,24 \pm 0,49 \text{ мкм}$.

Таблиця 5

Морфометричні показники уражених тканин шкіри експериментальних тварин на 28-му добу експерименту

Морфометричний показник уражених тканин шкіри	Підгрупа дослідження				
	8-ма	9-та	p	10-та	p
Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми, %	12,04±0,32	13,62±0,35	<0,05	13,98±0,37	<0,05
Середній діаметр судин рубцевої тканини та фіброзної тканини дерми, мкм	11,24±0,52	12,15±0,53	>0,05	12,29±0,54	>0,05

Примітка: p – достовірна відмінність порівняно з показниками 8-ї підгрупи

Відносна площа стромального набряку дорівнювала 26,12±0,72%, що свідчить про більш виражену патологічну реакцію судин та підвищену проникність їх стінки в ураженій тканині.

Судини дерми були дилатовані, повнокровні, ендотелій – набряклий, відмічався периваскулярний набряк. У більшості судин спостерігався сладж – феномен еритроцитів, що свідчить про виразні порушення мікрогемоциркуляції в уражених тканинах.

У тварин 4-ї дослідної підгрупи шкіра, взята на дослідження первинно, характеризувалася наявністю волокнистих структур (колагенових волокон) і великої кількості судин малого калібру з набряклим ендотелієм. Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми становила при цьому 16,34±0,51%, а їх середній діаметр – 21,04±0,48 мкм. Відносна площа стромального набряку дорівнювала 28,46±0,74%, що свідчить про виражену патологічну реакцію судин та підвищену проникність їх стінки в ураженій тканині.

Судини дерми були дилатовані, повнокровні, ендотелій – набряклий, відмічався значний периваскулярний набряк. У більшості судин спостерігався сладж – феномен еритроцитів, що засвідчує виразні порушення мікроциркуляції (табл. 3).

У 5-й експериментальній підгрупі тварин на 14-ту добу визначалася значно краща динаміка морфометричних показників. Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми становила 10,04±0,34%, а їх середній діаметр – 15,08±0,36 мкм. Відносна площа стромального набряку дорівнювала 17,32±0,44%, що є свідченням зменшення патологічної реакції судин зі зниженням проникності їх стінки в ураженій тканині. Судини дерми були нормального діаметру, дещо повнокровні, ендотелій не змінений, відмічався незначний периваскулярний набряк. Ці зміни в судинах свідчать про незначні порушення мікрогемоциркуляції в уражених тканинах. Відносна площа русла судин молоді рубцевої тканини складала 13,78±0,62%, а їх середній діаметр – 12,36±0,34 мкм, що свідчить про редукцію судин у зоні формування рубця. Відносна площа стромального набряку дорівнювала 14,15±0,28%. Кількість молодих фібробластів – 36 на 1 мм².

Отже, в 5-й підгрупі експериментальних тварин у біоптатах шкіри на 14-ту добу визначалося формування молодого рубця з великою кількістю молодих форм фібробластів, спостерігалася незначна патологічна судинна реакція.

У 6-й експериментальній підгрупі тварин на 14-ту добу визначалася дещо гірша динаміка морфометричних показників. Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми становила 9,06±0,34%, а їх середній діаметр – 17,28±0,39 мкм. Відносна площа стромального набряку дорівнювала 19,54±0,58%, що є свідченням більш виразної патологічної реакції судин із підвищенням проникності їх стінки в ураженій тканині. Судини дерми мали більший діаметр за рахунок дилатації та повнокров'я, ендотелій дещо набряклий, відмічався помірний периваскулярний набряк. Ці зміни в судинах свідчать про помірні порушення мікрогемоциркуляції в уражених тканинах. Відносна площа русла судин молоді рубцевої тканини складала 14,12±0,64%, а їх середній діаметр – 14,06±0,37 мкм, що свідчить про неповну редукцію судин у зоні формування рубця. Відносна площа стромального набряку дорівнювала 17,11±0,29%. Кількість молодих фібробластів – 24 на 1 мм².

Отже, у 6-й підгрупі експериментальних тварин в уражених тканинах на 14-ту добу визначалося формування молодого рубця з помірною кількістю молодих форм фібробластів, спостерігалася помірна патологічна судинна реакція.

У 7-й підгрупі експериментальних тварин на 14-ту добу визначалася значно гірша динаміка морфометричних показників порівняно з 6-ю підгрупою. Відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми становила 8,46±0,32%, а їх середній діаметр – 18,56±0,42 мкм. Відносна площа стромального набряку дорівнювала 21,14±0,52%, що є свідченням більш вираженої патологічної реакції судин із підвищенням проникності їх стінки в ураженій тканині. Судини дерми були більшого діаметру, дещо повнокровні, ендотелій дещо набряклий, відмічався помірний периваскулярний набряк. Ці зміни в судинах свідчать про помірні порушення мікрогемоциркуляції в уражених

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

тканинах. Відносна площа русла судин молодого рубцевої тканини складала $15,21 \pm 0,57\%$, а їх середній діаметр – $13,34 \pm 0,36$ мкм, що є свідченням неповної редукції судин у зоні формування рубця. Відносна площа стромального набряку дорівнювала $15,02 \pm 0,24\%$. Кількість молодих фіброblastів – 17 на 1 мм^2 .

Отже, у 7-й підгрупі хворих в уражених тканинах на 14-ту добу визначалося сповільнене формування молодого рубця з невеликою кількістю молодих форм фіброblastів на тлі помірної патологічної судинної реакції (табл. 4).

В експериментальних тварин 8-ї підгрупи на 28-му добу експерименту під час вивчення гістологічних препаратів шкіри встановлено, що патологічна судинна реакція була відсутня, про що свідчило зникнення периваскулярного та стромального набряку. Діаметр судин дерми в середньому становив $11,24 \pm 0,52$ мкм, їх відносна площа – $12,04 \pm 0,32\%$. Судинне русло також було представлене судинами дрібного калібру (капілярами, венулами, артеріолами), у зоні рубця судини були редуковані. Рубець був представлений паралельно орієнтованими волокнистими структурами – колагеновими волокнами.

У тварин 9-ї експериментальної підгрупи на 28-му добу під час вивчення гістологічних препаратів шкіри встановлено, що відмічалася незначна патологічна судинна реакція, про що свідчила наявність незначного периваскулярного та стромального набряку. Діаметр судин дерми становив $12,15 \pm 0,53$ мкм, їх відносна площа – $13,62 \pm 0,35\%$. Судинне русло також було представлене судинами дрібного калібру (капілярами, венулами, артеріолами), у зоні рубця майже всі судини були редуковані. Рубець був представлений паралельно орієнтованими волокнистими структурами – колагеновими волокнами.

У тварин 10-ї експериментальної підгрупи на 28-му добу експерименту під час вивчення гістологічних препаратів шкіри встановлено, що спостерігалася більш виражена патологічна судинна реакція, про що свідчила наявність незначного периваскулярного та стромального набряку. Діаметр судин дерми становив $12,29 \pm 0,54$ мкм, їх відносна площа – $13,98 \pm 0,37\%$. Судинне русло також було представлене судинами дрібного калібру (капілярами, венулами, артеріолами), у зоні рубця майже всі судини були редуковані. Рубець був представлений паралельно орієнтованими волокнистими структурами – колагеновими волокнами (табл. 5).

Підводячи підсумок експериментального дослідження, слід зауважити, що максимально виражені

морфологічні та морфометричні зміни в тканинах біоптатів шкіри в усі терміни дослідження визначались у III експериментальній групі тварин, а мінімальні – у I групі.

Важливим підтвердженням цього є нормалізація динаміки морфометричних показників уражених тканин біоптатів шкіри в процесі дослідження: відносна площа русла судин фіброзної тканини дерми між 2 і 8-ю підгрупами – відповідно $13,18 \pm 0,34\%$ проти $12,04 \pm 0,32\%$ ($p > 0,05$); між 3 і 9-ю підгрупами – відповідно $15,12 \pm 0,48\%$ проти $13,62 \pm 0,35\%$ ($p > 0,05$); між 4 і 10-ю підгрупами – відповідно $16,34 \pm 0,51\%$ проти $13,98 \pm 0,37\%$ ($p < 0,05$); середній діаметр судин рубцевої тканини та фіброзної тканини дерми між 2 і 8-ю підгрупами – відповідно $17,12 \pm 0,42$ мкм ($p < 0,05$); між 3 і 9-ю підгрупами – відповідно $19,24 \pm 0,49$ мкм проти $12,15 \pm 0,53$ мкм ($p < 0,05$); між 4 і 10-ю підгрупами – відповідно $21,04 \pm 0,48$ мкм проти $12,29 \pm 0,54$ мкм ($p < 0,05$).

Зазначена динаміка змін судинних показників біоптатів шкіри в досліджуваних підгрупах характеризувалася відсутністю у 8-й експериментальній підгрупі та різким зниженням патологічної судинної реакції у вигляді периваскулярного і стромального набряку в 9 і 10-й експериментальних підгрупах тварин.

Порівняльний аналіз динаміки зниження судинних показників у перебігу процесу відновлення цілісності операційної ділянки, серед усіх підгруп порівняння, показав в усіх випадках на 28-му добу експерименту зниження рівня величин нижче за рівні при первинній біопсії: відносно площі русла судин фіброзної тканини дерми між 2 і 8-ю підгрупами – в 1,09 раза, або на 8,75%, між 3 і 9-ю підгрупами – в 1,11 раза, або на 9,92%, між 4 і 10-ю підгрупами – в 1,17 раза, або на 14,46%, і середнього діаметру судин рубцевої тканини та фіброзної тканини між 2 і 8-ю підгрупами – в 1,52 раза, або на 34,55%, між 3 і 9-ю підгрупами – в 1,58 раза, або на 36,85%, між 4 і 10-ю підгрупами – в 1,71 раза, або на 41,59%.

Подібна динаміка морфометричних показників досліджуваних біоптатів шкіри свідчить про їх схильність до нормалізації на момент формування рубцевої тканини в ділянці післяопераційної рани.

Слід зазначити, що мінімальні морфометричні зміни ураження тканини в біоптатах шкіри експериментальних тварин відмічалися на всіх етапах дослідження в групі тварин, у яких висічення тканин проводили за допомогою скальпеля, а максимальні патоморфологічні зміни – при біопсії за допомогою монополярного коагулятора.

Висновки

Проведені морфологічні та морфометричні дослідження біоптатів шкіри експериментальних тварин при різних методах висічення переконливо засвідчили, що на всіх етапах експерименту мінімальні ураження тканин відмічалися в групі тварин, у яких висічення проводили за допомогою скальпеля, а максимальні патоморфологічні зміни – при біопсії за допомогою монополярного коагулятора. Зокрема, спостерігалася відсутність у 8-й експериментальній підгрупі та різке зниження патологічної судинної реакції у вигляді периваскулярного і стромального набряку у 9 і 10-й підгрупах тварин, нормалізація динаміки змін судинних показників, у тому числі відносної площі русла судин фіброзної тканини дерми, у 2 і 4-й підгрупах – відповідно $13,18 \pm 0,34\%$ проти $16,34 \pm 0,51\%$ ($p < 0,05$); у 5 і 7-й підгрупах – відповідно $17,32 \pm 0,44\%$ проти $21,14 \pm 0,52\%$ ($p < 0,05$); у 8 і 10-й підгрупах – відповідно $12,04 \pm 0,32\%$ проти $13,98 \pm 0,37\%$ ($p < 0,05$); середнього діаметру судин рубцевої тканини та фіброзної тканини дерми у 2 і 4-й підгрупах – відповідно $17,12 \pm 0,42$ мкм проти $21,04 \pm 0,48$ мкм ($p < 0,05$); у 5 і 7-й підгрупах – відповідно $10,04 \pm 0,34$ мкм проти $8,46 \pm 0,32$ мкм ($p < 0,05$); у 8 і 10-й підгрупах – відповідно $11,24 \pm 0,52$ мкм проти $12,29 \pm 0,54$ мкм ($p > 0,05$), що свідчить про зменшення негативного впливу морфологічних факторів на можливе поширення патологічного процесу.

Отримані в усі терміни експериментальних досліджень на морських свинках дані щодо більшої виразності негативного впливу саме енергетичних факторів порівняно з механічним фактором на стан і склад шкіри тварин, у краях і дні рани, за умови того, що в нормі за своєю морфологічною будовою вона дуже близька до структури шкіри людини, дають змогу екстраполювати ці результати на вибір оптимальної методики лікування пігментних невісів шкіри в дітей.

Відомості про авторів:

Пасічник Олег Вадимович – асистент каф. дитячої хірургії Вінницького НМУ імені М. І. Пирогова. Адреса: м. Вінниця, вул. Пирогова, 56. <https://orcid.org/0000-0001-8302-3520>.

Коноплицький Віктор Сергійович – д.мед.н., проф., зав. каф. дитячої хірургії Вінницького НМУ імені М. І. Пирогова. Адреса: м. Вінниця, вул. Пирогова, 56. <https://orcid.org/0000-0001-9525-1547>.

Коробко Юрій Євгенович – аспірант каф. дитячої хірургії Вінницького НМУ імені М. І. Пирогова. Адреса: м. Вінниця, вул. Пирогова, 56. <https://orcid.org/0000-0001-9525-1525>.

Стаття надійшла до редакції 18.08.2021 р., прийнята до друку 8.12.2021 р.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

References/Література

1. Berg-Knudsen TB, Ingvaldsen CA, Mørk G, Tønseth KA. (2020). Excision of skin lesions. Tidsskrift for Den norske legeförening. 140: 10–30.
2. Cengiz FP, Yilmaz Y, Emiroglu N, Onsun N. (2019). Dermoscopic Evolution of Pediatric Nevi. Annals of Dermatology. 31 (5): 518–524.
3. Cuevas RG, Villani A, Apalla Z, Kyrgidis A, Bagolini LP, Papageorgiou C, Lallas A. (2021). Dermoscopic predictors of melanoma arising in small-and medium-sized congenital nevi. Journal of the American Academy of Dermatology. 84 (6): 1703–1705.
4. Elçin G, Yıldırım SK, Gököz Ö, Günaydin SD, Bozdoğan Ö, Kittler H. (2020). A challenging diagnosis: Recurrent nevus or melanoma. TURKDERM-Turkish Archives of Dermatology and Venereology. 54 (2): 62–65.
5. Hong KT, Lim JM, Lee SE. (2017). A Treatment of Medium-to-Giant Congenital Melanocytic Nevi with Combined Er: YAG Laser and Long-Pulsed Alexandrite Laser. Medical Lasers. 6 (2): 77–85.
6. Maghari A. (2016). Recurrence of dysplastic nevi is strongly associated with extension of the lesions to the lateral margins and into the deep margins through the hair follicles in the original shave removal specimens. Dermatology research and practice.
7. Mutti LDA, Mascarenhas MRM, Paiva JMGL, Golcman R, Enokihara MY, Golcman B. (2017). Giant congenital melanocytic nevi: 40 years of experience with the serial excision technique. Anais brasileiros de dermatologia. 92: 256–259.
8. Oliveria SA, Satagopan JM, Geller AC, Dusza SW, Weinstock MA, Berwick M, Halpern AC. (2009). Study of Nevi in Children (SONIC): baseline findings and predictors of nevus count. American journal of epidemiology. 169 (1): 41–53.
9. Rorck JF, Hawryluk EB, Liang MG. (2012). Literature update on Melanocytic Nevi and pigmented lesions in the pediatric population. Current Dermatology Reports. 1 (4): 195–202.
10. Soares AS, Manzoni APD, de Souza CDA, Weber MB, Watanabe T, Camini L. (2016). Comparative analysis between sutured elliptical excision and shaving of intradermal melanocytic nevi: a Randomized Clinical Trial.
11. Topaz M, Gurevich M, Ashkenazi I. (2020). Simplified management of a giant forehead congenital nevus allows for early reconstruction. BMJ Case Reports CP. 13 (7): e234164.
12. Zhang LY, Zhang MX, Chen CY, Fang QQ, Ding SL, Xu JH, Tan WQ. (2018). Aesthetic removal of large melanocytic nevi using CO2 lasers with a programmed 4-step approach. International journal of clinical and experimental medicine. 11 (6): 6309–6315.